



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ Starch microsphere as a carriers for α -amylase inhibitor

โดย

ผศ.ดร.สันทณีย์ ปัญจอาหนด

เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ Starch microsphere as a carriers for α -amylase inhibitor

ผู้วิจัย สันทณีย์ ปัญจอนนท์
สังกัด สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี
คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5680004
 ชื่อโครงการ: Starch microsphere as a carrier for α -amylase inhibitor
 ชื่อนักวิจัย: สันทณีย์ ปัญจอนนท์
 สังกัด สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
 E-mail Address : santhanee.pun@kmutt.ac.th
 ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการเตรียม starch microsphere (SM) สมบัติของ SM (ระดับการเกิดครอสลิงค์ ลักษณะทางกายภาพ ขนาดของอนุภาค โครงสร้างผลึก สมบัติทางความร้อน และความคงทนต่ออุณหภูมิ pH และการย่อยด้วยเอนไซม์ α -amylase) และการนำ SM ไปใช้เป็นตัวพาสารยับยั้งเอนไซม์ α -amylase โดยเตรียม SM ด้วยวิธี water-in-water emulsion-crosslinking ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °C ระยะเวลา 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่า SM ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 30 °C มีระดับการเกิดครอสลิงค์สูงกว่าที่ 4 °C โดยที่อุณหภูมิ 4 °C ระยะเวลาน้อยกว่า 12 ชั่วโมง SM มีขนาดใหญ่และมีรูพรุนมากกว่าที่ 30 °C แต่ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง SM จากทั้งสองอุณหภูมิมีลักษณะใกล้เคียงกัน SM ที่เตรียมได้จากทุกสภาวะมีโครงสร้างแบบอสัณฐาน สามารถทนต่อความเป็นกรดได้ดีมากและทนต่อด่างได้ดี ส่วนความสามารถในการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ α -amylase จะขึ้นกับอุณหภูมิและระยะเวลาการเตรียม เมื่อนำ SM ที่อุณหภูมิ 4 °C ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มาทำการดูดซับโปรตีน α -amylase inhibitors ที่สกัดได้จากพืช 5 ชนิด ได้แก่ ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวเจ้า และถั่วขาว (มีกิจกรรมของ α -amylase อยู่ระหว่าง 0.8-1.42 Unit/mg protein และกิจกรรมของ α -amylase inhibitor อยู่ระหว่าง 0.01-0.38 Unit/mg protein) และวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การดูดซับและการยับยั้งเอนไซม์ พบว่า SM สามารถดูดซับสารละลายโปรตีนได้แต่ไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์ α -amylase และเมื่อทำการทดสอบการดูดซับสาร acarbose ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้ง α -amylase ได้เช่นเดียวกัน พบว่า SM ที่มีการดูดซับสาร acarbose ไปพร้อมกับการเตรียมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ α -amylase มากกว่าการเตรียม SM และนำ SM มาดูดซับ acarbose ภายหลัง

คำหลัก : แป้งมันสำปะหลัง, สตาร์ชไมโครสเฟียร์, ครอสลิงค์อิมัลชัน, สารยับยั้งเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลส

Abstract

Project Code : TRG5680004
Project Title : Starch microsphere as a carrier for α -amylase inhibitor
Investigator : Santhanee Puncha-arnon
Division of Biochemical Technology
School of Bioresources and Technology
E-mail Address : santhanee.pun@kmutt.ac.th
Project Period : 2 years

The aims of this research are to prepare and characterize the starch microspheres (SMs) and to study the effectiveness of SMs as a carrier for α -amylase inhibitor. The SMs were prepared by a water-in-water emulsion-crosslinking technique at 4 and 30 °C for 1, 6, 12 and 24 h and were analyzed for crosslinking density, morphology, particle size distribution, crystalline structure, thermal properties, x-ray diffraction pattern and stability against temperature, pH, and α -amylase hydrolysis. The crosslinking degree at 30 °C was considerably higher than that at 4 °C. SMs prepared at 4 °C for less than 12 h incubation had larger size and more porous structure as compared with those prepared at 30 °C, but the morphology became comparable after 24 h incubation. All SMs displayed amorphous structure. Stability tests revealed that the SMs were very stable under acidic and mild basic pH; however, stability against α -amylase hydrolysis varied depending on incubation temperature and time. The SMs prepared at 4 °C for 24 h were further used for the adsorption of α -amylase inhibitors proteins extracted from wheat, barley, sorghum, rice and white bean (specific α -amylase activity and α -amylase inhibitor activity are 0.8-1.42 Unit/mg protein and 0.01-0.38 Unit/mg protein, respectively). The data of percentage of protein adsorption and α -amylase inhibition analyses have shown that SMs could adsorb the proteins but no α -amylase inhibition activity was found. The adsorption of acarbose, a well-known synthetic α -amylase inhibitor, was also carried out. It was found that the adsorption during the SMs formation were more efficient means to inhibit α -amylase than the adsorption after SMs formation.

Keywords: cassava, starch microsphere, crosslink emulsion, α -amylase inhibitor

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ดุชนิ อุดมภาพ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้แนวคิดและคำแนะนำในการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนแก้ปัญหาต่างๆ ทั้งยังช่วยเหลืออนุเคราะห์ตำราและเอกสารทางวิชาการอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัย และขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ช่วยเหลือเงินทุนในการวิจัยครั้งนี้ให้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ผลเป็นอย่างดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
รายการตาราง	ช
รายการรูปประกอบ	ซ
บทที่	หน้า
1. บทนำ	
1.1 ปัญหาและที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
2. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 การเตรียม starch microsphere ด้วยวิธี water in water emulsion	6
2.2 คุณสมบัติการย่อยสลาย starch microsphere	7
2.3 การประยุกต์ใช้ starch microsphere เพื่อเป็น carrier	8
2.4 α -Amylase inhibitor	8
3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 วัสดุดิบในการทดลอง	12
3.2 อุปกรณ์ในการทดลอง	12
3.3 การเตรียม hydrolyzed cassava starch	12
3.4 การเตรียม starch microspheres	12
3.5 การวิเคราะห์คุณลักษณะและสมบัติของ starch microsphere	13
3.5.1 ระดับการเกิด crosslink	13
3.5.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ starch microsphere	13
3.5.3 ขนาดของ starch microsphere	14

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3.5.4 กำลังการพองตัวและการละลาย	14
3.5.5 การทนต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์	14
3.5.6 การทนต่อสภาวะกรดและด่าง	14
3.5.7 คุณสมบัติทางความร้อน	15
3.5.8 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชัน	15
3.5.9 โครงสร้างผลึก	15
3.6 การเตรียมสารสกัดจากพืช	15
3.7 การวิเคราะห์สมบัติของสารสกัดจากพืช	16
3.7.1 ปริมาณโปรตีน	16
3.7.2 เปอร์เซนต์การยับยั้งเอนไซม์ α -amylase	16
3.7.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการดูดซับสารโปรตีนของ starch microsphere	16
3.7.4 ความสามารถในการถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ α -amylase ของ starch microsphere ที่ดูดซับสาร acarbose	17
4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
4.1 การศึกษาคุณสมบัติของ starch microsphere	18
4.1.1 ระดับการเกิด crosslink	18
4.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ starch microsphere	19
4.1.3 ขนาดของ starch microsphere	24
4.1.4 คุณสมบัติทางความร้อน	24
4.1.5 โครงสร้างผลึก	26
4.1.6 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชัน	27
4.1.7 กำลังการพองตัวและการละลาย	28
4.1.8 ความคงทนต่อกรดและด่าง	30
4.1.9 ความคงทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ α -amylase	32
4.2 การศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดจากพืช	34
4.2.1 การศึกษาสารสกัด α -amylase inhibitor จากพืช	34
4.2.2 ศึกษาการดูดซับสารสกัดด้วย starch microsphere	34
4.2.3 ศึกษาการทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ α -amylase ของ starch microsphere ที่ดูดซับด้วยสารสกัดทั้ง 5 ชนิด	36

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4.2.4 ความสามารถในการถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ α -amylase ของ starch microsphere ที่ดูดซับสาร acarbose	37
5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	
5.1 บทสรุป	39
5.2 ข้อเสนอแนะ	39
เอกสารอ้างอิง	41
ภาคผนวก	46

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. Activity ของ amylase inhibitors ที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ และความสามารถในการยับยั้ง α -amylase ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและแมลง	9
2. คุณสมบัติทางความร้อนของแป้งมันสำปะหลังและ starch microsphere ที่เตรียมที่ อุณหภูมิ 4 และ 30 °C ระยะเวลา 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง	26
3. Protein content, specific amylase activity, total amylase inhibitor activity, specific amylase inhibitor activity และ %inhibition ของสารสกัดจากข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวเจ้า และถั่วขาว	34
4. ค่าการดูดซับสารสกัดโปรตีนปริมาณ 1 และ 10 mg ด้วย starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 4 °C ระยะเวลา 24 ชั่วโมง	35

รายการรูปประกอบ

รูปที่	หน้า
1. ระดับการเกิด crosslink ของ starch microsphere ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °C และระยะเวลาการเตรียม 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ที่ได้จากการดูดซับด้วย methylene blue	18
2. ลักษณะของ starch microsphere ที่ย้อมสีด้วยไอโอดีน ถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า	20
3. ลักษณะของ starch microsphere ที่ถ่ายภาพจากกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 1000 เท่า	21
4. ลักษณะภายในของ starch microsphere ที่ถูกผ่าครึ่งถ่ายภาพจากกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 5000 เท่า	23
5. ลักษณะการกระจายตัวของขนาดเม็ด starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °C ที่เวลา 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง	25
6. ลักษณะโครงสร้างผลึกของแป้งมันสำปะหลังและ starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °C เวลา 1 และ 24 ชั่วโมง	27
7. ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของแป้งมันสำปะหลังและ starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °C เวลา 1 และ 24 ชั่วโมง	28
8. กำลังการพองตัวของ native cassava starch และ starch microsphere ที่อุณหภูมิต่างๆ	29
9. ค่าการละลายของ starch microsphere ที่อุณหภูมิต่างๆ	30
10. ความคงทนต่อสภาวะกรด pH 2.0 ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ของ native cassava starch และ starch microsphere	31
11. ความคงทนต่อสภาวะด่าง pH 8.0 ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ของ native cassava starch และ starch microsphere	32
12. ความสามารถในการย่อยด้วยเอนไซม์ α -amylase ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง	33
13. ความสามารถในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ α -amylase ของ starch microsphere ที่เตรียมที่ 4 °C เวลา 24 ชั่วโมง ที่ดูดซับสาร acarbose ความเข้มข้น 1 และ 10 mg ภายหลังการเตรียม starch microsphere เปรียบเทียบกับการย่อย starch microsphere ที่ไม่ผ่านการดูดซับสาร acarbose	37
14. ความสามารถในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ α -amylase ของ starch microsphere ที่เตรียมที่ 4 และ 30 °C เวลา 24 ชั่วโมง ที่เตรียมโดยบรรจุสาร acarbose ความเข้มข้น 1 และ 10 mg พร้อมกับการเตรียม starch microsphere เปรียบเทียบกับการย่อย starch microsphere ที่ไม่ผ่านการดูดซับสาร acarbose	38

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ปัญหาและที่มาของงานวิจัย

แป้งเป็นผลิตภัณฑ์หลักของการผลิตทางการเกษตรที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม จัดเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลายเนื่องจากปลอดภัยและมีราคาถูก มีการนำมาประยุกต์ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการเตรียมเป็น microsphere สำหรับการใช้งานทางด้านอาหารและยา ซึ่ง starch microsphere หมายความว่า อนุภาคทรงกลมที่ทำจากแป้ง มีขนาดตั้งแต่ 1 ถึง 1,000 ไมโครเมตร ซึ่งส่วนใหญ่จะมีรูปร่างเป็นทรงกลมหรือใกล้เคียงทรงกลม และมีโครงสร้างภายในเหมือนกัน เกิดจากการทำให้โครงสร้างของเม็ดแป้งกระจายตัวและเกิดการเหนียวทำให้เกิดโครงสร้างใหม่ โดยมีความหนาแน่นและขนาดของรูพรุนขนาดเล็ก starch microsphere เกิดขึ้นได้จากการจับกันของสายโซ่พอลิเมอร์และเพิ่มความแข็งแรงให้กับโครงสร้างด้วยพันธะ crosslink

เนื่องด้วยลักษณะรูปร่างและโครงสร้างของ starch microsphere รวมถึงสมบัติของแป้งที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพและมีราคาถูก จึงทำให้มีความสนใจกันมากในการใช้สตาร์ชไมโครสเฟียร์เพื่อเป็นตัวพา (carrier) ยาและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive substance) โดยเฉพาะสารในกลุ่มโปรตีน สารอาหารเพื่อสุขภาพ เช่น วิตามิน โปรไบโอติกไบโอแอคทีฟ เปปไทด์ สารต้านอนุมูลอิสระ สารให้กลิ่นรส และสารเคมีทางการเกษตร โดยใช้เทคนิคการเตรียมที่เหมาะสมทำให้สามารถควบคุมการปลดปล่อยสาร (controlled release) ออกจากสตาร์ชไมโครสเฟียร์ได้ตามต้องการ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาการใช้สตาร์ชไมโครสเฟียร์ในการดูดซับไอออนของโลหะหนักที่เป็นอันตรายจากน้ำเสียในอุตสาหกรรมกระดาษและสิ่งทอ (Miao และ Wang, 2011) ตัวอย่างการนำสตาร์ชไมโครสเฟียร์มาใช้ในการนำส่งยา ได้แก่ ยาที่ให้ผ่านทางจมูก (nasal delivery) เช่น อินซูลิน นิโคติน เจนตาไมซิน โดยสตาร์ชไมโครสเฟียร์จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมตัวยาผ่านเมมเบรนของเซลล์เยื่อบุโพรงจมูก (Björk และคณะ, 1991; Illum และคณะ, 2001) เป็นต้น การเตรียม starch microsphere สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตกตะกอน, solvent-evaporation, spray-drying และ emulsion techniques (Jafari และคณะ, 2008; Li และคณะ, 2009a; Li และคณะ, 2009b; Ma และคณะ, 2011)

Emulsion technique เป็นวิธีหนึ่งที่ยิยมใช้ในการเตรียม starch microsphere (Elfstrand และคณะ, 2009; Li และคณะ, 2009a; Seki และคณะ, 2007) ซึ่งในอดีตการเตรียม starch microsphere โดยวิธี emulsion เป็นการผสมสารละลาย 2 ประเภท คือ สารละลายอินทรีย์ (organic phase) และสารละลายในน้ำ (aqueous phase) เข้าด้วยกัน (water in oil; w/o) (Kim และ Lee, 1992; Lu และ Park, 1995) ซึ่งเป็นระบบที่มีการศึกษาและใช้กันมานานเนื่องจากทำให้เกิดอิมัลชันได้ง่าย ตัวอย่างของสารละลายอินทรีย์ ได้แก่ cyclohexane (Hamdi และคณะ, 1998), toluene และ chloroform (Stertman และคณะ, 2006), paraffin liquid (Fang และคณะ, 2008) อย่างไรก็ตามสารละลายอินทรีย์ที่ใช้อาจส่งผลกระทบต่อสมบัติของสารที่จะนำส่งได้ เช่น โปรตีน

อาจมีการเปลี่ยนสภาพได้ในสารละลายอินทรีย์ (Manning และคณะ, 2010) และสารละลายอินทรีย์ที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์อาจเป็นพิษต่อผู้บริโภค ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารละลายอินทรีย์จึงได้มีการพัฒนาวิธีการเตรียม starch microsphere โดยใช้ระบบอิมัลชันของสารละลายโพลีเมอร์ในน้ำ 2 ชนิด (water in water; w/w) ที่สามารถแยกเฟสออกจากกันได้เมื่อนำมาผสมกัน (aqueous two-polymer system) (Franssen และ Hennink, 1998) โดยเฟสแรกเป็นสารละลายของแป้งในน้ำ และเฟสที่สองส่วนใหญ่จะใช้สารละลายของโพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol; PVA) โพลีไวนิลไพโรลิโดน (polyvinylpyrrolidone; PVP) หรือ เจลาติน (gelatin) ในน้ำ เมื่อนำมาผสมกันและใช้แรงกระทำให้เกิดสภาพอิมัลชัน จะได้อิมัลชันของสารละลายแป้ง (dispersed phase) กระจายในสารละลาย PEG (continuous phase) และอาจใช้ปฏิกิริยาครอสลิงก์ร่วมด้วยเพื่อให้ได้สตาร์ชไมโครสเฟียร์ที่มีความแข็งแรงมากขึ้น สารที่ใช้ในการครอสลิงก์ เช่น epichlorohydrin, glutaraldehyde, formaldehyde (Atyabi และคณะ, 2006), trisodiumtrimeta phosphate (Li และคณะ, 2009a)

Li และคณะ (2009b) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อ starch microsphere ไว้ทั้งหมด 7 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของสารละลายแป้ง (0.22 และ 0.25 g/g), ความเข้มข้นของ crosslinking agent (0.015 และ 0.02 g/g) ขนาดโมเลกุลของ PEG ที่ใช้เป็น continuous phase (10,000 และ 20,000 g/mol) ความเข้มข้นของ PEG (0.25 และ 0.30 g/g) สัดส่วนระหว่างสารละลายแป้งที่เป็น dispersed phase ต่อสารละลาย PEG ที่เป็น continuous phase (10:100 และ 15:95 mL/mL) ความเร็วรอบการกวน (250 และ 400 rpm) และระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยา crosslink (8 และ 12 h) พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายแป้งและสัดส่วนระหว่างสารละลายแป้งต่อสารละลาย PEG มีผล ทำให้ได้ starch microsphere ขนาดใหญ่ขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่เมื่อเพิ่มขนาดโมเลกุลของ PEG และความเข้มข้นของสารละลาย PEG ทำให้ขนาดของ starch microsphere เล็กลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนั้นในปีเดียวกัน Li และคณะ (2009a) ได้ศึกษาความเข้มข้นของ crosslinking agent ที่ความเข้มข้น 0.1-0.4 g/สารละลายแป้ง พบว่าที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นค่า crosslink density จะเพิ่มขึ้น แต่ค่า swelling degree ของ starch microsphere ลดลง ซึ่งต่อมาในปี 2012 ได้รายงานว่าขนาดโมเลกุลของ PEG ความเข้มข้นของ PEG ความเข้มข้นของ crosslinking agent และระยะเวลาการ crosslink มีผลต่อ yield และ crosslink density (Li และคณะ, 2012) อย่างไรก็ตามนอกจากปัจจัยที่ถูกศึกษาดังกล่าวแล้ว อุณหภูมิในการเตรียมก็เป็นเรื่องสำคัญ แม้ว่าในอดีต Seki และคณะ (2007) ได้ศึกษาถึงอุณหภูมิการเตรียมตั้งแต่ 20-60°C ต่อขนาดของ starch microsphere พบว่า ขนาดของ microsphere ขึ้นกับอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา แต่ช่วงอุณหภูมิดังกล่าวก็ยังไม่ใช่วงอุณหภูมิที่ครอบคลุมถึงการใช้งานทั้งหมด เช่น ในกรณีที่จะเอาไปใช้กับการเตรียมร่วมกับเอ็นไซม์ที่อุณหภูมิต่ำๆ

สารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase (α -amylase inhibitors; α Als) เป็นสารที่ช่วยลดการย่อยสลายแป้งด้วยเอนไซม์ α -amylase มีประโยชน์ช่วยลดการดูดซึมของน้ำตาลในร่างกาย สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่ไม่ใช่โปรตีน (nonproteinaceous inhibitors) และชนิดที่เป็นโปรตีน (proteinaceous inhibitors) (Franco และคณะ, 2002) สาร nonproteinaceous α -amylase inhibitors จัดเป็นสาร organic compound ตัวอย่างเช่น acarbose, isoacarbose, acarviosin-glucose, hibiscus acid and the cyclodextrins ส่วนสาร proteinaceous α -amylase inhibitors เป็นสารจำพวกโปรตีนที่พบได้ในสิ่งมีชีวิต เช่น จุลินทรีย์พืช และสัตว์ ในพืชสาร proteinaceous α -amylase inhibitors ถูกรายงานว่าพบได้ในพืชในกลุ่มธัญพืช เช่น ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวไรท์ ข้าวเจ้า และพืชตระกูลถั่ว ซึ่ง proteinaceous α -amylase inhibitors ที่พบในข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวไรท์ ข้าวเจ้า เป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กประมาณ 18-21 kDa (Abe และคณะ, 1993; Feng และคณะ, 1996; Franco และคณะ, 2002; Iulek และคณะ, 2000; Sogaard และคณะ, 1993; Yamagata และคณะ, 1998) โดยที่พืชแต่ละชนิดจะผลิต α -amylase inhibitors ที่มีความจำเพาะแตกต่างกัน (Richardson, 1990) และเป็นที่ทราบกันดีว่า α -amylase inhibitors มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -amylase ในการเปลี่ยนแป้งไปเป็นน้ำตาล จึงมีการนำ α -amylase inhibitors มาใช้ในทางการแพทย์ เช่น เป็นยาสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน หรือโรคอ้วน ซึ่ง proteinaceous α -amylase inhibitors เป็นสารสกัดที่ได้จากพืชธรรมชาติ ไม่เป็นพิษและตกค้างในสิ่งแวดล้อม หากแต่ proteinaceous α -amylase inhibitors ก็ยังมีข้อด้อยในเรื่องของความสะดวกต่อสภาวะแวดล้อม อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง และตัวทำละลายอินทรีย์ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส จึงเป็นที่มาในการนำ starch microsphere มาเป็นตัวดูดซับสารสกัด proteinaceous α -amylase inhibitors เพื่อเป็นการปกป้องการเสถียรภาพของสารจากสิ่งแวดล้อม โดยในงานวิจัยครั้งนี้เลือกการสกัดสาร proteinaceous α -amylase inhibitors จากธัญพืช 5 ชนิด ได้แก่ ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวเจ้า และถั่วขาว ซึ่งเคยมีรายงานว่ามีความเหมาะสมในการยับยั้งเอนไซม์ α -amylase จากนั้นนำมาดูดซับด้วย starch microsphere ที่เตรียมด้วยเทคนิค emulsion crosslinking และศึกษา stability ในด้านต่างๆ ได้แก่ temperature, pH and enzyme ของ starch microsphere ซึ่งค่า stability เป็นข้อมูลสำคัญสำหรับเลือกนำไปใช้งานในด้านต่างๆ ได้ดียิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการผลิต starch microsphere จากแป้งมันสำปะหลังด้วยวิธี emulsion-crosslink
2. เพื่อทราบคุณลักษณะและสมบัติของ starch microsphere ที่ผลิตได้
3. เพื่อประเมินศักยภาพการนำ starch microspheres ไปใช้ประโยชน์ในการนำส่งยา

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. เตรียม starch microsphere จากแป้งมันสำปะหลังตัดกึ่งที่ผ่านการย่อยด้วยกรด HCl 2.2 N เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง
 - ศึกษาอุณหภูมิการเตรียมที่ 4 และ 30°C
 - ศึกษาระยะเวลาการบ่มที่ 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง
2. ศึกษาคุณลักษณะของ starch microsphere
 - ลักษณะสัณฐานวิทยา
 - ขนาดอนุภาคของ starch microsphere
 - หมู่ฟังก์ชันภายในของ starch microsphere โดยใช้ Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy
 - โครงร่างผลึกโดยใช้ X-ray diffractometer
3. ศึกษาคุณสมบัติของ starch microsphere
 - การพองตัวและการละลาย
 - ความคงตัวในการเป็นกรดและด่าง
 - การย่อยด้วยเอนไซม์
4. ศึกษาการสกัดสาร α -amylase inhibitor จากพืช 5 ชนิด ได้แก่ ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวเจ้า และถั่วขาว
 - ปริมาณโปรตีน
 - กิจกรรมของ α -amylase
 - กิจกรรมของ α -amylase inhibitor
 - เพอร์เซ็นต์การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase
5. ศึกษาการดูดซับสารสกัดจากพืช 5 ชนิด
 - เพอร์เซ็นต์การดูดซับ
 - เพอร์เซ็นต์การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ของ starch microsphere ที่ดูดซับด้วยสารสกัดจากพืช 5 ชนิด
6. ศึกษาการดูดซับสาร acarbose ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ α -amylase ด้วย starch microsphere
 - วิธีที่ 1 โดยการเตรียมไปพร้อมกับการเตรียม starch microsphere
 - วิธีที่ 2 โดยการดูดซับด้วย starch microsphere
 - เพอร์เซ็นต์การดูดซับ
 - เพอร์เซ็นต์การถูกย่อยด้วยเอนไซม์ของ starch microsphere ที่ดูดซับด้วยสาร acarbose ทั้ง 2 วิธี

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เทคโนโลยีการผลิต starch microsphere จากแป้งมันสำปะหลัง
2. ทำให้ทราบถึงคุณลักษณะและคุณสมบัติของ starch microsphere ที่ผลิตจากแป้งมันสำปะหลัง
3. ได้ starch microsphere เพื่อนำมาใช้เป็นตัวนำส่งยาซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับแป้งมันสำปะหลัง

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Starch microsphere สามารถเตรียมได้หลายวิธี เช่น การตกตะกอน, solvent-evaporation, spray-drying และ emulsion techniques (Jafari และคณะ, 2008; Li และคณะ, 2009a; Li และคณะ, 2009b; Ma และคณะ, 2011) ซึ่งวิธี emulsion techniques เป็นการผสมสารละลาย 2 ประเภทเข้าด้วยกัน แบ่งเป็น 2 ระบบ คือ 1) สารละลายอินทรีย์ (organic phase) และสารละลายในน้ำ (aqueous phase) (water in oil; w/o) (Kim และ Lee, 1992; Lu และ Park, 1995) 2) ระบบอิมัลชันของสารละลายโพลิเมอร์ในน้ำ 2 ชนิด (water in water; w/w) ที่สามารถแยกเฟสออกจากกันได้เมื่อนำมาผสมกัน (aqueous two-polymer system) (Franssen และ Hennink, 1998)

2.1 การเตรียม starch microsphere ด้วยวิธี water in water emulsion

Seki และคณะ (2007) เตรียม starch microsphere โดยเตรียมจากสารละลายแป้ง 3-10 กรัม กับ polypropyleneglycol (PPG) 41.8 กรัม กวนที่ความเร็ว 400 rpm อุณหภูมิ 20-60°C ต่อเนื่องเป็นเวลา 30 นาที ถึง 2 ชั่วโมง และทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 0.5°C พบว่าขนาดของ starch microsphere ขึ้นกับอุณหภูมิเริ่มต้นในการเตรียม ที่อุณหภูมิสูงจะให้อนุภาคที่ใหญ่กว่าที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งผลจากอุณหภูมิการเตรียมเริ่มต้นจะเห็นชัดในอัตราส่วนผสม PPG:สารละลายแป้ง ที่ 93.3:6.7 มากกว่าที่สัดส่วน 80.7:19.3

Elfstrand และคณะ (2009) ศึกษาโครงสร้างผลึกของ starch microsphere ที่เตรียมจาก soluble starch ของแป้งข้าวโพดข้าวเหนียวด้วยเทคนิค w/w emulsification ใช้สารละลายแป้ง 30% โดยให้การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ จากนั้นเติมสารละลาย PEG 38% พร้อมกับปั่นกวนด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 15 นาที อิมัลชันจะถูกกวนต่อที่ 50 rpm เป็นเวลา 25 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส จากนั้นตั้งปัมไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 ชั่วโมง แล้วล้าง starch microsphere ด้วย phosphate buffer (5 mM, pH 5.0) นำไปทำให้แห้งโดย freeze drying เมื่อนำไปตรวจสอบโครงสร้างผลึกด้วย X-ray diffractometer พบว่า starch microsphere มีโครงสร้างผลึกเป็นแบบ type B

Li และคณะ (2009a; 2009b) ศึกษาการเตรียม starch-based microparticles (MPs) จากแป้งข้าวเหนียวข้าวโพด ที่ตัดแปรด้วย octenyl succinic anhydride (OSA) โดยใช้เทคนิค w/w emulsification crosslinking โดยเตรียมสารละลายผสมปริมาตร 10 mL ซึ่งประกอบด้วย OSA starch 22% (w/w), trisodium trimetaphosphate (TSTP) 2.0% (w/w) และ NaOH 1.5% (w/w) ค่อยๆ ผสมลงในสารละลาย 30%PEG (MW = 20,000) กวนให้ทั้ง 2 เฟสเข้ากัน ที่ 30°C พร้อมทั้งกวนด้วยความเร็ว 250 rpm เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นเติมแอลกอฮอล์ 100 mL เพื่อแยก starch microsphere แล้วนำไปล้างด้วยน้ำและ ethanol จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า starch microsphere มีการกระจายตัวดี มีรูปร่าง

เป็นทรงกลม และมีโครงสร้างแบบบอสันฐาน จากการศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ในกระบวนการเตรียมต่อขนาดของ starch microsphere พบว่าความเข้มข้นของแป้ง OSA และอัตราส่วนโดยปริมาตรของ dispersed phase ต่อ continuous phase ขนาดโมเลกุลของ PEG และความเข้มข้น PEG ส่งผลต่อขนาดอนุภาค starch microsphere อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Li และคณะ (2012) เปรียบเทียบคุณลักษณะของ starch microsphere ที่เตรียมโดยเทคนิค w/o emulsification และ w/w emulsification โดยระบบ w/w ใช้การเตรียมแบบสองขั้นตอน โดยเตรียมสารละลายผสมปริมาตร 18 mL (dispersed phase) ประกอบด้วย 16% soluble starch, สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 2% และ trisodium trimetaphosphate (TSTP) ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลายผสมลงในสารละลาย PEG ปริมาตร 90 mL ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 6 นาที โดยกวนที่ความเร็วรอบ 500 rpm จากนั้นนำสารละลายมาปั่นที่อุณหภูมิ 30°C (โดยไม่มีการกวนผสม) ตามเวลาที่กำหนด เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 mL และปั่นแยกที่ 5000 rpm นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นและ ethanol และอบแห้งในตู้อบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง สำหรับระบบ w/o ส่วน organic phase ประกอบด้วย paraffin liquid 90 mL และ Span 80 4.5 กรัม ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 30°C จน Span 80 ละลายหมด จากนั้นค่อยๆ เทสารละลายผสมของ water phase (dispersed phase) ปริมาตร 18 mL ลงไป กวนที่ความเร็วรอบ 500 rpm นาน 3 ชั่วโมง ปั่นแยกที่ 5000 rpm นาน 5 นาที และล้างด้วยอะซิโตน บีโตรเลียมและน้ำกลั่น 3 รอบ และอบให้แห้ง สรุปได้ว่าผลผลิตของ starch microsphere และ crosslink density ขึ้นกับขนาดโมเลกุลและความเข้มข้นของ PEG, ความเข้มข้นของ TSTP และระยะเวลาในการบ่มอิมัลชัน การเพิ่มขึ้นของปัจจัยเหล่านี้ส่งผลให้ crosslink density เพิ่มขึ้น เมื่อเตรียมโดยวิธี w/w พบว่าผลผลิตของ starch microsphere และ crosslink density ต่ำกว่าเมื่อใช้วิธี W/O แต่ starch microsphere ที่ได้จากทั้งสองวิธีมีลักษณะกลม ไม่มีรูพรุน ปราศจาก PEG และมีโครงสร้างแบบบอสันฐานไม่แตกต่างกัน

2.2 คุณสมบัติการย่อยสลาย starch microsphere (คุณสมบัติของ starch microsphere)

Hamdi และคณะ (1998) ศึกษาการย่อยสลาย starch microsphere ที่ได้จากการเตรียมโดยใช้ epichlorohydrin เป็นสาร crosslinking agent พบว่า starch microspheres ที่ได้จากการเตรียมมีลักษณะกลมพื้นผิวเรียบ ซึ่งหลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ α -amylase (5, 15, 25, 50, 100 IU/I) ในสารละลาย phosphate buffer pH 7.4 ที่ 37°C พบว่าขนาดของ starch microsphere เมื่อผ่านการย่อยมีขนาดลดลง โดยพบว่าลักษณะการย่อยของเอนไซม์ α -amylase จะเกิดขึ้นบริเวณพื้นผิวของ starch microsphere

2.3 การประยุกต์ใช้ starch microsphere เพื่อเป็น carrier

Starch microsphere ได้ถูกศึกษาและมีการนำมาประยุกต์ใช้ในการทางการแพทย์ ตัวอย่างเช่น nasal drug delivery (Pereswetoff-Morath, 1998; Björk and Edman, 1990; Björk and Edman, 1988), drug delivery (Fang et al., 2008; Li et al., 2009b; Surini et al., 2009) protein และ peptides delivery (Pareta and Edirisinghe, 2006; Elfstrand et al., 2007), metal ion adsorption (Li et al., 2008; Yang et al., 2010; Sancey et al., 2010), และเป็น encapsulation of plant oils (Glenn et al., 2010).

Pareta และ Edirisinghe (2006) ได้เตรียม polymer-coated starch/bovine serum albumin (BSA) microspheres โดยใช้วิธี coaxial electrohydrodynamic atomization (CEHDA) เพื่อทดสอบการเป็น protein drug delivery โดยเตรียม starch/BSA solution ที่ความเข้มข้น BSA 2% พบว่า สามารถเตรียม starch/BSA microsphere ที่มีปริมาณโปรตีนประมาณ 75% และสามารถควบคุมการปลดปล่อยได้ 7 วัน

Fang และคณะ (2008) ศึกษาการบรรจุยาและการปลดปล่อยยาของ cross-linked anionic starch microsphere โดยใช้ methylene blue (MB) แทนตัวยา พบว่าปริมาณที่สามารถบรรจุยาได้ขึ้นอยู่กับระยะเวลาการบรรจุ สารตัวกลางในการทำละลาย อุณหภูมิการบรรจุ และความเข้มข้นของ MB

Li และคณะ (2009b) ศึกษาคุณสมบัติการบรรจุยาของ starch microsphere ที่เตรียมด้วยวิธี emulsion crosslinking โดยใช้ TSTP เป็น crosslinking agent โดยใช้ MB เป็นสารแทนยา พบว่าความเข้มข้นของ TSTP มีผลต่อขนาดอนุภาค loading capacity และ swelling degree ของ starch microsphere เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TSTP ตั้งแต่ 0.1-0.4 g/g ขนาดของอนุภาค starch microsphere และ loading capacity จะเพิ่มมากขึ้น แต่ค่า swelling degrees มีลักษณะเป็น bell-shaped ขึ้นกับความเข้มข้นของ TSTP ถ้า TSTP ที่ความเข้มข้นต่ำการพองตัวจะต่ำ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นไประดับหนึ่งการพองตัวของ starch microsphere จะสูงขึ้น และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้นไปอีกการพองตัวของ starch microsphere จะลดต่ำลง

Surini และคณะ (2009) เตรียม starch microsphere จาก pregelatinized cassava starch succinate (PCSS) โดยใช้วิธี spray drying เพื่อศึกษาการปลดปล่อยยา propranolol (ยารักษาโรคความดันสูง ป้องกันการเจ็บหน้าอก และหัวใจวาย) ในสารละลาย HCl pH 1.2 และ phosphate buffer pH 7.2 พบว่า propranolol สามารถปลดปล่อยที่ pH 1.2 ได้ดีกว่าที่ pH 7.2 และ pregelatinized cassava starch succinate microsphere มีลักษณะเป็นเม็ดกลมสามารถเกาะติดได้ที่กระเพาะและลำไส้ได้ดี

2.4 α -Amylase inhibitor

α -Amylase inhibitor สามารถผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ตัวอย่างเช่น จุลินทรีย์ สัตว์ หรือพืชชั้นสูง โดยในพืชสามารถสกัดได้จากพืชตระกูลถั่ว (legumes) เช่น ถั่วแดง ถั่วดำ

และถั่วขาว (Kasahara และคณะ, 1996; Le Berre-Anton และคณะ, 1997; Yamaguchi, 1993) ในธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง (Abe และคณะ, 1993; Feng และคณะ, 1996; Franco และคณะ, 2002; Iulek และคณะ, 2000; Sogaard และคณะ, 1993; Yamagata และคณะ, 1998) α -amylase inhibitors ที่สกัดได้จากพืชสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆ ได้ทั้งหมด 6 กลุ่ม ตามแหล่งที่มา ได้แก่ 1) Lectin-like inhibitors สกัดได้จากพืชตระกูลถั่ว 2) Kunitz-like สกัดได้จากข้าวบาร์เลย์ (Rodenburg และคณะ, 1995) ข้าวสาลี (Gvozdeva และคณะ, 1993) ข้าวเจ้า (Ohtsubo และ Richardson, 1992) 3) Knottin-type สกัดได้จาก amaranth seed (Lu และคณะ, 1999; Martins และคณะ, 2001) 4) Cereal-type สกัดได้จาก ธัญพืช ข้าวสาลี (Feng และคณะ, 1996) ข้าวบาร์เลย์ (Richardson, 1990) 5) γ -purothionin-like สกัดได้จากข้าวฟ่าง (Blanco-Labra และ Iturbe-ChiÑAs, 1981) และ 6) thaumatin-like สกัดได้จากข้าวโพด (Batalia และคณะ, 1996; Blanco-Labra และ Iturbe-ChiÑAs, 1981) ซึ่งทั้งหมดเป็นสารโปรตีน โดยมีความจำเพาะต่อการยับยั้งเอนไซม์ α -amylase ที่แตกต่างกัน Yamagata และคณะ (1998) ทำการสกัด inhibitor จากข้าว โดยทำให้บริสุทธิ์โดย gel chromatography และ electrophoresis พบว่า inhibitor จากข้าวมีขนาด 21 kDa (RASI) ซึ่งมีลักษณะเป็น bifunction สามารถยับยั้งเอนไซม์ endogenous α -amylase จาก germinating seed ได้เล็กน้อย และยับยั้ง subtilisin ได้ดี โดยมีความจำเพาะสูงต่อชนิดของ α -amylase เช่นเดียวกับ α -amylase inhibitors จากข้าวบาร์เลย์ (BASI) ที่มีลักษณะเป็น bifunction เช่นเดียวกับ RASI แต่จะสามารถยับยั้งเอนไซม์ endogenous α -amylase ได้ดีกว่า RASI และยับยั้ง subtilisin ได้ดี แต่มีความจำเพาะกับกรดอะมิโน arginine, histidine, methionine และ tyrosine ในการจับกับ target ของเอนไซม์ barley α -amylase (Abe และคณะ, 1993) ชนิดของ α -amylase inhibitor ที่ได้จากแหล่งต่างๆ และความสามารถในการยับยั้ง α -amylase แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Activity ของ amylase inhibitors ที่ได้จากแหล่งต่างๆ และความสามารถในการยับยั้ง α -amylase ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและแมลง (Franco และคณะ, 2002)

Inhibitors	Source	Inhibitory activities	
		Mammalian	Insect
a-AI1	<i>Proteus vulgaris</i>	porcine pancreatic α -amylase (PPA)	<i>Callosobruchus maculatus</i> <i>Callosobruchus chinensis</i> <i>Diabrotica virgifera virgifera</i> <i>Hypothenemus hampei</i> <i>Tenebrio molitor</i>
a-AI2	<i>P. vulgaris</i>	None activity	<i>Zabrotes subfasciatus</i>

Wheat Extract	<i>Triticum aestivum</i>	PPA and human salivary α -amylase (HAS)	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i> <i>Lygus hesperus</i> <i>Lygus lineoralis</i>
0.19	<i>T. aestivum</i>	PPA and HSA	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i> <i>Callosobruchus maculatus</i> <i>Zabrotes subfasciatus</i> <i>Acanthoscelides obtectus</i> <i>Tenebrio molitor</i> <i>Sitophilus oryzae</i> <i>Tribolium castaneum</i>
0.53	<i>T. aestivum</i>	HSA and PPA (low)	<i>Tenebrio molitor</i> <i>Callosobruchus maculatus</i> <i>Zabrotes subfasciatus</i> <i>Acanthoscelides obtectus</i>
0.28	<i>T. aestivum</i>	PPA and HSA	<i>Tenebrio molitor</i>
WRP25	<i>T. aestivum</i>	None	<i>Sitophilus oryzae</i> <i>Tribolium castaneum</i> <i>Tenebrio molitor</i> <i>Callosobruchus maculatus</i> <i>Zabrotes subfasciatus</i>
WRP26	<i>T. aestivum</i>	None	<i>Tenebrio molitor</i> <i>Sitophilus oryzae</i> <i>Tribolium castaneum</i> <i>Callosobruchus maculatus</i>
WRP27	<i>T. aestivum</i>	None	<i>Tenebrio molitor</i> <i>Sitophilus oryzae</i>
1,2 and 3	<i>Secale cereale</i>	HSA	<i>Tenebrio molitor</i>
BIII	<i>S. cereale</i>	HSA and PPA	<i>Zabrotes subfasciatus</i> <i>Acanthoscelides obtectus</i>
AAI	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	None activity	<i>Tenebrio molitor</i> <i>Hypothenemus hampei</i> <i>Prostephanus truncatus</i>
CAI	<i>Vigna unguiculata</i>	None	<i>Callosobruchus maculatus</i>
PAI	<i>Cajanus cajan</i>	HSA and PPA	<i>Helicoverpa armigera</i>

Zeamatin	<i>Zea mays</i>	None activity	<i>Tribolium castaneum</i> <i>Sitophilus zeamais</i> <i>Rhyzoperta dominica</i>
Sla1, Sla2 and Sla3	<i>Sorghum bicolor</i>	HSA (low)	<i>Locusta migratoria</i> <i>Periplaneta americana</i>

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบในการทดลอง

แป้งมันสำปะหลังที่ซื้อจากท้องตลาด

3.2 อุปกรณ์ในการทดลอง

- เครื่องแก้ว
- ตู้อบ
- ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump)
- โหลกันความชื้น (Desiccator)
- เครื่องกวนสารละลาย (Hotplate Stirrer) (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance) (Sartorius analysis, Sartorius AG, Germany)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge BR 4I, Jouan Inc., USA)
- อ่างน้ำร้อนพร้อมเครื่องเขย่า (Water bath shaker) (Mettler UM, German)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Shimadzu UV-160, Japan)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Mettler UM, German)
- กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope) (Eclipse E200, Nikon, Japan)
- เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) (JSM-5410LV, JEOL Ltd., Japan)
- Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy
- เครื่อง X-ray diffraction (XRD) (D8 Discover, Bruker, Germany)
- Differential scanning calorimetry (DSC) (DSC-1, Mettler-Toledo International Inc., USA)

3.3 การเตรียม hydrolyzed cassava starch

แป้งมันสำปะหลัง ปริมาตร 25 g ในสารละลาย 2.2 M HCl ปริมาตร 500 mL นำไปต้มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พร้อมเขย่า จากนั้นนำไปกรองให้เหลือแต่ส่วนของแข็งล้างด้วยน้ำหลายๆ ครั้งจน pH เท่ากับ 7.0 จึงนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4 การเตรียม starch microspheres

นำ hydrolyzed cassava starch ที่เตรียมได้จากหัวข้อ 3.3 มาเตรียมเป็น starch microsphere โดยวิธี emulsion-crosslinking เริ่มจากเตรียมสารละลาย 2 ส่วน ส่วนที่ 1 (continuous phase) เตรียมสารละลาย PEG 40% ปริมาตร 500 mL (ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °C)

ส่วนที่ 2 เป็นสารละลายผสม เตรียมโดยใช้ hydrolyzed cassava starch 10 g ในน้ำ 200 mL เติม NaOH ปริมาณ 4 g กวนให้ NaOH ละลายและน้ำแบ่งเป็นเจลอย่างสมบูรณ์สังเกตจากน้ำแบ่งจะมีความใสเพิ่มมากขึ้น จากนั้นเติมสาร trisodium trimetaphosphate (TSTP) ปริมาณ 8 g เป็นสาร crosslinking agent กวนให้เข้ากัน เทสารละลายส่วนที่ 2 ลงในสารละลายส่วนที่ 1 อย่างช้าๆ พร้อมกวนที่ความเร็ว 700 rpm อุณหภูมิ 4 และ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดกวนตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °C เป็นเวลา 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง เติมน้ำปริมาตร 500 mL ก่อนนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยก starch microsphere ออก จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 3 เท่า จำนวน 3 ครั้ง และบดล้างด้วย ethanol 95% ในครั้งสุดท้าย กรองด้วย glass filter เบอร์ 4 ก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 °C จนแห้ง เก็บใส่ถุงพลาสติกไว้ในโหลกันความชื้น

3.5 การวิเคราะห์คุณลักษณะและสมบัติของ starch microsphere

3.5.1 ระดับการเกิด crosslink (Crosslink density)

การหาระดับการเกิดการ crosslink ทำได้โดยใช้ตัวอย่าง starch microsphere 20 mg จากนั้นเติมสารละลาย methylene blue (MB) 0.02 mg/mL ปริมาตร 10 mL เขย่าให้เข้ากัน นำไปตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm เวลา 5 นาที นำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665 nm คำนวณค่าการดูดซับ methylene blue ได้ดังนี้

$$RMB = \frac{C_0 - C_1}{C_0 - C_2}$$

C_0 = ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของสารละลาย methylene blue ก่อนดูดซับ

C_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย methylene blue ที่มี starch

microsphere

C_2 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย methylene blue ที่มี native cassava

starch

3.5.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ starch microsphere

ลักษณะสัณฐานวิทยาของ starch microsphere พิจารณาจากกล้อง 2 ชนิดได้แก่ กล้องจุลทรรศน์และกล้อง SEM การดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้การย้อมสีด้วยสารละลาย I_2/KI 0.2% ศึกษาที่กำลังขยาย 400 เท่า และการศึกษาด้วยกล้อง SEM เตรียมโดยโรยผง starch microsphere ลงบนภาวสองหน้าที่ติดอยู่ที่ circular specimen stub จากนั้นนำไปเคลือบทองโดยใช้ Balzers SCD 004 sputtering coater นำตัวอย่างที่เคลือบทองเรียบร้อยแล้วมาดูด้วยกล้อง SEM โดยกำหนดค่า kV = 15 ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

3.5.3 ขนาดของ starch microsphere

การหาขนาดของ starch microsphere จะวัดขนาดขนาดจากกล้องจุลทรรศน์ (Eclipse E200; Nikon, Tokyo, Japan) โดยใช้โปรแกรมในการวัด ซึ่งการวัดขนาดทำ size distribution จะวัดตัวอย่างละ 500 เม็ดจำนวน 2 ซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ย

3.5.4 กำลังการพองตัวและการละลาย (Swelling power and solubility)

การวิเคราะห์ค่ากำลังการพองตัวและการละลายของ starch microsphere ทำโดยชั่งน้ำหนักหลอด centrifuge เพื่อทราบน้ำหนักเริ่มต้น ก่อนชั่งตัวอย่างปริมาณ 0.1 g เติมน้ำปริมาณ 5 mL เขย่าให้เข้ากัน แช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50, 60, 70, 80 และ 90 °C เป็นเวลา 30 นาที โดยนำออกมาเขย่าทุกๆ 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 rpm นาน 10 นาที แยกส่วนใสและตะกอนออกจากกัน นำตะกอนที่ได้ไปชั่งน้ำหนักพร้อมหลอด centrifuge นำไปคำนวณหากำลังการพองตัวดังนี้

$$\text{Swelling power} = \frac{[\text{sediment weight} \times 100]}{[(\text{dry matter sample weight}) \times (100\% - \% \text{ of total carbohydrates in solution})]}$$

สำหรับค่าการละลายให้น้ำส่วนใสที่แยกไว้นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ total carbohydrate โดยวิธี Phenol-sulfuric

3.5.5 การทนต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Enzyme stability)

การทดสอบความทนต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ทดสอบโดยเตรียมตัวอย่างปริมาณ 0.1 g ในสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 25 mL ที่ประกอบด้วย phosphate buffer ความเข้มข้น 0.02 M pH 6.9 ที่มี 0.003 M CaCl_2 และเอนไซม์ α -amylase (10 Unit) เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C พร้อมเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เกินตัวอย่างครั้งละ 2 mL ที่เวลา 10, 30, 60, 90 และ 120 นาที นำตัวอย่างที่เก็บได้มาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 5000 rpm นาน 10 นาที เพื่อแยกส่วนตะกอนออก นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หา reducing sugar โดยวิธี Dinitrosalicylic colorimetric method (Miller, 1959) โดยใช้น้ำตาลมอลโตสเป็นสารละลายมาตรฐาน

3.5.6 การทนต่อสภาวะกรดและด่าง (Acid-Base stability)

การทดสอบความทนต่อสภาวะกรดและด่างจะทำที่ 2 สภาวะคือที่กรด pH 2.0 และด่าง pH 8.0 ทดสอบโดยเตรียมตัวอย่างปริมาณ 0.1 g ในสารละลายบัฟเฟอร์สองชนิด ได้แก่ 0.2 M citrate buffer pH 2.0 และ 0.2 M phosphate buffer pH 8.0 ปริมาตร 25 mL เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C พร้อมเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เกินตัวอย่างครั้งละ 2 mL ที่เวลา 10, 30, 60, 90 และ 120 นาที นำตัวอย่างที่เก็บได้มาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 5000 rpm นาน

10 นาที เพื่อแยกส่วนตะกอนออก นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หา reducing sugar โดยวิธี Dinitrosalicylic colorimetric method เช่นเดียวกับการทดสอบการทนต่อการย่อยสลายด้วย เอ็นไซม์

3.5.7 คุณสมบัติทางความร้อน (Thermal properties)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างปริมาณ 5 mg โดยน้ำหนักแห้ง ใส่ใน stainless pan ของเครื่อง DSC และเติมน้ำกลั่นลงไปให้ได้น้ำหนักรวม 50 mg ปิด stainless pan นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำ pan ใส่ในช่อง sample ของเครื่อง Differential scanning calorimeter (DSC) และวาง reference pan (pan เปล่า) ใส่ในช่อง reference ให้ความร้อนในช่วงอุณหภูมิ 30-250 °C ที่อัตราการเพิ่มของอุณหภูมิ 10 °C/นาที คำนวณค่าทางเทอร์โมไดนามิกส์โดยใช้ระบบ autocalculation และบันทึกค่าต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเจลลาติไนซ์

3.5.8 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชัน

นำตัวอย่างบดให้ละเอียดมาผสมกับสารโพแทสเซียมโบรไมด์ในอัตราส่วน 1:100 (โดยประมาณ) แล้วบดผสมรวมกันจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปอัดเป็นแผ่น (pellet) แล้วนำไปวิเคราะห์หาสเปกตรัมด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR) โดยตั้งค่าของเครื่องที่ค่า resolution = 4.0 cm⁻¹ และจำนวน scan =16

3.5.9 โครงสร้างผลึก (Crystalline structure)

นำตัวอย่างสตาซ์โรยบน sample plate แล้วกด sample plate ให้เม็ดสตาซ์เรียงตัวอัดกันแน่นและทำผิวหน้าให้เรียบ นำ sample plate ใส่เข้าเครื่อง X-ray diffractometer ที่ช่อง sample holder แล้วปิดฝาช่องตัวอย่าง ใช้แรงดันไฟฟ้าที่ 40kV, 40 mA โดยวัดค่าในช่วงมุม 2θ ที่ 4° ถึง 45° ที่อัตราเร็ว 0.1°/นาที ซึ่งเปอร์เซ็นต์ crystalline คำนวณได้จากสัดส่วนของพื้นที่ใต้กราฟต่อพื้นที่ทั้งหมด

3.6 การเตรียมสารสกัดจากพืช

เตรียมตัวอย่างโดยบดเมล็ดธัญพืช (ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวเจ้า และถั่วขาว) ให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น จากนั้นนำธัญพืชที่บดได้ 500 g ใส่ในน้ำ 2500 mL ที่อุณหภูมิ 4 °C กวนต่อเนื่องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองแยกกาก เทแยกส่วนใสออกมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 rpm นาน 10 นาที จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้ เรียกส่วนใสที่ได้นี้ว่า Crude extract และเอาส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนด้วย 80% NH₄(SO₄)₂ กวนที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน 1 วัน นำมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 8000 rpm นาน 10 นาที เอาตะกอนที่ได้มากำจัดเกลือออกด้วยการ dialysis ในสารละลาย 0.02 M phosphate

buffer pH 6.9 เก็บสารที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -18°C ก่อนนำมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ α -amylase

3.7 การวิเคราะห์สมบัติของสารสกัดจากพืช

3.7.1 ปริมาณโปรตีน

นำสารสกัดเจือจาง 50 เท่า ปริมาตร 1 mL วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (Lowry 1951) วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 660 nm โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1000 $\mu\text{g/mL}$

3.7.2 เปอร์เซนต์การยับยั้งเอนไซม์ α -amylase

เตรียมสารละลายเอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์ α -amylase 10 U ปริมาตร 0.1 mL และ สารสกัดจากพืชปริมาตร 0.1 mL ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย soluble starch 2% ใน 0.02M phosphate buffer pH 6.9 ปริมาตร 0.8 mL และ บ่มต่อที่ 37°C เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย dinitrosalicylic acid (DNS) 0.5 mL ต้มที่ 100°C เป็นเวลา 5 นาที แช่น้ำเย็น 5 นาที เติมน้ำปริมาตร 2 mL นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง ที่ 540 nm คำนวณเป็นเปอร์เซนต์การยับยั้งโดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากพืช

3.7.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการดูดซับสารโปรตีนของ starch microsphere

นำสารสกัดจากพืชที่ทราบปริมาณโปรตีนมาทำการเจือจางเพื่อปรับปริมาณโปรตีน เริ่มต้นให้เท่ากันที่ 1 และ 10 mg protein ในน้ำ 20 mL จากนั้นนำไปทำการดูดซับโดยผสมกับ starch microsphere ปริมาณ 1 g โดยกวนอย่างต่อเนื่องที่ความเร็ว 350 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมารองสารละลายออกจากส่วนของแข็งโดยใช้ glass filter เบอร์ 4 นำสารละลายที่กรองได้มาวัดปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการดูดซับเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนที่วัดได้ตอนเริ่มต้น คำนวณเป็นเปอร์เซนต์การดูดซับ

ส่วน starch microsphere ที่ได้ภายหลังการดูดซับ จะนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 mL ผ่าน glass filter เบอร์ 4 จากนั้นนำไปทำแห้งโดยใช้เครื่อง freeze dry เพื่อเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หาเปอร์เซนต์การยับยั้งเอนไซม์ α -amylase ของ starch microsphere ที่ดูดซับได้

3.7.4 ศึกษาการดูดซับและการย่อยด้วยเอนไซม์ α -amylase ของ starch microsphere ที่ดูดซับด้วยสาร acarbose

ทำการเตรียม starch microsphere ที่ดูดซับสาร acarbose 2 วิธี คือ

- 1) เตรียมพร้อมกับการเตรียม starch microsphere โดยนำสาร acarbose ความเข้มข้น 1 และ 10 mg ละลายในน้ำ 20 mL ในสารละลายส่วนที่ 2 ในขั้นตอนการเตรียม starch

microsphere โดยใช้ hydrolyzed cassava starch 1 g NaOH ปริมาณ 0.4 g และ TSTP 0.8 g ผสมสารละลายส่วนที่ 1 สารละลาย PEG 40% ปริมาตร 50 mL กวนด้วยความเร็ว 700 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดกวนตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมน้ำปริมาตร 50 mL ก่อนนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยก starch microsphere ออก จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 3 เท่า จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำไปทำแห้งโดยใช้เครื่อง freeze dry

2) เตรียมโดยการดูดซับกับ starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเตรียมสารละลาย acarbose ความเข้มข้น 1 และ 10 mg ในน้ำ 20 mL กวนกับ starch microsphere 1 g ที่อุณหภูมิ 30 °C 24 h จากนั้นนำมากรองสารละลายออกจากส่วนของแข็งโดยใช้ glass filter เบอร์ 4 นำ starch microsphere ที่ได้ภายหลังการดูดซับ จะนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 mL ผ่าน glass filter เบอร์ 4 จากนั้นนำไปทำแห้งโดยใช้เครื่อง freeze dry

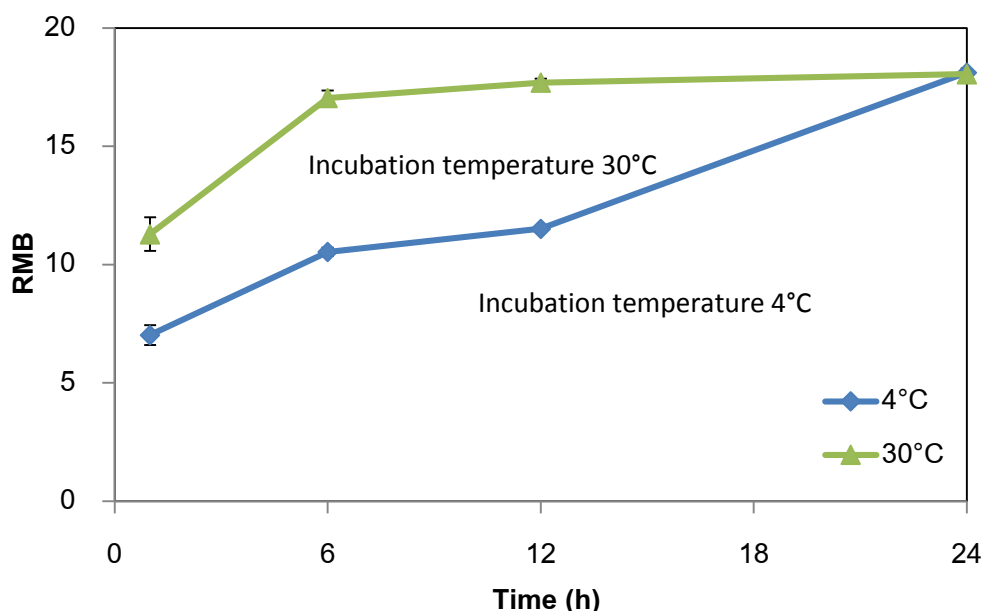
นำตัวอย่างที่เตรียมจากทั้ง 2 วิธีมาวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การย่อยด้วยเอนไซม์ α -amylase ของ starch microsphere ที่ดูดซับได้

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาคุณสมบัติของ starch microsphere

4.1.1 ระดับการเกิด crosslink

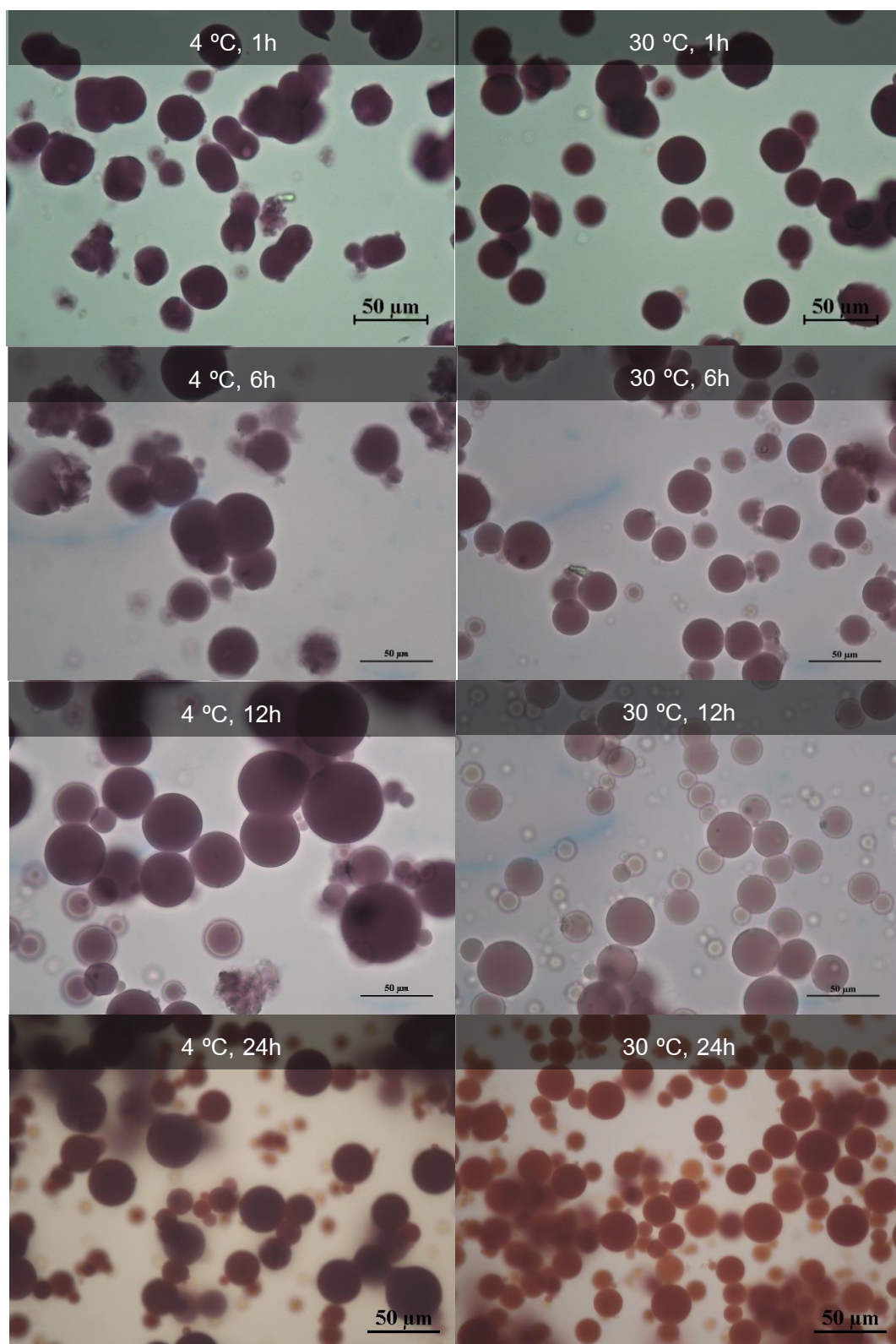
รูปที่ 1 แสดงค่า crosslink density ที่ได้จากการดูดซับด้วย methylene blue ของ starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิและเวลาแตกต่างกัน พบว่าค่า crosslink density ของ starch microsphere ที่เตรียมได้มีค่าเพิ่มขึ้นหลังการกวนเป็นเวลา 30 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ โดยอัตราการเพิ่มขึ้นของ crosslink density ของ starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 30°C จะมีสูงกว่า starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 4 °C โดย starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 30 °C จะมีค่า crosslink density เข้าใกล้จุดสูงสุดเมื่อตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในขณะที่ starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 4 °C ค่า crosslink density จะค่อยๆเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยที่ระยะเวลาการตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ค่า crosslink density ของ starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °C จะใกล้เคียงกัน คือ 18.03 และ 18.11 [Li และคณะ \(2012\)](#) รายงานว่า starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 30°C ระยะเวลา 9 ชั่วโมง มีค่า crosslink density เข้าใกล้จุดสูงสุด ซึ่งในงานวิจัยการเตรียม starch microsphere จะใช้อุณหภูมิในการเตรียมประมาณ 28-37°C ([Elfstrand และคณะ, 2007](#); [Elfstrand และคณะ, 2006](#); [Li และคณะ, 2012](#)) นอกจากนั้นการเกิดปฏิกิริยา crosslink อย่างช้าๆ ที่อุณหภูมิต่ำอาจจะส่งผลต่อโครงสร้างและคุณสมบัติของ starch microsphere



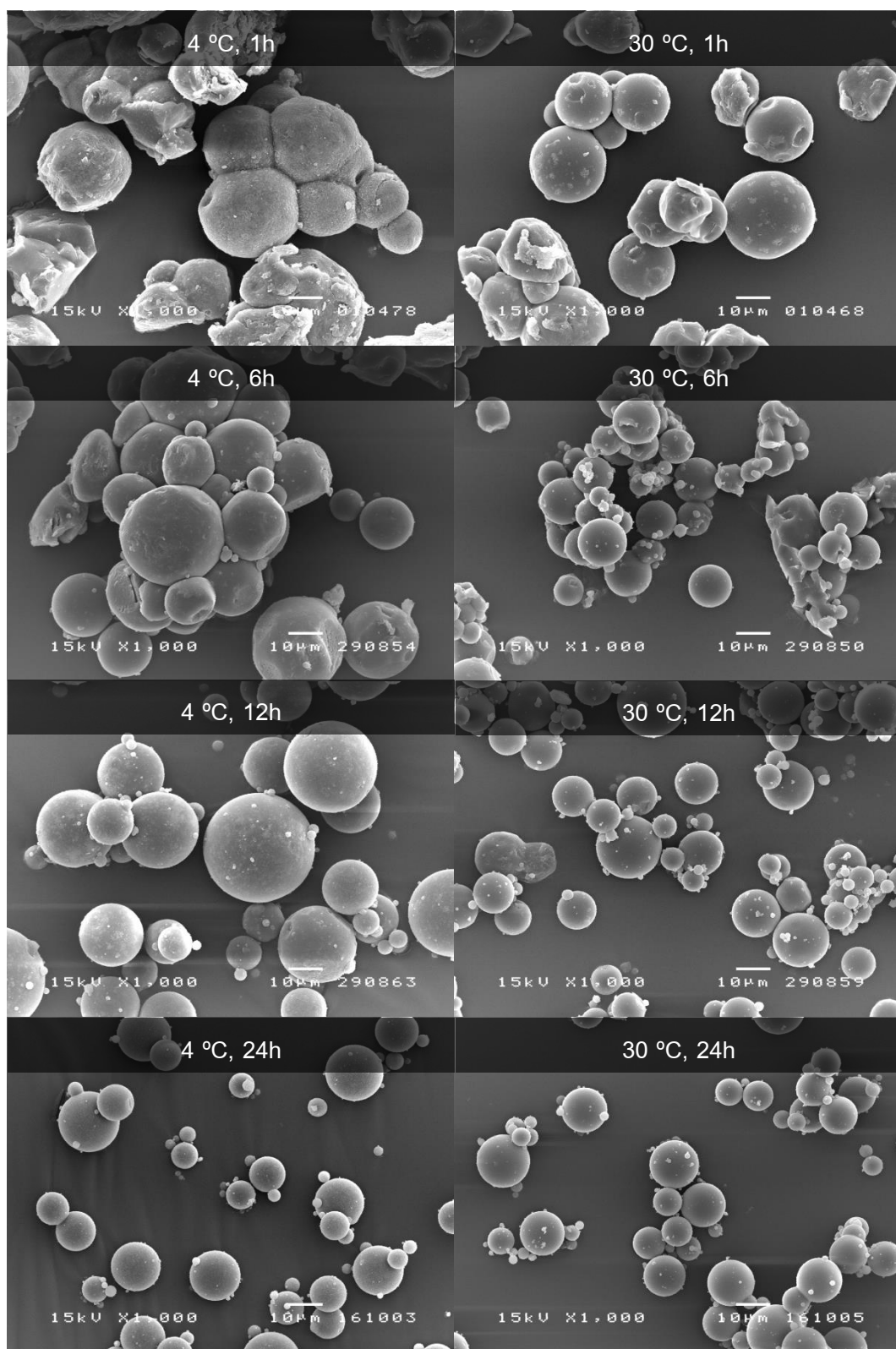
รูปที่ 1 ระดับการเกิด crosslink ของ starch microsphere ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °C และระยะเวลาการเตรียม 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ที่ได้จากการดูดซับด้วย methylene blue (relative amount of adsorbed methylene blue, RMB)

4.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ starch microsphere

จากการเตรียม starch microsphere ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °C ที่ระยะเวลาการเตรียม 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ในรูปที่ 2 แสดงลักษณะของ starch microsphere ที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์ พบว่า starch microsphere สามารถเกิดขึ้นได้ทั้ง 2 อุณหภูมิ และเกิดการสร้างขึ้นภายหลังจากเฟสการละลาย (dispersion phase) ลงไปที่ starch microsphere ที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นทรงกลม ขนาดไม่สม่ำเสมอตั้งแต่ 10-30 ไมครอน ย้อมติดสีไอโอดีนเป็นสีม่วงเข้มทึบแสง ยกเว้นที่เวลาการเตรียม 24 ชั่วโมง ย้อมติดสีม่วงแดง และที่ระยะเวลาการเตรียมนานขึ้นลักษณะของ starch microsphere จะมีรูปร่างกลมและขนาดสม่ำเสมอมากขึ้น รูปที่ 3 แสดงลักษณะของ starch microsphere ที่ถ่ายได้จากกล้อง SEM เพื่อดูลักษณะปรากฏ พบว่า starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 4 °C, 1 ชั่วโมง starch microsphere ที่ได้มีลักษณะพื้นผิวขรุขระ ไม่เป็นทรงกลมที่สมบูรณ์ เมื่อระยะเวลาการเตรียมเพิ่มมากขึ้น starch microsphere จะเป็นทรงกลมมากขึ้นและมีพื้นผิวเรียบเพิ่มขึ้นเช่นกัน และ starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 4 °C ที่ระยะเวลาการเตรียม 1, 6 และ 12 ชั่วโมง จะมีขนาดค่อนข้างใหญ่กว่าที่ระยะเวลาการเตรียม 24 ชั่วโมง ส่วนที่อุณหภูมิการเตรียม 30 °C, 1 ชั่วโมง starch microsphere จะมีลักษณะกลมมากกว่าที่อุณหภูมิ 4 °C แต่พื้นผิวยังคงขรุขระเช่นกัน เมื่อระยะเวลาการเตรียมเพิ่มมากขึ้น starch microsphere จะเป็นทรงกลมมากขึ้นและมีพื้นผิวเรียบเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับที่ 4 °C และ starch microsphere ที่การเตรียมที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง จะมีขนาดค่อนข้างใหญ่เช่นเดียวกับที่ 4 °C แต่เมื่อระยะเวลาการเตรียม 6, 12, 24 ชั่วโมง ขนาด starch microsphere จะมีขนาดเล็กลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาของ starch microsphere จะสัมพันธ์กับค่า crosslink density โดยค่า RMB ของ starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 30 °C จะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและค่อนข้างคงที่ที่ระยะเวลาการเตรียม 6 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของ starch microsphere ที่ระยะเวลาในการเตรียม 6 ชั่วโมงขึ้นไป ที่ starch microsphere จะมีขนาดเล็กลงและค่อนข้างคงที่ starch microsphere ที่เตรียมที่ 4 °C ก็เช่นกัน ค่า RMB จะมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และเข้าใกล้ค่าสูงสุดที่ระยะเวลาการเตรียม 24 ชั่วโมง ซึ่งการพัฒนาของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ starch microsphere ก็ค่อนข้างสมบูรณ์ที่ระยะเวลาการเตรียม 24 ชั่วโมงเช่นกัน

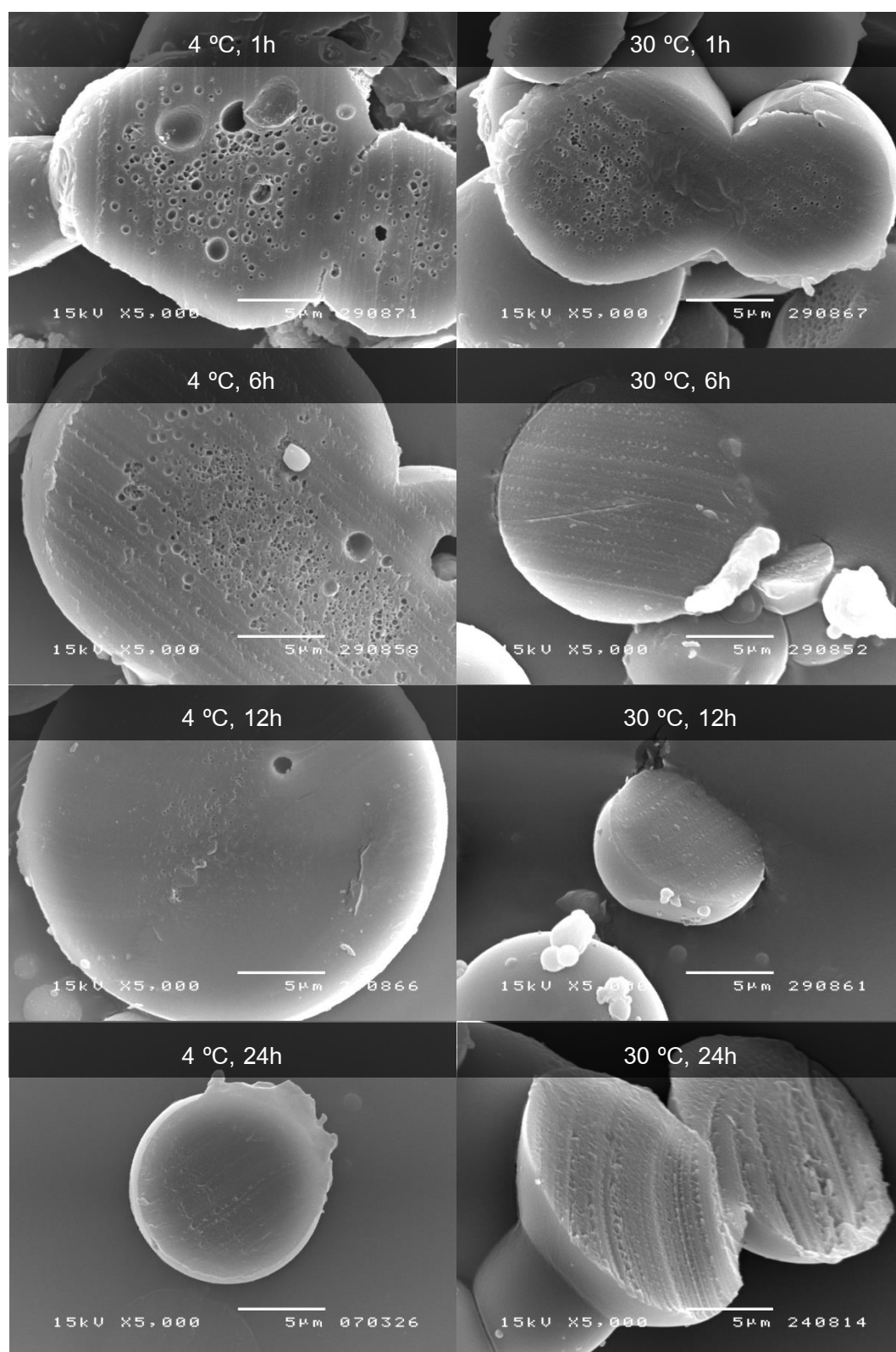


รูปที่ 2 ลักษณะของ starch microsphere ที่ย้อมสีด้วยไอโอดีน ถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 3 ลักษณะของ starch microsphere ที่ถ่ายภาพจากกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

ภาพตัดขวางของ starch microsphere เพื่อดูลักษณะภายในของ starch microsphere จากรูปที่ 4 พบว่าระยะเวลาการเตรียมที่ 1 ชั่วโมง starch microsphere ที่เตรียมจากอุณหภูมิ 4 และ 30 °C ภายใน starch microsphere จะมีลักษณะเป็นรูพรุนกระจายอยู่ภายในอนุภาคของ starch microsphere เป็นจำนวนมาก ขนาดของรูพรุนไม่แน่นอน ซึ่งขนาดของรูพรุนของ starch microsphere ที่เตรียมที่ 4 °C จะมีขนาดของรูพรุนใหญ่กว่า starch microsphere ที่เตรียมที่ อุณหภูมิ 30 °C และเมื่อเพิ่มระยะเวลาการเตรียมนานขึ้นพบว่าจำนวนและขนาดของรูพรุน ภายใน starch microsphere จะลดลง ซึ่งขนาดและจำนวนรูพรุนภายในโครงสร้างอาจจะขึ้นกับ อัตราการกวนขณะที่เกิด emulsion crosslink ของ starch microsphere โดยการเตรียมที่ อุณหภูมิ 30 °C โครงสร้างภายในของ starch microsphere จะมีลักษณะแน่นมากกว่า starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 4 °C ซึ่งระยะเวลาการเตรียมที่นานขึ้นจะทำให้จำนวนและ ขนาดของรูพรุนภายในโครงสร้างลดลง และที่ระยะเวลาการเตรียม 24 ชั่วโมงจะไม่พบรูพรุน ภายในอนุภาค starch microsphere ทั้งที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °C [Li et al., 2012](#) รายงานว่า วิธีการเตรียมแบบ water-water emulsion นั้นสามารถเตรียม starch microsphere ได้รูปร่าง กลมและพื้นผิวเรียบไม่มีรูพรุน แต่ยังไม่มียางานถึงลักษณะปรากฏภายใน starch microsphere มาก่อน ซึ่งความเป็นรูพรุนน่าจะมีผลต่อคุณสมบัติการพองตัว การดูดซับ และการเข้าถึงของ เอ็นไซม์ของ starch microsphere



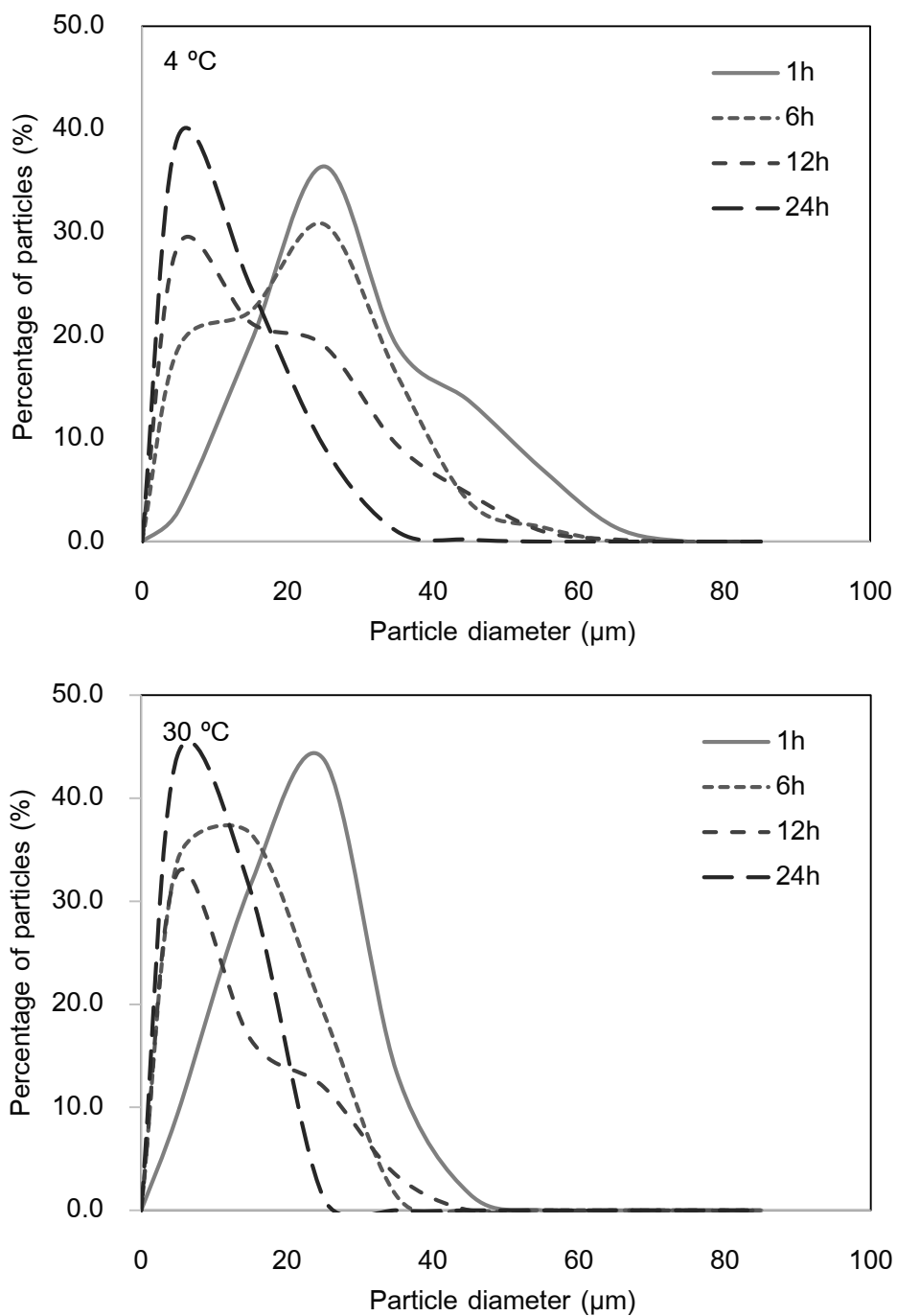
รูปที่ 4 ลักษณะภายในของ starch microsphere ที่ถูกผ่าครึ่งถ่ายภาพจากกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 5000 เท่า

4.1.3 ขนาดของ starch microsphere

ขนาดของ starch microsphere ที่วัดได้จากกล้องจุลทรรศน์และวิเคราะห์ออกมาเป็นค่าการกระจายตัวของขนาด starch microsphere ดังรูปที่ 4.1 พบว่า อุณหภูมิในการเตรียมมีผลต่อขนาดของ starch microsphere ที่ได้ โดยที่อุณหภูมิการเตรียม 4 °C จะได้ starch microsphere ที่มีขนาดใหญ่กว่าและมีช่วงที่กว้างกว่า starch microsphere อุณหภูมิการเตรียม 30 °C โดยที่ระยะเวลาการเตรียม 1 ชั่วโมง starch microsphere จะมีขนาดใหญ่ที่สุดประมาณ 30-40 μm และขนาดจะค่อยๆลดลงเมื่อระยะเวลาการเตรียมที่นานขึ้น ที่ระยะเวลาการเตรียม 24 ชั่วโมง starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 4 °C จะมีขนาดประมาณ 5-15 μm ส่วน starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 30 °C จะมีขนาดเล็กกว่า starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 4 °C เล็กน้อย และที่ระยะเวลาการเตรียม 24 ชั่วโมง starch microsphere จะมีขนาดใกล้เคียงกับ starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 4 °C

4.1.4 คุณสมบัติทางความร้อน

การตรวจวัดสมบัติทางความร้อนโดยใช้เครื่อง DSC เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงที่บอกถึงพลังงานที่ให้กับตัวอย่างในการเปลี่ยนสถานะหรือในการเกิดปฏิกิริยา จากผลการวิเคราะห์พบว่าแป้งมันสำปะหลังมีค่า T_o , T_p , T_c และ ΔH เท่ากับ 65.2 °C, 68.4 °C, 73.4 °C และ 14.1 J/g และเมื่อพิจารณาคุณสมบัติทางความร้อนของ starch microsphere พบว่าที่อุณหภูมิ 40-170 °C ไม่ทำให้เกิดการเจลาติไนเซชันของ starch microsphere แต่จะพบพีคเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 179-182 °C และสิ้นสุดที่อุณหภูมิ 206-232 °C และมีค่าพลังงานในการเปลี่ยนสถานะอยู่ในช่วง 16525-18270 J/g ซึ่งมีค่าสูงมากกว่าแป้งในธรรมชาติหรือแป้งที่ผ่านการดัดแปรมาก และไม่พบพีคและค่าพลังงานในการเปลี่ยนสถานะเป็นเจลในช่วงอุณหภูมิที่เกิดการเจลาติไนเซชัน และเมื่อพิจารณาจากลักษณะของตัวอย่างหลังวิเคราะห์พบว่าทุกตัวอย่าง starch microsphere มีลักษณะถูกเผาไหม้เป็นผงสีดำ จึงน่าจะเป็นไปได้ว่า starch microsphere มีความแข็งแรงค่อนข้างสูงไม่สามารถทำเป็นเป็นเจลได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 179 °C แต่จะเริ่มเกิดการเผาไหม้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 179-182 °C เป็นต้นไป และต้องใช้พลังงานในการเผาไหม้ตัวอย่าง starch microsphere ที่สูงมาก



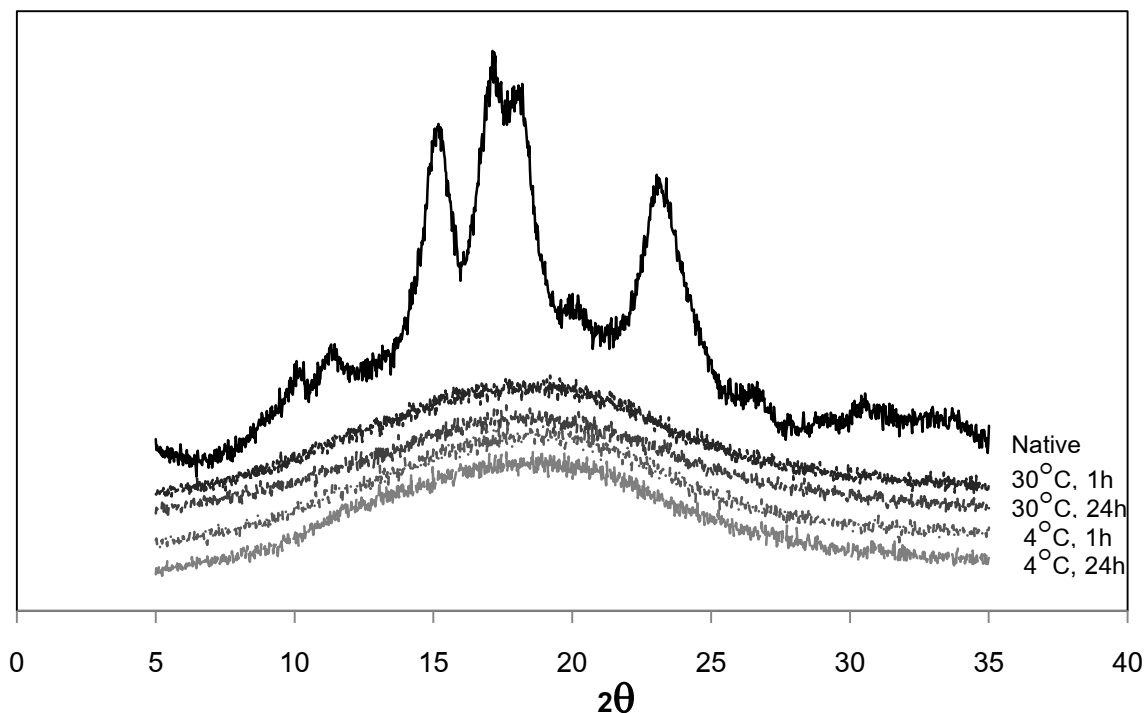
รูปที่ 5 ลักษณะการกระจายตัวของขนาดเม็ด starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °C ที่เวลา 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 2 คุณสมบัติทางความร้อนของแป้งมันสำปะหลังและ starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °C ระยะเวลา 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	T_o (°C)	T_p (°C)	T_c (°C)	ΔH (J/g)
แป้งมันสำปะหลัง	65.2	68.4	73.4	14.1
SM 30 °C, 1 h	135.2	181.2	206.4	17405.0
SM 30 °C, 6 h	169.9	180.4	214.2	16640.0
SM 30 °C, 12 h	162.4	179.0	211.5	16525.0
SM 30 °C, 24 h	137.9	182.3	232.5	18270.0
SM 4 °C, 1 h	133.4	181.2	220.8	17190.0
SM 4 °C, 6 h	157.6	179.7	218.3	17055.0
SM 4 °C, 12 h	157.5	176.2	207.4	17130.0
SM 4 °C, 24 h	156.8	181.9	209.9	17005.0

4.1.5 โครงสร้างผลึก

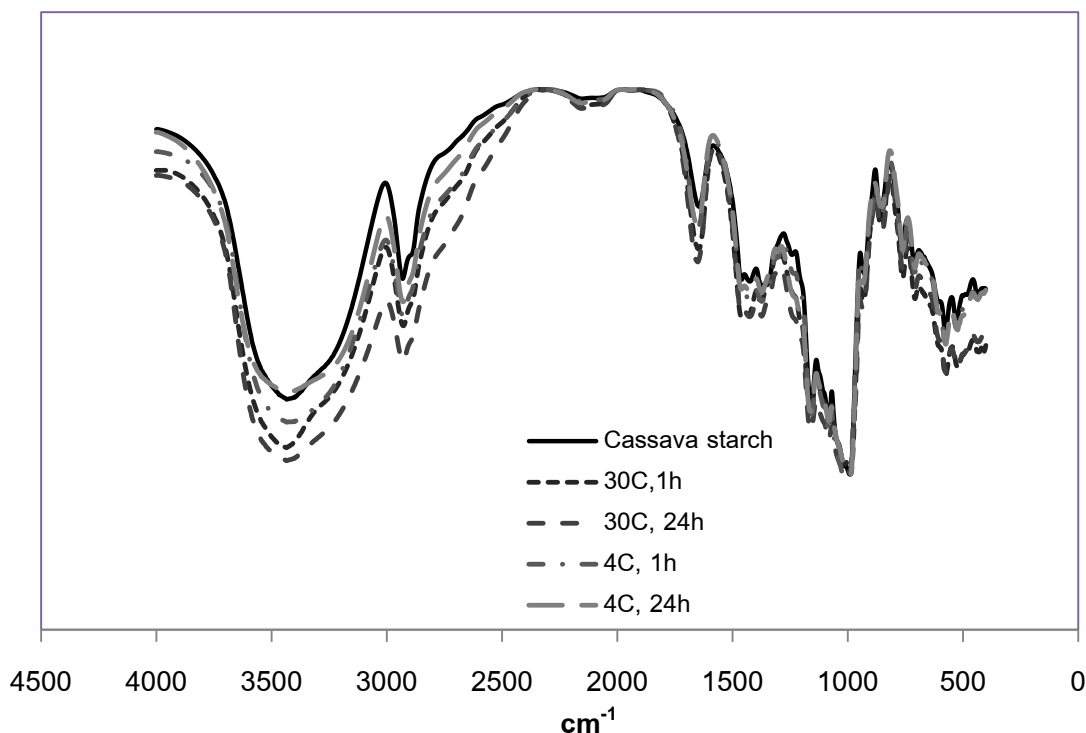
รูปที่ 6 แสดงโครงสร้างผลึกของแป้ง native และ starch microsphere โดยแสดงเฉพาะตัวอย่างที่ระยะเวลาการเตรียมน้อยที่สุดและมากที่สุด พบว่าแป้งมันสำปะหลังมีโครงสร้างแบบกึ่งผลึก (semi-crystalline structure) เป็นแบบ C_A โดยมีพีคที่เห็นได้ชัดเจนที่ตำแหน่ง 15, 23 และอีก 2 พีคที่ตำแหน่ง 17, 18 ในขณะที่ starch microsphere ที่เตรียมโดยวิธี water in water emulsion crosslink มีโครงสร้างแบบไม่เป็นผลึก (amorphous structure) ไม่พบพีคที่ตำแหน่งใดๆ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่รายงานว่าวิธีการเตรียมแบบ emulsion crosslink จะทำให้ได้ starch microsphere ที่เป็น amorphous structure (Li และคณะ, 2012) ซึ่งความเป็นผลึกจะเป็นตัววัดความแข็งแรงของโครงสร้าง ซึ่งถ้ามีความเป็นผลึกมากน่าจะทำให้โครงสร้างมีความแข็งแรงมากกว่าแบบ amorphous



รูปที่ 6 ลักษณะโครงสร้างผลึกของแป้งมันสำปะหลังและ starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °C เวลา 1 และ 24 ชั่วโมง

4.1.6 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชัน

รูปที่ 7 แสดงหมู่ฟังก์ชันของแป้งมันสำปะหลังและ starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °C เวลา 1 และ 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง FT-IR พบว่า แป้งมันสำปะหลังมีฟังก์ชันของหมู่ฟังก์ชันหลัก ได้แก่ ฟังก์ชันที่ตำแหน่งที่ 3434 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ -OH ฟังก์ชันที่ตำแหน่ง 2931 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ C-H stretching ฟังก์ชันที่ตำแหน่งที่ 1460 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ CH_2 bending (water adsorbed in amorphous region) ฟังก์ชันที่ตำแหน่งที่ 1081 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ C-O-H bending ฟังก์ชันที่ตำแหน่งที่ 860 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ C-H , CH_2 deformation และฟังก์ชันที่ตำแหน่งที่ 763 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ C-C stretching อ้างอิงจากงานวิจัยของ Kizil และคณะ (2002) และเมื่อวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของ starch microsphere พบว่า มีฟังก์ชันที่ตำแหน่ง 3434 , 2928 , 1459 , 1160 , 1082 , 761 cm^{-1} เช่นเดียวกับที่พบในแป้งมันสำปะหลัง แต่จะพบฟังก์ชันเพิ่มขึ้นที่ตำแหน่ง 1303 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงหมู่ฟังก์ชันของ organic phosphate P-O และ P=O ที่ตำแหน่ง 1016 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงหมู่ P-O-C และที่ตำแหน่ง 994 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงหมู่ P-O-P (Cavalcanti และคณะ, 2005) ซึ่งบ่งบอกถึงการเกิดการครอสลิงค์ด้วยสาร TSTP ในโครงสร้างของ starch microsphere แต่จากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วย FT-IR ไม่สามารถบอกถึงความแตกต่างระหว่างกรรมวิธีการเตรียม starch microsphere ได้



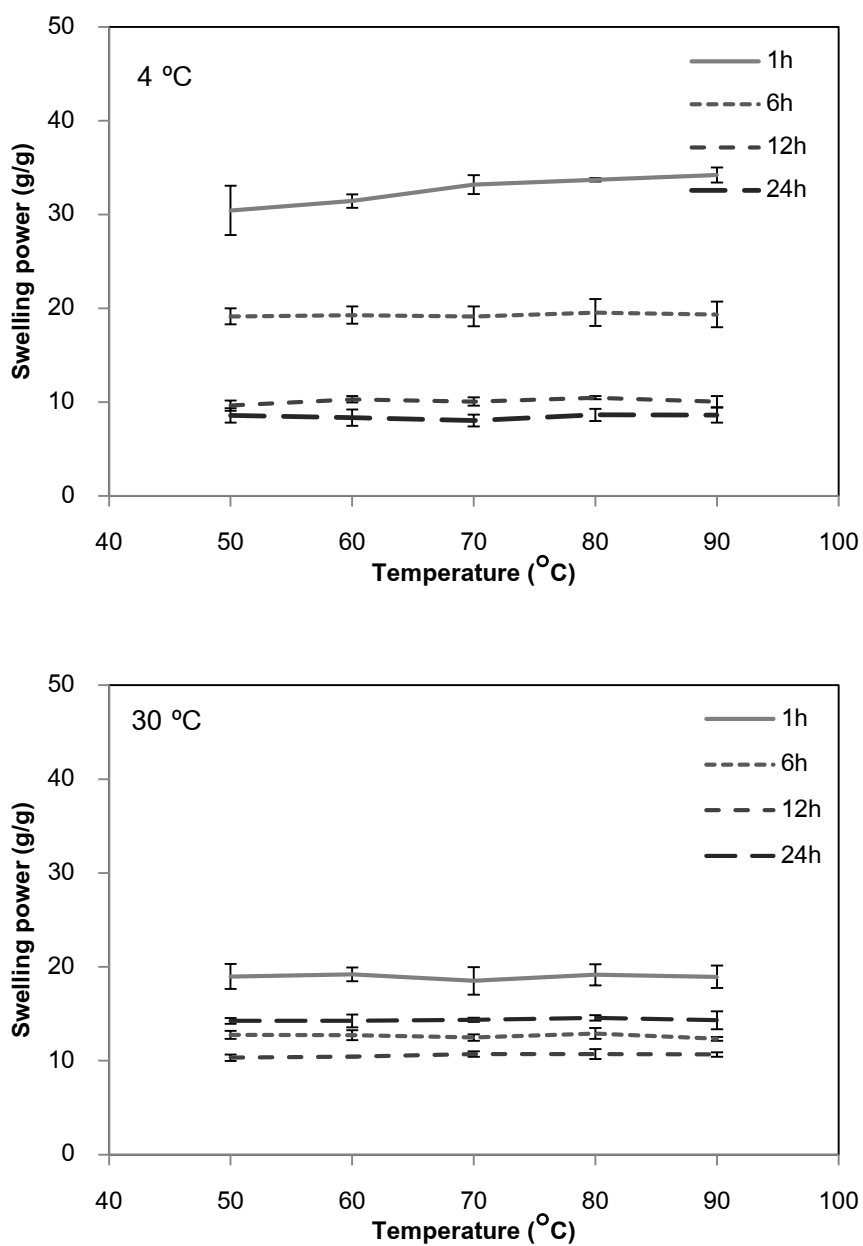
รูปที่ 7 ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของแป้งมันสำปะหลังและ starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °C เวลา 1 และ 24 ชั่วโมง

4.1.7 กำลังการพองตัวและการละลาย

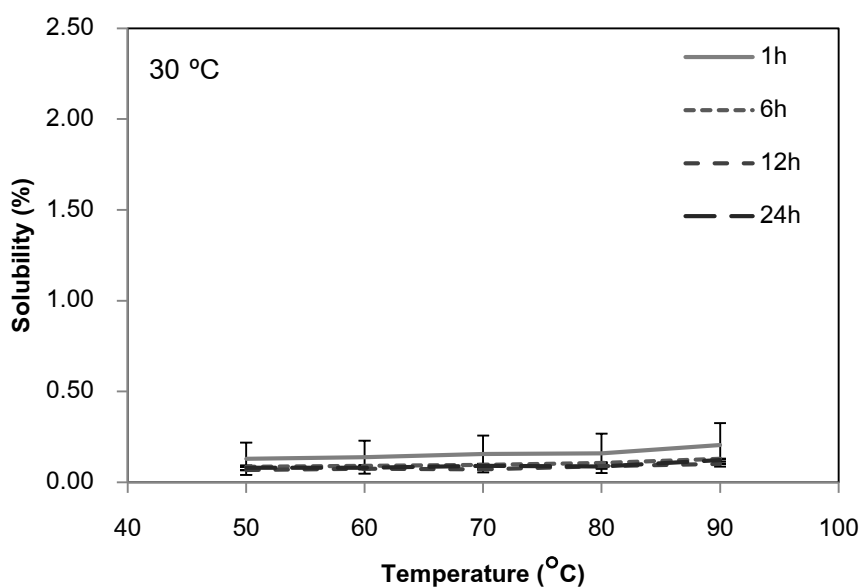
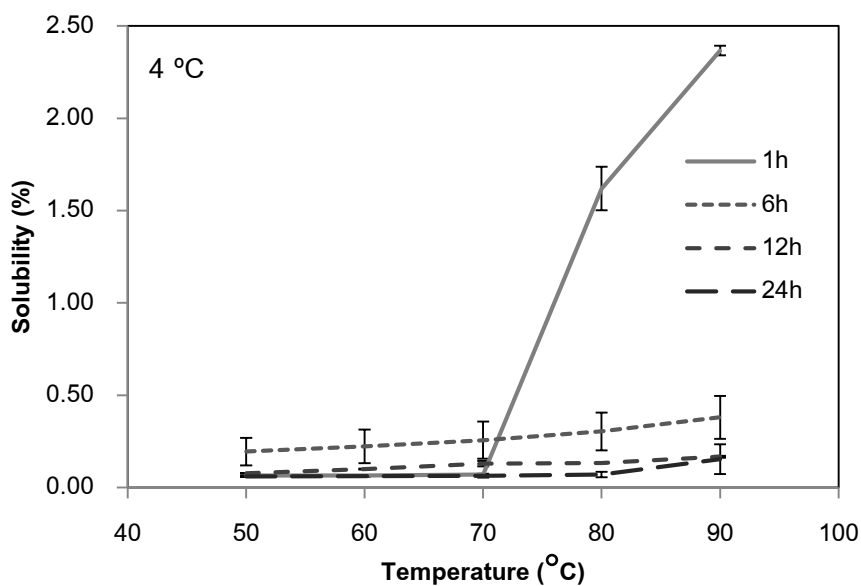
รูปที่ 8 และ 9 แสดงค่าการพองตัวและการละลายของ starch microsphere ที่อุณหภูมิ 50, 60, 70, 80 และ 90 °C พบว่าค่าการพองตัวของแป้ง native จะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น ส่วน starch microsphere จะมีค่าการพองตัวค่อนข้างคงที่ โดยมีกำลังการพองตัวที่อุณหภูมิ 50 และ 60 °C สูงกว่าแป้ง native ยกเว้น starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 4 °C ระยะเวลา 1 ชั่วโมง ที่มีกำลังการพองตัวสูง 30-35 เท่า เมื่อพิจารณาผลของระยะเวลาการเตรียมต่อการพองตัวของ starch microsphere พบว่า ระยะเวลาการเตรียมนานขึ้นทำให้กำลังการพองตัวของ starch microsphere ลดลง ยกเว้นตัวอย่างที่เตรียมที่อุณหภูมิ 30 °C ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่มีกำลังการพองตัวใกล้เคียงกับตัวอย่างที่เตรียมที่อุณหภูมิ 30 °C ระยะเวลา 1 ชั่วโมง

แป้ง native มีการละลายที่อุณหภูมิ 50, 60, 70, 80 และ 90 °C เท่ากับ 0.15, 0.51, 11.49, 18.44 และ 90.30 ตามลำดับ (ไม่ได้แสดงในรูป) ส่วน starch microsphere มีค่าการละลายที่ต่ำมาก ประมาณ 0.06-2.37% โดย starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 4 °C เวลา 1 ชั่วโมง มีค่าการละลายสูงที่สุด เนื่องจากโครงสร้างของ starch microsphere ยังไม่สมบูรณ์

และระดับการ crosslink ภายในโครงสร้างน้อยกว่าตัวอย่างอื่น ทำให้เกิดการหลุดออกของโมเลกุลเวลาให้ความร้อนได้ง่ายกว่า



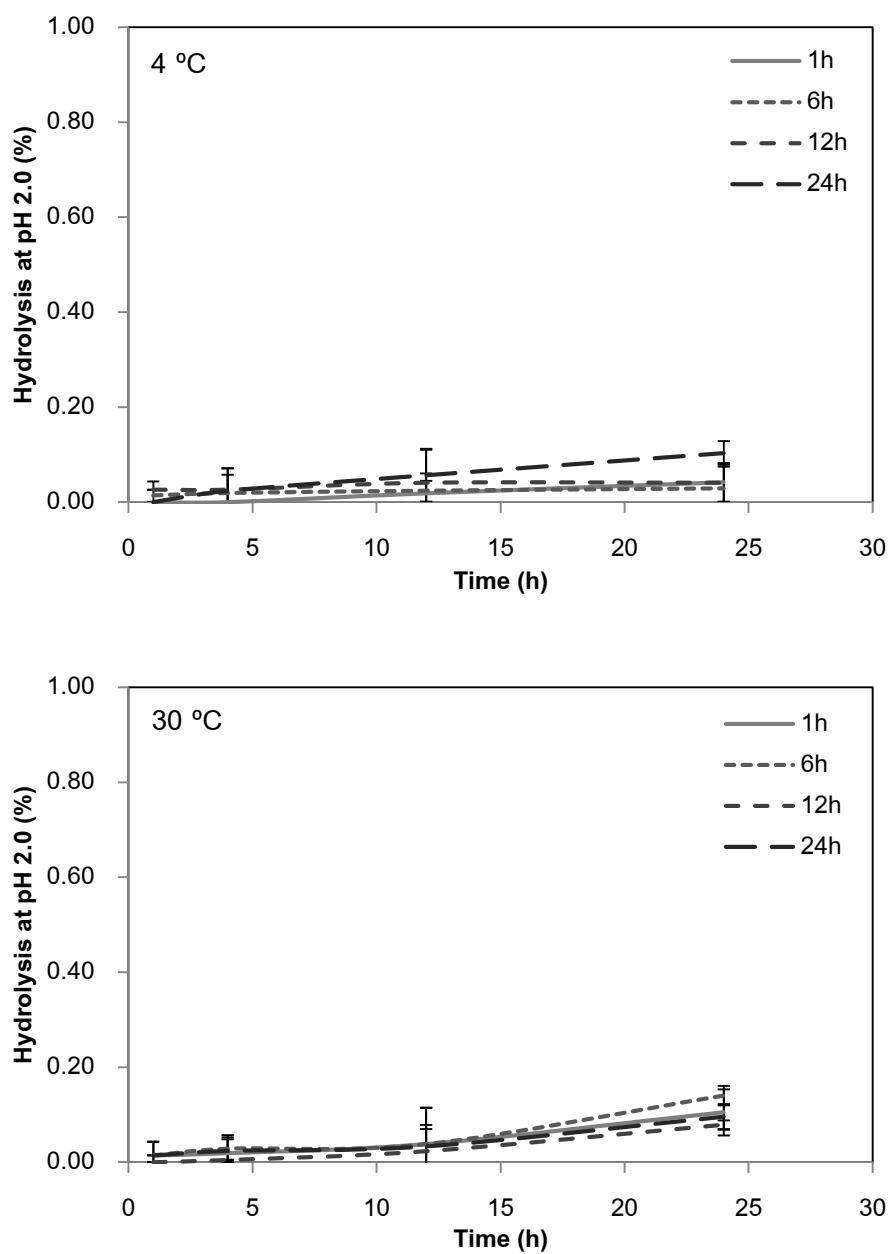
รูปที่ 8 กำลังการพองตัวของ native cassava starch และ starch microsphere ที่อุณหภูมิต่างๆ



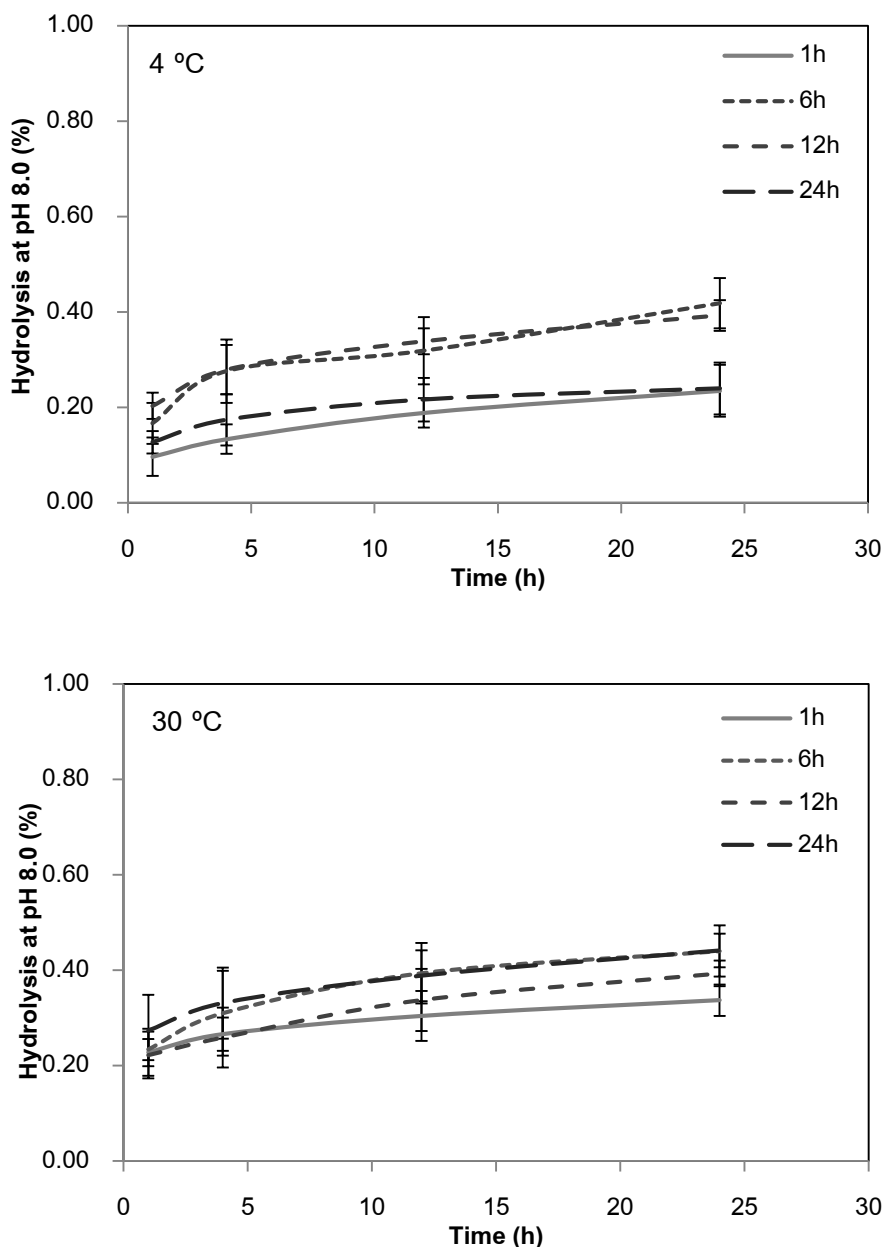
รูปที่ 9 ค่าการละลายของ starch microsphere ที่อุณหภูมิต่างๆ

4.1.8 ความคงทนต่อกรดและด่าง

จากการทดลองนำ native cassava starch และ starch microsphere ไปบ่มในกรดที่ pH 2.0 และด่างที่ pH 8.0 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า native cassava starch และ starch microsphere ทุกตัวอย่างสามารถคงทนต่อสภาวะที่เป็นกรด pH 2.0 และที่สภาวะด่าง pH 8.0 ได้อย่างดี (รูปที่ 10 และ 11)



รูปที่ 10 ความคงทนต่อสภาวะกรด pH 2.0 ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ของ native cassava starch และ starch microsphere

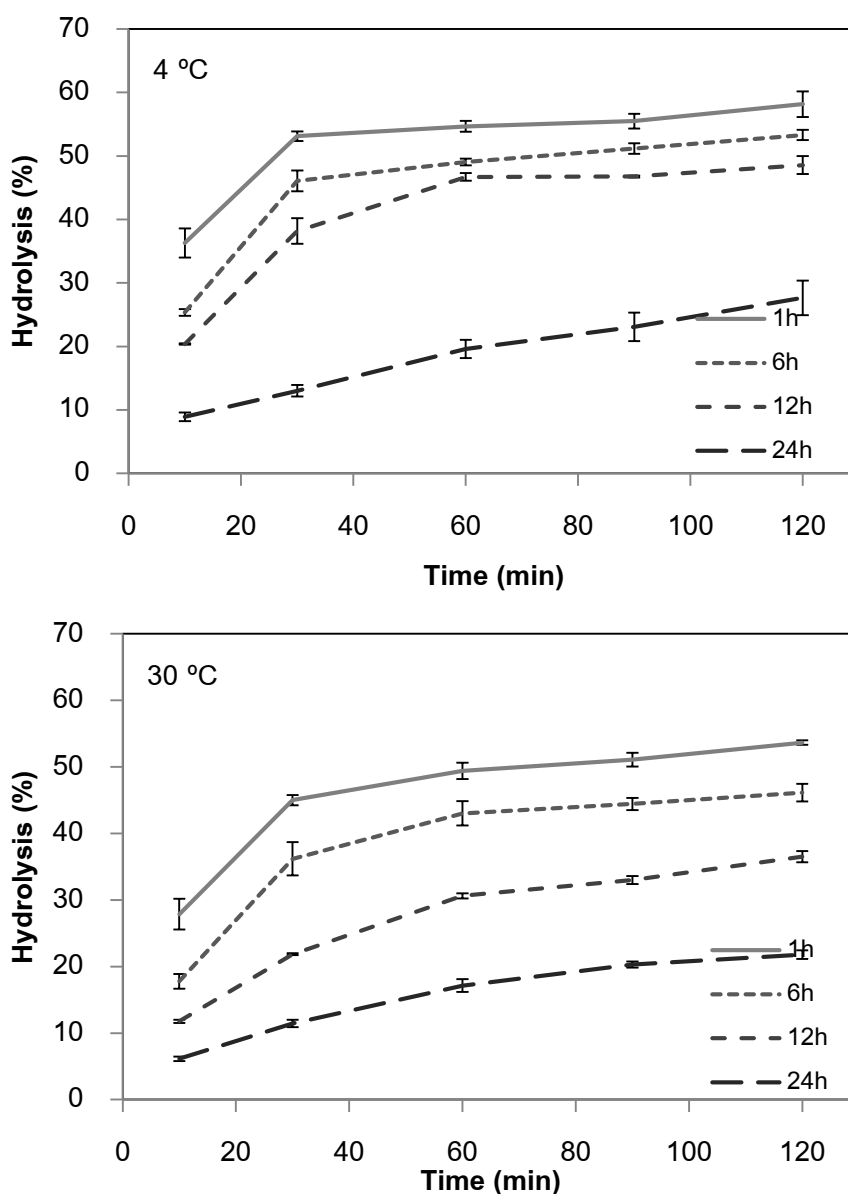


รูปที่ 11 ความคงทนต่อสภาวะต่าง pH 8.0 ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ของ native cassava starch และ starch microsphere

4.1.9 ความคงทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ α -amylase

รูปที่ 12 แสดงค่าการย่อยด้วยเอนไซม์ของ starch microsphere เปรียบเทียบกับแป้ง native พบว่า แป้ง native มีค่าการย่อยด้วยเอนไซม์สูงสุด 5.67% ในขณะที่ starch microsphere ทุกตัวอย่างมีค่าการย่อยด้วยเอนไซม์สูงกว่าแป้ง native เนื่องจากการทดลองวิเคราะห์ในลักษณะที่เป็น granule โดยไม่ได้มีการเจลาติไนซ์ก่อน ซึ่งในธรรมชาติแป้ง raw starch จะมีความเป็น resistant starch สูงอยู่แล้ว ส่วน starch microsphere เป็นอนุภาคที่เกิดจากการสร้าง

พันธะระหว่างโมเลกุลขึ้นใหม่ภายในอนุภาคซึ่งมีลักษณะโครงสร้างแบบ amorphous ทำให้เอ็นไซม์สามารถเข้าไปย่อยสลายได้ง่ายกว่า นอกจากนี้ starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 4 °C สามารถย่อยด้วยเอ็นไซม์ได้ง่ายกว่า starch microsphere ที่เตรียมที่ 30 °C และที่ระยะเวลาการเตรียมที่นานขึ้นจะทำให้ starch microsphere ถูกย่อยได้น้อยลง เนื่องจากความแข็งแรงภายในโครงสร้างที่มากขึ้นสอดคล้องกับค่า crosslink density ที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเตรียม



รูปที่ 12 ความสามารถในการย่อยด้วยเอ็นไซม์ α -amylase ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง

4.2 การศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดจากพืช

4.2.1 การศึกษาสารสกัด α -amylase inhibitor จากพืช

ในการทดลองได้ทำการสกัดสาร α -amylase inhibitor จากพืช 5 ชนิด ได้แก่ ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวเจ้า และถั่วขาว โดยทำการสกัดโดยใช้น้ำจากนั้นตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นนำไปทำไดอะไลซิสเพื่อกำจัดเกลือออก นำสารตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์หา Protein content, specific amylase activity, total amylase inhibitor activity, specific amylase inhibitor activity และ %inhibition (ตารางที่ 3) พบว่าปริมาณโปรตีน ในข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ และถั่วขาวสูงกว่าในสารสกัดจากข้าวฟ่างและข้าวเจ้า โดยมีปริมาณโปรตีนมากกว่า 10 mg/ml ในขณะที่ข้าวฟ่างและข้าวเจ้ามีปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกันคือประมาณ 5-6 mg/ml เมื่อนำไปหา specific activity ของ α -amylase inhibitor พบว่า สารสกัดจากข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์และถั่วขาวมีค่า specific activity ของ α -amylase inhibitor ต่ำกว่าข้าวฟ่างและข้าวเจ้า เมื่อหาค่า %inhibition พบว่าสารสกัดจาก ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง ข้าวเจ้า และถั่วขาว มี %inhibition ประมาณ 12-30% ยกเว้นสารสกัดจากข้าวบาร์เลย์ที่มี %inhibition ต่ำสุด คือ 0.32% ในการที่ %inhibition ของข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี และถั่วขาวต่ำ เนื่องจากสารสกัดที่นำมาวิเคราะห์อยู่ในรูปของ crude protein ซึ่งพืชทั้ง 3 ชนิด มีค่า specific activity ของ amylase สูงกว่า ข้าวฟ่าง และข้าวเจ้า จึงน่าจะเป็นเพราะโปรตีนที่พบในข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี และถั่วขาวมีปริมาณของ α -amylase มากกว่า α -amylase inhibitor เช่นเดียวกับที่มีค่า specific activity ของ α -amylase inhibitor ต่ำกว่าข้าวฟ่างและข้าวเจ้าด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 3 Protein content, specific amylase activity, total amylase inhibitor activity, specific amylase inhibitor activity และ %inhibition ของสารสกัดจากข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวเจ้า และถั่วขาว

	Protein content (mg/ml)	Specific amylase activity (Unit/mg protein)	Total amylase inhibitor activity (Unit/ml)	Specific amylase inhibitor activity (Unit/mg protein)	%Inhibition
ข้าวสาลี	18.16	1.07	1.31	0.07	17.66
ข้าวบาร์เลย์	12.76	1.42	0.03	0.01	0.32
ข้าวฟ่าง	4.55	0.98	1.61	0.35	21.73
ข้าวเจ้า	5.92	0.81	2.26	0.38	30.57
ถั่วขาว	19.5	1.02	0.88	0.05	11.96

4.2.2 ศึกษาการดูดซับสารสกัดด้วย starch microsphere

ในการทดลองการนำไปดูดซับกับ starch microsphere เลือก starch microsphere ที่เตรียมที่ 4 °C ระยะเวลา 24 h เป็นตัวดูดซับสารสกัดจากพืชทั้ง 5 ชนิด เนื่องจากสามารถทนต่อการย่อย กรด-ด่าง และอุณหภูมิได้ดี โดยกำหนดให้มีปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเท่ากันก่อนนำไปดูดซับด้วย starch microsphere การดูดซับจะทำโดยใช้ starch microsphere น้ำหนัก 1 g เติมลงในสารสกัดปริมาตร 20 mL ที่มีปริมาณโปรตีน 1 และ 10 mg กวนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อป้องกันการเสียสภาพของเอ็นไซม์ จากนั้นกรองแยกส่วนสารละลายออกจากของแข็ง นำสารละลายที่ได้มาหาปริมาณโปรตีนที่เหลือภายหลังการดูดซับ (ตารางที่ 4) พบว่า starch microsphere มีความสามารถในการดูดซับสารสกัดจากพืชแตกต่างกัน ที่การทดลองโดยใช้โปรตีน 1 mg พบว่าค่าการดูดซับจะอยู่ในช่วง 8-13% และการใช้โปรตีน 10 mg พบว่าจะมีเปอร์เซ็นต์การดูดซับอยู่ในช่วง 19-47% การเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีน 10 เท่า สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การดูดซับได้ประมาณ 2-5 เท่า และสารสกัดจากข้าวฟ่างสามารถถูกดูดซับได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดจากข้าวเจ้า ข้าวสาลี ถั่วขาว และข้าวบาร์เลย์ ตามลำดับ เนื่องจาก starch microsphere ที่เตรียมได้จากการทดลองมีลักษณะกลม พื้นผิวเรียบและไม่มีรูพรุน ซึ่งความสามารถในการดูดซับสารของ starch microsphere นั้น น่าจะขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุลของสารที่ถูกดูดซับ สารโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าน่าจะถูกดูดซับได้ดีกว่าสารโปรตีนโมเลกุลใหญ่ แต่เนื่องจากการทดลองนี้เป็นการวัดค่าปริมาณโปรตีนจากสารละลายที่เหลือจากการกวน ซึ่งปริมาณโปรตีนที่หายไปอาจไม่ใช่ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ถูกดูดซับ เนื่องจากอาจมีโปรตีนบางส่วนที่เกาะอยู่บริเวณผิวรอบนอกของ starch microsphere และถูกชะล้างออกไปในระหว่างการเตรียมตัวอย่าง

ตารางที่ 4 ค่าการดูดซับสารสกัดโปรตีนปริมาณ 1 และ 10 mg ด้วย starch microsphere ที่เตรียมที่อุณหภูมิ 4 °C ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

สารสกัด	การดูดซับสารโปรตีน 1 mg (%)	การดูดซับสารโปรตีน 10 mg (%)
ข้าวสาลี	8.47	21.91
ข้าวบาร์เลย์	9.40	18.92
ข้าวฟ่าง	8.18	47.02
ข้าวเจ้า	13.49	27.22
ถั่วขาว	8.66	19.05

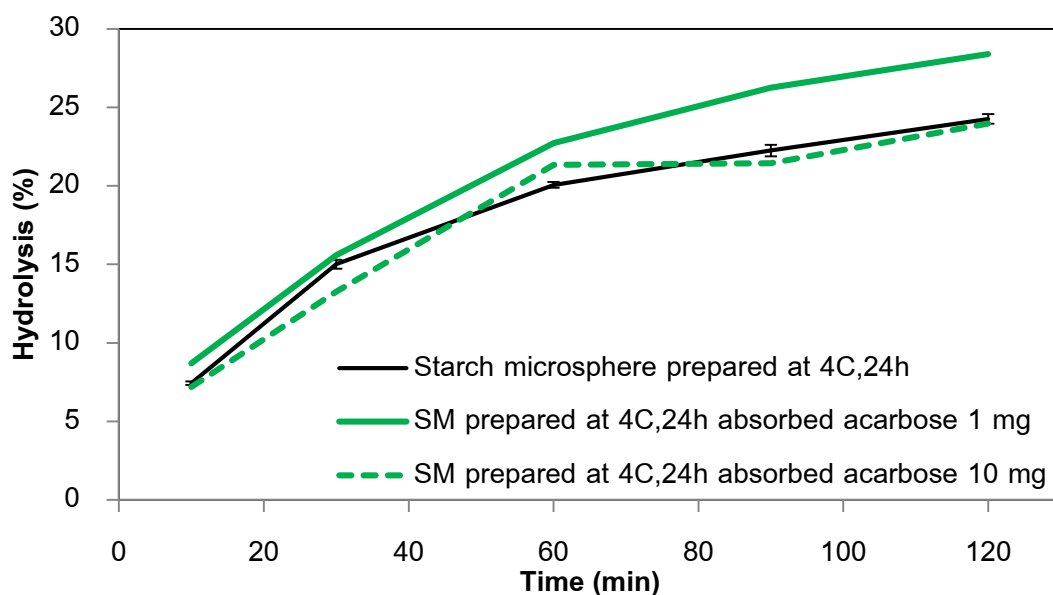
4.2.3 ศึกษาการทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ α -amylase ของ starch microsphere ที่ดูดซับด้วยสารสกัดทั้ง 5 ชนิด

การศึกษาการปลดปล่อยสาร α -amylase inhibitor ที่คาดว่าถูกดูดซับด้วย starch microsphere โดยนำตัวอย่าง starch microsphere ที่ดูดซับสารสกัดจากพืชทั้ง 5 ชนิด จากหัวข้อ 4.2.2 ทำการวิเคราะห์ % inhibition ของ α -amylase inhibitor โดยเปรียบเทียบกับการย่อย starch microsphere ที่ไม่ได้ดูดซับ พบว่า starch microsphere ที่ดูดซับสารสกัดทั้ง 5 ชนิดสามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ α -amylase ได้ดีกว่า starch microsphere ที่ดูดซับสารสกัด ทำให้ไม่สามารถคำนวณ % inhibition ได้ เนื่องจากในการดูดซับสารแต่ละชนิดเข้าไปในโครงสร้างของ starch microsphere นั้น มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายอย่าง เช่น พื้นที่ผิว ความมีรูพรุน และความมีประจุของสารดูดซับ นอกจากนั้นยังเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของสารที่ถูกดูดซับด้วย เช่น ขนาดของโมเลกุลของสารที่ถูกดูดซับ ความมีประจุ ความสามารถในการละลาย และอื่นๆ ซึ่งจากที่กล่าวมาว่าสารสกัดที่ได้จากพืชทั้ง 5 ชนิด เป็นสารที่อยู่ในรูปของ crude protein ที่มีเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อย พันธะ α ,1-4 ในโมเลกุลของแป้งรวมอยู่ด้วย นอกจากนั้นเอนไซม์ดังกล่าวยังมี activity มากกว่า activity ของ α -amylase inhibitor ที่พบในสารสกัดด้วย โดยมีรายงานว่า α -amylase/subtilisin inhibitor จาก cereal มีความจำเพาะสูงต่อ target α -amylase (Yamagata และคณะ, 1998) เมื่อทำการดูดซับ ส่วนที่ถูกดูดซับเข้าไปในโมเลกุลของ starch microsphere อาจจะเป็นเอนไซม์ในกลุ่มที่ทำหน้าที่ย่อยแป้ง เช่น α -amylase แทนที่จะเป็น α -amylase inhibitor อย่างที่คาดไว้ในตอนแรก แต่เพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าสาร α -amylase inhibitor สามารถที่จะถูกดูดซับได้โดย starch microsphere จึงได้ทำการทดสอบโดยใช้ acarbose ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ α -amylase ได้ดี มาใช้เป็นสารทดสอบต่อไป

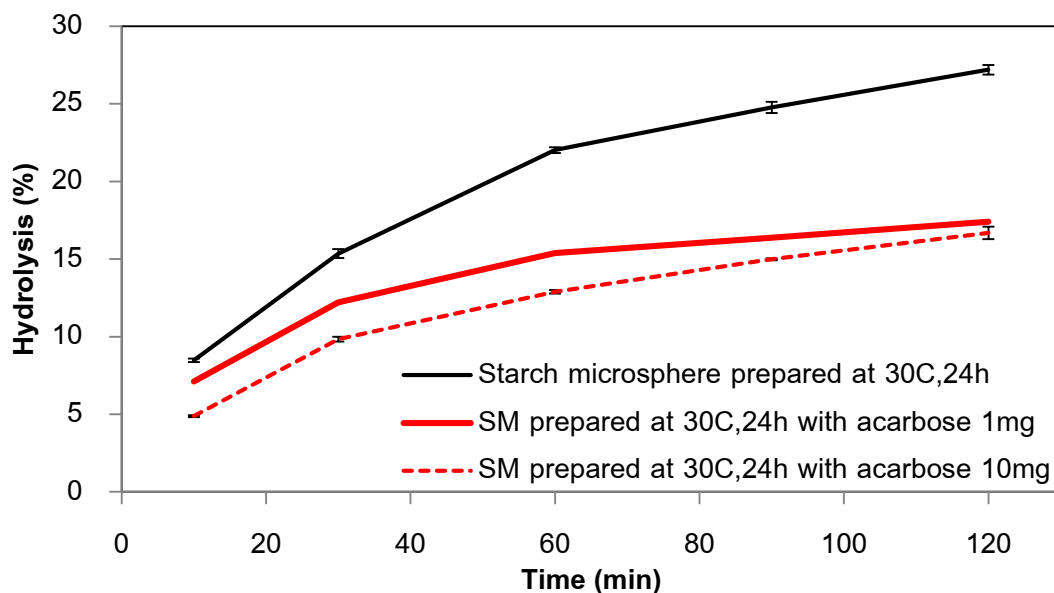
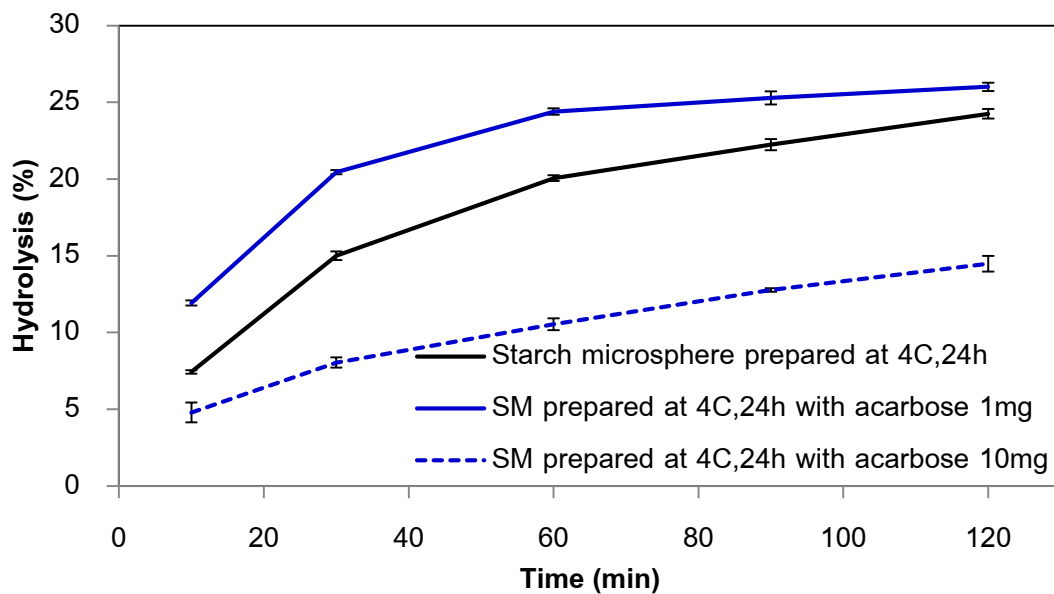
4.2.4 ความสามารถในการถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ α -amylase ของ starch microsphere ที่ดูดซับสาร acarbose

จากการนำสาร acarbose ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -amylase มาใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ α -amylase ของ starch microsphere ที่ดูดซับสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -amylase จากการเตรียม 2 วิธี ได้แก่ 1) การบรรจุสาร acarbose พร้อมกับการเตรียม starch microsphere และ 2) การดูดซับสาร acarbose ภายหลังการเตรียม starch microsphere พบว่า starch microsphere ที่เตรียมที่ 4 °C 24 h ที่ใช้วิธีการดูดซับสาร acarbose ภายหลัง มีค่าการย่อยด้วยเอนไซม์ α -amylase ไม่แตกต่างจาก starch microsphere ที่ไม่ได้ดูดซับสาร acarbose (รูปที่ 13) ส่วน starch microsphere ที่เตรียมที่ 4 °C เวลา 24 h ที่ใช้วิธีการบรรจุสาร acarbose แบบเตรียมพร้อมกับการเตรียม starch microsphere มีประสิทธิภาพลดการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

α -amylase โดยที่ความเข้มข้นของ acarbose 10 mg สามารถลดการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ α -amylase ที่เวลา 2 ชั่วโมงจาก 23% เหลือ 13-15% ขึ้นกับอุณหภูมิที่ใช้ในการเตรียม starch microsphere (รูปที่ 14) โดยที่อุณหภูมิการเตรียมที่ 4 °C น่าจะสามารถบรรจุสาร acarbose ได้มากกว่าที่อุณหภูมิ 30 °C เนื่องจากสามารถลดการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ α -amylase ได้มากกว่า แต่ทั้งนี้ความเข้มข้นของสารที่ต้องการบรรจุควรต้องมีปริมาณที่เหมาะสม การใช้สารที่ความเข้มข้นต่ำอาจทำให้ประสิทธิภาพการบรรจุสารลดลง



รูปที่ 13 ความสามารถในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ α -amylase ของ starch microsphere ที่เตรียมที่ 4 °C เวลา 24 ชั่วโมง ที่ดูดซับสาร acarbose ความเข้มข้น 1 และ 10 mg ภายหลังการเตรียม starch microsphere เปรียบเทียบกับการย่อย starch microsphere ที่ไม่ผ่านการดูดซับสาร acarbose



รูปที่ 14 ความสามารถในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ α -amylase ของ starch microsphere ที่เตรียมที่ 4 และ 30 °C เวลา 24 ชั่วโมง ที่เตรียมโดยบรรจุสาร acarbose ความเข้มข้น 1 และ 10 mg พร้อมกับการเตรียม starch microsphere เปรียบเทียบกับการย่อย starch microsphere ที่ไม่ผ่านการดูดซับสาร acarbose

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง

5.1 บทสรุป

จากผลการทดลองเตรียม starch microsphere โดยวิธี water in water emulsion crosslink ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °C ระยะเวลาการเตรียม 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด starch microsphere ได้ แต่ starch microsphere ที่ได้มีลักษณะภายนอก ขนาด และรูปร่างแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและระยะเวลา อุณหภูมิต่ำ การเกิดปฏิกิริยาในการสร้าง starch microsphere จะเป็นไปช้ากว่าที่อุณหภูมิสูง ทำให้ starch microsphere ที่ได้ มีขนาดใหญ่ เกาะติดกัน และมีรูพรุนจำนวนมากภายในโครงสร้างของ starch microsphere ที่ระยะเวลาการเตรียม 1, 6 และ 12 ชั่วโมง แต่เมื่อระยะเวลาการเตรียมนานเป็น 24 ชั่วโมง ค่า crosslink density ของ starch microsphere ที่เตรียมที่ 4 และ 30 °C จะใกล้เคียงกันและลักษณะปรากฏของอนุภาค starch microsphere จะคล้ายกัน และ starch microsphere ที่เตรียมได้จะมีความคงทนต่อสภาวะที่เป็นกรด pH 2.0 และด่าง pH 8.0 ได้ดี โดยสามารถถูกย่อยได้ที่สภาวะความเป็นด่างมากกว่าสภาวะที่เป็นกรด นอกจากนี้ starch microsphere ที่ได้สามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ α -amylase

เมื่อนำสารสกัดจากพืชธรรมชาติ 5 ชนิด ได้แก่ ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวเจ้า และถั่วขาว ซึ่งตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล (α -amylase) รวมทั้งเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล (α -amylase inhibitor) อยู่รวมกัน ทำให้ไม่สามารถหาค่าการยับยั้งเอนไซม์ α -amylase ได้ เมื่อนำสาร acarbose ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ α -amylase มาทดสอบการดูดซับ 2 วิธี คือ การเตรียม starch microsphere พร้อมสาร และการเตรียม starch microsphere แล้วค่อยดูดซับสาร พบว่าการเตรียม starch microsphere พร้อมสารมีประสิทธิภาพในการบรรจุสารได้ดีกว่า

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การทดสอบการดูดซับสารสกัดโปรตีนจากพืชสกัดควรทำการแยก α -amylase inhibitor ให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาทำการดูดซับ เนื่องจากโปรตีนที่สกัดได้จากพืชประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด และเอนไซม์แต่ละชนิดก็อาจจะมีความสามารถในการดูดซับได้ไม่เท่ากัน
2. วิธีการบรรจุสารแบบเตรียมไปพร้อม starch microsphere มีประสิทธิภาพมากกว่าการนำไปดูดซับภายหลัง แต่มีข้อจำกัดเรื่องวิธีการเตรียม เนื่องจากวิธีการเตรียม starch microsphere แบบ water-water emulsion crosslink จำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นสูงในการช่วยการแตกตัวของเม็ดแป้ง ทำให้ไม่เหมาะในการนำมาใช้ในการบรรจุสารโปรตีนซึ่ง

อาจเกิดการเสียสภาพได้ อาจมีการปรับวิธีการเตรียมสารละลายแบ่งโดยใช้ความร้อน แทนการใช้ NaOH

3. ระดับการ crosslink มีผลต่อความแข็งแรงของ starch microsphere และน่าจะมีผลต่อการบรรจุสารและปลดปล่อยสาร ควรมีการเปรียบเทียบการใช้สาร crosslink และการไม่ใช้สาร crosslink รวมถึงขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา crosslink ว่าการเติมสารที่ขั้นตอนใด สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการบรรจุสารหรือปลดปล่อยสารได้มากที่สุด
4. การเตรียม starch microsphere ที่อุณหภูมิ 30 °C จะมีการเกิดปฏิกิริยาที่เร็วกว่าที่ 4 °C ดังนั้นการนำมาใช้งาน ที่อุณหภูมิ 30 °C จะใช้ระยะเวลาการเตรียมที่น้อยกว่า อาจจะอยู่ในช่วง 12-24 ชั่วโมง ซึ่งควรทำการทดลองให้ละเอียดมากขึ้นเพื่อดูระยะเวลาที่เหมาะสม เนื่องจากการใช้ระยะเวลาที่มากเกินไปจะทำให้ starch microsphere มีการพองตัวที่เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บสาร

เอกสารอ้างอิง

- Abe, J., Sidenius, U. and Svensson, B., 1993, "Arginine is essential for the alpha-amylase inhibitory activity of the alpha-amylase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds", **Biochemical Journal**, Vol. 293 (Pt 1), pp. 151-5.
- Atyabi, F., Manoochehri, S., Moghadam, S. H. and Dinarvand, R., 2006, "Cross-linked starch microspheres: effect of cross-linking condition on the microsphere characteristics", **Archives of Pharmacal Research**, Vol. 29, No. 12, pp. 1179-1786.
- Batalia, M. A., Monzingo, A. F., Ernst, S., Roberts, W. and Robertus, J. D., 1996, "The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein family", **Nature Structural & Molecular Biology**, Vol. 3, No. 1, pp. 19-22.
- Björk, E., Bjurström, S. and Edman, P., 1991, "Morphologic examination of rabbit nasal mucosa after nasal administration of degradable starch microspheres", **International Journal of Pharmaceutics**, Vol. 75, No. 1, pp. 73-79.
- Blanco-Labra, A. and Iturbe-ChiñAs, F. A., 1981, "Purification and characterization of an α -amylase inhibitor from maise (*Zea maise*)", **Journal of Food Biochemistry**, Vol. 5, No. 1, pp. 1-17.
- Cavalcanti, O. A., Silva, C. C., Pineda, E. A. G. and Hechenleitner, A. A. W., 2005, "Synthesis and characterization of phosphated crosslinked chondroitin sulfate: Potential ingredient for specific drug delivery", **Acta Farmacéutica Bonaerense**, Vol. 24, No. 2, pp. 234-238.
- Elfstrand, L., Eliasson, A.-C., Jönsson, M., Larsson, M., Simpraga, A., Thelin, B. and Wahlgren, M., 2007, "Recrystallization of waxy maize starch during manufacturing of starch microspheres for drug delivery: Influence of excipients", **Carbohydrate Polymers**, Vol. 69, No. 4, pp. 732-741.
- Elfstrand, L., Eliasson, A.-C., Jönsson, M., Reslow, M. and Wahlgren, M., 2006, "From starch to starch microsphere: Factors controlling the microspheres quality", **Starch - Stärke**, Vol. 58, pp. 381-390.
- Elfstrand, L., Eliasson, A.-C. and Wahlgren, M., 2009, "Changes in starch structure during manufacturing of starch microspheres for use in parenteral drug formulations: Effects of temperature treatment", **Carbohydrate Polymers**, Vol. 75, No. 1, pp. 157-165.

Fang, Y.-y., Wang, L.-j., Li, D., Li, B.-z., Bhandari, B., Chen, X. D. and Mao, Z.-h., 2008, "Preparation of crosslinked starch microspheres and their drug loading and releasing properties", **Carbohydrate Polymers**, Vol. 74, No. 3, pp. 379-384.

Feng, G. H., Richardson, M., Chen, M. S., Kramer, K. J., Morgan, T. D. and Reeck, G. R., 1996, " α -amylase inhibitors from wheat: Amino acid sequences and patterns of inhibition of insect and human α -amylases", **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Vol. 26, No. 5, pp. 419-426.

Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R. and Grossi-de-Sá, M. F., 2002, "Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases", **European Journal of Biochemistry**, Vol. 269, No. 2, pp. 397-412.

Franssen, O. and Hennink, W. E., 1998, "A novel preparation method for polymeric microparticles without the use of organic solvents", **International Journal of Pharmaceutics**, Vol. 168, No. 1, pp. 1-7.

Gvozdeva, E. L., Valueva, T. A. and Mosolov, V. V., 1993, "Enzymatic oxidation of the bifunctional wheat inhibitor of subtilisin and endogenous α -amylase", **FEBS Letters**, Vol. 334, No. 1, pp. 72-4.

Hamdi, G., Ponchel, G. and Duchene, D., 1998, "An original method for studying in vitro the enzymatic degradation of cross-linked starch microspheres", **Journal of Controlled Release**, Vol. 55, No. 2-3, pp. 193-201.

Illum, L., Fisher, A. N., Jabbal-Gill, I. and Davis, S. S., 2001, "Bioadhesive starch microspheres and absorption enhancing agents act synergistically to enhance the nasal absorption of polypeptides", **International Journal of Pharmaceutics**, Vol. 222, No. 1, pp. 109-119.

Iulek, J., Franco, O. L., Silva, M., Slivinski, C. T., Bloch, C., Jr., Rigden, D. J. and Grossi de Sa, M. F., 2000, "Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new α -amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye)", **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Vol. 32, No. 11-12, pp. 1195-204.

Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y. and Bhandari, B., 2008, "Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification", **Food Hydrocolloids**, Vol. 22, No. 7, pp. 1191-1202.

Kasahara, K., Hayashi, K., Arakawa, T., Philo, J. S., Wen, J., Hara, S. and Yamaguchi, H., 1996, "Complete sequence, subunit structure, and complexes with

pancreatic alpha-amylase of an alpha-amylase inhibitor from Phaseolus vulgaris white kidney beans", **Journal Biochemistry**, Vol. 120, No. 1, pp. 177-83.

Kim, C.-J. and Lee, P., 1992, "Composite poly(vinyl alcohol) beads for controlled drug delivery", **Pharmaceutical Research**, Vol. 9, No. 1, pp. 10-16.

Kizil, R., Irudayaraj, J. and Seetharaman, K., 2002, "Characterization of irradiated starches by using ft-raman and FTIR spectroscopy", **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 50, No. 14, pp. 3912-3918.

Le Berre-Anton, V., Bompard-Gilles, C., Payan, F. and Rouge, P., 1997, "Characterization and functional properties of the alpha-amylase inhibitor (alpha-AI) from kidney bean (Phaseolus vulgaris) seeds", **Biochimica et Biophysica Acta**, Vol. 1343, No. 1, pp. 31-40.

Li, B.-z., Wang, L.-j., Li, D., Adhikari, B. and Mao, Z.-h., 2012, "Preparation and characterization of crosslinked starch microspheres using a two-stage water-in-water emulsion method", **Carbohydrate Polymers**, Vol. 88, No. 3, pp. 912-916.

Li, B.-Z., Wang, L.-J., Li, D., Bhandari, B., Li, S.-J., Lan, Y., Chen, X. D. and Mao, Z.-H., 2009a, "Fabrication of starch-based microparticles by an emulsification-crosslinking method", **Journal of Food Engineering**, Vol. 92, No. 3, pp. 250-254.

Li, B.-z., Wang, L.-j., Li, D., Chiu, Y. L., Zhang, Z.-j., Shi, J., Chen, X. D. and Mao, Z.-h., 2009b, "Physical properties and loading capacity of starch-based microparticles crosslinked with trisodium trimetaphosphate", **Journal of Food Engineering**, Vol. 92, No. 3, pp. 255-260.

Lu, S., Deng, P., Liu, X., Luo, J., Han, R., Gu, X., Liang, S., Wang, X., Li, F., Lozanov, V., Patthy, A. and Pongor, S., 1999, "Solution structure of the major alpha-amylase inhibitor of the crop plant amaranth", **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 274, No. 29, pp. 20473-8.

Lu, W. and Park, T. G., 1995, "Protein release from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: protein stability problems", **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, Vol. 49, No. 1, pp. 13-9.

Ma, U. V. L., Floros, J. D. and Ziegler, G. R., 2011, "Effect of starch fractions on spherulite formation and microstructure", **Carbohydrate Polymers**, Vol. 83, No. 4, pp. 1757-1765.

Manning, M. C., Chou, D. K., Murphy, B. M., Payne, R. W. and Katayama, D. S., 2010, "Stability of protein pharmaceuticals: an update", **Pharmaceutical Research**, Vol. 27, No. 4, pp. 544-75.

Martins, J. C., Enassar, M., Willem, R., Wieruzeski, J. M., Lippens, G. and Wodak, S. J., 2001, "Solution structure of the main alpha-amylase inhibitor from amaranth seeds", **European Journal of Biochemistry**, Vol. 268, No. 8, pp. 2379-89.

Miao, Z. and Wang, L., 2011, "The performance of starch microspheres treating wastewater", **International Conference on Materials for Renewable Energy & Environment (ICMREE)**, May 20-22, 2011, Shanghai Convention Center of Science & Technology, Shanghai, China, pp. 758-761.

Ohtsubo, K. and Richardson, M., 1992, "The amino acid sequence of a 20 kDa bifunctional subtilisin/alpha-amylase inhibitor from bran [correction of brain] of rice (*Oryza sativa* L.) seeds", **FEBS Letters**, Vol. 309, No. 1, pp. 68-72.

Pareta, R. and Edirisinghe, M. J., 2006, "A novel method for the preparation of biodegradable microspheres for protein drug delivery", **Journal of the Royal Society Interface**, Vol. 3, No. 9, pp. 573-582.

Richardson, M., 1990, "Seed storage proteins: the enzyme inhibitors", In **Methods in Plant Biochemistry**, Rogers, L. (Ed.) Academic Press, London, UK., pp. 261-307.

Rodenburg, K. W., Várallyay, E., Svendsen, I. and Svensson, B., 1995, "Arg-27, Arg-127 and Arg-155 in the beta-trefoil protein barley alpha-amylase/subtilisin inhibitor are interface residues in the complex with barley alpha-amylase 2", **Biochemical Journal**, Vol. 309, No. Pt 3, pp. 969-976.

Seki, T., Shinohara, K., Kato, N., Uchida, M., Natsume, H., Morimoto, K. and Juni, K., 2007, "A novel preparation method for microspheres of water soluble polymers using polypropyleneglycol as the dispersion medium", **Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, Vol. 55, No. 3, pp. 403-6.

Søgaard, M., Abe, J.-i., Martin-Eauclaire, M. F. and Svensson, B., 1993, " α -amylases: structure and function", **Carbohydrate Polymers**, Vol. 21, No. 2-3, pp. 137-146.

Stertman, L., Lundgren, E. and Sjöholm, I., 2006, "Starch microparticles as a vaccine adjuvant: only uptake in Peyer's patches decides the profile of the immune response", **Vaccine**, Vol. 24, No. 17, pp. 3661-8.

Yamagata, H., Kunimatsu, K., Kamasaka, H., Kuramoto, T. and Iwasaki, T., 1998, "Rice Bifunctional α -Amylase/Subtilisin Inhibitor: Characterization, Localization,

and Changes in Developing and Germinating Seeds", **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Vol. 62, No. 5, pp. 978-985.

Yamaguchi, H., 1993, "Isolation and characterization of the subunits of a heat-labile alpha-amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* white kidney bean", **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Vol. 57, No. 2, pp. 297-302.

ภาคผนวก

1. นำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการนานาชาติ 1 เรื่อง

Puncha-arnon, S. and Uttapap, D. 2013. Functional properties of cassava starch microsphere prepared by emulsion crosslink technique, International Conference on Life Science & Biological Engineering, November 7-9, 2013, Sapporo, Japan.

2. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

ยื่น manuscript สำหรับตีพิมพ์ในวารสาร Carbohydrate Polymer กำลังอยู่ในระหว่างการแก้ไข (ตามเอกสารแนบ)



ACCEPTANCE & INVITATION LETTER

2013 International Conference on Life Science & Biological Engineering

Osaka, 7-9 November, 2013

To Santhanee Pancha-arnon,

Herewith, LSBE 2013 Committee is pleased to inform you that the peer-reviewed & refereed conference paper ID: 666, titled as "Functional properties of cassava starch microsphere prepared by the emulsion crosslink technique" has been accepted for Poster presentation at the conference and publication in the Proceedings of the conference.

We would like to kindly invite you to present your research result at LSBE 2013, Osaka, Japan. Once again, thank for your support and look forward to seeing you in the LSBE Conference.

Thank you for your support of LSBE 2013. With your participation, we are assured to bring a successful academic gathering in the future.

Sincerely Yours,
LSBE Program Committee



Conference Secretariat/Email: lsbe@lsbe.org

Functional properties of cassava starch microsphere prepared by emulsion crosslink technique

Santhanee Pucha-arnon, Dudsadee Uttapap

King Mongkut's University of Technology Thonburi, 49, Soi Tientalay 25, Bangkhuntien-Chaitalay Road, Takham, Bangkhuntien, Bangkok 10150, Thailand

Abstract

Cassava starch microspheres (CSMs) were prepared according to a water-in-water emulsion crosslink technique using trisodium trimetaphosphate (TSTP) as a cross-linking agent. A dispersed phase solution containing 5% soluble cassava starch, 2% NaOH and 4% TSTP was poured slowly into a continuous phase solution (40% polyethylene glycol) under constant mechanical stirring. The emulsion was maintained at 4°C (or 30°C) for 30 min, and then kept for 1 h (or 24 h) without stirring. The CSMs obtained were investigated for their morphology, particle size distribution, crystalline pattern, FTIR spectra, swelling power and solubility. The CSMs were mostly spherical in shape with smooth surface and size ranging between 1-150 μm , except those prepared by emulsification at 4°C and incubation for 1 h, in which some of CSMs were not fully developed. All CSMs prepared under different conditions showed non-crystalline structure and their FTIR spectra were similar. The CSMs prepared at 4°C and incubation time of 1 h exhibited the highest swelling power (32-34x) and solubility (1.3-2.3%). Regardless of incubation time (1 or 24 h), swelling powers of CSMs prepared at 30°C were comparable (18-19x); while the CSMs prepared at 4°C and incubation time of 24 h displayed the lowest swelling power (8-9x).

Keywords: Cassava starch, Starch microsphere, Emulsion crosslink technique, Functional properties