

ผลของกระบวนการผลิตและการเก็บรักษาต่อเสถียรภาพของแอนโทไซยานินในน้ำเม่า *Antidesma* sp.



นายเสกสรร วงศ์ศิริ

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

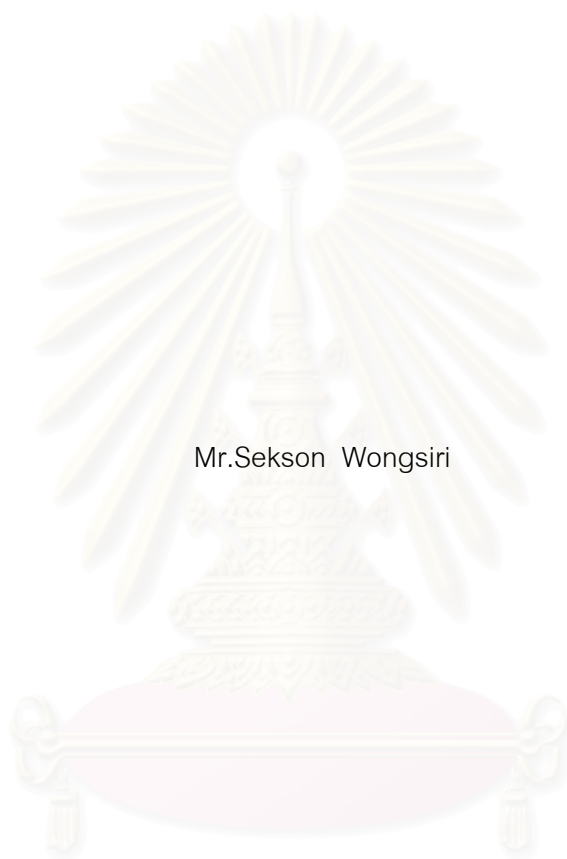
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4115-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF PROCESSING AND STORAGE ON ANTHOCYANINS STABILITY IN
THE JUICE OF MAO *Antidesma* sp.



Mr.Sekson Wongsiri

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-4115-4

4372467723 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEY WORD : ANTHOCYANINS / *Antidesma* sp. / JUICE

SEKSON WONGSIRI : EFFECTS OF PROCESSING AND STORAGE ON
ANTHOCYANINS STABILITY IN THE JUICE OF MAO *Antidesma* sp.

THESIS ADVISOR : KAITTISAK DUANGMAL, Ph.D., 108 pp.

ISBN 974-17-4115-4

Mao juice was extracted from frozen mao. The juice, pH 3.5 ± 0.1 contained 17.6 ± 0.3 °Brix total soluble solid, 17.62 ± 2.23 mg anthocyanins/100 ml juice, 311 ± 0.36 mg total phenolic compounds/100 ml juice and polyphenol oxidase (PPO) activity. The activity of this crude enzyme was $2,734 \pm 446$ units/mg protein. No vitamin C was found in the juice. The properties of PPO were studied. The pH-activity optimum was 6.5. This crude PPO retained <35% activity after incubation at pH 3.0-9.0, 0 °C for 1 hour. The temperature-activity optimum was 20 °C with $82.39 \pm 1.02\%$ of its maximum activity retained at 60 °C. The crude PPO was inactivated by heating at 85 °C for 10 min. During juice extraction vitamin C at concentration of 0, 50, 100, 150 and 200 mg per kilogram of mao were added to retard PPO activity. The result showed that there was no significant differences ($p > 0.05$) in PPO activity, total anthocyanins, total phenolic compounds, total titratable acid and hue among each treatment. Nevertheless, PPO activity tended to decrease when the amount of vitamin C increased. The more vitamin C added, the higher the levels of vitamin C remaining. Vitamin C content in each juice was 4.01 ± 0.8 , 6.08 ± 0.97 , 10.40 ± 1.03 and 13.56 ± 1.93 µg/ml, respectively. The optimum condition for pasteurization 25% mao juice was 85 °C for 10 min. This condition completely ceased PPO activity and destroyed microorganisms but retained a high anthocyanins content ($91.25 \pm 2.57\%$). The juice was filled in 300 ml clear glass bottles with 10 ml headspace and stored at 30 °C for 24 weeks. Degradation of anthocyanins in mao juice was found to be first order at a rate of 8.80×10^{-3} /day. The half life value of anthocyanins was 79 days. During storage, microbiological assay (total plate count, yeast and mold) showed negative results. The results from sensory evaluation showed that the preference in redness and in total colour ranged from 'like slightly' to 'like moderately' throughout the entire period of storage. The study of the effects of vitamin C on the change of 25% mao juice quality was carried out. Vitamin C was added to the juice at various levels to yield 0, 10, 25, 50 and 100% of vitamin C daily intake per bottle after pasteurization. Juice that had vitamin C added was filled in 190 ml tinted glass bottles with 4.5 ml headspace and stored 24 weeks at 30 °C. The result showed that degradation of anthocyanins in each treatment of mao juice was first order at rates of 8.00×10^{-3} , 8.20×10^{-3} , 9.30×10^{-3} , 1.02×10^{-2} and 1.09×10^{-2} /day, respectively. The half life values of anthocyanins were 88, 84, 74, 68 and 63 days, respectively. During storage, microbiological assay (total plate count, yeast and mold) showed negative results. The results from sensory evaluation showed that the preference in redness and in total colour ranged from 'like slightly' to 'like moderately' during the period of storage in every treatment.

Department Food Technology

Field of study Food Technology

Academic year 2003

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co- Advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ อ.ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลืออันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ทุกๆ ท่าน ได้แก่ รศ. ดร. ปราณี อานเป็รื่อง รศ. ดร. วรธนา ตูลยธัญ และ ผศ.ดร.รมณี สงวนดีกุล ที่ได้ให้ความรู้ ข้อคิดเห็น รวมทั้งวิเคราะห์ประเด็นผลการทดลอง ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์ตามหลักสูตรปริญญา มหาบัณฑิต

ขอขอบคุณสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรสกลนคร และบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณยาย และน้าน้อยสำหรับกำลังใจและการให้อภัยไม่รู้จักเหน็ดเหนื่อย

ขอบคุณเจ้เอ็ม พี่แอล โก้ เกี้ยว ไช้ค บุ่ม จอย ข่าง พี่ฟู พี่เปี้ยว และเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกคน ที่เป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลืออย่างดีมาตลอด

ขอบคุณพี่นก แอ้ว แดง ทิพย์ ก้อย คุ ป๊อบ ภา หนอย ย้อย พี่เล็ก พี่หนอย น้าโอ น้าไธต์ น้าอ้อม น้าพรรณ น้าดีดี พี่แต้ว พี่แขก พี่จ๊ีบ พี่ใจ พี่ก้อย พี่กบ สำหรับความช่วยเหลือทุกอย่าง อย่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฐ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. วารสารปริทัศน์.....	3
3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	22
4. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	31
5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	80
รายการอ้างอิง.....	81
ภาคผนวก.....	86
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	108

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 องค์ประกอบของผลเม่าสุก.....	5
2.2 ผลของการเติมแทนนินและวิตามินซีต่อปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือ ในน้ำผลไม้จำลองที่เติมแอนโทไซยานินจาก <i>Tradescantia pallida</i>	20
4.1 คุณภาพของน้ำคั้นที่ได้จากผลเม่า.....	31
4.2 ผลของการเติมวิตามินซีเพื่อยับยั้ง PPO activity ต่อคุณภาพของน้ำเม่า.....	40
4.3 ผลของการเติมวิตามินซีเพื่อยับยั้ง PPO activity ต่อค่าสีของน้ำเม่า.....	41
4.4 ผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อคุณภาพของน้ำเม่า 25%.....	45
4.5 ผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อค่าสีของน้ำเม่า 25%.....	46
4.6 ปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือ DI TCD และ PC ของน้ำเม่าที่บรรจุขวดในแก้วใส ระหว่างการเก็บรักษา.....	50
4.7 ค่าสีของน้ำเม่าที่บรรจุในขวดแก้วใสระหว่างการเก็บรักษา.....	53
4.8 ค่า h° ค่า C^* และค่า ΔH^* ของน้ำเม่าที่บรรจุขวดแก้วใสระหว่างการเก็บรักษา.....	55
4.9 ระดับความพอใจต่อสีแดงและสีโดยรวมของน้ำเม่าที่บรรจุขวดแก้วใสระหว่าง การเก็บรักษา.....	56
4.10 ปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา.....	59
4.11 ค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานินในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา.....	60
4.12 ค่า DI ในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา.....	62
4.13 ค่า TCD ในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา.....	63
4.14 ค่า PC ในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา.....	64
4.15 ค่า L^* ในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา.....	66
4.16 ค่า a^* ในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา.....	67
4.17 ค่า b^* ในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา.....	68
4.18 ค่า ΔE^* ในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา.....	69
4.19 ค่า h° ในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา.....	70
4.20 ค่า C^* ในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา.....	71
4.21 ค่า ΔH^* ในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา.....	72
4.22 ปริมาณวิตามินซีคงเหลือในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา.....	74
4.23 ปริมาณออกซิเจนในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา.....	74
4.24 สมการการสลายตัวของวิตามินซีในน้ำเม่าระหว่างการเก็บรักษา.....	75

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
4.25 ระดับความพอใจต่อสีแดงและสีโดยของน้ำเฝ้าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา.....	77
ภาคผนวก ข 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของการเติมวิตามินซีเพื่อยับยั้ง PPO activity ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในน้ำเฝ้า.....	97
ภาคผนวก ข 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของการเติมวิตามินซีเพื่อยับยั้ง PPO activity ต่อปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ทั้งหมดในน้ำเฝ้า.....	97
ภาคผนวก ข 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของการเติมวิตามินซีเพื่อยับยั้ง PPO activity ต่อปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในน้ำเฝ้า.....	97
ภาคผนวก ข 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของการเติมวิตามินซีเพื่อยับยั้ง PPO activity ต่อ PPO activity ในน้ำเฝ้า.....	97
ภาคผนวก ข 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของการเติมวิตามินซีเพื่อยับยั้ง PPO activity ต่อปริมาณวิตามินซีไอจเหลือในน้ำเฝ้า.....	97
ภาคผนวก ข 6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของการเติมวิตามินซีเพื่อยับยั้ง PPO activity ต่อค่า L* ในน้ำเฝ้า.....	98
ภาคผนวก ข 7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของการเติมวิตามินซีเพื่อยับยั้ง PPO activity ต่อค่า a* ในน้ำเฝ้า.....	98
ภาคผนวก ข 8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของการเติมวิตามินซีเพื่อยับยั้ง PPO activity ต่อค่า b* ในน้ำเฝ้า.....	98
ภาคผนวก ข 9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดของน้ำเฝ้า 25%.....	98
ภาคผนวก ข 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ ปริมาณยีสต์ และราของน้ำเฝ้า 25%.....	99
ภาคผนวก ข 11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ PPO activity ของน้ำเฝ้า 25%.....	99
ภาคผนวก ข 12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของน้ำเฝ้า 25%.....	99
ภาคผนวก ข 13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ ค่า DI ของน้ำเฝ้า 25%.....	99

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
ภาคผนวก ข 14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ ค่า TCD ของน้ำเม่า 25%.....	100
ภาคผนวก ข 15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ ค่า PC ของน้ำเม่า 25%.....	100
ภาคผนวก ข 16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ ค่า L* ของน้ำเม่า 25%.....	100
ภาคผนวก ข 17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ ค่า a* ของน้ำเม่า 25%.....	100
ภาคผนวก ข 18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ ค่า b* ของน้ำเม่า 25%.....	101
ภาคผนวก ข 19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ ค่า h ^o ของน้ำเม่า 25%.....	101
ภาคผนวก ข 20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ ค่า C* ของน้ำเม่า 25%.....	101
ภาคผนวก ข 21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือในน้ำเม่า ที่บรรจุในขวดแก้วใสระหว่างการเก็บรักษา	101
ภาคผนวก ข 22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า DI ในน้ำเม่าที่บรรจุในขวดแก้วใสระหว่าง การเก็บรักษา	102
ภาคผนวก ข 23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า TCD ในน้ำเม่าที่บรรจุในขวดแก้วใสระหว่าง การเก็บรักษา	102
ภาคผนวก ข 24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า PC ในน้ำเม่าที่บรรจุในขวดแก้วใสระหว่าง การเก็บรักษา	102
ภาคผนวก ข 25 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า L* ในน้ำเม่าที่บรรจุในขวดแก้วใส ระหว่างการเก็บรักษา	102
ภาคผนวก ข 26 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า a* ในน้ำเม่าที่บรรจุในขวดแก้วใส ระหว่างการเก็บรักษา	102
ภาคผนวก ข 27 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า b* ในน้ำเม่าที่บรรจุในขวดแก้วใส ระหว่างการเก็บรักษา	103

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
ภาคผนวก ข 28 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า h^0 ในน้ำเม่าที่บรรจุในขวดแก้วใส ระหว่างการใช้รักษา	103
ภาคผนวก ข 29 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า C^* ในน้ำเม่าที่บรรจุในขวดแก้วใส ระหว่างการใช้รักษา	103
ภาคผนวก ข 30 การวิเคราะห์ความแปรปรวนคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านสีแดงของ น้ำเม่าที่บรรจุในขวดแก้วใสระหว่างการใช้รักษา	103
ภาคผนวก ข 31 การวิเคราะห์ความแปรปรวนคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยรวมของ น้ำเม่าที่บรรจุในขวดแก้วใสระหว่างการใช้รักษา	103
ภาคผนวก ข 32 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณวิตามินซีคงเหลือในน้ำเม่าที่วิตามินซี 10 % daily intake ระหว่างการใช้รักษา	104
ภาคผนวก ข 33 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณวิตามินซีคงเหลือในน้ำเม่าที่วิตามินซี 25 % daily intake ระหว่างการใช้รักษา	104
ภาคผนวก ข 34 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณวิตามินซีคงเหลือในน้ำเม่าที่วิตามินซี 50 % daily intake ระหว่างการใช้รักษา	104
ภาคผนวก ข 35 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณวิตามินซีคงเหลือในน้ำเม่าที่วิตามินซี 100 % daily intake ระหว่างการใช้รักษา	104
ภาคผนวก ข 36 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณออกซิเจนในน้ำเม่าที่ไม่เติมวิตามินซี (control) ระหว่างการใช้รักษา	105
ภาคผนวก ข 37 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณออกซิเจนในน้ำเม่าที่วิตามินซี 10 % daily intake ระหว่างการใช้รักษา	105
ภาคผนวก ข 38 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณออกซิเจนในน้ำเม่าที่วิตามินซี 25 % daily intake ระหว่างการใช้รักษา	105
ภาคผนวก ข 39 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณออกซิเจนในน้ำเม่าที่วิตามินซี 50 % daily intake ระหว่างการใช้รักษา	105
ภาคผนวก ข 40 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณออกซิเจนในน้ำเม่าที่วิตามินซี 100 % daily intake ระหว่างการใช้รักษา	105
ภาคผนวก ข 41 การวิเคราะห์ความแปรปรวนคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านสีแดงของ น้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการใช้รักษา	105

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
ภาคผนวก ข 42 การวิเคราะห์ความแปรปรวนคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านสีโดยรวมของ น้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา	106



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูป	หน้า
2.1	ต้นเม่า.....4
2.2	ลักษณะของข้อผลเม่า.....4
2.3	โครงสร้างของแอนโทไซยานิน.....7
2.4	โครงสร้างของแอนโทไซยานิน.....8
2.5	ผลของการเติม PPO ต่อการสูญเสียแอนโทไซยานินในน้ำพลัมที่อุณหภูมิ 30°C.....14
2.6	ผลของการยับยั้ง PPO activity ต่อการสูญเสียแอนโทไซยานินในน้ำพลัม.....15
2.7	โครงสร้างของแอนโทไซยานินเมื่ออยู่ในสภาวะสมดุลในสารละลาย.....16
2.8	เสถียรภาพต่อความร้อนของ hordeumin ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ.....19
4.1	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ crude enzyme และ PPO activity.....33
4.2	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ crude enzyme และ PPO activity ต่อมิลลิลิตรของ crude enzyme.....33
4.3	pH activity profile ของ crude PPO ในน้ำเม่าที่อุณหภูมิ 25°C เมื่อใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ เป็น substrate.....34
4.4	pH stability profile ของ crude PPO ในน้ำเม่าหลังจากบ่มที่ pH ต่างๆ (อุณหภูมิ 0°C) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 25°C และใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 เป็น substrate.....36
4.5	Temperature activity profile ของ crude PPO ในน้ำเม่า เมื่อวิเคราะห์โดยใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 เป็น substrate.....37
4.6	Temperature stability profile ของ crude PPO ในน้ำเม่าหลังจากบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 10 นาที เมื่อวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 20°C และใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 เป็น substrate.....38
4.7	ความสัมพันธ์ของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบฟีนอลิก เอนไซม์ PPO และวิตามินซี.....41
4.8	การเสื่อมสลายของแอนโทไซยานินที่มีสาเหตุมาจากเอนไซม์ PPO.....42
4.9	กลไกการสลายตัวที่มีสาเหตุมาจากความร้อนของ anthocyanidin 3,5-diglycoside และ anthocyanidin 3-diglucoside.....47
4.10	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า a* และค่า b* ของน้ำเม่าที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ที่ภาวะต่างๆ..48

สารบัญรูป (ต่อ)

รูป	หน้า
4.11 ปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือในน้ำเม่าที่บรรจุในขวดแก้วใสระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C.....	51
4.12 ค่าดัชนีการสลายตัวของแอนโทไซยานินในน้ำเม่าที่บรรจุขวดแก้วใสระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C	52
4.13 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า a* และค่า b* ของน้ำเม่าที่บรรจุในขวดแก้วใสระหว่างการเก็บรักษา 24 สัปดาห์.....	57
4.14 ปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีในปริมาณต่างๆระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C	60
4.15 ค่า DI ของแอนโทไซยานินในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C	61
4.16 ปริมาณวิตามินซีคงเหลือในน้ำเม่าระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C	75
4.17 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า a* และ b* ของน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา....	78
ภาคผนวก ก 1 Absorption spectrum ของแอนโทไซยานินในน้ำเม่า.....	87
ภาคผนวก ก 2 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด.....	89
ภาคผนวก ก 3 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี.....	89
ภาคผนวก ก 4 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน.....	91
ภาคผนวก ก 5 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำเม่า 25% ที่ความยาวคลื่น 526 nm ในช่วง pH 1.0 – 5.0.....	94
ภาคผนวก ก 6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณวิตามินซีที่เติม และปริมาณคงเหลือหลังการพาสเจอร์ไรส์ในน้ำเม่า 25%.....	96

บทที่ 1

บทนำ

กระแสการบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพมีการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง ทำให้น้ำผลไม้เป็นสินค้าที่เข้ามาแบ่งส่วนแบ่งทางการตลาดเครื่องดื่มไม่มีแอลกอฮอล์ ด้วยสภาพความเป็นอยู่ที่เปลี่ยนแปลงไป ความเร่งรีบ ความห่วงใยต่อสุขภาพ กลายเป็นปัจจัยสำคัญที่กระตุ้นให้ตลาดน้ำผลไม้พร้อมดื่มเติบโตขึ้น โดยน้ำผลไม้ผสมเข้มข้นร้อยละ 10 - 50 เป็นตลาดน้ำผลไม้พร้อมดื่มที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ประกอบกับการบริโภคน้ำผลไม้ของคนไทยยังนับว่าอยู่ในเกณฑ์ต่ำเมื่อเทียบกับต่างประเทศ กล่าวคือคนไทยดื่มน้ำผลไม้เฉลี่ย 10 ลิตรต่อคนต่อปี เมื่อเทียบกับญี่ปุ่นที่มีการบริโภคน้ำผลไม้มากกว่าคนไทยถึง 3 เท่าตัว และสหรัฐอเมริกาที่มีอัตราการบริโภคน้ำผลไม้เฉลี่ย 80 ลิตรต่อคนต่อปี แสดงให้เห็นว่าตลาดน้ำผลไม้ในประเทศยังมีโอกาสขยายตัวได้อีกมาก ทำให้ผู้ส่งออกน้ำผลไม้เริ่มหันมาทำตลาดน้ำผลไม้ในประเทศควบคู่ไปกับตลาดส่งออก เนื่องจากมองเห็นช่องทางในการขยายตลาด ตลาดน้ำผลไม้ในประเทศมีมูลค่ามากกว่า 1,500 ล้านบาท อัตราการขยายตัวของตลาดประมาณร้อยละ 10 - 15 ต่อปี ในส่วนของการนำเข้าน้ำผลไม้ เริ่มมีแนวโน้มการนำเข้ามากขึ้นในช่วง 2 - 3 ปีที่ผ่านมา เนื่องจากการลดอัตราภาษีเครื่องดื่มน้ำผลไม้ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศของกรมสรรพสามิตในปี 2538 เพื่อให้สอดคล้องกับการเก็บภาษีสรรพสามิตเครื่องดื่มน้ำผลไม้ที่ผลิตในประเทศ โดยน้ำผลไม้ชนิดใดที่ได้รับการลดหรือยกเว้นภาษีสรรพสามิตเครื่องดื่ม น้ำผลไม้ชนิดเดียวกันที่นำเข้ามาจากต่างประเทศจะได้รับการยกเว้นภาษีสรรพสามิตด้วย ส่งผลให้น้ำผลไม้ต่างประเทศเข้ามาในตลาดเมืองไทยมากขึ้น (ปัญญาภัทร ธาระนิช, 2541) เพื่อลดสัดส่วนการนำเข้าน้ำผลไม้ดังกล่าวการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ชนิดใหม่ๆ ออกสู่ตลาดเพื่อเป็นทางเลือกให้กับผู้บริโภคและขยายตลาดน้ำผลไม้ให้กว้างขึ้นจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ควรพิจารณา โดยเฉพาะน้ำผลไม้จากผลไม้ท้องถิ่นของประเทศ

ที่ผ่านมาสถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรสกลนครได้นำผลเม่า (*Antidesma* sp.) ซึ่งเป็นผลไม้ท้องถิ่นของภาคตะวันออกเฉียงเหนือมาทดลองผลิตเป็นน้ำผลไม้ พบว่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้รับความนิยมจากผู้บริโภคเป็นอย่างดีเพราะมีสีแดงสดใส มีรสชาติและกลิ่นหอมเฉพาะตัวซึ่งเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค แต่จากการศึกษาในเบื้องต้นพบว่าผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ดังกล่าวยังมีปัญหาในเรื่องความคงตัวของสี โดยเมื่อเก็บไว้ในระยะเวลาหนึ่งสีของผลิตภัณฑ์จะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีน้ำตาลซึ่งถือว่าเป็นข้อจำกัดของผลิตภัณฑ์ทำให้โอกาสในการขยายตลาดเป็นไปได้ยาก เพื่อเป็นการแก้ปัญหาดังกล่าวจึงจำเป็นต้องศึกษาถึงชนิดและปริมาณ สารสีแดงในผลเม่า รวมถึงการติดตามการเปลี่ยนแปลงสีในระหว่างการแปรรูปและการเก็บรักษา เพื่อหา

สาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวแล้วหาแนวทางป้องกันแก้ไข เพื่อเป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำเม่าให้มีคุณภาพดีขึ้นและมีโอกาสแข่งขันในตลาดน้ำผลไม้ได้มากขึ้นต่อไป โดยในเบื้องต้นคาดว่าสีของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวน่าจะเกิดจากรงควัตถุในกลุ่มแอนโทไซยานิน (anthocyanins) ส่วนสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีดังกล่าวน่าจะเกิดจากสาเหตุต่างๆ เช่น กิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสในผลเม่า ความร้อนระหว่างการฆ่าเชื้อ การทำปฏิกิริยาของออกซิเจนใน head space ของภาชนะบรรจุ การเกิดพอลิเมอร์ (polymerization) ของแอนโทไซยานินโดยมีแสงเป็นตัวเร่ง การเกิดการสลายตัว (degradation) ของแอนโทไซยานินเอง และระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษา ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงสาเหตุดังกล่าวข้างต้น



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

1. เม่า

เม่า หรือ มะเม่า มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Antidesma* sp. อยู่ในวงศ์ Stilaginaceae เป็นไม้ผลท้องถิ่นของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จัดเป็นไม้พุ่ม (shurb) เจริญเติบโตเป็นลำต้นเดี่ยว สูง 6 – 12 เมตร การเรียงตัวของใบเป็นแบบสลับ (alternate) ขอบใบเรียบ รูปร่างของใบเป็นลักษณะรูปหอกยาว 3-6 นิ้ว ผิวใบด้านบนมีลักษณะมันวาวกว่าด้านใต้ใบ (รูปที่ 2.1) มีลักษณะการออกดอกแบบแยกเพศ ไม่มีกลีบดอกชั้นใน (apetalous) ออกดอกเป็นช่อตรงปลายยอด ลักษณะช่อผลคล้ายช่อพริกไทยที่เรียกว่าแบบ paniced spik (รูปที่ 2.2) การออกดอกจะเกิดในช่วงเดือนพฤษภาคม - กรกฎาคม และผลจะสุกในเดือนสิงหาคม - ตุลาคม ผลมีลักษณะค่อนข้างกลม (round) ขนาดกว้างยาว 0.8 - 1.0 เซนติเมตร ภายใน 1 ผลประกอบด้วย 1 เมล็ด และมีเปลือกแข็ง ผลดิบมีสีเขียวอ่อนหรือสีเขียวเข้ม เมื่อผลเข้าสู่ระยะสุกเปลือกจะเปลี่ยนเป็นสีแดงและสีดำเมื่อสุกเต็มที่ มีการสุกของผลบนช่อไม่พร้อมกัน ผลสุกรับประทานได้มีรสชาติหวานอมเปรี้ยว และมีรสฝาด มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดอยู่ในระดับ 13 – 21^o Brix (อร่าม คุ่มกลาง และ วินัย แสงแก้ว, 2543) เมื่อนำผลสุกไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีก็พบว่าประกอบด้วยสารอาหารต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ปัจจุบันได้มีการนำผลเม่าสุกมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ เช่น น้ำผลไม้ ไวน์ และแยม ซึ่งผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคเป็นอย่างดี เนื่องจากมีรสชาติดี และสีส้มที่สวยงามจากรงควัตถุแอนโทไซยานินในผลเม่า

2. น้ำผลไม้ (Juice) (Bates, Morris และ Crandall, 1996)

น้ำผลไม้ หมายถึง ของเหลวที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อของผัก และผลไม้ โดยการคั้นหรือบีบอัด (crushing, comminuting or pressing) อาจจะมีลักษณะใส (clear) ชุ่น (cloudy) หรือมีส่วนของเนื้อผลไม้ผสมอยู่จนขึ้น (pulpy) ก็ได้ น้ำผลไม้ที่ได้ อาจเรียกว่า puree หากของเหลวที่ได้จากการสกัดมีความหนืด (consistency) ที่ไหลได้ช้าเมื่อเท หรืออาจเรียกว่า pulp หากไหลได้ช้ามากเมื่อเท สามารถเติมกรดและน้ำตาลได้ตามมาตรฐานของน้ำผลไม้แต่ละชนิด หรืออาจทำให้เข้มข้นเพื่อช่วยยืดอายุการเก็บรักษา และสะดวกต่อการขนส่ง

น้ำผลไม้สามารถแบ่งย่อยออกไปได้หลายชนิด ซึ่งน้ำผลไม้แต่ละชนิดก็จะมีมาตรฐานแตกต่างกันออกไป เช่น pure juice เป็นน้ำผลไม้ 100% ที่ไม่ผ่านการปรับแต่งใด ๆ และต้องไม่ทำ



รูปที่ 2.1 ต้นเม่า



รูปที่ 2.2 ลักษณะของช่อผลเม่า

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของผลไม้อายุสุก

องค์ประกอบ	ปริมาณ
โปรตีน (N × 6.25) (ร้อยละ)	0.63
ไขมัน (ร้อยละ)	0.09
ใยอาหาร (ร้อยละ)	0.79
เถ้า (ร้อยละ)	0.93
คาร์โบไฮเดรต (โดยการคำนวณ) (ร้อยละ)	17.96
น้ำตาลทั้งหมด (คิดเป็นน้ำตาลอินเวอร์ท) (ร้อยละ)	14.10
แคลเซียม (มิลลิกรัม/100 กรัม)	13.30
แมกนีเซียม (มิลลิกรัม/100 กรัม)	21.20
เหล็ก (ไมโครกรัม/100 กรัม)	4.00
วิตามิน บี 1 (ไมโครกรัม/100 กรัม)	4.50
วิตามิน บี 2 (ไมโครกรัม/100 กรัม)	0.03
วิตามินซี (มิลลิกรัม/100 กรัม)	ไม่พบ
วิตามินอี (หน่วยสากล/100 กรัม)	0.37

ที่มา: กรมวิทยาศาสตร์บริการ (2539)

จากน้ำผลไม้เข้มข้น fresh squeezed เป็นน้ำผลไม้ที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ nectar มีส่วนผสมของน้ำผลไม้อยู่ 25 – 50% มีการเติมกรด น้ำ หรือน้ำตาลลงไป อาจมีลักษณะใสหรือมีส่วนของเนื้อผลไม้ผสมอยู่ด้วยก็ได้ juice drink มีน้ำผลไม้อยู่ 10 – 20% ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของแข็งในน้ำผลไม้ และมาตรฐานของแต่ละประเทศ

กรณีของน้ำผลไม้เข้มข้นที่ต้องมีการผสมน้ำก่อนการบริโภค หรือน้ำผลไม้ที่ทำจากน้ำผลไม้เข้มข้น (from concentrate) ปริมาณน้ำที่เติมจะขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำผลไม้ โดยจะต้องให้มีปริมาณของแข็งซึ่งกำหนดเป็น °Brix หรือ % soluble solids ตามปริมาณของแข็งในน้ำผลไม้ก่อนนำมาทำเข้มข้น (initial juice) ซึ่งในแต่ละประเทศจะมีกฎหมายกำหนดเอาไว้ ตัวอย่างของปริมาณของแข็งในน้ำผลไม้บางชนิดหลังการเจือจางด้วยน้ำ เช่น น้ำแอปเปิล 11.5 °Brix น้ำกล้วย 22 °Brix น้ำแครนเบอรี่ 7.5 °Brix น้ำองุ่น 16 °Brix และน้ำสับปะรด 12.8 °Brix เป็นต้น

3. แอนโทไซยานิน (Anthocyanins)

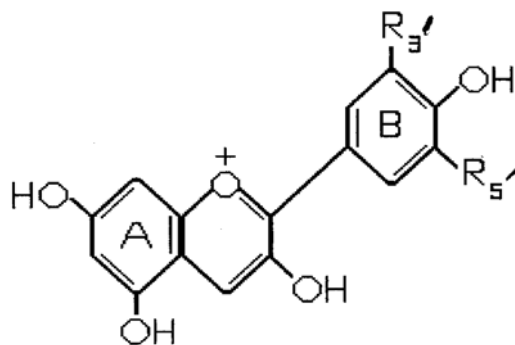
3.1 โครงสร้างของแอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานินเป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งมีโครงสร้างหลักเป็น $C_6C_3C_6$ เป็นรงควัตถุที่พบในผักผลไม้ และดอกไม้หลายชนิด เช่น ผลองุ่น, เอลเดอร์เบอร์รี่ (elderberries) แบลคเคอแรนท์ (black currants) ราสเบอร์รี่ (raspberries) ดอกอัญชัญ ดอกกุหลาบ เป็นต้น แอนโทไซยานินละลายอยู่ในแวคคิวโอแซพ (vacuole sap) ในเซลล์ของพืช ซึ่งรงควัตถุนี้มีบทบาทต่อสีในผักผลไม้ และดอกไม้ โดยให้สีในช่วงสีแดงไปจนถึงสีน้ำเงิน สามารถละลายได้ในน้ำแต่ไม่ละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีหมู่ไฮดรอกซิล (non-hydroxyl solvent) เช่น อีเทอร์ อะซีโตน คลอโรฟอร์ม และ เบนซีน เป็นต้น (Jackman และ Smith, 1996)

แอนโทไซยานินเป็นอนุพันธ์พอลิไฮดรอกซี (polyhydroxy) และ พอลิเมทอกซี (polymethoxy) ของฟลาเวิลียม (flavylium) หรือ 2-phenylbenzopyrylium โมเลกุลประกอบขึ้นด้วยแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin) หรือ aglycone จับตัวกับน้ำตาลด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) (Brouillard, 1982)

แอนโทไซยานิดินที่พบทั่วไปในธรรมชาติมีประมาณ 18 ชนิด แต่ที่พบมากในพืชมี 6 ชนิด ซึ่งเรียกชื่อแตกต่างกันตามตำแหน่งของการมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl : OH) และ เมทอกซิล (methoxyl : OCH_3) ที่ B-ring ดังรูปที่ 2.3

น้ำตาลที่จับกับแอนโทไซยานิดินที่พบบ่อย ได้แก่ glucose นอกจากนี้ยังพบ Monosaccharide เช่น xylose, arabinose, rhamnose, galactose และ fructose disaccharide ซึ่งส่วนใหญ่เป็น rutinose, sambubiose และ sophorose และ trisaccharide ในโมเลกุลด้วย โดยน้ำตาลส่วนใหญ่จะเกาะที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 บางครั้งจะพบที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ด้วย ส่วนคาร์บอนตำแหน่งที่ 7 และ 3' พบน้อยมาก (Francis, 1989) ดังนั้นแอนโทไซยานินที่พบส่วนใหญ่จึงเป็น 3-monoside ซึ่งมีน้ำตาลเกาะ 1 ตัวที่ตำแหน่ง C_3 3-biosides ซึ่งมีน้ำตาลเกาะ 2 ตัวที่ตำแหน่ง C_3 และ 3,5 - diglycosides ซึ่งมีน้ำตาลเกาะ 2 ตัวที่ตำแหน่ง C_3 และ C_5 น้ำตาลเหล่านี้จะช่วยทำให้แอนโทไซยานิดินมีความเสถียรดีขึ้น และละลายน้ำได้มากขึ้น ดังนั้นน้ำตาลจึงมีผลต่อความเสถียรของสีของแอนโทไซยานินมากกว่า aglycone ที่เป็นแอนโทไซยานิดิน (Wrolstad, 2000)



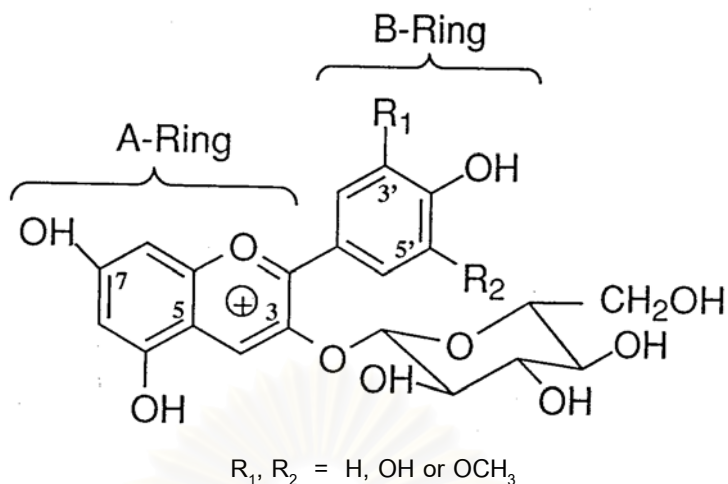
Anthocyanidin	Substitution pattern (R)		Colour
	R ₃	R ₅	
Pelargonidin (Pg)	H	H	Orange
Cyanidin (Cy)	OH	H	Orange-red
Delphinidin (Dp)	OH	OH	Blue-red
Peonidin (Pn)	OCH ₃	H	Orange-red
Petunidin (Pt)	OCH ₃	OH	Blue-red
Malvidin (Mv)	OCH ₃	OCH ₃	Blue-red

รูปที่ 2.3 โครงสร้างของแอนโทไซยานิดิน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Jackman และ Smith (1996) และ Brouillard (1982)

ในบางครั้งโมเลกุลน้ำตาลจะถูก acylated ด้วยกรดอินทรีย์บางชนิด ได้แก่ aromatic acid ตัวอย่างเช่น *p*-coumaric, caffeic, ferulic, gallic acid เป็นต้น และ/หรือ aliphatic acid ตัวอย่างเช่น malonic, acetic, succinic, oxalic acid เป็นต้น โดยมักเชื่อมกันที่ตำแหน่ง -OH ของคาร์บอนที่ตำแหน่งที่ 6 ของน้ำตาลซึ่งช่วยให้แอนโทไซยานินมีเสถียรภาพดีขึ้น (Jackman และ Smith, 1996)

สูตรโครงสร้างของแอนโทไซยานิน แสดงดังรูปที่ 2.4 เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของแอนโทไซยานินจะเห็นว่าแอนโทไซยานินขาดอิเล็กตรอน จึงทำให้แอนโทไซยานินมีความว่องไวต่อปฏิกิริยาสูง ผลจากปฏิกิริยาจะได้สารประกอบซึ่งมีโครงสร้างและสีที่ไม่พึงประสงค์ บางครั้งอาจทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดสีน้ำตาลขึ้นมาได้



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของแอนโทไซยานิน

ที่มา : Wrolstad (2000)

3.2 การวิเคราะห์แอนโทไซยานิน

การวิเคราะห์แอนโทไซยานินมักจะมีความยุ่งยาก เนื่องจากแอนโทไซยานินสามารถเปลี่ยนรูปโครงสร้าง (structure transformation) และเกิดปฏิกิริยาที่ซับซ้อน นอกจากนี้ยังเป็นการยากที่จะแยกแอนโทไซยานินออกจากสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ตัวอื่นๆ เพราะมีโครงสร้างและลักษณะการเกิดปฏิกิริยาที่คล้ายคลึงกัน (Mazza และ Miniati, 1993)

Francis (1982) ได้แบ่งการวิเคราะห์แอนโทไซยานินออกเป็น 2 แบบ ได้แก่

3.2.1 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative analysis) เป็นการวิเคราะห์หาชนิดของแอนโทไซยานิดิน ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของแอนโทไซยานิน และตำแหน่งที่เกาะกับแอนโทไซยานิดิน รวมถึงสารประกอบอะซิล (acyl compounds) ในโมเลกุลของแอนโทไซยานิน

3.2.2 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด โดยแบ่งตามลักษณะตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

3.2.2.1 ตัวอย่างที่มีสารประกอบซึ่งดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับแอนโทไซยานินปนอยู่เล็กน้อยหรือไม่มีเลย

โดยปกติในผักและผลไม้สดจะมีสารประกอบที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นเดียวกับแอนโทไซยานิน (500 – 535 นาโนเมตร) อยู่เป็นอย่างมาก ดังนั้นปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดจึงสามารถหาได้โดยอาศัยหลักการดูดกลืนแสงดังกล่าว

Fuleki และ Fransis (1968a) ได้สกัดแอนโทไซยานินจากผลแครนเบอร์รี่ (cranberry) โดยการใช้เอทานอลกับกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.5 นอร์มอล ในอัตราส่วน 85:15 โดยปริมาตรเป็นตัวทำละลายในการสกัด ขั้นตอนในการสกัด คือ เติมตัวทำละลาย 100 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างหนัก 100 กรัม (SW) ปั่นใน Waring blender ด้วยความเร็วสูงสุด เทตัวอย่างลงในบีกเกอร์ขนาด 400 มิลลิลิตร ล้างภาชนะที่ใช้ปั่นด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด 50 มิลลิลิตร ปิดบีกเกอร์ด้วยแผ่นพาราฟิล์ม (parafilm) เก็บไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มารองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ล้างกากด้วยตัวทำละลายจนกระทั่งได้สารสกัดประมาณ 450 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร (TEV) ด้วยตัวทำละลาย นำสารสกัดที่ได้จำนวนเล็กน้อย (SV) มาเจือจางด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด (DV) เพื่อให้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้อยู่ในช่วง 0.3 – 0.8 เก็บไว้ในที่มืด 2 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดการสมดุลงของรูป (form) ต่างๆ ของแอนโทไซยานิน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer แล้วคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดจากสูตรต่อไปนี้

$$T\ O.D. = O.D. \times DV \times VF \quad (2-1)$$

โดยที่

- O.D. คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากตัวอย่างที่เจือจางแล้วโดยใช้เซลล์ขนาด 1 เซนติเมตร
- DV คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อให้ค่าที่วัดได้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม (Diluted Volume)
- VF คือ ค่าที่ใช้คูณเข้าไปเพื่อให้ค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณได้มีหน่วยเป็น OD/100 มิลลิลิตรของสารสกัด (Volume Factor)

$$T\ O.D. \text{ ต่อ } 100 \text{ กรัม} = T\ O.D. \text{ ของสารสกัด } 100 \text{ มิลลิลิตร} \times TEV/CrW \quad (2-2)$$

โดยที่

- TEV คือ ปริมาตรของสารสกัดที่ได้ทั้งหมดเป็นมิลลิลิตร (Total Extract Volume)
- CrW คือ น้ำหนักของแครนเบอร์รี่เป็นกรัม

$$TAcy \text{ มิลลิกรัม ต่อ } 100 \text{ กรัม} = \frac{T\ O.D. \text{ ต่อ } 100 \text{ กรัม}}{E_{1cm}^{1\%}/10} \quad (2-3)$$

โดยที่

- $E_{1cm}^{1\%}$ คือ ค่า Extinction coefficient ซึ่งได้จากค่าเฉลี่ยโดยน้ำหนักโมเลกุลของแอนโทไซยานินทุกตัวที่มีอยู่ในแครนเบอร์รี่

จากสูตรที่ 2-1, 2-2 และ 2-3 สามารถนำมาเขียนเป็นสูตรใหม่ได้ดังสูตรที่ 2-4

$$TAcy = O.D. \times DV \times \frac{100}{SV} \times \frac{TEV}{SW} \times \frac{1}{E^{1\%}_{1cm}/10} \quad (2-4)$$

โดยที่

TAcy คือ ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (มิลลิกรัมแอนโทไซยานินต่อวัตต์ดิบ 100 กรัม)

SV คือ ปริมาตรของสารละลายสกัดที่เตรียมสำหรับเจือจาง (มิลลิลิตร)

SW คือ น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด (กรัม)

ในกรณีที่ไม่ทราบค่า $E^{1\%}_{1cm}$ ของแอนโทไซยานินในตัวอย่าง Fuleki และ Francis (1968a) แนะนำให้ใช้ค่า $E^{1\%}_{1cm}$ ของผลแครนเบอร์รี่ในการคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ซึ่งจะสามารถตัดความผิดพลาดจากการคำนวณทิ้งไปได้ เมื่อใช้เปรียบเทียบปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดได้

นอกจากนี้ยังอาจใช้ค่า $E^{1\%}_{1cm}$ ของแอนโทไซยานินตัวใดตัวหนึ่งที่มีอยู่ในตัวอย่างในการคำนวณปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดได้ เนื่องจากค่า $E^{1\%}_{1cm}$ เป็นเพียง factor ที่นำมาคำนวณ ซึ่งในกรณีที่ต้องการเปรียบเทียบปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดได้จะช่วยกำจัดความผิดพลาดจากการคำนวณออกไปได้

Du และ Francis (1973) และ บุศรรัตน์ สายเชื้อ (2545) คำนวณปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของกลีบดอกกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.) โดยใช้ค่า $E^{1\%}_{1cm}$ ของ delphinidin-3-glucoside ซึ่งเป็นแอนโทไซยานินตัวหนึ่งในกลีบดอกกระเจี๊ยบแดง ค่า $E^{1\%}_{1cm}$ เท่ากับ 559

Do และ คณะ (1976) คำนวณปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของเชอร์รี่ โดยใช้ค่า $E^{1\%}_{1cm}$ ของ cyanidin-3-galactoside ซึ่งเป็นแอนโทไซยานินตัวหนึ่งในเชอร์รี่ ค่า $E^{1\%}_{1cm}$ เท่ากับ 3.4×10^4

Tulyathan, Duangmal และ Thanpittayakul (1993) คำนวณปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของดอกอัญชัน โดยใช้ค่า $E^{1\%}_{1cm}$ ของ delphinidin-3-glucoside ซึ่งเป็นแอนโทไซยานินตัวหนึ่งในดอกอัญชัน ค่า $E^{1\%}_{1cm}$ เท่ากับ 559

Garzon และ Wrolstad (2002) คำนวณปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของสตรอเบอร์รี่ โดยใช้ค่า $E^{1\%}_{1cm}$ ของ pelargonidin-3-glucoside ซึ่งเป็นแอนโทไซยานินตัวหนึ่งในสตรอเบอร์รี่ ค่า $E^{1\%}_{1cm}$ เท่ากับ 433.2

3.2.2.2 ตัวอย่างที่มีสารประกอบซึ่งดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับ

แอนโทไซยานินปนอยู่

ในผลิตภัณฑ์ที่มีรงควัตถุแอนโทไซยานินเป็นสารให้สี หลังจากผ่านกระบวนการให้ความร้อน การเก็บรักษา หรือกระบวนการผลิตอย่างใดอย่างหนึ่ง มักจะก่อให้เกิดสารที่ได้จากการสลายตัวของผลิตภัณฑ์ (degradation products) เช่น ผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของแอนโทไซยานิน ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลกับกรดอะมิโน (Maillard reactions) ซึ่งสารเหล่านี้มักจะรบกวน (interfere) การวิเคราะห์แอนโทไซยานิน เนื่องจากสารดังกล่าวมีค่าการดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับแอนโทไซยานิน ทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินที่วิเคราะห์ได้ผิดพลาด การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินในตัวอย่างที่มีสารประกอบเหล่านี้ยังสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

แยกสารรบกวน (interfering materials) ที่ดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับแอนโทไซยานินออกไปก่อน โดยวิธีการแยกวิธีใดวิธีหนึ่ง เช่น ion exchange, paper chromatography, thin-layer chromatography, gas chromatography และ high performance liquid chromatography เป็นต้น

ข. อาศัยหลักการที่แอนโทไซยานินจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง เมื่อความเป็นกรดต่างในระบบเกิดการเปลี่ยนแปลง ทำให้ความสามารถในการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินเกิดการเปลี่ยนแปลงตามไปด้วย จึงสามารถคำนวณปริมาณแอนโทไซยานินจากความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงในระบบที่มีค่าความเป็นกรดต่างต่างกันได้ ทั้งนี้เพราะค่าการดูดกลืนแสงจากสารรบกวนซึ่งดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับแอนโทไซยานินจะถูกหักล้างออกไป วิธีการนี้เรียกว่า “ pH differential method “

การเลือกระดับค่าความเป็นกรดต่างในการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH differential method ต้องพิจารณาถึง

ก. ค่าความเป็นกรดต่างทั้ง 2 ค่าที่เลือกนั้นควรให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มีผลต่างห่างกันมากที่สุด หลีกเลี่ยงการเลือกช่วงค่าความเป็นกรดต่างในบริเวณเส้นโค้งที่มีความชันสูง ซึ่งจะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงได้มากเมื่อค่าความเป็นกรดต่าง เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย

การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างรอบ ๆ ค่าความเป็นกรดต่างที่เลือกไม่ควรทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงมากนัก

แอนโทไซยานินควรอยู่ในรูปที่เสถียรที่ระดับความเป็นกรดต่างที่เลือกใช้

Fuleki และ Francis (1986b) หาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในน้ำแครนเบอร์รี่ โดยใช้หลักการของวิธี pH differential โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างในสารละลายบัฟเฟอร์ KCl-HCl ที่ pH 1.0 และ CH₃COONa-HCl ที่ pH 4.5 ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร โดยที่ pH 1.0 แอนโทไซยานินจะอยู่ในรูป flavylum cation ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด และที่ pH 4.5 แอนโทไซยานินจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูป carbinol base ซึ่งจะให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุด ที่ความยาวคลื่นเดียวกัน โดยปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดสามารถคำนวณได้จากสูตรที่ (2-5)

$$T_{Acy} = \frac{\Delta O.D. \times 10}{Avg.E^{1\%}_{1cm}} \quad (2-5)$$

โดยที่

T_{Acy} = ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมสารละลายสกัด)

$Avg.E^{1\%}_{1cm}$ คือ ค่า Extinction coefficient ซึ่งได้จากค่าเฉลี่ยโดยน้ำหนักโมเลกุลของแอนโทไซยานินทุกตัวที่มีอยู่ในแครนเบอร์รี่

$$\square O.D. = T_{O.D.}(pH 1.0) - T_{O.D.}(pH 4.5)$$

$$T_{O.D.} = O.D. \times DV \times VF$$

DV (Dilution Volume) คือ ปริมาตรสารละลายสกัดที่เจือจางไว้สำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสง (มิลลิลิตร)

VF (Volume Factor) คือ ปริมาตรสารละลายสกัดเริ่มต้น / ปริมาตรสารละลายสกัดตัวอย่าง

ข้อดีอีกอย่างหนึ่งของการวัดปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธี

pH differential method คือ สามารถคำนวณค่า degree of degradation ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงสัดส่วนของรงควัตถุแอนโทไซยานินที่เสื่อมสลาย (degrade) ไปได้ โดยแสดงในเทอมของค่าดัชนีการสลายตัว (Degradation Index : DI)

ค่า degree of degradation สามารถคำนวณได้จากสูตรที่ (2-6)

$$\text{Degradation Index (DI)} = \frac{T_{Acy \text{ by the single pH method}}}{T_{Acy \text{ by the pH differential method}}} \quad (2-6)$$

T_{Acy} by the pH differential method

ในงานวิจัยนี้ใช้วิธี pH differential method ตามวิธีการของ Fuleki และ Francis (1968b) ในการหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด โดยเลือกวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ระดับความเป็นกรดต่าง 1.0 และ 4.5 ที่ความยาวคลื่น 526 นาโนเมตร

3.2.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินแต่ละชนิด

ในการวิเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานินแต่ละชนิด จำเป็นที่จะต้องแยกรงควัตถุแอนโทไซยานินออกจากรงควัตถุชนิดอื่นๆ ก่อน เพื่อให้ได้สารละลายแอนโทไซยานินที่ปราศจากน้ำตาลและผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของรงควัตถุดังกล่าวโดยการนำ lead acetate, polyamide, polyvinylpyrrolidone หรือ ion-exchange resins จากนั้นจึงนำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อหาชนิดของแอนโทไซยานินต่อไป ซึ่งวิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ high-performance liquid chromatography (HPLC), thin-layer chromatography (TLC) เป็นต้น

3.3 เสถียรภาพของแอนโทไซยานินในน้ำผลไม้

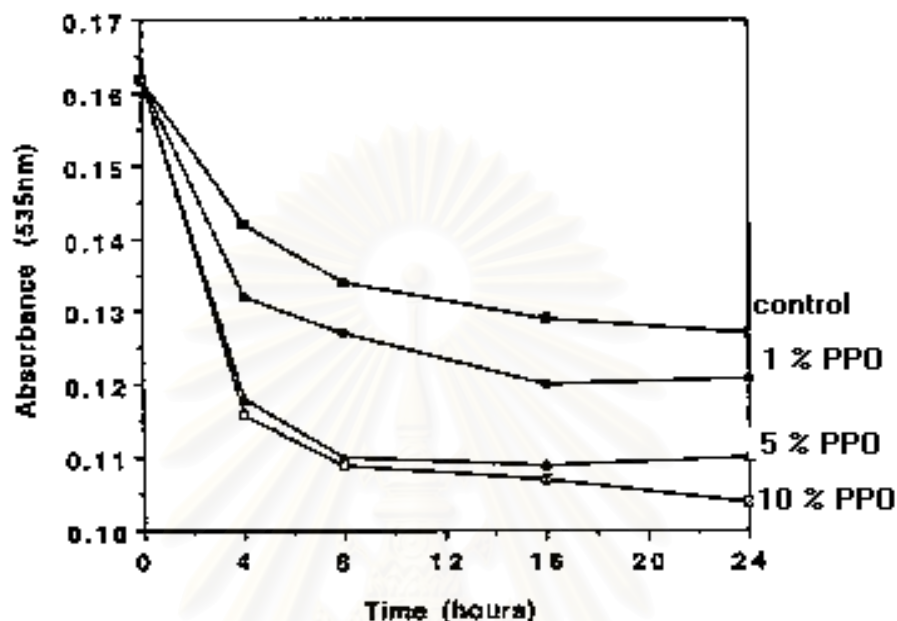
ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ที่มีรงควัตถุแอนโทไซยานินเป็นสารให้สีแดงซึ่งเป็นลักษณะที่ดีของผลิตภัณฑ์จะเปลี่ยนไป เกิดสีน้ำตาลขึ้นในผลิตภัณฑ์ ทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดได้จากปัจจัยต่างๆ หลายปัจจัย เช่น ความเป็นกรดต่างของผลิตภัณฑ์ ความร้อน แสง และออกซิเจน เป็นต้น นอกจากนี้การให้ความร้อนในระหว่างกระบวนการผลิตก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งของการเปลี่ยนแปลงของรงควัตถุแอนโทไซยานิน ปัจจัยที่มีผลสำหรับงานวิจัยนี้ได้แก่

3.3.1 กิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase: PPO) ที่มีอยู่ในน้ำผลไม้

เมื่อน้ำผลไม้ถูกทำลายในระหว่างการสกัดน้ำผลไม้ PPO จะเร่งการออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำผลไม้ นั้น ๆ ไปเป็น *o*-quinone ซึ่งสารนี้มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาและสามารถทำปฏิกิริยากับแอนโทไซยานินทำให้เกิดสารที่มีสีน้ำตาลได้ (รูปที่ 4.8)

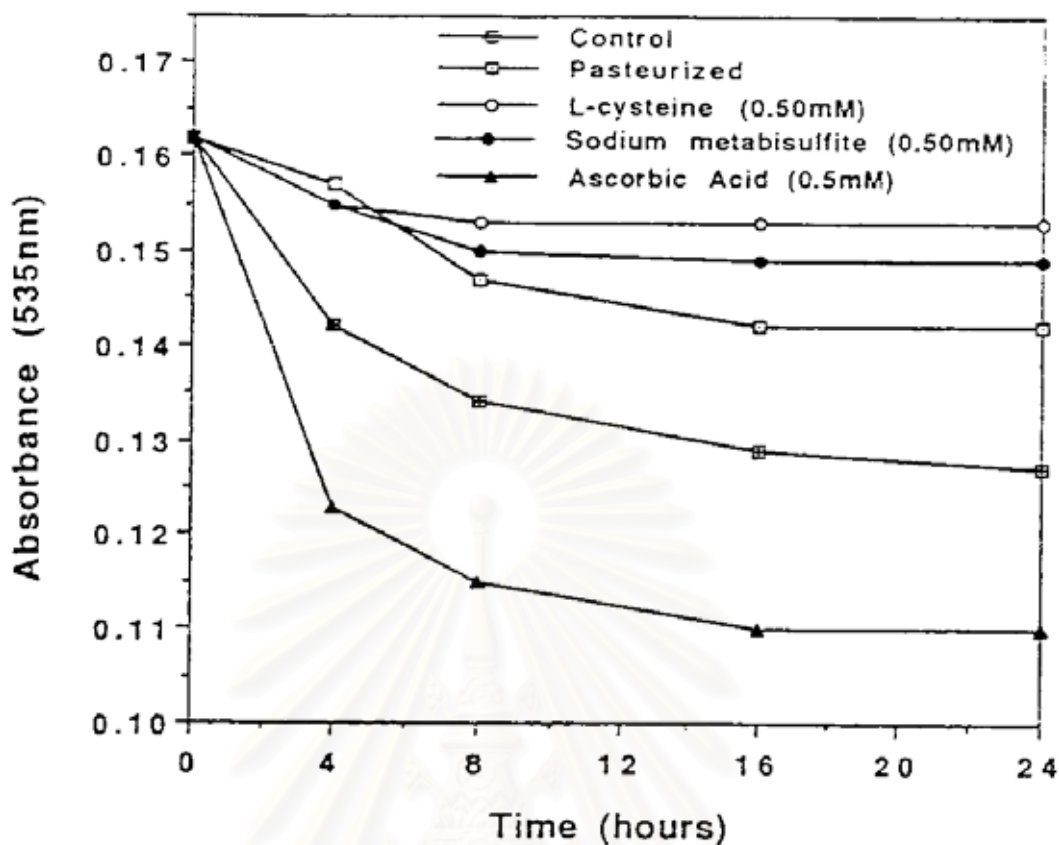
Siddiq และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของ PPO และตัวยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว ต่อการเปลี่ยนแปลงสีในน้ำพลัม (plum juice) โดยเตรียมน้ำพลัมจากผลพลัมที่ผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส น้ำพลัมที่ได้มีค่าความเป็นกรดต่าง 3.9 และของแข็งที่ละลายได้ 14 องศาบริกซ์ นำมาผ่านการพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 88 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ก่อนเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำมาศึกษาถึงผลของ PPO ต่อเสถียรภาพของแอนโทไซยานินในน้ำพลัม โดยเติม PPO ที่สกัดได้จากผลพลัมลงในน้ำพลัมให้มีความเข้มข้นร้อยละ 1.0, 5.0 และ 10.0 ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร ทุก ๆ ชั่วโมง ในช่วง 8 ชั่วโมงแรก จากนั้นวัดค่าเมื่อครบ 16 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ พบว่า การสูญเสียรงควัตถุแอนโทไซยานินใน

น้ำพาล์มมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ PPO และระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา โดยในสภาวะที่มีความเข้มข้นของ PPO สูงและการใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยานาน จะส่งผลให้เกิดการสูญเสียของแอนโทไซยานินสูงขึ้นตามไปด้วย (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 ผลของการเติม PPO ต่อการสูญเสียแอนโทไซยานินในน้ำพาล์มที่อุณหภูมิ 30°C
ที่มา: Siddiq และคณะ (1994)

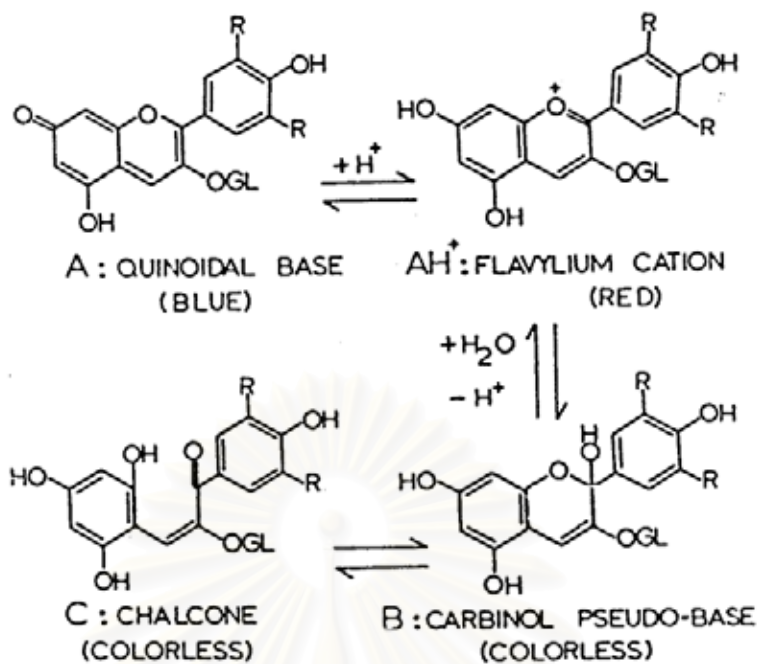
เมื่อศึกษาถึงผลของการยับยั้งกิจกรรมของ PPO โดยการพาสเจอไรส์ที่อุณหภูมิ 88 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที หรือเติมตัวยับยั้ง PPO 3 ชนิด ได้แก่ ascorbic acid, L-cysteine หรือ sodium metabisulfite ความเข้มข้น 0.5 mM ต่อเสถียรภาพของแอนโทไซยานินในน้ำพาล์มที่เติม PPO ลงไปร้อยละ 0.5 เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม (control) ซึ่งเป็นน้ำพาล์มที่ไม่ผ่านกระบวนการยับยั้ง PPO โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร พบว่าการพาสเจอไรส์ การเติม L-cysteine หรือ sodium metabisulfite สามารถลดการสูญเสียของแอนโทไซยานินในน้ำพาล์มลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับชุดการทดลองควบคุม (รูปที่ 2.6) ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวผู้ทำการทดลองได้ให้ข้อเสนอว่า L-cysteine น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะใช้ทดแทน sulfiting agent ซึ่งปัจจุบันได้ถูกห้ามใช้ในผลิตภัณฑ์หลายชนิดแล้ว โดยการใช้ L-cysteine จะให้ผล 2 ประการคือเพิ่ม lag period ของการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล และการจับกับ quinines ของ L-cysteine จะช่วยยับยั้งการเกิดเมลานินได้ด้วย ส่วนผลการเติม ascorbic acid พบว่าทำให้เกิดการสลายตัวของแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับชุดการทดลองควบคุม



รูปที่ 2.6 ผลของการยับยั้ง PPO activity ต่อการสูญเสียแอนโทไซยานินในน้ำพลัม
ที่มา: Siddiq และคณะ (1994)

3.3.2 ความร้อนจากการพาสเจอร์ไรส์และการเก็บรักษา

Brouillard (1982) และ Francis (1989) รายงานว่า แอนโทไซยานินจะถูกทำลายด้วยความร้อนทั้งในระหว่างกระบวนการผลิตและการเก็บรักษา อัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานินเป็นแบบ first order kinetic การเกิดสมดุลของปฏิกิริยาระหว่างรูปแบบ (form) ของแอนโทไซยานินเป็นปฏิกิริยาแบบดูดความร้อน ทำให้สมดุลเลื่อนจากซ้ายไปขวา ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นสมดุลจะเลื่อนไปทางขวามากขึ้น ทำให้สีของแอนโทไซยานินซีดลงเนื่องจากเกิด chalcone เพิ่มขึ้น แต่ chalcone จะเปลี่ยนกลับไปเป็น flavylum cation ได้ช้าลง (รูปที่ 2.7) ซึ่ง chalcone จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ carboxylic acid คือ substituted benzoic acids ที่ได้จาก B-ring และ carboxyaldehyde คือ 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde จาก A-ring ของแอนโทไซยานิน ผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะนำไปสู่การเกิดผลิตภัณฑ์สีน้ำตาลชนิด melanodins ขึ้นในน้ำผลไม้



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของแอนโทไซยานินเมื่ออยู่ในสภาวะสมดุลในสารละลาย
ที่มา: Francis (1989)

Cemeroglu, Velioglu และ Isik (1994) ได้ศึกษาจลนศาสตร์การสลายตัวของแอนโทไซยานินในน้ำเชอร์รี่ โดยใช้น้ำเชอร์รี่เข้มข้น 45 และ 71 °Brix ทำการพาสเจอร์ไรส์ จากนั้นบรรจุขวดปิดสนิท และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5, 20 และ 37 องศาเซลเซียส ติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอนโทไซยานินในระหว่างการเก็บรักษา ผลการทดลองพบว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงขึ้นจะส่งผลให้เกิดการสูญเสียของแอนโทไซยานินสูงขึ้นตามไปด้วย โดยที่อุณหภูมิ 5, 20 และ 37 องศาเซลเซียส ค่าคงที่ของอัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานินในน้ำเชอร์รี่เข้มข้น 45 °Brix จะเท่ากับ 1.00×10^3 , 5.29×10^3 และ 18.44×10^3 ต่อวัน ตามลำดับ ในขณะที่น้ำเชอร์รี่ที่มีความเข้มข้น 71 °Brix จะมีค่าคงที่ของอัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานินเท่ากับ 0.82×10^3 , 6.55×10^3 และ 23.89×10^3 ต่อวัน ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานินในน้ำเชอร์รี่ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิดังกล่าว พบว่าน้ำเชอร์รี่ที่มีความเข้มข้น 45 °Brix จะมีค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานินเท่ากับ 310, 45 และ 14.4 วัน ตามลำดับ ขณะที่น้ำเชอร์รี่ที่มีความเข้มข้น 71 °Brix จะมีค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานินเท่ากับ 356, 38 และ 11 วัน ตามลำดับ

เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อนต่อเสถียรภาพของแอนโทไซยานินในน้ำเชอร์รี่ โดยนำน้ำเชอร์รี่ที่มีความเข้มข้น 45 และ 71 °Brix บรรจุใส่หลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร ไล่อากาศออกจาก headspace แล้วปิดฝาเพื่อป้องกัน

การระเหย ก่อนนำมาแช่ไว้ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิสูงขึ้นจะส่งผลให้เกิดการสูญเสียของแอนโทไซยานินสูงขึ้นตามไปด้วย โดยที่อุณหภูมิ 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ค่าคงที่ของอัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานินในน้ำเซอรีเข้มข้น 45 °Brix จะเท่ากับ 5.15×10^3 , 10.99×10^3 , 24.31×10^3 และ 57.19×10^3 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่น้ำเซอรีที่มีความเข้มข้น 71 °Brix จะมีค่าคงที่ของอัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานินเท่ากับ 7.50×10^3 , 18.75×10^3 , 40.47×10^3 และ 97.14×10^3 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาถึงค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานินในน้ำเซอรีที่ผ่านกระบวนการผลิตที่อุณหภูมิดังกล่าวก็พบว่าในน้ำเซอรีที่มีความเข้มข้น 45 °Brix จะมีค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานินเท่ากับ 52.0, 24.0, 10.9 และ 4.4 ชั่วโมง ตามลำดับ ขณะที่น้ำเซอรีที่มีความเข้มข้น 71 °Brix จะมีค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานินเท่ากับ 35.4, 13.1, 5.9 และ 2.4 ชั่วโมง ตามลำดับ เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะเร่งให้เกิดการเสื่อมสลายของแอนโทไซยานินได้มากขึ้น และเมื่อพิจารณาถึงผลของปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในน้ำเซอรี พบว่าของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดส่วนใหญ่จะได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตส และกรดมาลิก ซึ่งน้ำตาลและสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการเสื่อมสลายของน้ำตาลจะเป็นตัวเร่งให้เกิดการเสื่อมสลายของแอนโทไซยานิน ทำให้น้ำเซอรีที่มีความเข้มข้น 71 °Brix มีค่าคงที่ของอัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานินสูงกว่าน้ำเซอรีที่มีความเข้มข้น 45 °Brix ส่งผลให้มีค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานินต่ำกว่าน้ำเซอรีที่มีความเข้มข้น 45 °Brix

จากผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการสลายตัวของแอนโทไซยานินในน้ำเซอรี มีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการผลิตและการเก็บรักษา โดยค่าคงที่ของอัตราการสลายตัว (rate constant) ของแอนโทไซยานินจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ

Riichiro และ คณะ (1995) ศึกษาเสถียรภาพของ hordeumin ซึ่งเป็นรงควัตถุแอนโทไซยานินจากข้าวบาร์เลย์ โดยเตรียม hordeumin (จากตะกอนที่ได้จากการกรองหลังการหมักข้าวบาร์เลย์ให้เกิดแอลกอฮอล์) แล้วนำมาละลายในสารละลาย 1% HCl-methanol บรรจุสารละลายที่ได้ลงในหลอด vial ขนาด 3 มิลลิลิตร ปิดฝีกและเก็บรักษาในที่มืดที่อุณหภูมิ 25, 5 และ -20 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างมาตรวจสอบปริมาณรงควัตถุแอนโทไซยานินคงเหลือ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้ค่าครึ่งชีวิตของปริมาณแอนโทไซยานินยิ่งลดลง โดยค่าครึ่งชีวิตของ hordeumin ที่เก็บที่อุณหภูมิ 25, 5 และ -20 องศาเซลเซียสมีค่าเท่ากับ 10, 42 และ 600 วัน ตามลำดับ

จากนั้นทดสอบเสถียรภาพต่อความร้อนของ hordeumin โดยการนำสารละลาย hordeumin มาบ่มที่อุณหภูมิ 5, 40, 50, 60, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 5, 15 และ 30 นาที นำตัวอย่างออกมาตรวจสอบปริมาณรงควัตถุแอนโทไซยานินคงเหลือ โดย

ให้ปริมาณรังควัตถุแอนโทไซยานินใน hordeumin ที่ไม่ได้ให้ความร้อนมีค่าเท่ากับ 100% ผลการทดลองพบว่าเมื่ออุณหภูมิในการให้ความร้อนสูงขึ้นและเวลานานขึ้นปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือก็จะลดลง แสดงให้เห็นว่าความร้อนและระยะเวลาที่ใช้มีผลต่อการสลายตัวของ hordeumin โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จะทำให้ปริมาณรังควัตถุแอนโทไซยานินเหลืออยู่ 90% และลดลงเหลือ 80% เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิดังกล่าวนาน 30 นาที ขณะที่การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีจะทำให้รังควัตถุดังกล่าวเหลืออยู่เพียง 60% (รูปที่ 2.8)

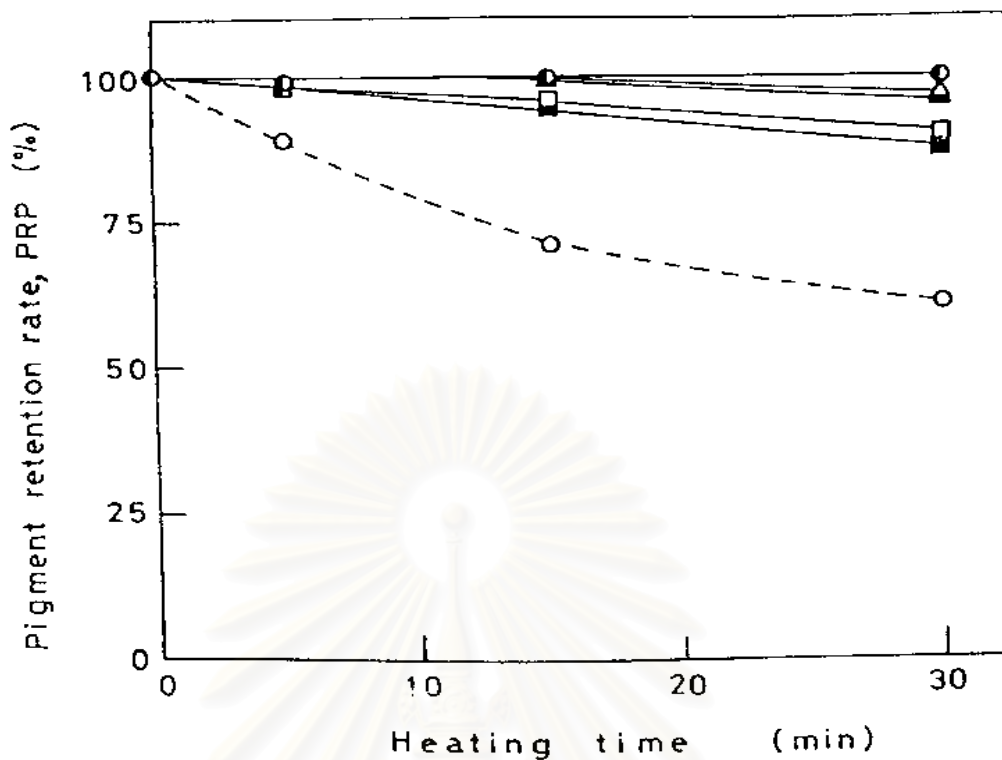
3.3.3 แสงระหว่างการเก็บรักษา

การบรรจุผลไม้ในขวดแก้วใสหรือภาชนะที่ไม่สามารถป้องกันแสงได้จะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้รับแสงตลอดเวลาระหว่างการเก็บรักษา แสงจะเร่งการเสื่อมสลายของแอนโทไซยานินโดยทำให้เกิดพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) หรือคอนเดนเซชัน (condensation) ซึ่งทำให้เกิดสารสีน้ำตาล ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเหมือนกับการเสื่อมสลายของแอนโทไซยานินเนื่องจากความร้อน (Von-Elbe และ Schartz, 1996)

Iversen (1999) ศึกษาผลของแสงในระหว่างการเก็บรักษาต่อปริมาณแอนโทไซยานินในผลิตภัณฑ์ nectar จากผล black currant โดย nectar ที่ใช้ในการทดลองมี soluble solid 16 °Brix และ pH 3.0 จากนั้นนำมาไล่อากาศออก (deaerated โดยใช้ความดันสุญญากาศที่ 925 มิลลิบาร์) แล้วพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 27 วินาทีด้วย heat exchanger บรรจุขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสในที่มืดและภายใต้แสง daylight สุ่มตัวอย่างออกมาตรวจปริมาณแอนโทไซยานินผลการทดลองพบว่าแสงมีผลต่อการสลายตัวของแอนโทไซยานิน โดยการสลายตัวดังกล่าวเป็นแบบ first order ซึ่ง nectar ที่เก็บรักษาในที่มืดจะมีค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานินอยู่ที่ 216 วัน ขณะที่ nectar ที่เก็บรักษาภายใต้แสง daylight มีค่าครึ่งชีวิตเหลืออยู่เพียง 165 วันเท่านั้น

3.3.4 ออกซิเจนและวิตามินซีในผลิตภัณฑ์

ในระบบที่มีออกซิเจนและวิตามินซีอยู่ร่วมกัน วิตามินซีจะถูกออกซิไดซ์ให้ไปอยู่ในรูปของ dehydroascorbic acid ซึ่งจะก่อให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนโทไซยานินได้โดยมี copper เป็นตัวเร่ง ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะเข้าทำปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง C₂ ของแอนโทไซยานิน ทำให้ pyrylium ring แตกออกเป็นสารประกอบที่ไม่มีสีและสารอนุพันธ์ของ coumarin สารผลิตภัณฑ์ที่ได้อาจสลายตัวต่อไปหรือเกิด polymerization แล้วทำให้เกิดตะกอนสีน้ำตาลขึ้นในน้ำผลไม้ได้ (Von-Elbe และ Schwartz, 1996)



รูปที่ 2.8 เสถียรภาพต่อความร้อนของ hordeumin ที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ --○- 5°C, --●- 40°C, --△- 50°C, --▲- 60°C, --□- 70°C, --■- 80°C, --○- 100°C

ที่มา: Riichiro และคณะ (1995)

Zulin, Lin และ Francis (1992) ศึกษาผลของวิตามินซีและแทนนินต่อเสถียรภาพของแอนโทไซยานินจาก *Tradescantia pallida* โดยใช้ใบสดหรือใบที่ผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -28 องศาเซลเซียส มาสกัดแอนโทไซยานินโดยแช่ในสารละลาย 0.1% HCl ในน้ำ ข้ามคืน จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านสารละลายที่ได้นบน cation exchange resin และ elute จาก column ด้วย 0.1% HCl ใน methanol นำแอนโทไซยานินที่ได้มาละลายในสารละลาย citric acid/dibasic sodium phosphate buffer pH 4.5 ที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์แล้ว เติมน้ำตาลทรายเพื่อให้สารละลายที่ได้มีของแข็งที่ละลายได้ 16.2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำสารละลายที่ได้บรรจุใส่หลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหลอดละ 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายแทนนิน วิตามินซี หรือน้ำ 1 มิลลิลิตร นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ (มีน้ำตาล 15%) มาพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที ก่อนไล่อากาศออกโดยการ flush ด้วยไนโตรเจน แล้วปิดด้วยจุกคอร์กที่ผ่านการสเตอริไรส์ที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีมาแล้ว จุ่มในสารละลายพาราฟินเพื่อป้องกันการถ่ายเทของออกซิเจนระหว่างการเก็บรักษา เก็บตัวอย่างไว้ 4 เดือนก่อนนำมาตรวจสอบปริมาณแอนโทไซยานินเปรียบเทียบกับก่อนเก็บรักษา ซึ่งผลการทดลองที่ได้ พบว่า การเติมแทนนิน และวิตามินซีในปริมาณที่สูงขึ้นจะทำให้มีการสูญเสียแอนโทไซ

ยานินมากขึ้นตามไปด้วย โดยตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารละลายแทนนินแต่เติมสารละลายวิตามินซี ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร จะมีปริมาณแอนโทไซยานินเหลืออยู่ 62 และ 25% ตามลำดับ (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 ผลของการเติมแทนนินและวิตามินซีต่อปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือ ใน น้ำผลไม้จำลองที่เติมแอนโทไซยานินจาก *Tradescantia pallida*

Tannin (%)	Ascorbic acid (mg/ml)	Pigment (% retained)	
		Storage time (months)	
		0	4
0	0.0	100	62
	0.1	97	30
	0.5	96	25
0.1	0.0	90	21
	0.1	89	20
	0.5	91	23
0.3	0.0	73	16
	0.1	63	28
	0.5	69	30

ที่มา: ดัดแปลงจาก Zulin, Lin และ Francis (1992)

Iversen (1999) ศึกษาผลของออกซิเจนต่อเสถียรภาพของ

แอนโทไซยานินและวิตามินซีในผลิตภัณฑ์ nectar จากผล black currant โดยเตรียมผลิตภัณฑ์ nectar จากส่วนของ mash ซึ่งได้จากการสกัดน้ำผลไม้ เปรียบเทียบระหว่างผลิตภัณฑ์ที่มีการไล่ อากาศออก (deaerated) และชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการไล่อากาศออก นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ มาตรวจสอบปริมาณออกซิเจน แอนโทไซยานิน และวิตามินซีในระหว่างการเก็บรักษา ผลการทดลองที่ได้พบว่า ปริมาณออกซิเจนในผลิตภัณฑ์ที่ไม่ได้ไล่อากาศออก จะลดลงอย่างรวดเร็วจนไม่มีความแตกต่างกับปริมาณออกซิเจนในผลิตภัณฑ์ที่ไล่อากาศออก หลังเก็บไว้เพียง 1 วัน โดยก่อนการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ nectar ที่ไม่ได้ไล่อากาศออกจะมีปริมาณออกซิเจนอยู่ 5.10 ± 0.14 ppm ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ซึ่งผ่านการไล่อากาศออกจะมีปริมาณออกซิเจนอยู่ 1.60 ± 0.07 ppm แต่หลังจากเก็บรักษาไว้ 1 วันพบว่าผลิตภัณฑ์ทั้งสองมีปริมาณออกซิเจนเหลืออยู่ 1.07 ± 0.07 และ 1.05 ± 0.07 ppm ตามลำดับ และจากข้อมูลที่ได้ยังพบอีกว่าการเอาอากาศออก

จากผลิตภัณฑ์หรือไม่ ไม่มีผลต่อเสถียรภาพของแอนโทไซยานิน และปริมาณวิตามินซีในผลิตภัณฑ์ nectar ซึ่งผู้ทำการทดลองให้เหตุผลว่าอาจเป็นเพราะในผลิตภัณฑ์ยังมีสารประกอบอื่นที่มีคุณสมบัติเป็น antioxidant ซึ่งสามารถใช้ออกซิเจนในผลิตภัณฑ์ได้ เช่น สารประกอบ ฟีนอลิก อยู่ด้วย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุประสงค์ สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 วัตถุประสงค์

ทุกการทดลองใช้ผลเม่าที่อยู่ในระยะสุกแก่เต็มที่ (ผลสีดำ) ซึ่งเก็บรวบรวมจากเขตพื้นที่จังหวัดสกลนคร อุดรธานี และนครพนม โดยสถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรสกลนคร ในช่วงเดือนสิงหาคม – ตุลาคม 2544 นำมาบรจจุสูง high density polyethylene ถูงละ 1 กิโลกรัม เก็บรักษาโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18°C

3.1.2 สารเคมี

Acetic acid	A.R. grade (Merck)
Ammonium sulphate	A.R. grade (Fluka)
L-ascorbic acid	A.R. grade (Sigma)
L-ascorbic acid	Food grade
Bovin serum albumin	A.R. grade (Sigma)
Catechol	A.R. grade (Merck)
Citric acid	A.R. grade (Fluka)
Citric acid	Food grade
Copper sulphate pentahydrate	A.R. grade (Merck)
Disodium hydrogen phosphate	A.R. grade (Merck)
Folin-Ciocalteu phenol reagent	A.R. grade (Merck)
Gallic acid	A.R. grade (Fluka)
Hydrochloric acid	A.R. grade (Fluka)
<i>m</i> -phosphoric acid	A.R. grade (Merck)
<i>O</i> -phosphoric acid	A.R. grade (Merck)
Potassium chloride	A.R. grade (Sigma)
Potassium hydrogen phthalate	A.R. grade (Merck)
Potassium metabisulphite	A.R. grade (Merck)
Potassium tartrate	A.R. grade (Merck)

Sodium acetate	A.R. grade (Merck)
Sodium carbonate	A.R. grade (Merck)
Sodium deoxycholate	A.R. grade (Fluka)
Sodium dihydrogen phosphate	A.R. grade (Merck)
Sodium dodecyl sulphate	A.R. grade (Sigma)
Sodium hydroxide	A.R. grade (Sigma)
Trichloroacetic acid	A.R. grade (Fluka)
อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar	A.R. grade (Merck)
อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar	A.R. grade (Merck)

3.1.3 อุปกรณ์

Hand refractometer (รุ่น 2110-W06 บริษัท Atago, Japan)
 pH meter (รุ่น F-21 บริษัท Horiba, Japan)
 Refrigerated centrifuge (รุ่น multi-RF บริษัท Thermo IEC, USA)
 Spectrophotometer (รุ่น Geneys-10 UV บริษัท Thermo Spectronic, USA)
 Spectrophotometer (รุ่น Lamda 25 บริษัท Perkin Elmer, USA)
 เครื่องชั่งน้ำหนัก (รุ่น 3100s บริษัท Sartorius, Germany)
 เครื่องวัดสี (รุ่น CR-310 บริษัท Minolta, Japan)

3.2 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำคั้นที่ได้จากผลเม่า

นำผลเม่าสุกที่ผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18°C จำนวน 100 กรัม มาละลายน้ำแข็ง (thaw) โดยนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 1 คืน ก่อนคั้นด้วยผ้าขาวบางและนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge (อุณหภูมิ 4°C) เป็นเวลา 10 นาที ความเร็ว $6,000 \times g$ นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์คุณภาพดังต่อไปนี้

3.2.1 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solids)

ใช้การวัดด้วย Hand refractometer

3.2.2 ปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ทั้งหมด

ใช้การไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 N ตามวิธีการของ A.O.A.C. (1995) แล้วคำนวณปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ในรูปของกรดซิตริก (โดยในการคำนวณกำหนดให้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 N 1 ml ทำปฏิกิริยาสมมูลย์พอดีกับกรดซิตริก 6.4 mg)

- 3.2.3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)
 นำน้ำเม่าที่คั้นได้ไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้ pH meter
- 3.2.4 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด
 ใช้การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด โดยดัดแปลงจากวิธีการ
 ของ Fuleki และ Francis (1968a) (ภาคผนวก ก 1)
- 3.2.5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด
 ใช้การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu
 (Folin และ Ciocalteu, 1927) (ภาคผนวก ก 2)
- 3.2.6 ปริมาณวิตามินซี
 ใช้การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีการของ
 นิภาภรณ์ ลักษณะสมยา (2541) (ภาคผนวก ก 3)
- 3.2.7 วัดค่าสี
 ใช้การวัดค่าสีในระบบ CIE L*a*b* ด้วยเครื่องวัดสี Minolta รุ่น CR-310 โดยใช้
 แหล่งกำเนิดแสง D65
- 3.2.8 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์ และรา
 ใช้วิธี viable plate count ในการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์ และ
 รา ตามวิธีการของ A.O.A.C.(1995)
- 3.2.9 กิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (PPO activity)
- 3.2.9.1 เตรียม crude enzyme (ภาคผนวก ก 4)
- 3.2.9.2 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน crude enzyme
 ใช้การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี modified Lowry (Peterson,
 1977) (ภาคผนวก ก 5)
- 3.2.9.3 วิเคราะห์ PPO activity
 ใช้การวิเคราะห์ PPO activity ตามวิธีการของ Duangmal และ Owusu-
 Apenten (1999) โดยนำ crude enzyme 200 μ l มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย catechol
 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมล ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 7.0
 จำนวน 2.80 ml ที่อุณหภูมิ 25^oC วัดการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น
 420 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (Perkin Elmer รุ่น Lamda 25) ชนิดที่มี
 water bath ควบคุมอุณหภูมิของ cuvette holder คำนวณอัตราเร็วเริ่มต้นจากความชันของกราฟ
 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลา คำนวณ PPO activity โดยให้เอนไซม์ 1 หน่วย

(unit) เท่ากับการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง 0.001 ต่อนาที รายงาน PPO activity ที่ได้ในรูปของ units/mg protein

3.3 ศึกษาสมบัติของ crude PPO ในน้ำเเม้า

เตรียม crude enzyme ตามวิธีการในข้อ 3.2.9.1 ก่อนนำมาศึกษาสมบัติในด้านต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

3.3.1 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ crude enzyme และ substrate

นำ crude enzyme (แปรปริมาณเป็น 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 μ l) มาทำปฏิกิริยากับ substrate (สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 M pH 7.0) จำนวน 2.95, 2.90, 2.85, 2.80, 2.75 และ 2.70 ml ตามลำดับ เพื่อให้ reaction mixture มีปริมาตร 3 ml ที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$ C วิเคราะห์ PPO activity ตามข้อ 3.2.9.3 สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง PPO activity (units) กับปริมาณ crude enzyme ที่ใช้

3.3.2 ศึกษา optimum pH ของ crude PPO ในน้ำเเม้า

นำ crude enzyme จำนวน 200 μ l มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ในช่วง pH 3.0 – 9.0 (โดยแปรค่า pH เป็น 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0) จำนวน 2.80 ml ที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$ C วิเคราะห์ PPO activity ตามข้อ 3.2.9.3 คำนวณ PPO activity ที่ได้ในแต่ละ pH ในรูปของ % relative activity โดยให้ PPO activity ที่มีค่าสูงสุดเป็น 100%

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % relative activity ของ PPO activity ในน้ำเเม้า กับค่า pH ที่ระดับต่าง ๆ เลือกค่า pH ที่ให้ PPO activity สูงที่สุดไปใช้ในการศึกษาในหัวข้อต่อไป

3.3.3 ศึกษา pH stability ของ crude PPO ในน้ำเเม้า

เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ในช่วง pH 3.0- 8.5 (โดยแปรค่า pH เป็น 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 และ 8.5) นำ crude enzyme มาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าวในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 บ่มที่อุณหภูมิ 0 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ จำนวน 200 μ l มาวิเคราะห์ PPO activity ตามวิธีการในข้อ 3.2.9.3 ที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$ C โดยใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH ตามที่เลือกไว้ในข้อ 3.3.2 จำนวน 2.80 ml เป็น substrate เปรียบเทียบกับ crude enzyme ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7.0 อัตราส่วน 1 ต่อ 4 ที่ไม่ได้ผ่านการบ่ม (control) คำนวณ PPO activity แต่ละค่า pH ในรูปของ % residual activity โดยให้ PPO activity ที่วิเคราะห์ได้จาก control มี % residual activity เท่ากับ 100%

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % residual activity ของ PPO activity กับค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการบ่ม crude enzyme

3.3.4 ศึกษา optimum temperature ของ crude PPO ในน้ำเมา

นำ crude enzyme จำนวน 200 μ l มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH ที่เลือกไว้ในข้อ 3.3.2 จำนวน 2.80 ml วิเคราะห์ PPO activity ตามวิธีการในข้อ 3.2.9.3 โดยแปรอุณหภูมิเป็น 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 และ 90 $^{\circ}$ C ควบคุมอุณหภูมิโดยใช้ water bath ซึ่งต่อเชื่อมกับ cuvette holder คำนวณ PPO activity ที่ได้ในแต่ละอุณหภูมิเป็น % relative activity โดยให้ PPO activity ที่มีค่าสูงที่สุดมี relative activity เท่ากับ 100%

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง relative activity กับอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา เลือกระดับอุณหภูมิที่ให้ PPO activity สูงที่สุดไปศึกษาในหัวข้อต่อไป

3.3.5 ศึกษา temperature stability ของ crude PPO ในน้ำเมา

นำ crude enzyme มาบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85 และ 90 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 10 นาที นำมาทำให้เย็นทันทีใน ice bath ก่อนนำ crude enzyme ที่บ่มเสร็จแล้วจำนวน 200 μ l มาวิเคราะห์ PPO activity ตามวิธีการในข้อ 3.2.9.3 โดยใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH ที่เลือกไว้ในข้อ 3.3.2 จำนวน 2.80 ml ที่อุณหภูมิที่เลือกไว้ในข้อ 3.3.4 เปรียบเทียบกับ PPO activity ใน crude enzyme ที่ไม่ได้ผ่านการบ่ม นำ PPO activity ที่ตรวจสอบได้มาคำนวณเป็น % residual activity โดยให้ PPO activity ใน crude enzyme ที่ไม่ผ่านการบ่มมี residual activity เท่ากับ 100%

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง residual activity กับอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม crude enzyme

3.4 ศึกษาผลของวิตามินซีต่อการยับยั้ง PPO activity ในน้ำเมา

ศึกษาผลของการเติมวิตามินซี 4 ระดับ คือ 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ผลเมาต่อการยับยั้ง PPO activity ในน้ำเมา โดยเติมวิตามินซีลงไปเผลเมาก่อนการสกัดน้ำเมา เปรียบเทียบกับการสกัดน้ำเมาโดยไม่เติมวิตามินซี (control) ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge (อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ C) ที่ความเร็ว 6,000 x *g* เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์คุณภาพดังต่อไปนี้

3.4.1 ปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ทั้งหมด ตามข้อ 3.2.2

- 3.4.2 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ตามข้อ 3.2.4
- 3.4.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ตามข้อ 3.2.5
- 3.4.4 ปริมาณวิตามินซี ตามข้อ 3.2.6
- 3.4.5 ค่าสี ตามข้อ 3.2.7
- 3.4.6 PPO activity ตามข้อ 3.2.9

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Statistical Package for the Social Science (SPSS) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ได้โดยใช้ Duncan's New Multiple Rank Test (Cochran และ Cox, 1992)

เลือกปริมาณวิตามินซีที่เหมาะสมต่อการสกัดน้ำเอนไซม์ โดยพิจารณาจากผลการยับยั้ง PPO activity เพื่อนำไปใช้ในการทดลองข้อต่อไป

3.5 ศึกษาผลของการพาสเจอร์ไรส์ต่อคุณภาพของน้ำเอนไซม์ 25%

เลือกปริมาณวิตามินซีที่เหมาะสมในการสกัดน้ำเอนไซม์จากข้อ 3.4 สกัดน้ำเอนไซม์และน้ำเอนไซม์ที่ได้มาเตรียมเป็นน้ำเอนไซม์ 25% โดยปรับให้มีปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ทั้งหมด 0.5% (ในรูปของกรดซิตริก) และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 15 องศาบริกซ์ (ด้วยน้ำตาลทราย) น้ำเอนไซม์ที่ได้มี pH 3.1 พาสเจอร์ไรส์โดยแปรอุณหภูมิและเวลาในการพาสเจอร์ไรส์ตัวแปรละ 3 ระดับ คือ 80, 85 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 15 และ 20 นาที บรรจุน้ำเอนไซม์ที่ได้ในขวดสีชา ขนาด 190 ml ครอบด้วย head space ให้เท่ากับ 4.5 ml ปิดผนึกด้วยฝาพลาสติก 2 ชั้น ทำให้เย็นทันทีที่อุณหภูมิห้อง นำมาวิเคราะห์คุณภาพดังต่อไปนี้

3.5.1 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์ และรา ตามข้อ 3.2.8

3.5.2 PPO activity ตามข้อ 3.2.9

3.5.3 ค่าสี ตามข้อ 3.2.7 จากนั้นใช้ค่าที่วัดได้คำนวณค่าของการเปลี่ยนแปลงสี (total color difference, ΔE^*) เทียบกับน้ำเอนไซม์ก่อนพาสเจอร์ไรส์ ค่า Hue angle (h°) และค่า Chroma (C^*) ตามวิธีการของ Hunt (1998) (ภาคผนวก ก 7)

3.5.4 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด

ใช้การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดด้วยวิธี pH differential (Fuleki และ Francis, 1968b) (ภาคผนวก ก 8)

3.5.5 ดัชนีการสลายตัวของแอนโทไซยานิน (degradation index, DI)

ใช้การวิเคราะห์ดัชนีการสลายตัวของแอนโทไซยานินตามวิธีการของ Fuleki และ Francis (1986b) และ Chulkyoon และ Hettiarachchy (1991) (ภาคผนวก ก 9)

3.5.6 ความเข้มสีทั้งหมด (total color density, TCD)

ใช้การวิเคราะห์ความเข้มสีทั้งหมดตามวิธีการของ Somers (1971) และ Spayd และคณะ (1984) (ภาคผนวก ก 10)

3.5.7 ปริมาณสีพอลิเมอร์ (polymeric color, PC)

ใช้การวิเคราะห์ปริมาณสีพอลิเมอร์ตามวิธีการของ Somers (1971) และ Spayd และคณะ (1984) (ภาคผนวก ก 11)

วางแผนการทดลองแบบ symmetric factorial experiment design ขนาด 3 x 3 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS (Cocham และ Cox, 1992)

เลือกสภาวะที่เหมาะสมในการพาสเจอร์ไรส์น้ำเฝ้า 25% โดยพิจารณาจากภาวะที่สามารถทำลายจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์ และรา และ PPO activity ได้อย่างสมบูรณ์ แต่ยังคงเหลือปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดสูงที่สุด

3.6 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพระหว่างการเก็บรักษาน้ำเฝ้า 25%

จากผลการทดลองในข้อ 3.5 นำวิธีการพาสเจอร์ไรส์ที่เหมาะสมมาทำการผลิตน้ำเฝ้า 25% บรรจุขวดแก้วใสขนาด 300 ml หนึ่งขวด โดยคุม head space ให้เท่ากับ 10.0 ml ปิดด้วยฝาจับแล้วทำให้เย็นทันทีที่อุณหภูมิห้อง เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 สัปดาห์ โดยทุก ๆ สัปดาห์สุ่มตัวอย่างน้ำเฝ้าออกมาวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

3.6.1 ค่าสี ตามข้อ 3.2.7

3.6.2 ค่า ΔE^* ค่า h° ค่า C^* ตามข้อ 3.5.3 และค่า Hue difference (ΔH^*) ตามวิธีการของ Hunt (1998) (ภาคผนวก ก 7)

3.6.3 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ตามข้อ 3.5.4

นำปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดที่คำนวณได้ มาคำนวณเป็นค่า natural logarithm (ln) ของร้อยละปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือ (% retention) ต่อปริมาณแอนโทไซยานินก่อนการเก็บรักษา แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษา

3.6.4 ค่าคงที่ของการสลายตัวของแอนโทไซยานิน (reaction rate constant, k)

ใช้การคำนวณค่าคงที่ของการสลายตัวของแอนโทไซยานิน ตามวิธีการของ Roos (1995) (ภาคผนวก ก 12)

3.6.5 ค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานิน (half life, $t_{1/2}$)

ใช้การคำนวณค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานิน ตามวิธีการของ Roos (1995)

(ภาคผนวก ก 13)

3.6.6 ดัชนีการสลายตัวของแอนโทไซยานิน ตามข้อ 3.5.5

3.6.7 ความเข้มข้นทั้งหมด ตามข้อ 3.5.6

3.6.8 ปริมาณสีฟอลิเมอร์ค ตามข้อ 3.5.7

3.6.9 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์ และรา ตามข้อ 3.2.8 (ทุก 2 สัปดาห์)

3.6.10 คุณภาพทางประสาทสัมผัส ใช้แบบทดสอบแบบ Hedonic score 9 ระดับ โดยให้ผู้ทดสอบ 30 คนประเมินความชอบที่มีต่อสีแดง และสีโดยรวมของน้ำเม่า 25% (ทุก 4 สัปดาห์)

3.7 ศึกษาผลของการเติมวิตามินซีต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพระหว่างการเก็บรักษา น้ำเม่า 25%

ผลิตน้ำเม่า 25% โดยเติมวิตามินซีให้มีปริมาณคงเหลือหลังการพาสเจอร์ไรส์ ร้อยละ 0, 10, 25, 50 และ 100 ของปริมาณวิตามินซีที่แนะนำให้บริโภคต่อวัน (60 มิลลิกรัม) (Williams, 1988) ต่อน้ำเม่า 25% 1 ขวด (190 มิลลิลิตร, 1 หน่วยบริโภค) (ภาคผนวก ก 14) ก่อนบรรจุในขวดแก้ว สีชาขนาด 190 ml ฝาครอบ โดยคัม head space ให้เท่ากับ 4.5 ml ปิดด้วยฝาพลาสติก 2 ชั้น ทำให้เย็นทันทีที่อุณหภูมิห้อง เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 สัปดาห์โดยทุก ๆ สัปดาห์ สุ่มตัวอย่างน้ำเม่าพร้อมดื่มออกมาวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

3.7.1 ค่าสี ตามข้อ 3.2.7

3.7.2 ค่า ΔE^* ค่า h^0 ค่า C^* และค่า ΔH^* ตามข้อ 3.6.2

3.7.3 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ตามข้อ 3.5.4

นำปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดที่คำนวณได้ มาคำนวณเป็นค่า natural logarithm (ln) ของร้อยละปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือ (% retention) ต่อปริมาณแอนโทไซยานินก่อนการเก็บรักษา นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษา

3.7.4 ค่าคงที่ของการสลายตัวของแอนโทไซยานิน (reaction rate constant, k) ตามข้อ 3.6.4

3.7.5 ค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานิน (half life) ตามข้อ 3.6.5

3.7.6 ดัชนีการสลายตัวของแอนโทไซยานิน ตามข้อ 3.5.5

3.7.7 ความเข้มข้นทั้งหมด ตามข้อ 3.5.6

3.7.8 ปริมาณสีฟอสฟอริค ตามข้อ 3.5.7

3.7.9 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์ และรา ตามข้อ 3.2.8 (ทุก 2 สัปดาห์)

3.7.10 ปริมาณวิตามินซี ตามข้อ 3.2.6 (ทุก 3 สัปดาห์)

3.7.11 ปริมาณออกซิเจนที่เหลืออยู่โดยใช้ Oxygen probe (ทุก 3 สัปดาห์)

3.7.12 คุณภาพทางประสาทสัมผัส ใช้แบบทดสอบแบบ Hedonic score 9 ระดับ โดยให้ผู้ทดสอบ 30 คนประเมินความชอบที่มีต่อสีแดง และสีโดยรวมของน้ำแม่่า 25% (ทุก 4 สัปดาห์)

วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS (Cochran และ Cox, 1992)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์คุณภาพของน้ำคั้นที่ได้จากผลเม่า

ในการผลิตน้ำผลไม้ไม่มีความจำเป็นที่จะต้องทราบถึงองค์ประกอบต่าง ๆ ที่มีในผลไม้ ซึ่งอาจจะส่งผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ศึกษาถึงองค์ประกอบต่าง ๆ ของน้ำเม่า โดยสกัดน้ำเม่าแล้วนำมาตรวจสอบคุณภาพตามวิธีการในข้อ 3.2 ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 คุณภาพของน้ำคั้นที่ได้จากผลเม่า

ลักษณะคุณภาพ	ปริมาณ
ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ($^{\circ}$ Brix)	17.6 \pm 0.3
ปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ (% as citric acid)	0.87 \pm 0.09
ค่าความเป็นกรดต่าง (pH)	3.5 \pm 0.1
ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ^{1/} (mg/100 ml)	17.62 \pm 2.23
ปริมาณสารประกอบฟีนอลลิคทั้งหมด (mg/100 ml)	311 \pm 0.36
ปริมาณวิตามินซี (μ g/ml)	ไม่พบ
ค่าสี	
L*	1.15 \pm 0.32
a*	27.51 \pm 4.20
b*	1.68 \pm 0.53
PPO activity (units/mg protein)	2,734 \pm 446
ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/ml)	2.06 x 10 ²
ปริมาณเชื้อราและยีสต์ (CFU/ml)	ไม่พบ

^{1/} ในการคำนวณใช้ค่า $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ของผลแครนเบอร์รี่ซึ่งมีค่าเท่ากับ 982 (Fuleki และ Francis, 1968a) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 526 นาโนเมตร (ภาคผนวก ก 1)

จากผลการวิเคราะห์คุณภาพของน้ำคั้นที่ได้จากผลเม่า (ตารางที่ 4.1) พบว่าน้ำเม่ามีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 17.6 \pm 0.3 $^{\circ}$ Brix ซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในองุ่นที่มีค่าเท่ากับ 12-17 $^{\circ}$ Brix (Patil และคณะ, 1995) และผลไม้ในตระกูล

berries ที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 10.2-19.7°Brix (Kotecha และ Madhavi, 1995) และเมื่อพิจารณาปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ทั้งหมดของน้ำเม่าที่มีค่าเท่ากับ $0.87 \pm 0.09\%$ ก็พบว่าอยู่ในช่วงเดียวกับปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ทั้งหมดในองุ่นและ berries ที่มีค่าเท่ากับ 0.4–1.2% ในรูปของกรดทาทาริก และ 0.5 – 3.6% ในรูปของกรดซิตริก ตามลำดับ

4.2 การศึกษาสมบัติของ crude PPO ในน้ำเม่า

จากผลการทดลองในข้อ 4.1 มีการตรวจพบเอนไซม์ PPO ในน้ำเม่า ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวมีผลต่อเสถียรภาพของแอนโทไซยานินในน้ำเม่า โดยจะ catalyse การออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเม่าไปเป็น *o*-quinone ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีความไวสูงต่อการเกิดปฏิกิริยาโดย *o*-quinone ที่เกิดขึ้นสามารถออกซิไดซ์แอนโทไซยานิน แล้วทำให้แอนโทไซยานินเกิดการเสื่อมสลายไปในที่สุด (Markakis, 1982) ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาถึงสมบัติในด้านต่าง ๆ ของ PPO ในน้ำเม่า เพื่อที่จะได้ใช้เป็นแนวทางในการหาวิธีการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวต่อไป

การศึกษาสมบัติของ crude PPO ในน้ำเม่า จะเตรียม crude enzyme ตามวิธีการในข้อ

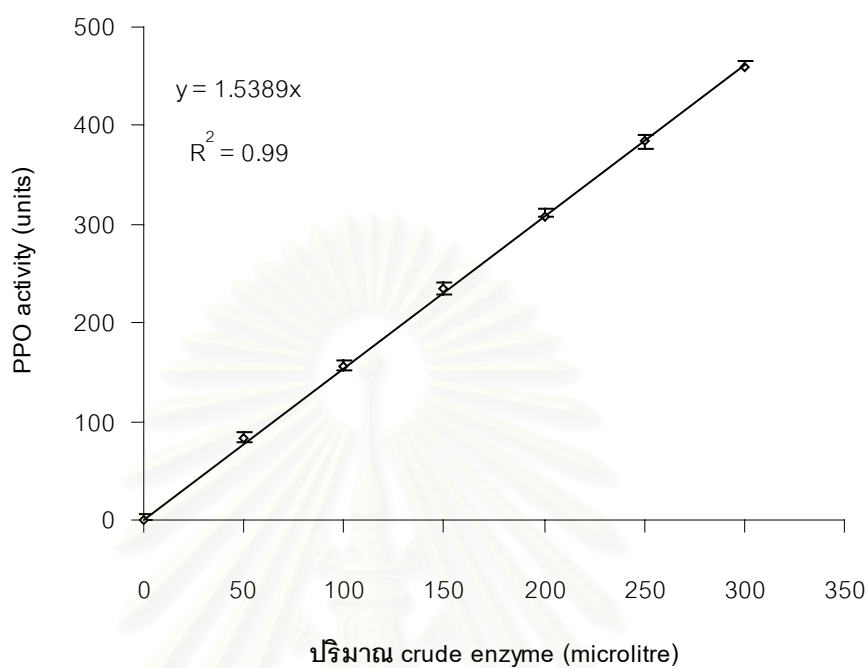
3.2.9.1 ก่อนนำมาศึกษาสมบัติในด้านต่างๆ ดังนี้

4.2.1 การศึกษาเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ crude enzyme กับ substrate

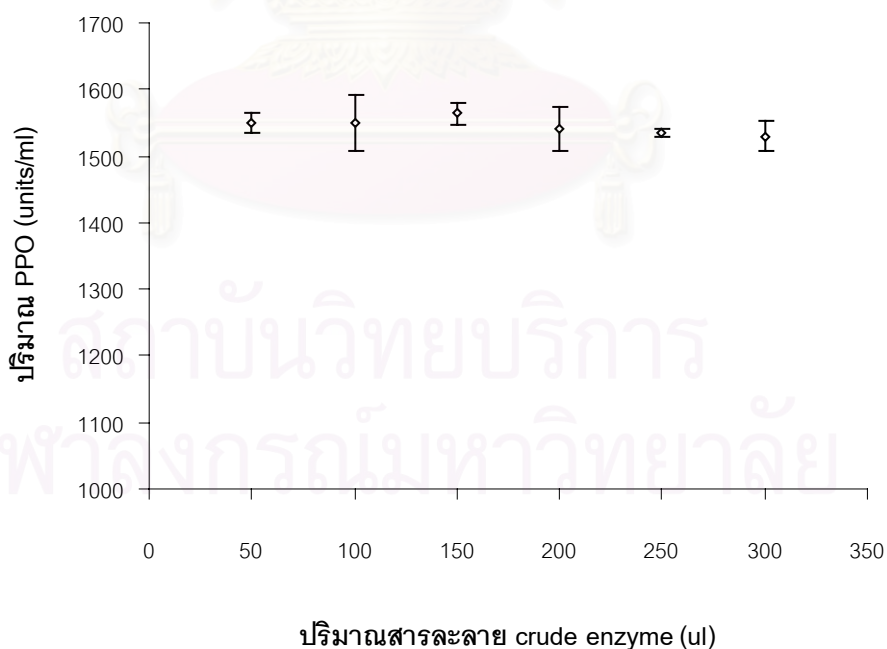
ในการศึกษา activity ของเอนไซม์ ระบบที่ใช้ศึกษาจะต้องมีปริมาณ substrate ที่มากเกินไป เพื่อให้การวัด activity ของเอนไซม์เป็นไปอย่างถูกต้อง (Scopes, 1994) ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ crude enzyme กับสารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลาย phosphate buffer pH 7.0 ซึ่งใช้เป็น substrate (ตามวิธีการในข้อ 3.3.1) ที่อุณหภูมิ 25 °C ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.1

จากผลการทดลอง (รูปที่ 4.1) จะเห็นว่าเมื่อใช้ crude enzyme ในปริมาณที่มากขึ้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้น โดยมีความสัมพันธ์กันในลักษณะเชิงเส้นตรง (linear increase) มีค่า R^2 เท่ากับ 0.99 จากความสัมพันธ์ดังกล่าวเมื่อคำนวณ PPO activity ที่ได้ในรูปของ units/ml ของ crude enzyme แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับปริมาณ crude enzyme ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (รูปที่ 4.2) เพื่อกำจัดความแตกต่างอันเนื่องมาจากปริมาณ crude enzyme ที่ใช้ พบว่าปริมาณ crude enzyme ที่เลือกใช้ในการทดลองไม่มีผลต่อปริมาณ PPO activity ที่ตรวจพบ แสดงให้เห็นว่าสถานะที่ใช้ในการทดลองมีปริมาณ substrate มากเกินไป ทำให้ PPO activity ในรูปของ units/ml ของ crude enzyme ที่ใช้ไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกใช้ crude enzyme 0.20 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ความเข้มข้น 0.2 M (pH 7.0) จำนวน 2.80 มิลลิลิตร ในการศึกษาสมบัติของ crude PPO ใน
น้ำเม้าต่อไป



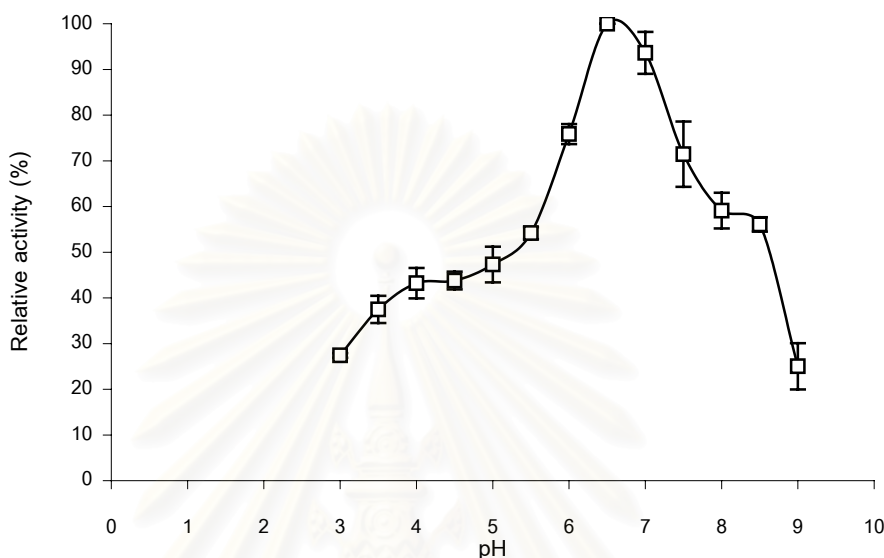
รูปที่ 4.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ crude enzyme และ PPO activity



รูปที่ 4.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ crude enzyme และ PPO activity ต่อมิลลิลิตรของ
crude enzyme

4.2.2 การศึกษา optimum pH ของ crude PPO ในน้ำเม่า

นำ crude enzyme ที่สกัดได้จากน้ำเม่ามาศึกษา optimum pH ที่อุณหภูมิ 25°C โดยแปรค่า pH ในช่วง 3.0-9.0 (วิธีการในข้อ 3.3.2) วิเคราะห์ PPO activity ที่ pH ต่าง ๆ แล้วคำนวณค่าที่ได้เป็น relative activity ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 pH activity profile ของ crude PPO ในน้ำเม่าที่อุณหภูมิ 25 °C เมื่อใช้สารละลาย

catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH ต่าง ๆ เป็น substrate

จากผลการทดลอง (รูปที่ 4.3) พบว่า crude PPO ในน้ำเม่ามี optimum pH อยู่ที่ pH 6.5 โดย optimum pH จะเป็น pH ที่ enzyme มี activity สูงที่สุด เมื่อระบบมี pH มากหรือน้อยกว่า optimum pH ของเอนไซม์ก็จะทำให้เอนไซม์มี activity ลดลง ดังผลการทดลอง (รูปที่ 4.3) ที่พบว่า crude PPO ในน้ำเม่าจะมี activity เหลืออยู่ 43.21±3.33% ที่ pH 4.0 และเหลืออยู่ 25.04±5.07% ที่ pH 9.0 ทั้งนี้เพราะ pH มีผลต่อการเกิด ionization ของ prototropic groups ที่บริเวณ active site ของเอนไซม์ ซึ่งจะทำหน้าที่จับกับ substrate หรือเปลี่ยน substrate ให้เป็น products (Whitaker, 1972) ดังนั้น pH ที่เปลี่ยนแปลงไปจึงมีผลต่อการจับ substrate ของเอนไซม์ จากการทดลองจะเห็นว่าเอนไซม์มี activity สูงสุดในช่วง pH 6.5 - 7.0 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Fennema (1996) ที่ว่าโดยปกติ PPO จะมี optimum pH อยู่ใน ช่วง 5.0 – 7.0 และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Cash, Sistrunk และ Stutte (1976) ที่ศึกษา optimum pH ของ crude PPO จากผลองุ่น (Concord grape) โดยมี substrate เป็น สารละลาย catechol ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ในสารละลายบัฟเฟอร์ อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส พบว่า optimum pH ของ crude PPO จากผลองุ่นดังกล่าวคือ pH 6.0 และ

ผลการทดลองของ Siddiq, Sinha และ Cash (1992) ที่ศึกษา optimum pH ของ crude PPO จากผลพลัม (Stanley plum) โดยมี substrate เป็นสารละลาย catechol ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ในสารละลายบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ก็พบว่า optimum pH ของ crude PPO จากผลพลัมคือ pH 6.0 เช่นกัน

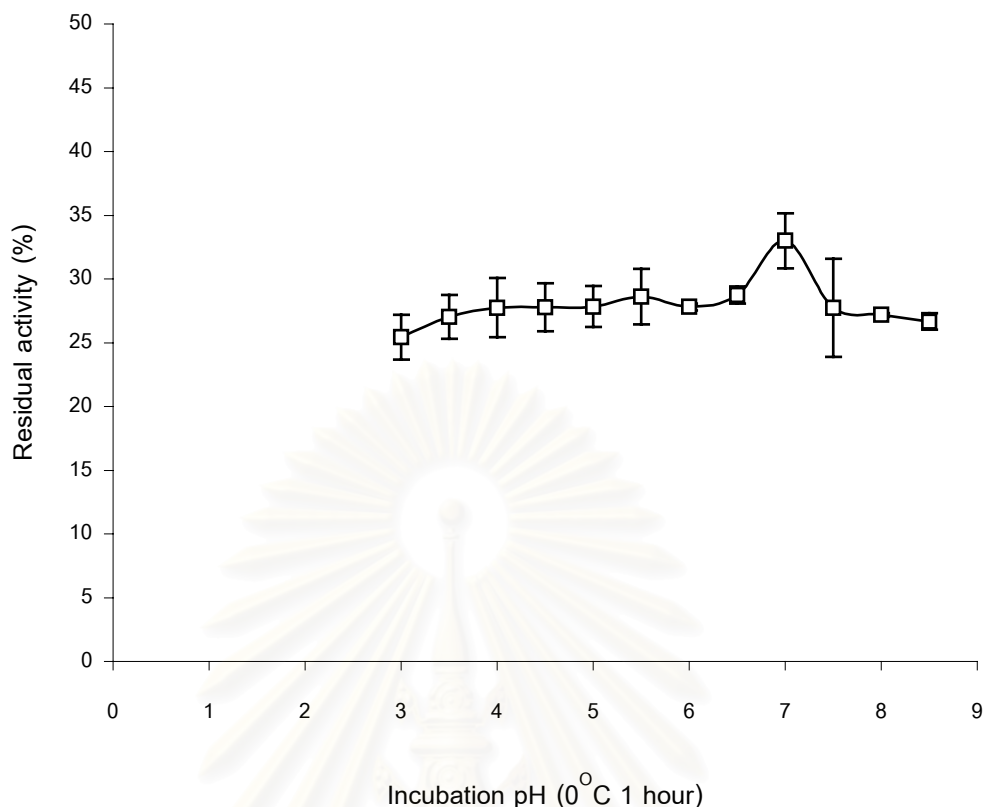
จากผลการทดลองพบว่าที่ pH 3.5 ซึ่งเป็น pH ของน้ำเฝ้า (ตารางที่ 4.1) crude PPO จะมี activity เพียง $37.47 \pm 2.98\%$ แสดงว่าในน้ำเฝ้าเองแม้จะมีเอนไซม์ PPO อยู่แต่เอนไซม์ดังกล่าวก็ไม่สามารถมี activity ได้อย่างเต็มที่ เนื่องจาก pH ของน้ำเฝ้าไม่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

การทดลองขั้นต่อไปเลือกใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 เพื่อเป็น substrate สำหรับศึกษาสมบัติของ crude PPO ในน้ำเฝ้า

4.2.3 การศึกษา pH stability ของ crude PPO ในน้ำเฝ้า

นำ crude enzyme ที่สกัดได้จากน้ำเฝ้า มาศึกษา pH stability โดยบ่ม crude enzyme ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH ในช่วง 3.0 - 9.0 ที่อุณหภูมิ 0°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาวิเคราะห์ PPO activity ที่อุณหภูมิ 25°C แล้วคำนวณค่าที่ได้เป็น residual activity เทียบกับ crude enzyme ที่ไม่ได้บ่ม ตามวิธีการในข้อ 3.3.3 โดยใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 เป็น substrate ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.4

จากผลการทดลอง (รูปที่ 4.4) จะพบว่า crude PPO ในน้ำเฝ้าจะมีเสถียรภาพต่ำเมื่อบ่มที่ pH ในช่วง 3.0- 9.0 ที่อุณหภูมิ 0°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยจะมี activity เหลืออยู่เพียง 25 - 35% เท่านั้น โดย crude enzyme จะมีเสถียรภาพที่ pH 7.0 ดีกว่า pH ช่วงอื่น ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของ pH จะมีผลต่อ secondary, tertiary และ quaternary structure ของโปรตีน ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนโครงสร้างสามมิติ ซึ่งนำไปสู่การเบี่ยงเบนของการจับกับ substrate เอนไซม์จึงมี activity ลดลง (Whitaker, 1972) และเมื่อพิจารณาที่ pH ของน้ำเฝ้าซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.5 ± 0.1 (ตารางที่ 4.1) จะพบว่าที่ pH 3.5 crude PPO ในน้ำเฝ้าจะมี activity เพียง $37.47 \pm 2.98\%$ เท่านั้น (รูปที่ 4.3) และ activity จะลดลงเหลือเพียง $27.03 \pm 1.73\%$ เมื่อบ่ม crude enzyme ไว้ที่ pH ดังกล่าวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (รูปที่ 4.4)

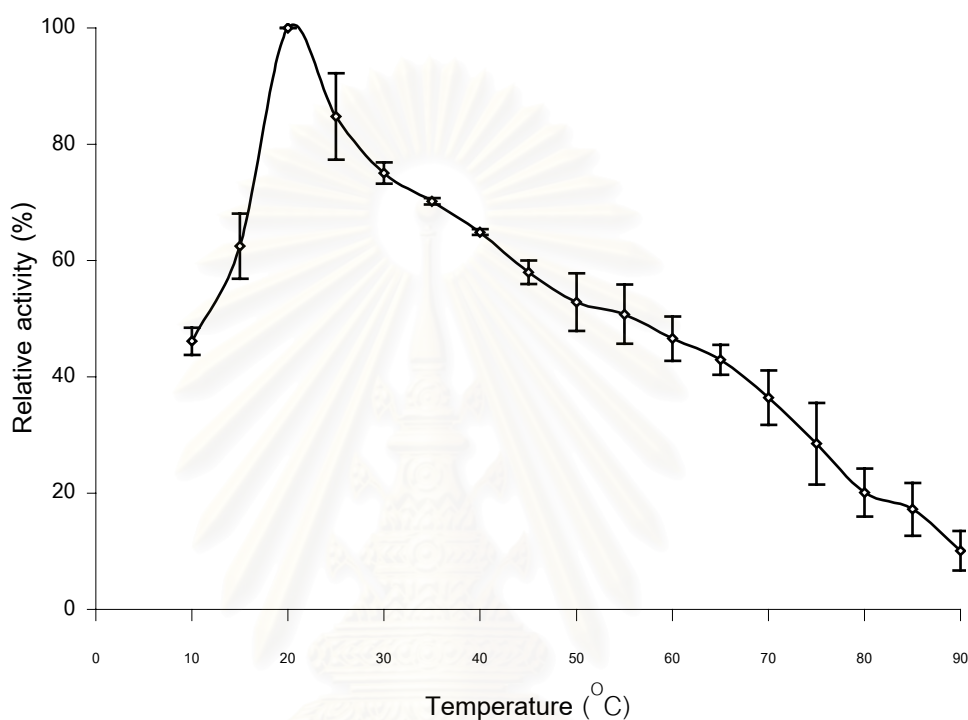


รูปที่ 4.4 pH stability profile ของ crude PPO ในน้ำเฝ้าหลังจากบ่มที่ pH ต่างๆ (อุณหภูมิ 0°C) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 25 °C และใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 เป็น substrate

แสดงให้เห็นว่า pH ของน้ำเฝ้ามีผลต่อการชะลอ activity ของเอนไซม์ PPO ผลการทดลองที่ได้ดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองของ Zemel และ คณะ (1990) ที่ศึกษา pH stability ของ crude PPO จากผลแอปเปิล โดยใช้น้ำแอปเปิลที่ปรับให้มี pH เท่ากับ 3.00, 2.75, 2.50, 2.25 และ 2.00 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2.4 โมลาร์ เปรียบเทียบกับน้ำแอปเปิลที่เป็นตัวอย่างควบคุมซึ่งไม่ผ่านการปรับ pH (pH 3.90) ทั้งไว้ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 0.75, 1.5 และ 3.0 ชั่วโมง ก่อนนำมาตรวจสอบ PPO activity ที่อุณหภูมิ 25°C โดยใช้สารละลาย pyrocatechin ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.50 เป็น substrate ติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร พบว่าที่ pH ต่ำ crude PPO จะมี stability ลดลง และจะยิ่งลดลงมากขึ้นเมื่อทิ้งไว้ที่ pH ดังกล่าวเป็นเวลานานขึ้น โดยเมื่อทิ้งน้ำแอปเปิลที่มี pH 3.00 ไว้ 0.75 ชั่วโมง จะมี PPO activity เหลืออยู่ไม่ถึง 50 % และจะลดลงเหลือต่ำกว่า 40% เมื่อทิ้งไว้ 1.5 ชั่วโมง

4.2.4 การศึกษา optimum temperature ของ crude PPO ในน้ำเฝ้า

นำ crude enzyme ที่สกัดได้จากน้ำเฝ้า มาศึกษา optimum temperature โดยแปรอุณหภูมิในช่วง 10 - 90 °C วิเคราะห์ PPO activity ที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 เป็น substrate คำนวณค่าที่ได้เป็น relative activity ตามวิธีการในข้อ 3.3.4 ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 Temperature activity profile ของ crude PPO ในน้ำเฝ้าหลังจากบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 10 นาที เมื่อวิเคราะห์โดยใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 เป็น substrate

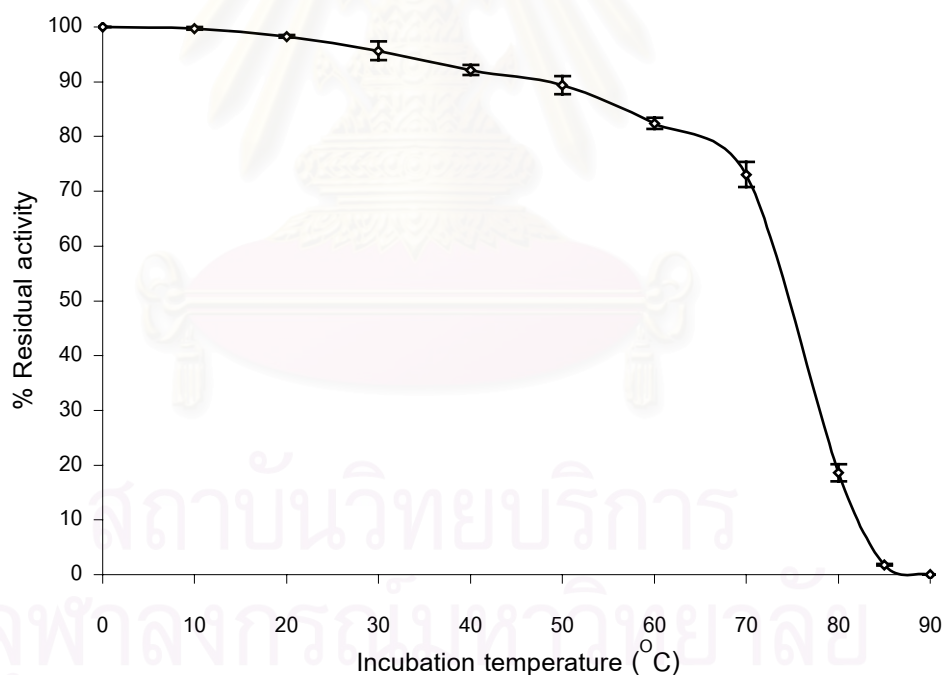
จากผลการทดลอง (รูปที่ 4.5) พบว่า crude PPO ในน้ำเฝ้ามี optimum temperature อยู่ที่ 20°C ซึ่ง optimum temperature เป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์มี activity สูงที่สุด ดังนั้นหากอุณหภูมิในระบบสูงหรือต่ำกว่า optimum temperature ของเอนไซม์ก็จะทำให้เอนไซม์มี activity ลดลง ดังผลการทดลอง (รูปที่ 4.5) พบว่าที่อุณหภูมิ 50°C crude PPO ในน้ำเฝ้ามี activity เพียง 52.83±4.95% ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Whitaker (1996) ที่ว่าโดยปกติ PPO จะมี optimum temperature อยู่ในช่วง 25–35°C และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Siddiq, Sinha และ Cash (1992) ที่ศึกษา optimum temperature ของ crude PPO จากผลพลัม โดยใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ในสารละลาย

โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 6.0 เป็น substrate พบว่า optimum temperature ของ crude PPO จากผลพลั้ดดังกล่าวคือ 20°C

การทดลองขั้นต่อไปเลือกใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 เพื่อเป็น substrate สำหรับศึกษาสมบัติของ crude PPO ในน้ำเฝ้า โดยวัด activity ที่อุณหภูมิ 20°C

4.2.5 การศึกษา temperature stability ของ crude PPO ในน้ำเฝ้า

นำ crude enzyme ที่สกัดได้จากน้ำเฝ้า มาศึกษา temperature stability โดยบ่ม crude enzyme ที่อุณหภูมิช่วง 0 – 90°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นทันทีใน ice bath ก่อนนำมาวิเคราะห์ PPO activity โดยใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 เป็น substrate ที่อุณหภูมิ 20°C คำนวณค่าที่ได้เป็น residual activity เมื่อเทียบกับ crude enzyme ที่ไม่ได้บ่ม (ตามวิธีการในข้อ 3.3.5) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 Temperature stability profile ของ crude PPO ในน้ำเฝ้าหลังจากบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 10 นาที เมื่อวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 20°C และใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 เป็น substrate

จากผลการทดลอง (รูปที่ 4.6) พบว่า crude PPO ในน้ำเมายังคงรักษา activity ไว้ได้เมื่อบ่มที่อุณหภูมิช่วง 0 – 60 °C เป็นเวลา 10 นาที โดยหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 10 นาทียังมี activity เหลืออยู่ถึง 82.39±1.02% และ PPO activity จะลดลงเรื่อย ๆ เมื่ออุณหภูมิที่ใช้บ่มเพิ่มสูงขึ้น จนกระทั่งที่ภาวะอุณหภูมิ 85 °C เวลา 10 นาทีจะสามารถยับยั้ง PPO activity ได้หมด เนื่องจากความร้อนจะทำให้เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนทำให้ activity ของเอนไซม์หมดไป (Whitaker, 1972) ซึ่งอุณหภูมินี้จะสามารถนำไปพิจารณาในการผลิตน้ำเม่า 25% ต่อไป

การทดลองนี้ใช้ crude PPO ในการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ PPO ในน้ำเม่า เพื่อให้ผลการทดลองที่ได้สามารถนำไปใช้ได้จริงในการผลิตน้ำเม่า เนื่องจากเอนไซม์ PPO ที่พบตามธรรมชาติในน้ำเม่าอยู่ในรูปของ crude enzyme

4.3 การศึกษาผลของวิตามินซีต่อการยับยั้ง PPO activity ในระหว่างการคั้นน้ำเม่า

จากผลการวิเคราะห์คุณภาพของน้ำคั้นที่ได้จากผลเม่าพบเอนไซม์ PPO (ตารางที่ 4.1) ซึ่ง activity ของเอนไซม์ดังกล่าวจะมีผลต่อเสถียรภาพของแอนโทไซยานินในน้ำเม่าโดยตรง ถึงแม้ว่า optimum pH ของ crude PPO ในน้ำเม่าจะอยู่ที่ pH 6.5 (รูปที่ 4.3) ในขณะที่น้ำเม่ามี pH 3.5±0.1 (ตารางที่ 4.1) แต่ที่ pH ดังกล่าว crude PPO ในน้ำเม่าก็ยังมี activity อยู่ถึง 37.47±2.98% (รูปที่ 4.3) และเมื่อพิจารณาจากกระบวนการผลิตน้ำเม่า พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวจะเริ่มมี activity ทันทีเมื่อทำการสกัดน้ำเม่า ดังรายงานของ Skrede, Wrolstad และ Durst (2000) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลิกระหว่างกระบวนการผลิตน้ำ highbush blueberries ที่พบว่าการสกัดน้ำผลไม้เป็นขั้นตอนหนึ่งที่ทำให้เกิดการสูญเสียแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดขั้นตอนหนึ่ง ซึ่งเป็นผลมาจาก PPO ที่มีอยู่ตามธรรมชาติในผล blueberry เอง ดังนั้นหากสามารถยับยั้ง activity ของเอนไซม์ ตั้งแต่กระบวนการสกัดน้ำเม่า น่าจะลดการสูญเสียของแอนโทไซยานินในน้ำเม่าที่มีสาเหตุมาจาก PPO activity ลงได้ การทดลองนี้จึงศึกษาผลของการเติมวิตามินซีต่อการยับยั้ง PPO activity ในน้ำเม่า โดยเติมวิตามินซี 4 ระดับ คือ 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อผลเม่า 1 กิโลกรัม ก่อนสกัดน้ำเม่าโดยการคั้นด้วยมือ เปรียบเทียบกับการสกัดน้ำเม่าโดยไม่เติมวิตามินซี (control) นำน้ำเม่าที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 6,000 x g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณกรดที่ไตรเตรตได้ทั้งหมด ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด PPO activity ปริมาณวิตามินซีคงเหลือ และค่าสีในระบบ CIE L*a*b* ตามวิธีการในข้อ 3.4 ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.2 และ 4.3

ตารางที่ 4.2 ผลของการเติมวิตามินซีเพื่อยับยั้ง PPO activity ต่อคุณภาพของน้ำเฝ้า

ปริมาณวิตามินซีที่เติม (mg/kg)	Total phenolic compounds ^{ns} (mg/ml)	Total acidity ^{ns} (% as citric acid)	Total anthocyanins ^{ns} (mg/100ml)	PPO activity ^{ns} (units/mg protein)	ปริมาณวิตามินซี คงเหลือ (µg/ml)
0	2.74±0.24	0.91±0.02	15.09±0.22	2,521±152	0.00 ^a
50	2.84±0.24	0.89±0.02	15.78±1.80	2,379±354	4.01 ^b ±0.80
100	2.86±0.15	0.84±0.03	15.72±0.94	2,305±152	6.09 ^c ±0.97
150	2.91±0.15	0.87±0.07	16.94±1.77	2,277±591	10.40 ^d ±1.03
200	2.96±0.19	0.87±0.06	17.25±1.35	1,855±176	13.56 ^e ±1.93

ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

* ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับ (a, b, c...) ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

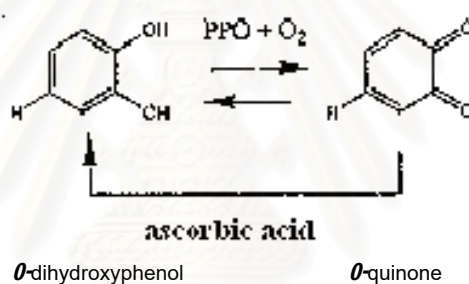
จากการศึกษาผลของวิตามินซีต่อการยับยั้ง PPO activity ในน้ำเฝ้า พบว่าการเติมวิตามินซีทั้ง 4 ระดับในระหว่างการสกัดน้ำเฝ้า ไม่มีผลต่อการยับยั้ง PPO activity ในน้ำเฝ้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่ก็มีแนวโน้มที่ PPO activity จะลดลงเมื่อเติมวิตามินซีในปริมาณที่สูงขึ้น ขณะที่คุณภาพทางด้านอื่น ๆ ของน้ำเฝ้า ได้แก่ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ทั้งหมด ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (ตารางที่ 4.2) ค่าสีในระบบ CIE L*a*b* (ตารางที่ 4.3) ก็ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ยกเว้นปริมาณวิตามินซีคงเหลือที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยน้ำเฝ้าที่ได้จากการเติมวิตามินซีลงไปในช่วงการสกัดจะมีปริมาณวิตามินซีคงเหลือมากกว่าน้ำเฝ้าที่ได้จากการสกัดโดยไม่เติมวิตามินซี และเมื่อพิจารณาถึงปริมาณที่เติมลงไปต่อปริมาณที่วิเคราะห์ได้พบว่าปริมาณวิตามินซีคงเหลือในน้ำเฝ้ามีค่าน้อยกว่าปริมาณที่เติมลงไป แสดงว่ามีวิตามินซีบางส่วนสูญเสียไปในช่วงการสกัดน้ำเฝ้า การสูญเสียวิตามินซีน่าจะมีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ PPO และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ตรวจพบในน้ำเฝ้า เนื่องจากเอนไซม์จะทำหน้าที่เปลี่ยนสารประกอบฟีนอลิกให้กลายเป็น *o*-quinone แต่ด้วยคุณสมบัติในการเป็น reducing agent ของวิตามินซี จึงมีวิตามินซีบางส่วนทำหน้าที่ reduce *o*-quinone ที่เกิดขึ้นให้กลับมาเป็น *o*-dihydroxyphenol (รูปที่ 4.7) (Iyengar และ McEvily, 1992) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Yueming (2000) ที่ศึกษาบทบาทของแอนโทไซยานิน PPO และสารประกอบฟีนอลิกต่อการเกิดสีน้ำตาลในเปลือกลิ้นจี่ ที่พบว่าการเกิดสีน้ำตาลในเปลือกลิ้นจี่จะเกิดได้ช้าในสภาวะที่มีวิตามินซีอยู่สูง และจะเกิดได้เร็วขึ้นเมื่อมีวิตามินซีในระบบลดลง เนื่องจากวิตามินซีจะไปทำหน้าที่เป็น reducing agent ซึ่งจะถูกรีดิวซ์โดย *o*-quinone ที่เกิด

ตารางที่ 4.3 ผลของการเติมวิตามินซีเพื่อยับยั้ง PPO activity ต่อค่าสีของน้ำเฒ่า

ปริมาณวิตามินซีที่เติม (mg/kg)	L* ^{ns}	a* ^{ns}	b* ^{ns}
0	0.67±0.03	14.61±2.51	0.85±0.06
50	0.43±0.06	18.40±2.80	0.71±0.09
100	0.58±0.09	19.38±3.02	0.69±0.17
150	0.56±0.21	19.52± 4.45	0.70±0.33
200	0.55±0.10	20.98±4.21	0.63±0.18

ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

* น้ำเฒ่าเริ่มต้นมีค่า L* = 0.70±0.20, a* = 17.09±2.49, b* = 0.87±0.39

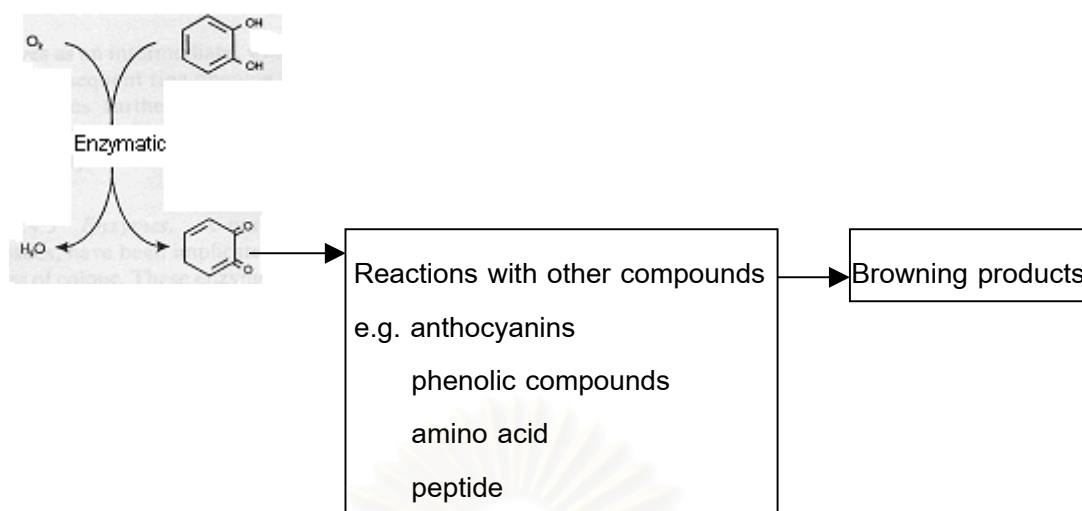


รูปที่ 4.7 ความสัมพันธ์ของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบฟีนอลิก เอนไซม์ PPO และวิตามินซี

ที่มา: ดัดแปลงจาก Iyengar และ McEvily (1992)

จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง PPO กับสารประกอบฟีนอลิก ทำให้ในระบบที่มีปริมาณวิตามินซีลดลง นอกจากนี้ออกซิเจนบางส่วนก็อาจจะถูก oxidized ด้วยออกซิเจนในระหว่างการสกัดน้ำเฒ่า (Fennema, 1996) ซึ่งก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งของการสูญเสียวิตามินซีดังกล่าว

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่าง PPO activity กับปริมาณแอนโทไซยานินในเฒ่าที่ได้ (ตารางที่ 4.2) พบว่าในตัวอย่งน้ำเฒ่าที่มี PPO activity อยู่สูง จะมีปริมาณแอนโทไซยานินอยู่น้อยกว่าตัวอย่งน้ำเฒ่าที่มีเอนไซม์ดังกล่าวในปริมาณที่ต่ำกว่า ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ PPO จะเร่งการเกิดออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในน้ำเฒ่าให้กลายเป็น *o*-quinone (รูปที่ 4.8) ซึ่งสารประกอบดังกล่าวจะไปทำปฏิกิริยากับแอนโทไซยานิน ทำให้แอนโทไซยานินถูกออกซิไดซ์และเปลี่ยนรูปไป ก่อให้เกิดสารสีน้ำตาล ดังนั้นในน้ำเฒ่าที่มี PPO activity สูงก็จะ



รูปที่ 4.8 การเสื่อมสลายของแอนโทไซยานินที่มีสาเหตุมาจากเอนไซม์ PPO
ที่มา: ดัดแปลงจาก Whitaker (1972) และ Wrolstad (2000)

ก่อให้เกิด *O*-quinone ได้มากขึ้นส่งผลให้แอนโทไซยานินถูกทำลายได้มากกว่านั่นเอง การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะสัมพันธ์กับค่าสีของน้ำเฝ้าที่ได้ โดยเมื่อพิจารณาจากค่า a^* ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความเป็นสีแดงของน้ำเฝ้า พบว่าในน้ำเฝ้าที่มี PPO activity อยู่สูงค่า a^* จะมีแนวโน้มลดลง (ตารางที่ 4.3) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Siddiq และคณะ (1994) ที่ศึกษาผลของเอนไซม์ PPO ต่อการเปลี่ยนแปลงของแอนโทไซยานินในน้ำพลัม ผลการทดลองที่ได้พบว่าการสูญเสียแอนโทไซยานินในน้ำพลัมมีความสัมพันธ์กับปริมาณเอนไซม์ PPO ที่เติมลงไป โดยในน้ำพลัมที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์อยู่สูงจะเกิดการสูญเสียของแอนโทไซยานินสูงขึ้นตามไปด้วย

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณวิตามินซีที่เติมลงไปในน้ำเฝ้า พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อมีการเติมวิตามินซีลงในระหว่างการสกัดน้ำเฝ้าในปริมาณที่มากขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากวิตามินซีที่เติมลงไปยังไปทำหน้าที่ reduce สารประกอบ *O*-quinone ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ PPO กับสารประกอบฟีนอลิกในน้ำเฝ้าให้กลับมาเป็นสารประกอบฟีนอลิกอีกครั้ง (Jackman และ Smith, 1996) ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่วิเคราะห์ได้มีปริมาณสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Peng และ Jay-Allemand ที่ว่าวิตามินซีและโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์จะทำหน้าที่เป็น antioxidant ทำให้หมู่ฟีนอล (phenol groups) ของสารประกอบฟีนอลิกยังคงหน้าที่อย่างสมบูรณ์อยู่ได้ (1991, อ้างถึงใน Waterman และ Mole, 1994: 90) อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ต้องอาศัยการออกซิไดซ์ของ substrate เพื่อทำให้เกิดสารประกอบที่มีสีในระหว่างการ

ทำปฏิกิริยา ดังนั้นหากในตัวอย่างมี substrate อื่นที่สามารถถูกออกซิไดซ์ด้วย reagent ได้ก็จะเกิดสารประกอบที่มีสีในระหว่างการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นได้ด้วย ซึ่งวิตามินซีเองก็เป็นสารประกอบตัวหนึ่งที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้ (Waterman และ Mole, 1994) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ ไม่ได้มาจากสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในน้ำเฝ้าเพียงอย่างเดียว แต่เกิดจากการออกซิไดซ์ของวิตามินซีที่เติมลงไปรวมอยู่ด้วย

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า การเติมวิตามินซีในปริมาณดังกล่าวลงไปในช่วงการสกัดน้ำเฝ้าไม่ได้มีผลต่อการยับยั้ง PPO activity แต่อย่างใด เนื่องจากน้ำเฝ้าที่สกัดได้หลังจากการเติมวิตามินซีมี PPO activity ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่จะทำให้ น้ำเฝ้าที่ได้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และวิตามินซีสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าปริมาณวิตามินซีที่เติมมีปริมาณน้อยเกินไป โดยการเติมวิตามินซีในปริมาณ 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อผลเฝ้า 1 กิโลกรัมจะทำให้ น้ำเฝ้าที่สกัดได้มีวิตามินซี 0.47, 0.96, 1.42 และ 1.87 mM ตามลำดับ (ผลเฝ้า 1 กิโลกรัมสามารถสกัดน้ำเฝ้าได้ 600 มิลลิลิตร) ซึ่งจากรายงานของ Duangmal และ Owusu-Apenten (1999) ที่ศึกษาการยับยั้ง PPO activity ใน crude PPO จากมันฝรั่งและเผือกด้วยวิตามินซี โดยใช้สารละลาย 4-methylcatechol ความเข้มข้น 5.0 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์เป็น substrate ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าต้องใช้วิตามินซีความเข้มข้น 5.0 mM จึงจะสามารถยับยั้ง PPO activity ในมันฝรั่งได้หมด ขณะที่การใช้วิตามินซีในปริมาณดังกล่าวยับยั้ง PPO activity ในเผือกได้ไม่ถึง 40%

ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกการสกัดน้ำเฝ้าโดยไม่เติมวิตามินซีเพื่อนำไปใช้ในการทดลองข้อต่อไป

4.4 การศึกษาผลของการพาสเจอร์ไรส์ต่อคุณภาพของน้ำเฝ้า 25%

ในการผลิตน้ำเฝ้า 25% การให้ความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์มีความจำเป็นเพื่อทำลายจุลินทรีย์และยับยั้ง PPO activity ในน้ำเฝ้า ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถเก็บรักษาได้นานขึ้น ซึ่งความร้อนที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจะส่งผลโดยตรงต่อเสถียรภาพของแอนโทไซยานินในน้ำเฝ้า ดังนั้นการทดลองนี้จึงศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อที่สามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด และยับยั้ง PPO activity ในน้ำเฝ้าได้อย่างสมบูรณ์ และมีปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลืออยู่มากที่สุด โดยผลิตน้ำเฝ้า 25% ที่มีกรดที่ไต่ตรงได้ทั้งหมด 0.5% ในรูปของกรดซิตริก และของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 15°Brix พาสเจอร์ไรส์โดยแปรอุณหภูมิและเวลาตัวแปรละ 3 ระดับคือ 80, 85 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 15 และ 20 นาที บรรจุน้ำเฝ้าที่ได้ในขวดสี่ขาขนาด 195 มิลลิลิตรขณะร้อน โดยควบคุมให้มี head space 4.5 มิลลิลิตร ปิดด้วยฝา

พลาสติก 2 ชั้นแล้วทำให้เย็นทันทีที่อุณหภูมิห้อง นำน้ำเฒ่าที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพตามวิธีการในข้อ 3.5 ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.4 และ 4.5

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการพาสเจอร์ไร้น้ำเฒ่า 25% ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เป็นภาวะที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และรา และ PPO activity ได้อย่างสมบูรณ์ และยังคงมีปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลืออยู่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับภาวะอื่นๆ โดยยังมีปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลืออยู่ถึง $91.25 \pm 2.57\%$ (ตารางที่ 4.4) เมื่อพิจารณาถึงผลของอุณหภูมิและเวลาดังกล่าวที่มีต่อการยับยั้ง PPO activity ในน้ำเฒ่า จะเห็นว่าผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาถึง temperature stability ของ crude PPO ในน้ำเฒ่า (รูปที่ 4.6) ที่พบว่าต้องให้ความร้อนแก่ crude enzyme ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จึงจะสามารถทำลาย PPO activity ในน้ำเฒ่าได้อย่างสมบูรณ์

การให้ความร้อนกับน้ำเฒ่า 25% ที่อุณหภูมิสูงขึ้นเป็นเวลานานขึ้นทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือในน้ำเฒ่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าความร้อนที่ใช้ในการพาสเจอร์ไรส์มีผลต่อการสลายตัวของแอนโทไซยานินในน้ำเฒ่า โดยความร้อนจะทำให้สมดุลระหว่าง form ต่าง ๆ ของแอนโทไซยานินในน้ำเฒ่าเปลี่ยนไปเป็น chalcone ซึ่งอยู่ในรูปที่ไม่มีสีมากขึ้น ขณะที่การเปลี่ยนกลับมาเป็น flavylum cation ซึ่งมีสีแดงจะเกิดได้ช้าลง (รูปที่ 2.7) ทำให้สีของผลิตภัณฑ์ซีดจางลง (Francis, 1989) ซึ่งกลไกการสลายของแอนโทไซยานินเนื่องจากความร้อนยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีอยู่ 3 กลไกที่น่าสนใจ คือ (ก) flavylum cation จะถูกเปลี่ยนเป็น quinonoidal base ก่อนที่จะเกิดสารตัวกลางต่าง ๆ ขึ้นมากมายและถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุพันธ์ของ coumarin และสารประกอบจาก B-ring ในที่สุด (ข) flavylum cation จะถูกเปลี่ยนเป็น cabinol base ซึ่งเป็นรูปที่ไม่มีสี จากนั้นเปลี่ยนเป็น chalcone และสารผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำตาล ตามลำดับ (ค) มีกลไกการสลายตัวคล้าย (ข) แต่ สารผลิตภัณฑ์ที่ได้จะแตกต่างกันออกไป (รูปที่ 4.9) ทั้งนี้การสลายตัวของแอนโทไซยานินทั้ง 3 แบบต่างก็ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและชนิดของแอนโทไซยานิน (Fennema, 1996) ซึ่งจากผลการทดลอง (ตารางที่ 4.4) พบว่าการให้ความร้อนแก่น้ำเฒ่าที่อุณหภูมิสูงขึ้น จะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มี PC สูงขึ้นตามไปด้วยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงว่ามีการ form สารประกอบพอลิเมอร์ขึ้นในผลิตภัณฑ์ระหว่างการให้ความร้อน แต่ที่ภาวะการพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที PC ในผลิตภัณฑ์ไม่มีความแตกต่างจากภาวะการพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

เมื่อพิจารณาค่า DI (ตารางที่ 4.4) พบว่าการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงขึ้นเป็นเวลานานขึ้นทำให้ค่า DI ในน้ำเฒ่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเวลาที่ใช้ในการให้ความร้อนน้อยเกินไปทำให้เห็นความแตกต่างไม่ชัดเจน

ตารางที่ 4. 4 ผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อคุณภาพของน้ำเฝ้า 25%

อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	Total plate count (% inhibition)	Yeast and mold ^{ns} (% inhibition)	PPO activity (% retention)	Total anthocyanin (% retention)	DI ^{ns}	TDC ^{ns}	PC
80	10	98.35 ^a ±1.96	100.00±0.00	52.07 ^a ±1.26	96.63 ^a ±1.02	1.22±0.05	0.23±0.05	0.24 ^a ±0.02
	15	99.80 ^b ±0.35	100.00±0.00	10.30 ^b ±0.75	95.89 ^{ab} ±1.33	1.21±0.02	0.24±0.05	0.25 ^{ab} ±0.03
	20	0.15 ^b ±0.02	100.00±0.00	0.86 ^c ±0.05	94.47 ^{abc} ±1.94	1.24±0.04	0.25±0.04	0.26 ^{ab} ±0.03
85	10	100.00 ^b ±0.00	100.00±0.00	0.00 ^c ±0.00	91.25 ^{bcd} ±2.57	1.22±0.02	0.25±0.03	0.26 ^{ab} ±0.03
	15	100.00 ^b ±0.00	100.00±0.00	0.00 ^c ±0.00	90.05 ^{cd} ±3.74	1.24±0.04	0.26±0.03	0.27 ^{abc} ±0.03
	20	100.00 ^b ±0.00	100.00±0.00	0.00 ^c ±0.00	90.17 ^{cd} ±2.28	1.24±0.05	0.28±0.04	0.28 ^{abc} ±0.03
90	10	100.00 ^b ±0.00	100.00±0.00	0.00 ^c ±0.00	88.08 ^{de} ±3.35	1.27±0.06	0.26±0.01	0.28 ^{abc} ±0.02
	15	100.00 ^b ±0.00	100.00±0.00	0.00 ^c ±0.00	86.73 ^{de} ±2.83	1.28±0.07	0.26±0.03	0.29 ^{bc} ±0.02
	20	100.00 ^b ±0.00	100.00±0.00	0.00 ^c ±0.00	84.66 ^e ±3.01	1.31±0.08	0.28±0.04	0.31 ^c ±0.01

ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05)

* ตัวเลขที่มีอักษรกำกับ (a,b,c...) ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

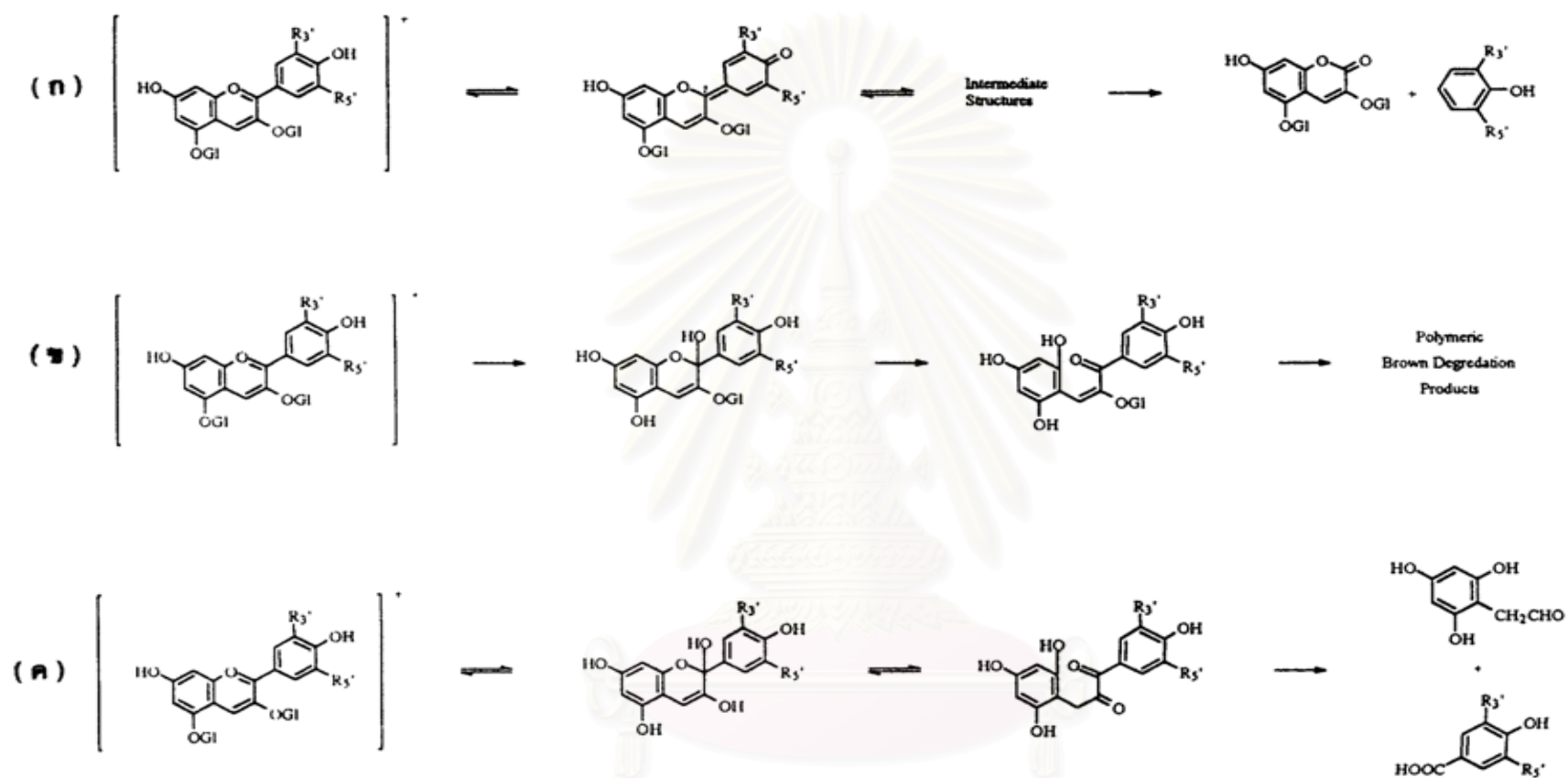
ตารางที่ 4.5 ผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อค่าสีของน้ำเฝ้า 25%

อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	L*	a* ^{ns}	b*	h ^{o ns}	C* ^{ns}	ΔE*
80	10	18.90 ^a ±1.28	62.46±2.41	31.53 ^a ±2.64	26.57±1.21	69.96±3.22	3.51±0.95
	15	18.33 ^{ab} ±1.12	61.78±2.44	30.61 ^{ab} ±2.33	26.34±0.87	68.95±3.21	4.76±0.67
	20	18.13 ^{abc} ±1.22	61.55±2.30	29.97 ^{ab} ±2.71	25.93±1.18	68.47±3.25	5.48±0.92
85	10	17.88 ^{abc} ±0.72	61.21±2.26	29.74 ^{ab} ±1.14	25.93±1.06	68.06±2.21	5.83±1.58
	15	17.56 ^{abc} ±0.51	61.05±2.68	29.29 ^{ab} ±0.95	25.64±0.94	67.71±2.62	6.41±1.05
	20	17.15 ^{abcd} ±0.72	60.80±2.19	28.59 ^{abc} ±0.93	25.20±1.21	67.20±1.92	7.24±1.97
90	10	17.08 ^{bcd} ±0.76	60.27±2.62	28.45 ^{abc} ±1.22	25.28±1.28	66.66±2.48	7.63±1.40
	15	16.32 ^{cd} ±0.75	59.96±2.60	27.23 ^{bc} ±1.13	24.44±1.33	65.87±2.38	9.05±1.77
	20	15.50 ^d ±1.02	59.54±2.03	25.86 ^c ±1.43	23.50±1.72	64.93±1.52	10.65±2.95

ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05)

* ตัวเลขที่มีอักษรกำกับ (a,b,c...) ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

** ΔE* เป็นการเปรียบเทียบกับตัวอย่างน้ำเฝ้า 25% ก่อนพาสเจอร์ซึ่งมีค่า L* = 21.22±1.06, a* = 66.95±2.15 และ b* = 36.06±2.31



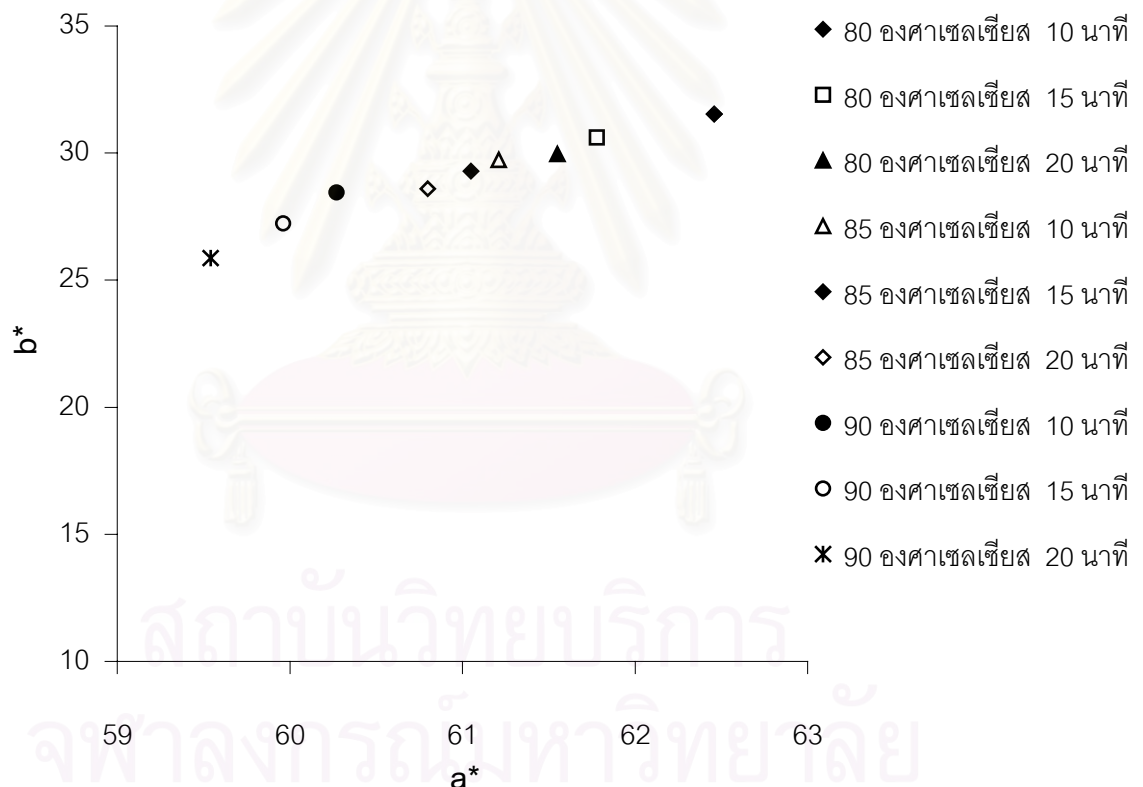
รูปที่ 4.9 กลไกการสลายตัวที่มีสาเหตุมาจากความร้อนของ anthocyanidin 3,5-diglycoside และ anthocyanidin 3-diglucoside

$R_3, R_5 = -OH, -H, -OCH_3$ หรือ $-OGL$; GL = glucosyl group

ที่มา: Von-Elbe และ Schwartz (1996) โดย DI จะมีค่าเท่ากับ 1.31, 1.38 และ 1.95

เมื่อพิจารณาถึงค่าสี (ตารางที่ 4.5) พบว่าการพาสเจอร์ไรส์โดยใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นเป็นเวลานานขึ้น จะทำให้ค่า L^* และค่า b^* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจากมีการสลายตัวของแอนโทไซยานินในระบบมากขึ้น (ตารางที่ 4.4) แต่ไม่มีผลต่อค่า TCD และค่า a^* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ผลจากการเปลี่ยนแปลงของค่า L^* a^* และ b^* ที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ส่งผลถึงค่า ΔE^* ในผลิตภัณฑ์โดยจะเห็นว่าน้ำเมา 25% ที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิสูงจะมีค่า ΔE^* สูงขึ้น

เมื่อนำค่าสีที่ได้จากการวัดในระบบ CIE $L^*a^*b^*$ มาคำนวณค่า h° ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงเฉดสีของผลิตภัณฑ์และค่า C^* ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความเข้มสีของผลิตภัณฑ์ พบว่าน้ำเมาที่ได้มีค่า h° และค่า C^* ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงเป็นเวลานานมีแนวโน้มที่จะทำให้ค่า h° เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.10) แสดงว่ามีการ shift ของเฉดสีจากสีแดง โดยค่าความเป็นสีแดงลดลง



รูปที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า a^* และค่า b^* ของน้ำเมาที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ที่ภาวะต่าง ๆ

ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้การพาสเจอร์ไรส์น้ำเมา 25% ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4.5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพระหว่างการรักษาน้ำเมา 25 %

การเสื่อมสลายของแอนโทไซยานินในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ นอกจากจะเกิดในระหว่างกระบวนการผลิตแล้ว ยังเกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาได้อีกด้วย โดยการเสื่อมสลายของแอนโทไซยานินระหว่างการเก็บรักษามีปัจจัยต่าง ๆ เข้ามาเกี่ยวข้องหลายปัจจัย เช่น แสง อุณหภูมิในการเก็บรักษา ออกซิเจน วิตามินซีในผลิตภัณฑ์ เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการทดลองนี้จึงศึกษาการเปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาของน้ำเมา 25% โดยผลิตน้ำเมา 25 % ที่มีปริมาณกรดที่ไต่เตรตได้ทั้งหมด 0.5 % (ในรูปของกรดซิตริก) และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 15 ° Brix พาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส 10 นาที บรรจุขวดแก้วใสขนาด 300 มิลลิลิตรขณะร้อน โดยควบคุม head space ให้ได้ 10 มิลลิลิตร ปิดด้วยฝาจับแล้วทำให้เย็นทันทีที่อุณหภูมิห้อง บรรจุใส่กล่องกระดาษแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เป็นเวลา 24 สัปดาห์ นำมาตรวจสอบคุณภาพตามวิธีการในข้อ 3.6

ผลการทดลองพบว่าเมื่อเก็บน้ำเมา 25 % เป็นเวลานานขึ้น จะทำให้มีปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับ DI และ PC ที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่งผลให้ TCD มีแนวโน้มลดลง (ตารางที่ 4.6) การสลายตัวของแอนโทไซยานินดังกล่าวน่าจะเป็นผลมาจากอิทธิพลของแสงในระหว่างการเก็บรักษา เมื่อสร้างกราฟระหว่างค่า natural logarithm (ln) ของร้อยละปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือในน้ำเมาระหว่างเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ ต่อปริมาณแอนโทไซยานินก่อนการเก็บรักษากับเวลาการเก็บรักษา พบว่ากราฟที่ได้มีความสัมพันธ์กันในลักษณะเชิงเส้นตรง (linear) มีค่า R^2 เท่ากับ 0.96 แสดงว่าการสลายตัวของแอนโทไซยานินในน้ำเมา 25% เป็นแบบ first order (รูปที่ 4.11) โดยปกติ first order reaction จะเกิดในช่วงต้นของปฏิกิริยา แต่จากค่า R^2 ที่ได้จึงประมาณอัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานินตลอดเวลาการเก็บรักษาว่าเป็นแบบ first order ซึ่งค่าคงที่ของการสลายตัว (k) และค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานิน ($t_{1/2}$) คำนวณได้จากสูตร

$$\ln(TA_{cy} / TA_{cy_0}) = -kt$$

และ

$$t_{1/2} = \ln 0.5 / k$$

โดยที่

TA_{cy_0} คือ ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในน้ำเมา 25% ก่อนการเก็บรักษา

TA_{cy} คือ ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในน้ำเมา 25% หลังการเก็บรักษาไว้

เป็นเวลา t ที่อุณหภูมิ 30°C

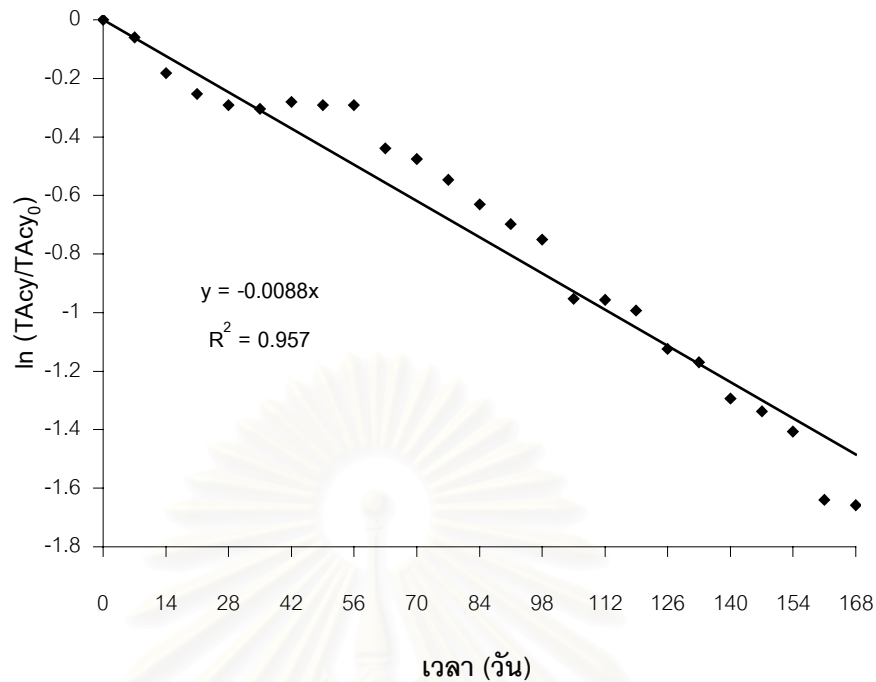
ตารางที่ 4.6 ปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือ DI TCD และ PC ในน้ำเฝ้าที่บรจุในขวด
แก้วใสระหว่างการเก็บรักษา

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ปริมาณ แอนโทไซยานิน คงเหลือ (%)	DI	TCD ^{ns}	PC
0	100.00 ^a	1.50 ^a ±0.10	0.92±0.12	0.97 ^a ±0.08
1	94.12 ^{ab} ±4.93	1.49 ^{ab} ±0.05	0.92±0.13	0.97 ^a ±0.08
2	83.42 ^{abc} ±3.55	1.56 ^{abc} ±0.07	0.92±0.13	1.05 ^{ab} ±0.07
3	77.56 ^{abcd} ±3.92	1.67 ^{abc} ±0.11	0.94±0.14	1.07 ^{abc} ±0.07
4	74.72 ^{bcd} ±4.53	1.69 ^{abc} ±0.19	0.92±0.10	1.12 ^{bcd} ±0.06
5	73.77 ^{bcd} ±6.28	1.67 ^{abc} ±0.14	0.93±0.11	1.15 ^{bcd} ±0.05
6	75.56 ^{bcd} ±4.77	1.78 ^{abc} ±0.34	0.90±0.10	1.18 ^{bcd} ±0.08
7	74.71 ^{bcd} ±9.66	1.78 ^{bc} ±0.05	0.90±0.13	1.20 ^{bcd} ±0.09
8	74.76 ^{bcd} ±10.45	1.87 ^{bc} ±0.14	0.90±0.12	1.22 ^{cdef} ±0.08
9	64.52 ^{cde} ±2.40	1.92 ^{bc} ±0.11	0.88±0.12	1.25 ^{cdef} ±0.07
10	62.15 ^{cdef} ±8.63	2.02 ^{bcd} ±0.10	0.87±0.10	1.29 ^{def} ±0.09
11	57.94 ^{dffg} ±3.53	2.16 ^{bcd} ±0.18	0.82±0.11	1.31 ^{defg} ±0.07
12	53.26 ^{defgh} ±7.67	2.23 ^{bcd} ±0.24	0.79±0.11	1.28 ^{efgh} ±0.05
13	49.78 ^{efghi} ±3.11	2.29 ^{bcd} ±0.23	0.80±0.09	1.29 ^{efgh} ±0.08
14	47.18 ^{efghi} ±8.51	2.30 ^{bcd} ±0.29	0.77±0.10	1.32 ^{efghi} ±0.08
15	38.59 ^{ghij} ±5.84	2.73 ^d ±0.21	0.78±0.09	1.39 ^{fghi} ±0.08
16	38.45 ^{ghijk} ±7.72	2.56 ^d ±0.11	0.80±0.09	1.40 ^{fghi} ±0.10
17	37.02 ^{hijkl} ±8.21	2.58 ^d ±0.22	0.83±0.09	1.41 ^{ghi} ±0.06
18	32.47 ^{ijkl} ±8.58	2.71 ^d ±0.34	0.80±0.07	1.43 ^{hi} ±0.07
19	31.05 ^{ijkl} ±6.64	3.70 ^e ±0.28	0.82±0.08	1.43 ^{hi} ±0.08
20	27.42 ^{ijkl} ±1.52	4.09 ^{ef} ±0.06	0.83±0.08	1.46 ^{hij} ±0.04
21	26.25 ^{ijkl} ±5.55	3.51 ^{ef} ±0.04	0.81±0.09	1.44 ^{hij} ±0.11
22	24.50 ^{ijkl} ±7.27	3.83 ^{ef} ±0.61	0.78±0.08	1.39 ^{hijk} ±0.07
23	19.39 ^{ijkl} ±2.02	4.04 ^f ±0.52	0.76±0.09	1.47 ^{ijk} ±0.11
24	19.07 ^{ijkl} ±1.02	3.38 ^f ±0.31	0.76±0.07	1.48 ^{ijk} ±0.08

ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

* ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับ (a, b, c...) ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

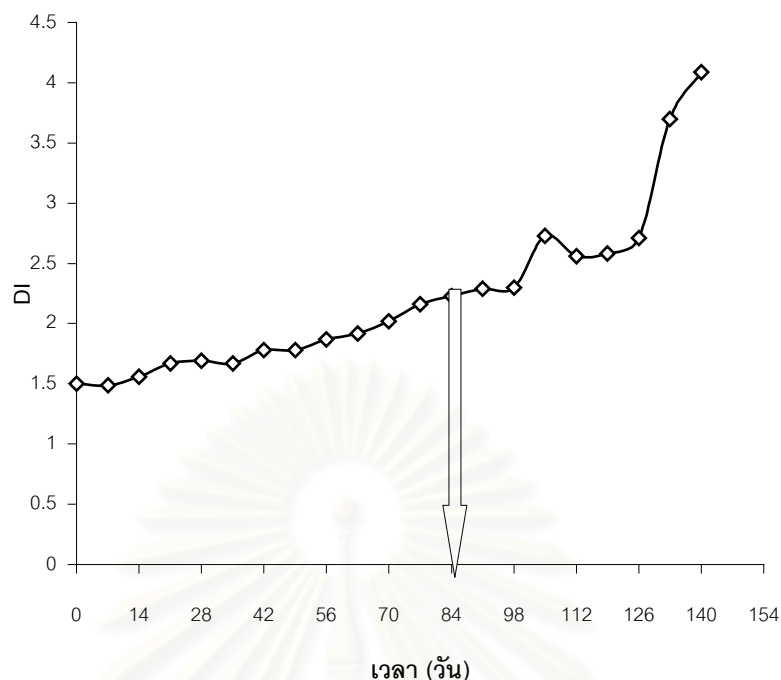
** ก่อนเก็บรักษาน้ำเฝ้ามีปริมาณแอนโทไซยานิน 5.31±0.97 mg/100 ml



รูปที่ 4.11 ปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือในน้ำเม่าที่บรรจุในขวดแก้วใสระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 °C เมื่อ TAcy คือปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือในน้ำเม่าหลังการเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่าง ๆ และ TAcy₀ คือปริมาณแอนโทไซยานินเริ่มต้นในน้ำเม่าก่อนการเก็บรักษา

จากกราฟการสลายตัวของแอนโทไซยานินในน้ำเม่า พบว่าน้ำเม่ามีค่า k เท่ากับ 8.80×10^{-3} ต่อวัน และค่า $t_{1/2}$ เท่ากับ 79 วัน ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Skrede และคณะ (1992) ที่ศึกษาเสถียรภาพของแอนโทไซยานินในน้ำสตรอเบอร์รี่และแบลคเคอแรนท์ พบว่าการสลายตัวของแอนโทไซยานินในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เป็นแบบ first order โดย น้ำสตรอเบอร์รี่และแบลคเคอแรนท์มีค่า $t_{1/2}$ เท่ากับ 0.9 และ 2.0 เดือน ตามลำดับ Kirca และ Cemeroglu (2003) ศึกษาจลนศาสตร์การสลายตัวของแอนโทไซยานินในน้ำ blood orange พบว่าการสลายตัวของแอนโทไซยานินในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เป็นแบบ first order เช่นกัน โดยน้ำ blood orange ความเข้มข้น 45 และ 60 °Brix ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 °C มีค่า $t_{1/2}$ เท่ากับ 9.7 และ 17.7 วัน ตามลำดับ การที่ค่า $t_{1/2}$ ต่างกันอาจเป็นเพราะค่า $t_{1/2}$ ขึ้นกับชนิดของแอนโทไซยานินในผลิตภัณฑ์นั้น ๆ

เมื่อนำค่า DI มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับเวลาการเก็บรักษา (รูปที่ 4.12) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของค่า DI ในน้ำเม่าเกิดขึ้นเล็กน้อยในช่วงแรกของการเก็บรักษาและจะเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วหลังจากเก็บรักษาไปแล้ว 84 วัน ซึ่งผ่านค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานินไปแล้ว



รูปที่ 4.12 ค่า DI ในน้ำเหมายที่บรรจุในขวดแก้วใสระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C

เมื่อพิจารณาค่าสีในน้ำเหมาย 25 % ระหว่างการเก็บรักษา (ตารางที่ 4.7) พบว่าในระหว่างการเก็บรักษา น้ำเหมายค่า L^* ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงค่าความสว่างของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทั้งนี้เป็นผลมาจากการเสื่อมสลายของแอนโทไซยานินในผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษา ขณะที่ค่า a^* ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงสีแดงในน้ำเหมายระหว่างการเก็บรักษาลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงแนวโน้มการเกิดสีน้ำตาลซึ่งสัมพันธ์กับ PC ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4.6) เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยา polymerization ของแอนโทไซยานินทำให้เกิด polymeric pigment ขึ้นในผลิตภัณฑ์ (Somers, 1971 และ Markakis, 1982) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Garzon และ Wrolstad (2002) ที่ศึกษาเสถียรภาพของ pelargonidin-base anthocyanins ในน้ำสตรอเบอรี่ และน้ำสตรอเบอรี่เข้มข้น ที่พบว่าผลิตภัณฑ์มีค่า L^* เพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา เนื่องจากการสลายตัวของแอนโทไซยานิน และผลการทดลองของบุศรารัตน์ สายเชื้อ (2545) ที่ศึกษาการนำสีแอนโทไซยานินทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจากดอกกระเจี๊ยบแดงมาใช้ใน model system ผลิตภัณฑ์น้ำหวาน โดยพบว่าระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์มีค่า L^* เพิ่มขึ้นและมีค่า a^* ลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากการเสื่อมสลายของแอนโทไซยานินในระหว่างการเก็บรักษา จากการเปลี่ยนแปลงของค่า L^* และ a^* ดังกล่าวส่งผลให้ค่า ΔE^* ในระหว่างการเก็บรักษาของน้ำเหมายเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับ

ตารางที่ 4.7 ค่าสีของน้ำเมาที่บรรจุในขวดแก้วใสระหว่างการเก็บรักษา

ระยะเวลา (สัปดาห์)	L*	a*	b* ^{ns}	ΔE*
0	19.93 ^a ±0.15	60.87 ^a ±0.76	33.70±2.018	-
1	20.77 ^a ±0.03	62.08 ^a ±1.00	35.16±2.52	1.50±0.58
2	21.44 ^{ab} ±2.32	60.52 ^a ±0.50	33.45±2.03	1.81±0.49
3	22.54 ^{abc} ±3.27	60.28 ^a ±0.69	32.01±4.43	2.36±0.65
4	22.50 ^{abc} ±2.11	60.34 ^a ±0.23	33.35±1.27	3.10±0.17
5	23.32 ^{abc} ±3.72	60.48 ^a ±0.42	33.39±1.69	4.05±0.42
6	22.27 ^{abc} ±2.81	59.64 ^a ±0.91	32.17±1.83	5.02±0.66
7	23.26 ^{abc} ±4.08	59.57 ^{ab} ±0.57	32.55±2.25	6.96±0.72
8	22.02 ^{abc} ±4.38	57.27 ^{aba} ±1.76	30.18±3.75	7.12±0.94
9	21.78 ^{abc} ±2.74	57.45 ^{bcd} ±1.88	31.11±1.15	7.26±0.58
10	21.74 ^{abc} ±4.02	56.07 ^{bcde} ±1.10	30.43±2.72	7.56±0.41
11	21.13 ^{abc} ±0.06	51.40 ^{cdef} ±0.91	25.35±3.48	7.98±0.24
12	23.45 ^{abc} ±2.83	54.20 ^{cdef} ±2.52	33.09±1.73	7.99±0.40
13	22.51 ^{abc} ±0.94	52.20 ^{efg} ±0.13	28.89±3.42	8.92±1.15
14	25.04 ^{abc} ±0.44	54.50 ^{efgh} ±0.54	32.08±2.32	9.05±0.31
15	22.55 ^{abc} ±2.92	53.67 ^{efg} ±2.28	30.62±2.55	9.41±1.54
16	22.93 ^{abc} ±2.92	51.74 ^{efghi} ±1.58	28.69±2.48	10.36±12
17	23.35 ^{abc} ±2.01	50.02 ^{efghi} ±3.14	32.02±1.02	10.72±0.96
18	23.72 ^{abc} ±3.42	50.51 ^{efghi} ±1.35	28.50±2.83	10.41±0.85
19	24.49 ^{abc} ±3.37	53.67 ^{fghi} ±2.28	33.96±1.52	10.56±0.41
20	23.91 ^{abc} ±2.25	51.27 ^{ghi} ±3.24	33.72±1.21	11.24±0.93
21	25.00 ^{abc} ±4.11	52.61 ^{hi} ±0.36	33.19±1.98	11.86±0.93
22	25.96 ^{abc} ±3.80	53.28 ⁱ ±2.17	33.97±1.64	12.13±0.45
23	27.72 ^{bc} ±0.08	50.18 ⁱ ±1.81	33.80±2.99	12.58±0.88
24	27.07 ^c ±3.11	50.20 ⁱ ±2.42	33.05±2.25	12.72±0.43

ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

* ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับ (a, b, c...) ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ที่เวลา 0 สัปดาห์ โดยถ้าค่า ΔE^* ที่มากกว่า 1 แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงของสีเกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Hunt, 1998)

เมื่อนำค่าสีที่ได้จากการวัดในระบบ CIE L* a* b* มาคำนวณเป็นค่า h° ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงเฉดสีของผลิตภัณฑ์ ค่า C^* ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความเข้มสีของผลิตภัณฑ์ และค่า ΔH^* ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของเฉดสี (ตารางที่ 4.8) พบว่าในระหว่างการเก็บรักษาน้ำเฝ้าค่า h° เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าในระหว่างการเก็บรักษาน้ำเฝ้ามีการ shift ของเฉดสีจากสีแดงไปเป็นสีส้มมากขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับค่า ΔH^* ที่เพิ่มขึ้นแสดงว่าในระหว่างการเก็บรักษามีการเปลี่ยนแปลงของเฉดสีเกิดขึ้น ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Garzon และ Wrolstad (2002) ที่ศึกษาเสถียรภาพของ pelargonidin-base anthocyanins ในน้ำสตรอเบอร์ และน้ำสตรอเบอร์เข้มข้น และผลการทดลองของ Skrede และคณะ (1992) ที่ศึกษาเสถียรภาพของแอนโทไซยานินในน้ำสตรอเบอร์ และแบลคเคอแรนท์ ที่ต่างก็พบว่าผลิตภัณฑ์ที่มีค่า h° เพิ่มขึ้นระหว่างการเก็บรักษา ขณะที่ค่า C^* ของน้ำเฝ้ามีค่าลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ทั้งนี้เป็นผลมาจากการเสื่อมสลายของแอนโทไซยานินในระหว่างการเก็บรักษาทำให้สีแดงของผลิตภัณฑ์ลดลง แสดงให้เห็นว่าน้ำเฝ้ามีความเข้มของสีลดลงซึ่งสัมพันธ์กับ TCD ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4.6) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Garzon และ Wrolstad (2002) ที่ศึกษาเสถียรภาพของ pelargonidin-base anthocyanins ในน้ำสตรอเบอร์ และน้ำสตรอเบอร์เข้มข้น ที่พบว่าผลิตภัณฑ์ที่มีค่า C^* ลดลงระหว่างการเก็บรักษา เนื่องจากมีการเสื่อมสลายของแอนโทไซยานินเกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาทำให้ความเข้มของสีแดงในผลิตภัณฑ์ลดลง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.8 ค่า h^0 ค่า C^* และค่า ΔH^* ของน้ำเม่าที่บรรจุในขวดแก้วใสระหว่างการเก็บรักษา

ระยะเวลา (สัปดาห์)	h^0	C^*	ΔH^*
0	28.12 ^a ±0.32	70.20 ^a ±0.51	-
1	28.34 ^{ab} ±0.36	69.90 ^a ±0.71	1.08±0.86
2	28.92 ^{abc} ±1.50	69.17 ^{ab} ±1.02	1.37±0.42
3	29.63 ^{abcd} ±1.67	69.38 ^{ab} ±1.95	1.24±0.43
4	29.22 ^{abcd} ±1.17	69.15 ^{ab} ±0.53	1.81±0.59
5	29.22 ^{abcde} ±1.69	69.32 ^{abc} ±0.67	2.14±0.59
6	30.08 ^{abcde} ±1.07	68.21 ^{bc} ±0.18	2.96±0.71
7	30.54 ^{abcde} ±1.03	68.03 ^{cd} ±1.52	3.44±0.72
8	30.42 ^{abcde} ±1.17	67.85 ^{cd} ±1.12	3.95±0.64
9	30.27 ^{abcde} ±1.57	66.66 ^{de} ±1.00	4.61±0.63
10	30.95 ^{abcde} ±1.32	65.26 ^{ef} ±1.82	4.79±0.93
11	30.44 ^{abcdef} ±0.98	65.49 ^f ±0.64	4.81±0.95
12	31.26 ^{abcdef} ±1.23	65.12 ^{fg} ±1.86	5.92±0.84
13	30.98 ^{abcdef} ±1.42	64.65 ^{fg} ±0.14	5.11±0.95
14	31.52 ^{abcdef} ±0.21	63.93 ^g ±0.48	5.28±0.98
15	31.08 ^{abcdef} ±2.01	62.30 ^h ±0.29	6.19±0.84
16	31.67 ^{bcdef} ±0.75	59.89 ^{hi} ±1.23	6.86±0.82
17	32.61 ^{bcdef} ±1.24	61.07 ^{ij} ±1.40	6.69±0.95
18	32.63 ^{def} ±1.53	60.82 ^{ij} ±1.77	6.88±0.95
19	32.25 ^{ef} ±1.85	60.42 ^{ij} ±1.12	6.92±0.75
20	32.63 ^{ef} ±2.34	60.21 ^{ijk} ±0.23	7.58±0.93
21	32.65 ^{ef} ±1.47	60.68 ^{ijk} ±1.11	7.72±0.94
22	32.55 ^{ef} ±1.83	59.52 ^{jk} ±0.52	8.65±0.96
23	32.88 ^{ef} ±2.95	59.63 ^{jk} ±0.25	8.37±0.95
24	34.06 ^f ±2.15	59.13 ^k ±1.54	9.18±0.89

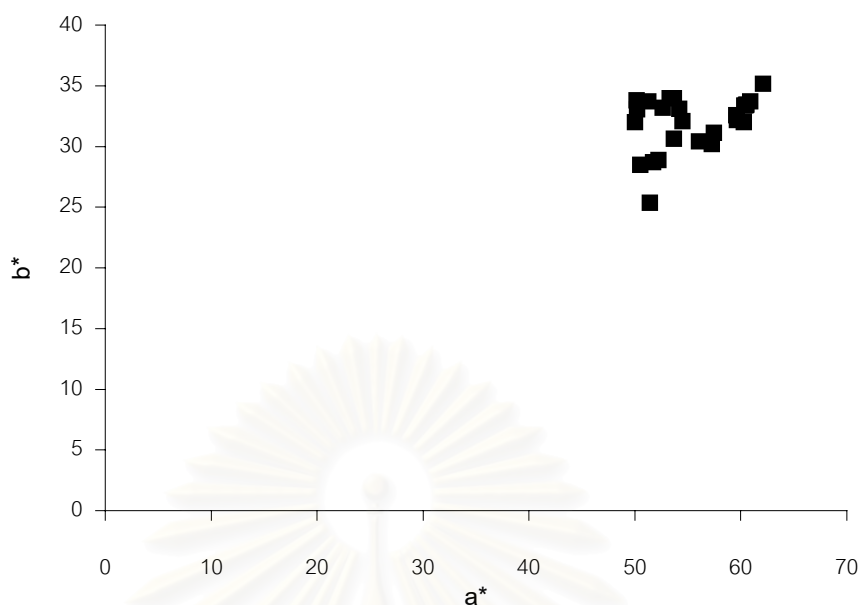
* ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับ (a, b, c...) ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

เมื่อนำน้ำเมามาประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสระหว่างการเก็บรักษา โดยใช้แบบทดสอบแบบ Hedonic score 9 ระดับ (9 คะแนน หมายถึง ชอบมากที่สุด และ 1 คะแนน หมายถึง ไม่ชอบมากที่สุด) ให้ผู้ทดสอบ 30 คนประเมินความชอบที่มีต่อสีแดงและสีโดยรวมของน้ำเมาทุกเดือน พบว่าน้ำเมาได้รับคะแนนความชอบต่อสีแดงและสีโดยรวมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยได้รับคะแนนความชอบอยู่ในช่วงชอบเล็กน้อยถึงชอบปานกลางตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา(ตารางที่ 4.9) เมื่อนำคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าซึ่งได้จากการวัดทางกายภาพ (ตารางที่ 4.7 และ 4.8) จะเห็นว่ามี การเปลี่ยนแปลงของสีเกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์แต่ผู้ทดสอบก็ยังให้การยอมรับตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ทั้งนี้เนื่องมาจากการมองเห็นสีของผู้ทดสอบจะไม่สามารถมองค่า a^* และค่า b^* แยกออกจากกันได้ เมื่อนำค่า a^* และ b^* ในระหว่างการเก็บรักษามาสร้างเป็นกราฟความสัมพันธ์ (รูปที่ 4.13) พบว่าข้อมูลที่ได้มีการเกาะกันเป็นกลุ่มด้วยเหตุผลนี้จึงทำให้ผู้ทดสอบไม่สามารถมองเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นได้ แม้ค่า ΔH^* ที่คำนวณได้จะมีค่าเพิ่มขึ้นซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเฉดสีเกิดขึ้นก็ตาม แต่เมื่อเวลาการเก็บรักษานานขึ้นคะแนนทางประสาทสัมผัสที่ได้ก็มีแนวโน้มลดลง

ตารางที่ 4.9 ระดับความพอใจต่อสีแดงและสีโดยรวมของน้ำเมาที่บรรจุขวดแก้วใสระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C

ระยะเวลา (เดือน)	สีแดง ^{ns}	สีโดยรวม ^{ns}
0	7.58±1.14	7.39±1.07
1	7.20±1.06	6.90±1.29
2	6.10±1.18	6.23±1.76
3	6.20±1.32	6.50±1.46
4	6.33±1.12	6.50±1.22
5	6.23±1.22	6.33±1.21
6	6.20±1.21	6.37±1.27

ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0,05$)



รูปที่ 4.13 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า a^* และ b^* ของน้ำเม่าที่บรรจุขวดแก้วใสในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C 24 สัปดาห์

ส่วนผลการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาของน้ำเม่า 25 % ระหว่างการเก็บรักษา ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และราตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา แสดงว่าผลิตภัณฑ์ยังไม่เกิดการเน่าเสียในระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 24 สัปดาห์

4.6 การศึกษาผลของการเติมวิตามินซีต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพระหว่างการเก็บรักษาน้ำเม่า 25%

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ 2 ประการ ประการแรกคือต้องการเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้กับน้ำเม่า จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำเม่า (ตารางที่ 4.1) พบว่าน้ำเม่าไม่พบวิตามินซี ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเติมวิตามินซีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ให้กับน้ำเม่า 25% เพื่อเป็นการเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้กับผลิตภัณฑ์ ประการที่ 2 เนื่องจากในน้ำเม่ามีสารประกอบฟีนอลิกและ PPO activity (ตารางที่ 4.1) ซึ่งสามารถทำให้เกิด *O*-quinone ที่จะทำปฏิกิริยากับแอนโทไซยานินแล้วทำให้เกิดการเสื่อมสลายของแอนโทไซยานินได้ แม้ว่า PPO activity จะถูกยับยั้งในระหว่างการพาสเจอร์ไรส์แต่ *O*-quinone ยังคงอยู่ ดังนั้นวิตามินซีที่เติมลงไปน่าจะไปช่วย reduce *O*-quinone ได้ ถึงแม้ว่าการเกิด oxidation ของวิตามินซีเองเป็นสาเหตุหนึ่งของการเสื่อมสลายของแอนโทไซยานิน แต่การเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวก็มีอิทธิพลจากปริมาณออกซิเจน

ในผลิตภัณฑ์ หากมีการจำกัดปริมาณออกซิเจนในผลิตภัณฑ์โดยการควบคุม head space ในระหว่างการบรรจุ การเกิด oxidation ของวิตามินซีก็จะเกิดขึ้นได้น้อยลง และเมื่อพิจารณาโดยรวมแล้วการเติมวิตามินซีลงไปในผลิตภัณฑ์น่าจะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ได้

ผลิตภัณฑ์น้ำเม่า 25% ที่มีปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ทั้งหมด 0.5% (ในรูปของกรดซิตริก) และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 15 ° Brix พาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 85 °C 10 นาที เติมวิตามินซีให้มีปริมาณคงเหลือหลังการพาสเจอร์ไรส์ 0, 10, 25, 50 และ 100% ของปริมาณที่แนะนำ ให้บริโภคต่อวัน (60 mg) (Williams, 1988) ต่อน้ำเม่า 1 ขวด (190 ml, 1 หน่วยบริโภค) บรรจุใส่ขวดแก้วสีชาขณะร้อนโดยควบคุม head space ให้เท่ากับ 4.5 ml ปิดด้วยฝาพลาสติก 2 ชั้น ทำให้เย็นทันทีที่อุณหภูมิห้อง บรรจุใส่กล่องกระดาษแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 สัปดาห์ นำมาวิเคราะห์ตามข้อ 3.7

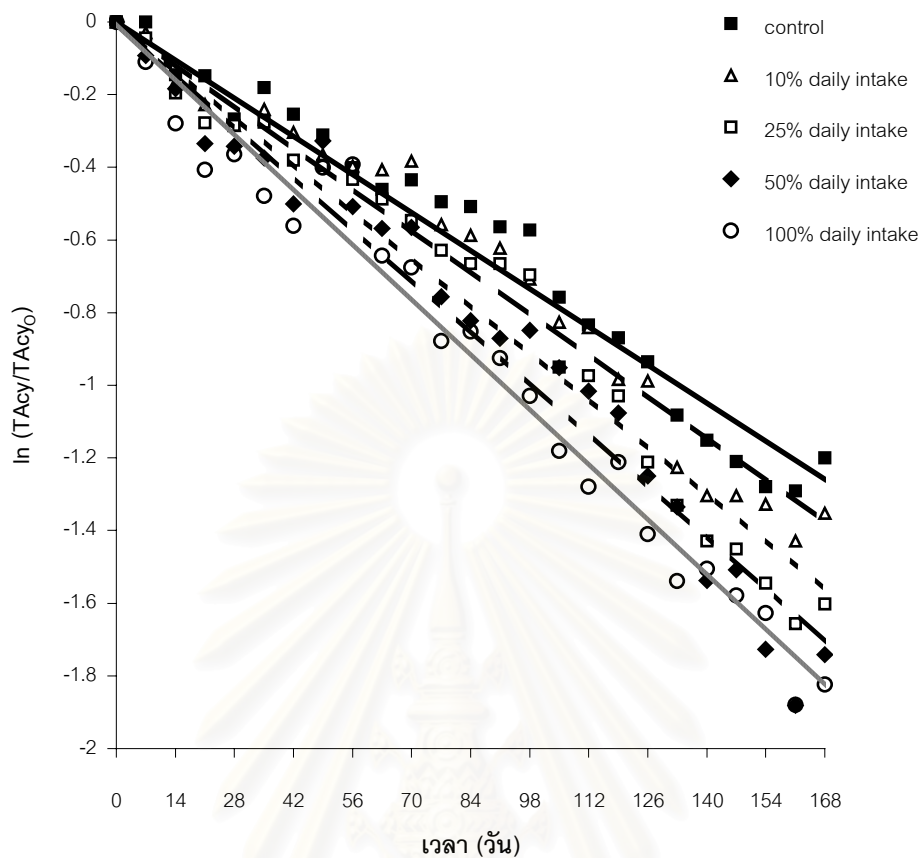
ผลการทดลองที่ได้พบว่าน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีจะมีปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือลดลงเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลานานขึ้น โดยการเติมวิตามินซีในปริมาณที่มากขึ้นมีแนวโน้มที่จะทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือในน้ำเม่ายิ่งลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 24 สัปดาห์ แต่ค่าที่ได้ในแต่ละสัปดาห์ก็ไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 4.10) เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า natural logarithm (ln) ของปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีในแต่ละระดับต่อปริมาณแอนโทไซยานินในน้ำเม่าก่อนการเก็บรักษา กับเวลาการเก็บรักษา (รูปที่ 4.15) พบว่ากราฟที่ได้มีลักษณะความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงในทุกตัวอย่าง โดยมีค่า R^2 ดังแสดงในตารางที่ 4.11 แสดงว่าการสลายตัวของแอนโทไซยานินในทุกตัวอย่างเป็นแบบ first order โดยปกติ first order reaction จะเกิดในช่วงต้นของปฏิกิริยา แต่จากค่า R^2 ที่ได้จึงประมาณอัตราการสลายตัวของแอนโทไซยานินตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาว่าเป็นแบบ first order ซึ่งมีค่าคงที่ของการสลายตัว และค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานินเมื่อคำนวณตามข้อ 4.5 แสดงในตารางที่ 4.11 โดยพบว่า การเติมวิตามินซีในปริมาณที่สูงขึ้นจะทำให้ค่าคงที่ของการสลายตัวของแอนโทไซยานินสูงขึ้น ส่งผลให้ค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานินในน้ำเม่าลดลง ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Choi, Kim และ Lee (2002) ที่ศึกษาผลของปริมาณวิตามินซีคงเหลือต่อสีและเสถียรภาพของรงควัตถุใน blood orange juice ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4.5 °C) แล้วพบว่า การเติมวิตามินซี ลงไปในน้ำส้มจะทำให้เกิดการเสื่อมสลายของแอนโทไซยานินได้มากกว่าผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีการเติมวิตามินซีลงไป และผลการทดลองของ Garcia-Viguera และ Bridle (1999) ที่ศึกษาผลของ โครงสร้างต่อเสถียรภาพของสีของแอนโทไซยานินและ flavylum salt ในระบบที่มีวิตามินซี พบว่าการเติมวิตามินซีลงไปจะทำให้เกิดการเสื่อมสลายของแอนโทไซยานินในระบบสูงขึ้น เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาระหว่าง

ตารางที่ 4.10 ปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือ (%retention)				
	ปริมาณวิตามินซีที่เติม (% daily intake)				
	0	10	25	50	100
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
1 ^{ns}	100.00±0.05	97.05±1.79	95.64±2.47	91.21±1.01	89.58±3.31
2 ^{ns}	86.45±3.81	84.66±6.21	82.24±3.79	83.21±3.60	75.69±3.01
3 ^{ns}	86.25±7.79	79.67±3.02	75.76±2.27	71.50±5.13	66.59±2.44
4 ^{ns}	76.56±5.79	75.16±17.34	75.25±4.99	71.04±9.59	69.48±7.93
5 ^{ns}	83.42±2.94	78.64±7.98	75.90±3.10	68.73±10.92	61.98±5.64
6 ^{ns}	77.53±11.02	73.82±3.87	68.33±1.61	60.64±3.43	57.09±1.63
7 ^{ns}	73.30±7.77	69.36±2.21	67.35±8.99	72.08±22.16	67.00±14.71
8 ^{ns}	66.93±7.50	67.24±11.44	64.82±13.87	60.14±13.76	67.56±11.87
9 ^{ns}	63.09±8.58	66.55±18.35	61.43±4.93	56.62±22.46	52.54±19.85
10 ^{ns}	64.77±10.56	68.18±15.68	57.92±11.23	56.83±10.51	50.90±12.85
11 ^{ns}	60.97±16.96	57.21±15.76	53.33±10.47	46.94±8.09	41.54±7.85
12 ^{ns}	60.16±11.69	55.58±12.01	51.41±13.09	43.91±12.83	42.67±7.35
13 ^{ns}	56.90±13.86	53.68±11.87	51.40±14.39	41.86±2.30	39.64±11.55
14 ^{ns}	56.42±14.23	49.26±14.75	49.87±13.31	42.82±8.48	35.70±17.02
15 ^{ns}	46.84±7.29	43.72±10.78	38.66±9.69	38.61±9.27	30.73±11.30
16 ^{ns}	43.44±13.10	43.11±8.66	37.77±13.86	36.21±12.48	27.82±8.07
17 ^{ns}	41.91±11.58	37.37±8.45	35.72±6.95	34.07±9.68	29.77±7.04
18 ^{ns}	39.22±8.33	37.21±10.31	29.77±7.81	28.68±10.98	24.42±5.63
19 ^{ns}	33.90±6.67	29.34±5.01	26.43±3.62	26.33±4.82	21.47±4.96
20 ^{ns}	31.63±6.69	27.14±7.56	23.96±7.68	21.48±9.05	22.21±7.19
21 ^{ns}	29.83±4.12	27.15±5.85	23.44±6.86	22.13±8.64	20.63±5.74
22 ^{ns}	27.83±7.47	26.50±7.66	21.34±7.41	17.79±4.59	19.64±3.59
23 ^{ns}	27.50±3.71	23.96±4.82	19.09±4.01	15.25±1.14	15.27±2.57
24 ^{ns}	30.15±3.46	25.85±3.61	20.16±6.01	17.53±7.55	16.14±8.16

ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

* ก่อนเก็บรักษาน้ำเม่าที่เติมวิตามินซี 0, 10, 25, 50 และ 100% daily intake มีปริมาณแอนโทไซยานิน 5.27±0.82, 5.52±0.96, 5.43±0.78, 5.27±0.60 และ 5.28±0.94 mg/100 ml ตามลำดับ



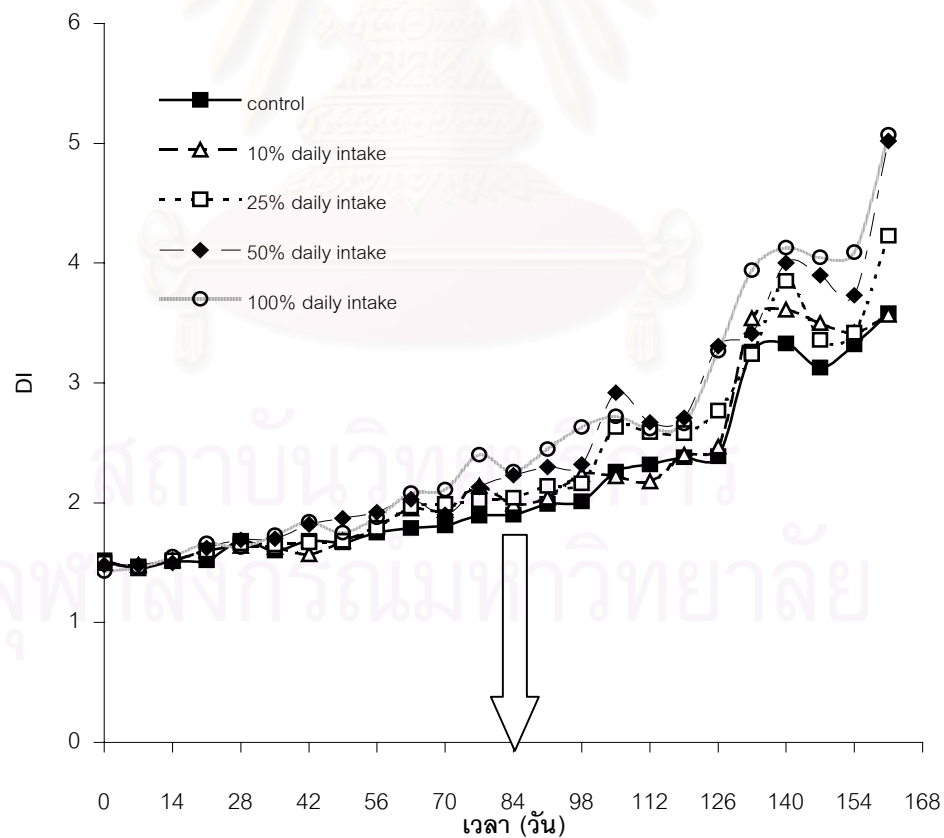
รูปที่ 4.14 ปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือในน้ำแม่ที่เติมวิตามินซีในปริมาณต่าง ๆ ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C เมื่อ TAcy คือปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือในน้ำแม่หลังการเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่าง ๆ และ TAcy₀ คือปริมาณแอนโทไซยานินเริ่มต้นในน้ำแม่ก่อนเก็บรักษา

ตารางที่ 4.11 ค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานินในน้ำแม่ที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา

ปริมาณวิตามินซีที่เติม (% daily intake)	สมการ	R ²	t _{1/2} (วัน)	k (ต่อวัน)
0	y = -0.0080x	0.97	86	8.00 × 10 ⁻³
10	y = -0.0082x	0.97	84	8.20 × 10 ⁻³
25	y = -0.0093x	0.97	74	9.30 × 10 ⁻³
50	y = -0.0102x	0.96	68	1.02 × 10 ⁻²
100	y = -0.0109x	0.97	63	1.09 × 10 ⁻²

แอนโทไซยานินกับ hydrogen peroxide ที่เกิดจากปฏิกิริยา oxidation ของวิตามินซีในระบบระหว่างการเก็บรักษา

การเสื่อมสลายของแอนโทไซยานินในน้ำเม่านอกจากจะมีผลต่อปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือในผลิตภัณฑ์แล้ว ยังมีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่า DI (ตารางที่ 4.12) ค่า TCD (ตารางที่ 4.13) และค่า PC (ตารางที่ 4.14) อีกด้วย โดยเมื่อเก็บรักษาน้ำเม่าเป็นเวลานานขึ้นจะทำให้ค่า DI สูงขึ้น ขณะที่การเติมวิตามินซีในระดับต่างๆ ไม่มีผลต่อค่า DI อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่มีแนวโน้มว่าการเติมวิตามินซีในปริมาณที่มากขึ้นจะส่งผลให้ค่า DI สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับค่า TCD ที่ลดลงและค่า PC ที่เพิ่มขึ้นระหว่างการเก็บรักษา เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยา polymerization ของแอนโทไซยานินแล้วทำให้เกิด polymeric pigment ขึ้นในผลิตภัณฑ์ (Somers, 1971 และ Markakis, 1982) เมื่อนำค่า DI มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับเวลาระหว่างการเก็บรักษา (รูปที่ 4.16) พบว่าในช่วงแรกของการเก็บรักษามีการเปลี่ยนแปลงของค่า DI เกิดขึ้นเล็กน้อย จากนั้นค่า DI จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากเก็บรักษาไว้ 84 วันซึ่งผ่านครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานินในผลิตภัณฑ์ไปแล้ว



รูปที่ 4.15 ค่า DI ของแอนโทไซยานินในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 30°C

ตารางที่ 4.12 ค่า DI ในน้ำเมาที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ค่า DI				
	ปริมาณวิตามินซีที่เติม (% daily intake)				
	0	10	25	50	100
0 ^{ns}	1.52±0.04	1.50±0.06	1.50±0.03	1.48±0.03	1.43±0.04
1 ^{ns}	1.45±0.02	1.48±0.03	1.47±0.03	1.48±0.05	1.46±0.05
2 ^{ns}	1.51±0.07	1.52±0.06	1.52±0.08	1.50±0.02	1.55±0.05
3 ^{ns}	1.52±0.10	1.60±0.07	1.60±0.02	1.62±0.15	1.66±0.12
4 ^{ns}	1.68±0.01	1.64±0.13	1.66±0.07	1.69±0.16	1.63±0.13
5 ^{ns}	1.60±0.03	1.63±0.04	1.65±0.08	1.70±0.10	1.73±0.08
6 ^{ns}	1.68±0.06	1.57±0.02	1.67±0.00	1.82±0.03	1.84±0.04
7 ^{ns}	1.67±0.17	1.68±0.10	1.68±0.03	1.87±0.14	1.75±0.07
8 ^{ns}	1.75±0.21	1.80±0.14	1.79±0.07	1.92±0.14	1.88±0.18
9 ^{ns}	1.79±0.09	1.95±0.09	1.97±0.12	2.03±0.18	2.08±0.06
10 ^{ns}	1.81±0.08	1.94±0.08	1.99±0.04	1.90±0.14	2.11±0.15
11 ^{ns}	1.89±0.23	2.14±0.19	2.02±0.06	2.13±0.07	2.40±0.04
12 ^{ns}	1.90±0.06	1.99±0.06	2.04±0.23	2.23±0.11	2.26±0.13
13 ^{ns}	1.99±0.14	2.04±0.08	2.14±0.21	2.30±0.14	2.45±0.11
14 ^{ns}	2.01±0.09	2.24±0.33	2.16±0.13	2.32±0.16	2.63±0.52
15 ^{ns}	2.26±0.22	2.22±0.54	2.63±0.03	2.92±0.43	2.72±0.48
16 ^{ns}	2.32±0.01	2.18±0.05	2.59±0.28	2.67±0.19	2.62±0.05
17 ^{ns}	2.38±0.09	2.40±0.24	2.58±0.20	2.71±0.12	2.66±0.03
18 ^{ns}	2.39±0.08	2.47±0.29	2.77±0.47	3.31±0.85	3.27±0.23
19 ^{ns}	3.26±0.74	3.54±0.05	3.24±0.54	3.41±0.60	3.94±0.71
20 ^{ns}	3.33±0.20	3.61±0.08	3.85±0.91	4.00±0.04	4.13±0.12
21 ^{ns}	3.13±0.11	3.50±0.11	3.36±0.46	3.90±0.73	4.05±0.64
22 ^{ns}	3.32±0.43	3.42±0.40	3.42±0.53	3.73±0.10	4.09±0.16
23 ^{ns}	3.58±0.68	3.57±0.97	4.23±1.11	5.02±0.78	5.07±0.51
24 ^{ns}	2.34±0.08	3.04±0.13	3.63±0.56	4.00±0.62	4.73±0.78

ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 4.13 ค่า TCD ในน้ำเมาที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ค่า TCD				
	ปริมาณวิตามินซีที่เติม (% daily intake)				
	0	10	25	50	100
0 ^{ns}	0.93±0.13	0.93±0.11	0.96±0.11	0.93±0.10	0.95±0.15
1 ^{ns}	0.91±0.10	0.92±0.10	0.91±0.08	0.91±0.11	0.91±0.11
2 ^{ns}	0.92±0.12	0.93±0.12	0.92±0.13	0.91±0.13	0.90±0.12
3 ^{ns}	0.92±0.14	0.93±0.11	0.92±0.12	0.91±0.14	0.89±0.08
4 ^{ns}	0.93±0.13	0.80±0.16	0.93±0.12	0.92±0.10	0.90±0.14
5 ^{ns}	0.95±0.12	0.97±0.14	0.95±0.12	0.91±0.14	0.93±0.11
6 ^{ns}	0.89±0.09	0.89±0.09	0.87±0.11	0.89±0.10	0.85±0.13
7 ^{ns}	0.90±0.11	0.90±0.10	0.89±0.11	0.87±0.11	0.88±0.11
8 ^{ns}	0.92±0.11	0.91±0.12	0.88±0.10	0.87±0.10	0.95±0.02
9 ^{ns}	0.88±0.09	0.89±0.10	0.85±0.13	0.84±0.12	0.81±0.12
10 ^{ns}	0.89±0.11	0.86±0.11	0.86±0.09	0.85±0.08	0.82±0.11
11 ^{ns}	0.83±0.09	0.82±0.10	0.80±0.10	0.78±0.08	0.77±0.09
12 ^{ns}	0.83±0.05	0.82±0.10	0.79±0.08	0.80±0.08	0.79±0.08
13 ^{ns}	0.84±0.11	0.82±0.09	0.83±0.10	0.82±0.09	0.80±0.12
14 ^{ns}	0.81±0.09	0.82±0.09	0.81±0.10	0.79±0.08	0.78±0.09
15 ^{ns}	0.78±0.11	0.74±0.09	0.76±0.08	0.75±0.08	0.75±0.09
16 ^{ns}	0.84±0.03	0.79±0.08	0.81±0.07	0.79±0.09	0.77±0.08
17 ^{ns}	0.81±0.08	0.81±0.09	0.79±0.09	0.80±0.09	0.79±0.09
18 ^{ns}	0.80±0.08	0.81±0.08	0.80±0.08	0.79±0.08	0.76±0.08
19 ^{ns}	0.85±0.03	0.81±0.07	0.79±0.05	0.81±0.08	0.78±0.07
20 ^{ns}	0.82±0.08	0.81±0.06	0.80±0.08	0.81±0.08	0.81±0.07
21 ^{ns}	0.80±0.08	0.81±0.06	0.81±0.08	0.80±0.08	0.79±0.08
22 ^{ns}	0.77±0.07	0.76±0.07	0.76±0.07	0.76±0.07	0.77±0.08
23 ^{ns}	0.79±0.06	0.82±0.02	0.79±0.09	0.80±0.08	0.78±0.07
24 ^{ns}	0.76±0.07	0.79±0.02	0.75±0.07	0.76±0.05	0.75±0.08

ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 4.14 ค่า PC ในน้ำเฝ้าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ค่า PC				
	ปริมาณวิตามินซีที่เติม (% daily intake)				
	0	10	25	50	100
0 ^{ns}	0.95±0.06	0.94±0.07	0.93±0.07	0.93±0.07	0.94±0.07
1 ^{ns}	0.99±0.06	1.00±0.07	0.97±0.08	0.98±0.07	0.98±0.05
2 ^{ns}	1.04±0.08	1.05±0.03	1.00±0.06	1.05±0.05	1.03±0.11
3 ^{ns}	1.06±0.09	1.06±0.07	1.02±0.08	1.05±0.06	1.06±0.12
4 ^{ns}	1.11±0.09	1.11±0.07	1.08±0.07	1.11±0.05	1.11±0.05
5 ^{ns}	1.16±0.06	1.14±0.08	1.12±0.07	1.15±0.07	1.15±0.06
6 ^{ns}	1.19±0.07	1.17±0.07	1.15±0.06	1.17±0.07	1.19±0.05
7 ^{ns}	1.21±0.06	1.19±0.01	1.19±0.02	1.19±0.05	1.19±0.08
8 ^{ns}	1.21±0.08	1.21±0.07	1.20±0.08	1.20±0.08	1.27±0.03
9 ^{ns}	1.20±0.08	1.26±0.08	1.26±0.05	1.28±0.03	1.26±0.07
10 ^{ns}	1.27±0.10	1.27±0.06	1.26±0.07	1.28±0.07	1.29±0.07
11 ^{ns}	1.29±0.08	1.26±0.09	1.30±0.09	1.29±0.12	1.27±0.08
12 ^{ns}	1.30±0.02	1.30±0.09	1.30±0.08	1.31±0.07	1.31±0.11
13 ^{ns}	1.34±0.09	1.32±0.08	1.36±0.08	1.33±0.09	1.39±0.06
14 ^{ns}	1.37±0.05	1.34±0.07	1.40±0.07	1.38±0.13	1.39±0.07
15 ^{ns}	1.40±0.02	1.35±0.12	1.40±0.07	1.38±0.06	1.41±0.14
16 ^{ns}	1.44±0.10	1.38±0.10	1.41±0.08	1.42±0.03	1.42±0.08
17 ^{ns}	1.42±0.02	1.42±0.10	1.43±0.03	1.45±0.03	1.47±0.06
18 ^{ns}	1.42±0.09	1.46±0.02	1.45±0.08	1.44±0.02	1.49±0.06
19 ^{ns}	1.47±0.07	1.45±0.10	1.47±0.07	1.48±0.07	1.48±0.04
20 ^{ns}	1.48±0.11	1.46±0.05	1.47±0.05	1.48±0.07	1.49±0.04
21 ^{ns}	1.49±0.08	1.47±0.05	1.47±0.03	1.47±0.06	1.51±0.08
22 ^{ns}	1.46±0.08	1.42±0.09	1.46±0.06	1.43±0.07	1.50±0.08
23 ^{ns}	1.53±0.09	1.56±0.03	1.49±0.11	1.50±0.09	1.56±0.05
24 ^{ns}	1.46±0.10	1.50±0.04	1.46±0.07	1.48±0.06	1.53±0.07

ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

เมื่อพิจารณาค่าสีในน้ำเฝ้า 25% ที่เติมวิตามินซีในระดับต่างๆ ระหว่างการเก็บรักษา พบว่าในระหว่างการเก็บรักษาค่า L^* ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความสว่างของผลิตภัณฑ์มีค่าเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.15) เนื่องจากมีการสลายตัวของแอนโทไซยานินเกิดขึ้น (ตารางที่ 4.10) แต่การเติมวิตามินซีในปริมาณที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อค่า L^* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ขณะที่ค่า a^* ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความแดงของผลิตภัณฑ์ลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา (ตารางที่ 4.16) สอดคล้องกับค่า PC ที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.14) แสดงว่าผลิตภัณฑ์ที่มีสีแดงลดลง ในขณะที่ค่า b^* ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (ตารางที่ 4.17) จากการเปลี่ยนแปลงของค่า L^* และ a^* ดังกล่าวทำให้ค่า ΔE^* สูงขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา (ตารางที่ 4.18) แต่การเติมวิตามินซีที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อค่า ΔE^* เมื่อนำค่าสีที่ได้จากการวัดในระบบ CIE $L^* a^* b^*$ มาคำนวณเป็นค่า h° ค่า C^* และค่า ΔH^* พบว่าเมื่อเก็บรักษาน้ำเฝ้าเป็นระยะเวลาสั้นขึ้น ค่า h° จะเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.19) ในขณะที่ค่า C^* ลดลง (ตารางที่ 4.20) แสดงว่าผลิตภัณฑ์ที่มีการ shift ของเฉดสีจากสีแดงไปเป็นสีส้ม มากขึ้นและมีความเข้มของสีแดงลดลง ซึ่งสัมพันธ์กับค่า TCD ที่ลดลง (ตารางที่ 4.13) และสอดคล้องกับค่า ΔH^* (ตารางที่ 4.21) ที่เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา

เมื่อพิจารณาถึงผลของการเติมวิตามินซีในปริมาณต่างๆ ต่อค่าสีของน้ำเฝ้า พบว่าปริมาณวิตามินซีที่เติมลงไปไม่มีผลต่อค่าสีของผลิตภัณฑ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเทียบกับ control ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิตามินซีที่เติมลงไปมีปริมาณน้อย โดยการเติมวิตามินซีในปริมาณ 10, 25, 50 และ 100% ของปริมาณที่แนะนำให้บริโภคต่อวัน (60 mg) ต่อน้ำเฝ้า 1 ขวด (190 ml) จะทำให้น้ำเฝ้ามีวิตามินซี 3.16, 7.89, 15.79 และ 31.58 mg/100 ml ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ Freedman และ Francis (1984) ที่ศึกษาผลของวิตามินซีต่อสีของเยลลี่จากผล blackberry ที่พบว่าการเติมวิตามินซีในปริมาณ 0 และ 35 mg/100 ml ให้ค่าสีของผลิตภัณฑ์ที่ไม่แตกต่างกันในระหว่างการเก็บรักษา ขณะที่การเติมวิตามินซีในปริมาณ 70 mg/100 ml จะทำให้ผลิตภัณฑ์มีค่า L^* และ h° สูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่ไม่เติมวิตามินซี เนื่องจากการเติมวิตามินซีในปริมาณที่สูงขึ้นจะทำให้เกิดการเสื่อมสลายของแอนโทไซยานินมากขึ้น ทำให้ค่า L^* ของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น และสีของผลิตภัณฑ์มีการ shift จากสีแดงไปเป็นสีน้ำตาลมากขึ้น ค่า h° จึงสูงขึ้น

ตารางที่ 4.15 ค่า L* ในน้ำเฝ้าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ค่า L*				
	ปริมาณวิตามินซีที่เติม (% daily intake)				
	0	10	25	50	100
0 ^{ns}	19.19±0.09	19.64±0.35	19.83±0.33	20.16±0.23	20.36±0.32
1 ^{ns}	21.08±0.72	20.97±0.51	21.42±0.08	21.39±0.57	21.66±1.13
2 ^{ns}	21.71±3.16	21.25±2.58	21.56±2.29	22.06±2.41	22.23±2.97
3 ^{ns}	21.22±1.89	22.38±1.69	22.35±2.41	20.51±3.18	22.90±2.21
4 ^{ns}	21.92±3.14	22.14±3.00	22.11±2.63	21.80±1.44	23.10±3.22
5 ^{ns}	21.64±1.71	22.09±2.69	22.38±2.39	21.42±1.10	22.79±2.10
6 ^{ns}	22.17±2.41	22.37±2.22	22.58±2.83	22.02±2.69	22.31±2.41
7 ^{ns}	22.39±2.98	22.07±2.93	23.19±3.07	22.83±3.99	22.52±3.67
8 ^{ns}	22.47±3.51	22.79±2.93	23.56±2.57	23.67±3.99	19.92±0.59
9 ^{ns}	22.74±1.55	22.05±3.21	23.84±5.08	22.49±4.19	22.68±3.95
10 ^{ns}	22.21±3.76	22.64±4.00	23.21±3.97	22.37±1.66	22.81±4.27
11 ^{ns}	21.23±3.13	23.22±3.66	21.15±2.30	21.55±2.30	22.05±2.32
12 ^{ns}	22.76±3.05	23.83±4.79	23.85±2.74	22.86±3.60	22.63±3.50
13 ^{ns}	21.24±3.71	22.62±3.05	22.99±3.85	22.91±4.19	22.25±5.00
14 ^{ns}	22.84±1.68	22.82±3.52	22.83±3.60	23.55±4.19	22.75±2.79
15 ^{ns}	22.24±3.48	23.39±3.97	23.90±3.75	23.71±2.87	23.78±5.48
16 ^{ns}	23.04±2.91	21.38±4.04	24.88±3.95	22.92±3.46	24.00±3.43
17 ^{ns}	23.40±4.57	23.37±4.42	24.68±4.22	24.25±2.90	24.67±4.87
18 ^{ns}	17.87±3.87	24.32±4.77	17.66±3.35	20.33±2.70	21.12±2.39
19 ^{ns}	23.14±0.97	24.48±3.35	24.84±2.33	24.98±3.46	24.46±4.49
20 ^{ns}	24.00±3.98	24.52±2.72	25.21±4.48	25.36±4.36	24.73±3.10
21 ^{ns}	25.32±3.54	24.06±2.26	25.69±2.22	25.58±3.32	24.96±3.92
22 ^{ns}	25.58±2.88	26.37±2.52	25.57±2.94	26.27±4.08	25.07±4.59
23 ^{ns}	25.84±3.18	26.35±3.35	25.81±5.12	25.24±4.05	25.32±3.40
24 ^{ns}	25.99±3.63	26.42±4.78	25.99±2.53	26.39±2.40	25.61±5.29

ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 4.16 ค่า a* ในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ค่า a*				
	ปริมาณวิตามินซีที่เติม (% daily intake)				
	0	10	25	50	100
0 ^{ns}	60.16±0.89	61.17±0.84	61.88±0.76	61.87±0.67	62.07±1.05
1 ^{ns}	62.45±0.24	61.98±0.70	62.69±0.80	62.94±0.68	62.00±0.68
2 ^{ns}	61.32±0.52	60.80±0.84	61.43±1.00	61.18±0.94	61.32±0.90
3 ^{ns}	59.22±1.58	57.45±1.87	57.76±0.85	56.31±0.97	58.87±3.24
4 ^{ns}	60.03±0.92	61.03±1.34	61.82±0.59	60.42±2.29	61.14±2.06
5 ^{ns}	60.50±1.41	60.69±1.30	61.62±1.23	60.86±1.49	61.12±1.13
6 ^{ns}	59.35±0.87	59.77±1.80	58.30±4.17	59.27±2.44	60.02±1.50
7 ^{ns}	60.03±1.33	59.77±1.87	61.12±0.97	60.06±1.80	59.95±0.42
8 ^{ns}	58.21±0.44	57.52±1.66	58.84±1.00	57.82±0.92	56.92±0.30
9 ^{ns}	57.92±1.19	57.18±0.67	57.29±2.37	54.73±4.00	55.41±3.80
10 ^{ns}	57.23±0.93	56.02±1.54	57.35±1.47	56.59±1.62	57.10±5.71
11 ^{ns}	51.49±0.13	53.66±0.48	51.36±1.93	51.11±0.96	52.26±1.75
12 ^{ns}	57.17±1.20	56.74±0.90	57.28±1.95	55.60±1.97	55.93±0.34
13 ^{ns}	53.75±0.62	53.50±1.18	51.10±2.95	51.36±5.06	52.99±1.73
14 ^{ns}	53.76±2.63	55.21±1.87	54.44±2.38	54.69±1.94	54.49±2.62
15 ^{ns}	53.61±0.33	54.59±1.92	54.88±2.48	55.05±1.34	52.56±1.88
16 ^{ns}	51.75±1.96	50.05±5.71	51.85±1.02	52.68±4.01	52.29±2.97
17 ^{ns}	53.92±1.53	53.46±1.50	54.55±3.33	54.32±2.49	54.11±1.89
18 ^{ns}	45.74±5.38	47.53±4.63	43.22±4.70	48.17±5.07	45.68±2.72
19 ^{ns}	54.11±1.61	55.06±2.16	53.14±1.95	55.86±1.87	53.58±2.12
20 ^{ns}	53.61±1.15	54.23±2.57	53.75±3.13	53.31±2.62	54.35±2.67
21 ^{ns}	53.89±1.93	53.33±3.43	54.24±3.43	53.08±3.11	53.21±2.23
22 ^{ns}	52.62±1.38	53.85±2.46	53.71±3.17	52.94±2.98	51.82±2.74
23 ^{ns}	52.17±2.01	53.23±1.21	51.72±1.43	53.78±2.45	50.69±4.80
24 ^{ns}	52.43±1.35	51.93±.91	53.01±2.82	52.42±2.22	50.81±3.53

ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

ตารางที่ 4.17 ค่า b* ในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการศึกษา

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ค่า b*				
	ปริมาณวิตามินซีที่เติม (% daily intake)				
	0	10	25	50	100
0 ^{ns}	32.78±2.87	33.39±2.38	33.83±2.58	34.21±2.59	34.41±2.29
1 ^{ns}	35.41±2.26	35.17±2.05	35.56±1.88	35.68±2.06	35.69±1.78
2 ^{ns}	33.65±2.81	32.94±2.54	33.76±1.90	33.60±1.69	34.14±2.65
3 ^{ns}	31.93±1.15	28.41±4.32	30.44±2.55	29.36±3.21	31.76±2.48
4 ^{ns}	33.50±2.45	33.49±1.83	33.80±1.90	33.24±0.81	34.14±1.04
5 ^{ns}	33.01±0.81	33.57±1.78	33.83±1.32	33.95±1.40	34.11±1.31
6 ^{ns}	32.14±1.59	32.21±1.72	33.18±1.19	31.70±1.96	32.35±0.12
7 ^{ns}	33.40±2.00	33.01±1.20	34.19±1.72	33.74±1.27	33.01±2.42
8 ^{ns}	30.23±4.35	30.77±3.35	32.41±2.23	31.79±2.57	29.21±0.67
9 ^{ns}	31.58±1.91	30.75±2.43	31.80±2.16	31.13±2.90	32.07±2.71
10 ^{ns}	31.19±2.33	30.97±2.24	31.95±2.00	31.47±1.12	31.97±2.40
11 ^{ns}	26.38±3.18	28.24±3.48	27.45±1.62	27.78±1.74	28.94±1.75
12 ^{ns}	32.96±1.95	31.83±3.00	33.68±1.15	32.20±1.94	32.11±2.33
13 ^{ns}	29.00±2.72	29.56±3.41	27.40±3.88	27.53±4.76	29.21±4.61
14 ^{ns}	31.44±1.39	31.08±2.89	30.97±2.11	31.45±2.76	32.16±1.53
15 ^{ns}	31.70±2.22	33.27±2.21	32.26±1.84	31.89±1.66	31.17±3.32
16 ^{ns}	28.56±2.21	26.97±5.94	29.19±3.25	31.01±2.14	31.33±3.22
17 ^{ns}	32.23±2.14	30.85±2.64	33.36±1.42	32.01±1.97	32.32±2.43
18 ^{ns}	21.45±5.54	27.41±4.88	21.49±4.73	26.90±3.23	27.00±2.14
19 ^{ns}	32.86±0.96	33.88±1.77	34.02±0.94	34.35±1.79	33.68±2.89
20 ^{ns}	33.14±2.19	34.07±1.40	34.47±2.99	33.49±2.71	34.46±1.91
21 ^{ns}	33.38±2.16	32.79±1.64	33.55±2.30	33.59±2.47	34.29±2.54
22 ^{ns}	33.25±3.10	34.30±2.01	33.93±1.13	34.26±2.88	33.08±3.50
23 ^{ns}	34.10±1.55	34.06±2.28	33.06±3.62	33.49±2.00	35.49±4.38
24 ^{ns}	33.55±2.57	34.50±2.96	34.25±1.28	33.16±1.49	32.94±4.33

ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 4.18 ค่า ΔE^* ในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ค่า ΔE^*				
	ปริมาณวิตามินซีที่เติม (% daily intake)				
	0	10	25	50	100
0 ^{ns}	-	-	-	-	-
1 ^{ns}	1.92±0.95	2.70±0.34	2.72±0.04	1.86±0.68	2.62±0.89
2 ^{ns}	1.27±0.44	1.39±0.80	0.90±0.38	1.95±0.71	1.02±0.26
3 ^{ns}	1.34±0.52	1.49±0.44	1.23±0.29	1.76±0.72	1.48±0.31
4 ^{ns}	1.81±0.41	1.77±0.48	1.18±0.40	2.26±0.67	2.44±0.18
5 ^{ns}	1.81±0.20	1.76±0.97	1.80±0.51	2.47±0.55	1.91±0.39
6 ^{ns}	2.03±0.48	2.73±0.62	4.07±0.14	3.02±0.21	3.01±0.77
7 ^{ns}	3.59±0.93	2.91±0.61	3.90±0.51	3.70±0.30	4.06±0.24
8 ^{ns}	6.90±0.32	5.92±0.79	4.50±0.22	5.64±0.37	5.85±0.71
9 ^{ns}	4.63±0.35	5.87±0.71	5.94±0.97	8.04±0.48	7.85±0.48
10 ^{ns}	5.74±0.29	6.84±0.29	5.59±0.63	5.66±0.93	7.07±0.54
11 ^{ns}	12.49±1.80	9.87±1.72	11.84±0.87	8.51±0.96	10.38±1.11
12 ^{ns}	4.85±0.39	6.69±0.69	6.12±0.43	7.21±0.38	7.08±0.98
13 ^{ns}	9.55±0.24	9.56±0.22	12.47±0.59	12.03±0.77	10.75±1.77
14 ^{ns}	7.38±0.87	7.60±0.24	8.15±0.79	8.25±0.55	7.99±0.36
15 ^{ns}	7.73±0.38	8.90±0.44	7.92±0.97	7.53±0.28	10.50±1.56
16 ^{ns}	11.12±1.35	13.88±0.53	11.20±0.47	9.72±0.33	10.43±0.61
17 ^{ns}	7.31±0.81	9.37±0.29	8.44±0.57	8.33±0.28	8.91±0.46
18 ^{ns}	17.78±1.81	16.04±0.59	16.36±1.64	14.87±1.84	17.16±2.64
19 ^{ns}	6.47±0.76	8.46±0.51	9.76±0.74	8.14±0.83	9.80±0.57
20 ^{ns}	9.02±0.38	8.98±0.79	10.13±0.57	9.73±0.44	9.14±0.41
21 ^{ns}	8.41±0.75	9.11±0.94	8.97±0.42	9.89±0.51	10.34±0.42
22 ^{ns}	10.07±1.69	9.59±0.98	9.36±0.93	10.46±0.59	11.18±0.66
23 ^{ns}	9.51±0.47	10.22±2.64	11.61±0.66	9.29±0.86	12.94±0.72
24 ^{ns}	9.41±0.63	11.34±0.71	10.20±0.78	10.12±0.31	12.34±0.55

ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 4.19 ค่า h° ในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ค่า h°				
	ปริมาณวิตามินซีที่เติม (% daily intake)				
	0	10	25	50	100
0 ^{ns}	28.56±1.96	28.61±1.67	28.64±1.69	28.91±1.55	28.99±1.61
1 ^{ns}	28.71±1.47	28.79±1.44	28.33±1.32	28.74±1.47	29.02±1.31
2 ^{ns}	28.73±1.78	28.43±2.04	28.78±1.45	28.77±1.59	29.08±1.68
3 ^{ns}	28.34±1.49	28.64±2.72	28.75±1.65	28.81±2.31	29.12±1.31
4 ^{ns}	28.72±1.62	28.76±1.53	28.66±1.46	28.84±1.25	29.20±1.58
5 ^{ns}	28.63±1.14	28.67±1.43	28.77±1.36	29.17±1.57	29.17±1.36
6 ^{ns}	28.69±1.47	28.32±1.23	29.02±2.62	29.41±1.33	29.33±0.56
7 ^{ns}	28.75±1.42	28.71±1.46	29.22±1.55	29.33±1.59	29.82±1.89
8 ^{ns}	28.67±1.67	28.75±1.24	29.17±1.37	29.77±1.80	29.66±0.30
9 ^{ns}	28.82±1.20	28.58±1.67	29.06±2.67	29.84±4.06	30.13±3.59
10 ^{ns}	28.57±1.89	28.94±2.35	29.12±1.83	29.09±1.44	30.07±3.33
11 ^{ns}	28.41±1.47	29.12±1.86	29.08±1.47	29.16±1.62	30.33±1.69
12 ^{ns}	29.46±1.95	29.27±2.66	29.26±1.70	29.59±2.32	30.84±1.90
13 ^{ns}	29.68±1.91	29.40±1.89	29.32±2.15	29.74±1.63	30.27±2.35
14 ^{ns}	29.84±2.27	29.50±2.03	29.67±2.77	29.87±2.08	30.59±2.33
15 ^{ns}	29.99±2.29	29.73±2.17	30.46±1.70	30.09±1.89	30.64±2.75
16 ^{ns}	30.26±2.19	29.65±2.87	30.09±2.27	30.67±3.63	30.90±2.64
17 ^{ns}	30.45±1.92	30.32±2.38	31.50±2.67	30.88±2.23	30.86±2.57
18 ^{ns}	30.30±2.87	30.01±2.20	31.32±2.86	30.10±2.43	30.70±2.36
19 ^{ns}	30.47±1.32	31.62±1.90	31.65±1.69	31.60±2.17	32.16±2.24
20 ^{ns}	31.40±1.94	31.18±2.27	31.71±1.68	32.17±1.32	32.40±1.64
21 ^{ns}	31.47±2.47	31.64±1.69	31.96±1.82	32.38±1.42	32.81±1.01
22 ^{ns}	32.34±2.49	32.65±2.46	32.33±2.22	32.97±2.33	32.90±2.79
23 ^{ns}	32.47±2.17	32.64±2.04	32.89±3.08	33.27±2.07	33.74±2.62
24 ^{ns}	33.19±2.07	34.05±2.34	32.97±2.31	33.37±2.27	33.58±2.75

ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 4.20 ค่า C* ในน้ำเฝ้าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ค่า C*				
	ปริมาณวิตามินซีที่เติม (% daily intake)				
	0	10	25	50	100
0 ^{ns}	71.80±1.86	71.28±1.48	72.08±1.69	72.36±1.84	71.55±1.52
1 ^{ns}	69.54±1.33	70.71±1.21	70.55±1.18	70.71±1.11	70.98±1.00
2 ^{ns}	69.75±1.82	69.18±1.05	70.11±1.20	69.82±1.97	70.21±1.89
3 ^{ns}	69.29±1.88	69.27±2.64	69.31±1.91	69.54±2.15	69.90±2.78
4 ^{ns}	69.69±1.70	69.36±1.30	69.47±0.85	68.97±1.91	70.04±1.29
5 ^{ns}	68.93±1.88	68.99±1.35	69.31±1.69	68.71±1.73	68.01±1.51
6 ^{ns}	68.51±1.52	68.91±2.01	68.12±2.09	68.23±2.71	68.19±1.34
7 ^{ns}	67.43±1.97	67.74±1.95	68.05±1.54	67.91±1.09	67.46±1.94
8 ^{ns}	66.64±2.74	66.26±2.85	67.20±1.15	67.00±1.78	66.98±1.57
9 ^{ns}	66.24±2.47	65.95±1.84	66.57±2.99	66.07±1.96	66.11±2.46
10 ^{ns}	65.20±1.28	65.05±1.82	65.67±2.32	65.76±2.12	65.56±2.87
11 ^{ns}	64.90±2.38	64.69±2.04	65.26±1.93	65.19±2.18	64.77±2.85
12 ^{ns}	64.05±2.26	64.10±1.78	64.47±2.13	64.29±2.94	64.51±2.97
13 ^{ns}	63.91±2.14	63.17±2.27	64.05±2.67	64.32±2.42	64.57±3.74
14 ^{ns}	63.29±1.74	63.38±1.67	62.68±1.99	63.11±2.46	63.31±1.61
15 ^{ns}	63.47±1.96	62.95±1.67	62.68±2.42	62.65±1.36	62.16±2.40
16 ^{ns}	62.51±1.32	62.92±2.49	62.56±1.06	62.21±2.30	61.00±2.36
17 ^{ns}	62.27±2.23	61.77±1.59	61.99±2.08	61.10±1.16	60.07±1.19
18 ^{ns}	61.98±2.84	61.04±2.11	60.34±2.73	61.20±2.55	60.09±2.56
19 ^{ns}	61.85±1.12	60.67±1.77	60.12±1.18	60.61±1.71	60.36±2.22
20 ^{ns}	61.62±1.19	60.08±1.45	59.94±1.42	60.03±2.92	59.60±1.40
21 ^{ns}	61.15±2.56	60.65±2.44	59.83±2.40	59.89±1.35	59.36±2.66
22 ^{ns}	60.69±1.89	59.89±1.05	59.56±2.30	59.14±1.88	59.58±2.66
23 ^{ns}	60.82±1.36	59.21±1.16	59.46±1.06	59.40±1.58	60.10±1.27
24 ^{ns}	60.59±1.86	59.49±2.54	59.15±1.86	59.06±1.06	59.73±1.48

ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 4.21 ค่า ΔH^* ในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ค่า ΔH^*				
	ปริมาณวิตามินซีที่เติม (% daily intake)				
	0	10	25	50	100
0	-	-	-	-	-
1 ^{ns}	0.76±0.24	0.89±0.19	1.04±0.35	0.81±0.15	0.94±0.23
2 ^{ns}	1.19±0.35	1.56±0.48	1.40±0.38	1.18±0.41	1.11±0.21
3 ^{ns}	1.25±0.31	1.61±0.44	1.42±0.29	1.34±0.23	1.41±0.26
4 ^{ns}	1.70±0.24	1.71±0.32	1.68±0.61	1.82±0.40	1.49±0.35
5 ^{ns}	1.79±0.93	2.24±0.35	1.96±0.53	2.19±0.79	2.11±0.48
6 ^{ns}	1.91±0.93	2.44±0.94	2.06±0.87	2.59±0.58	2.33±0.39
7 ^{ns}	2.60±0.74	3.38±0.35	3.28±0.53	3.03±0.85	3.07±0.18
8 ^{ns}	2.86±0.98	3.63±0.93	3.53±0.10	3.38±0.76	3.48±0.41
9 ^{ns}	2.92±0.94	3.96±0.35	3.58±0.84	3.83±0.09	4.15±0.97
10 ^{ns}	3.52±0.84	4.15±0.09	3.60±0.97	4.26±0.31	4.52±0.44
11 ^{ns}	4.05±0.50	4.42±0.99	4.15±0.29	4.34±0.95	4.93±0.68
12 ^{ns}	4.28±0.31	4.61±0.24	4.56±0.62	4.60±0.77	5.11±0.82
13 ^{ns}	4.60±0.82	4.90±0.88	4.86±0.54	4.63±0.97	5.20±0.95
14 ^{ns}	4.69±0.21	5.17±0.92	4.95±0.58	4.95±0.70	5.26±0.61
15 ^{ns}	4.83±0.58	5.09±0.71	5.56±0.23	4.98±0.69	5.70±0.95
16 ^{ns}	4.84±0.87	5.26±0.95	5.78±0.53	5.32±0.76	5.72±0.86
17 ^{ns}	4.87±0.86	5.27±0.95	5.85±0.53	5.70±0.79	5.79±0.51
18 ^{ns}	5.14±0.82	5.54±0.48	5.95±0.84	5.76±0.63	6.07±0.44
19 ^{ns}	5.25±0.73	5.84±0.42	6.00±0.27	5.77±0.49	6.21±0.96
20 ^{ns}	5.43±0.94	6.19±0.77	6.48±0.46	5.77±0.91	6.59±0.94
21 ^{ns}	5.47±0.85	6.75±0.81	6.60±0.57	6.07±0.95	6.76±0.78
22 ^{ns}	6.09±0.88	6.96±0.49	6.92±0.86	6.80±0.53	7.67±0.96
23 ^{ns}	6.51±0.97	7.39±0.81	7.08±0.73	7.69±0.96	7.92±0.88
24 ^{ns}	7.73±0.70	7.68±0.69	8.74±0.97	8.87±0.89	8.31±0.94

ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

จากผลการตรวจสอบปริมาณวิตามินซีคงเหลือในน้ำเม่าที่เติมวิตามินซีในระดับต่างๆ ระหว่างการเก็บรักษา พบว่าปริมาณวิตามินซีในน้ำเม่ามีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา (ตารางที่ 4.22) โดยในช่วงแรกของการเก็บรักษาจะมีการลดลงของปริมาณวิตามินซีที่มากกว่าช่วงหลังของการเก็บรักษา ซึ่งค่าที่ได้สัมพันธ์กับปริมาณออกซิเจนคงเหลือในผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาที่มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีการลดลงในปริมาณที่สูงในช่วงแรกของการเก็บรักษาเช่นกัน (ตารางที่ 4.23) เนื่องจากเกิดปฏิกิริยา oxidation ของวิตามินซีขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งต้องใช้ออกซิเจนในการทำปฏิกิริยาด้วย (Gregory, 1996) โดยในช่วงแรกของการเก็บรักษา ระบบยังมีวิตามินซีและออกซิเจนอยู่สูงทำให้เกิดการ oxidation ของวิตามินซีได้มาก ส่งผลให้เกิดการสูญเสียของวิตามินซีและออกซิเจนในปริมาณที่สูง ปริมาณวิตามินซีและออกซิเจนในระบบจึงลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเก็บรักษาไปได้ระยะหนึ่งปริมาณออกซิเจนในระบบจะมีอยู่อย่างจำกัด ทำให้เกิดการ oxidation ของวิตามินซีได้น้อยลงอัตราการสูญเสียของวิตามินซีจึงลดลงตามไปด้วย

เมื่อนำปริมาณวิตามินซีคงเหลือมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า natural logarithm (\ln) ของปริมาณวิตามินซีคงเหลือที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่าง ๆ ต่อปริมาณวิตามินซีเริ่มต้นในน้ำเม่าก่อนการเก็บรักษากับเวลาการเก็บรักษา (รูปที่ 4.17) พบว่ากราฟที่ได้มีความสัมพันธ์ในลักษณะเชิงเส้นตรง (linear decrease) ซึ่งมีค่า R^2 ดังแสดงในตารางที่ 4.24 จากความสัมพันธ์ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการสลายตัวของวิตามินซีในน้ำเม่าเป็นแบบ first order โดยปฏิกิริยา first order reaction จะเกิดในช่วงต้นของปฏิกิริยา แต่จากค่า R^2 ที่ได้จึงประมาณอัตราการสลายตัวของวิตามินซีตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาว่าเป็นแบบ first order ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Choi, Kim และ Lee (2002) ที่เติมวิตามินซีในปริมาณ 30 mg/ 100ml ในน้ำ blood orange พบว่าการสลายตัวของวิตามินซีในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เป็นแบบ first order

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.22 ปริมาณวิตามินซีคงเหลือในน้ำเฝ้าระหว่างการรักษา

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ปริมาณวิตามินซีคงเหลือ (mg/100 ml)				
	ปริมาณวิตามินซีที่เติม (% daily intake)				
	0 ^{ns}	10	25	50	100
0	0.00±0.00	2.93 ^a ±0.10	7.48 ^a ±0.45	15.12 ^a ±0.21	30.82 ^a ±0.29
3	0.00±0.00	2.01 ^b ±0.09	6.49 ^b ±0.42	13.20 ^b ±0.60	28.52 ^b ±0.54
6	0.00±0.00	1.37 ^c ±0.09	5.02 ^c ±0.43	11.87 ^c ±0.77	26.61 ^c ±1.33
9	0.00±0.00	0.69 ^d ±0.06	4.22 ^d ±0.14	9.25 ^d ±0.38	25.82 ^c ±0.35
12	0.00±0.00	0.00 ^e ±0.00	3.28 ^e ±0.28	7.65 ^e ±0.42	23.38 ^d ±0.75
15	0.00±0.00	0.00 ^e ±0.00	2.33 ^f ±0.22	6.94 ^e ±0.45	21.83 ^{de} ±1.64
18	0.00±0.00	0.00 ^e ±0.00	1.31 ^g ±0.27	5.03 ^f ±0.27	20.06 ^{ef} ±0.49
21	0.00±0.00	0.00 ^e ±0.00	0.37 ^h ±0.16	3.01 ^g ±0.76	17.85 ^{fg} ±1.22
24	0.00±0.00	0.00 ^e ±0.00	0.00 ^h ±0.00	1.24 ^h ±0.36	16.00 ^g ±1.15

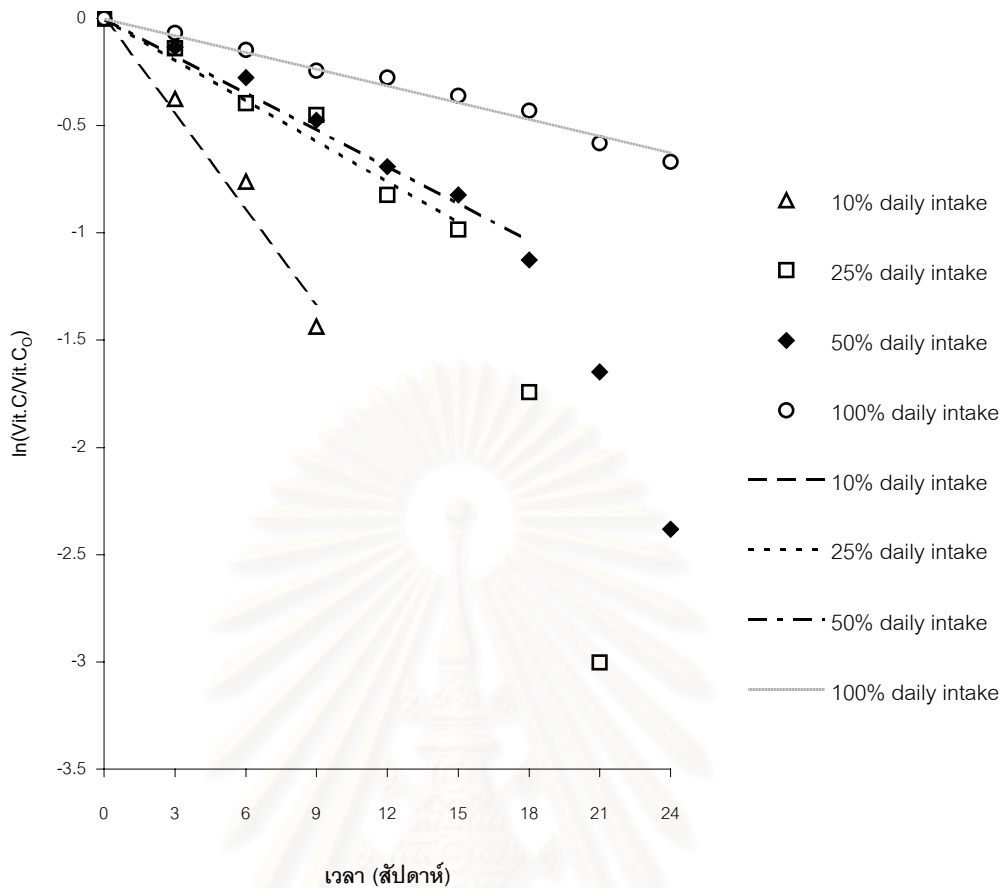
ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

* ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับ (a, b, c...) ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 4.23 ปริมาณออกซิเจนในน้ำเฝ้าที่เติมวิตามินซีระหว่างการรักษา

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ปริมาณออกซิเจน (mg/l)				
	ปริมาณวิตามินซีที่เติม (% daily intake)				
	0	10	25	50	100
0	4.03 ^a ±0.78	3.81 ^a ±0.52	3.68 ^a ±0.44	3.69 ^a ±0.10	3.42 ^a ±0.16
3	2.08 ^b ±0.51	2.16 ^b ±0.35	2.10 ^b ±0.18	1.99 ^b ±0.18	1.81 ^b ±0.42
6	2.01 ^b ±0.28	1.83 ^b ±0.29	1.80 ^{bc} ±0.09	1.71 ^b ±0.21	1.68 ^{bc} ±0.38
9	2.00 ^b ±0.23	1.83 ^b ±0.17	1.69 ^{cd} ±0.02	1.55 ^c ±0.04	1.49 ^{bcd} ±0.16
12	1.94 ^b ±0.03	1.71 ^b ±0.22	1.58 ^{de} ±0.18	1.53 ^c ±0.23	1.38 ^{def} ±0.09
15	1.84 ^b ±0.09	1.69 ^{bc} ±0.14	1.48 ^{def} ±0.28	1.30 ^c ±0.19	1.25 ^{ef} ±0.18
18	1.72 ^b ±0.03	1.68 ^{bc} ±0.16	1.50 ^{def} ±0.13	1.19 ^{cd} ±0.26	1.02 ^{ef} ±0.19
21	1.53 ^b ±0.04	1.27 ^{cd} ±0.23	1.14 ^{ef} ±0.19	0.97 ^{cd} ±0.21	0.79 ^f ±0.07
24	1.47 ^b ±0.48	1.09 ^d ±0.20	0.99 ^{ef} ±0.24	0.81 ^d ±0.12	0.52 ^f ±0.09

* ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับ (a, b, c...) ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



รูปที่ 4.16 ปริมาณวิตามินซีคงเหลือในน้ำเมาระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C เมื่อ Vit.C คือปริมาณวิตามินซีในน้ำเมาหลังการเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ และ Vit.C₀ คือปริมาณวิตามินซีเริ่มต้นในน้ำเมาก่อนการเก็บรักษา

ตารางที่ 4.24 สมการการสลายตัวของวิตามินซีในน้ำเมาระหว่างการเก็บรักษา

ปริมาณวิตามินซีที่เติม (% daily intake)	สมการ	k (ต่อวัน)	R ²
10	$y = -0.1478x$	1.48×10^{-1}	0.97
25	$y = -0.0636x$	6.36×10^{-2}	0.97
50	$y = -0.0577x$	5.77×10^{-2}	0.98
100	$y = -0.0261x$	2.61×10^{-2}	0.98

เมื่อนำน้ำเฝ้าที่เติมวิตามินซีในปริมาณต่างๆ มาประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ระหว่างการเก็บรักษา โดยใช้แบบทดสอบแบบ Hedonic score 9 ระดับ (9 คะแนน หมายถึง ชอบมากที่สุด และ 1 คะแนน หมายถึง ไม่ชอบมากที่สุด) ให้ผู้ทดสอบ 30 คน ประเมิน ความชอบที่มีต่อสีแดงและสีโดยรวมของน้ำเฝ้าทุกเดือน พบว่าน้ำเฝ้าที่เติมวิตามินซีใน ปริมาณต่างกันได้รับคะแนนความชอบต่อสีแดงและสีโดยรวมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ ($p > 0.05$) โดยได้รับคะแนนความชอบอยู่ในช่วงชอบเล็กน้อยถึงชอบปานกลางตลอดระยะเวลา การเก็บรักษา 24 สัปดาห์ในทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 4.25) แสดงว่าการเติมวิตามินซีในน้ำเฝ้า ในช่วง 0-100% daily intake ไม่มีผลต่อการยอมรับในด้านสีของผู้ทดสอบซึ่งสัมพันธ์กับค่าสีที่ได้ จากการวัดทางกายภาพ ที่พบว่าการเติมวิตามินซีในปริมาณดังกล่าวให้ค่าสีของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 4.15 - 4.20) ทั้งนี้คะแนนทางประสาทสัมผัสที่ได้ก็มี แนวโน้มลดลงเมื่อเก็บรักษาน้ำเฝ้าเป็นเวลานานขึ้น เมื่อนำค่า a^* และค่า b^* ของตัวอย่างที่เวลา ต่างๆ ในระหว่างการเก็บรักษามาสร้างเป็นกราฟความสัมพันธ์ (รูปที่ 4.18) พบว่ากราฟที่ได้มีรูปแบบ คล้ายคลึงกันในทุกตัวอย่าง ซึ่งชี้ให้เห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของเฉดสีที่สัมพันธ์กับค่า h° ที่สูงขึ้น (ตารางที่ 4.19) และค่า C^* ที่ลดลง (ตารางที่ 4.20) เมื่อเก็บรักษาน้ำเฝ้าเป็นเวลานาน ขึ้น

ผลการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาของน้ำเฝ้าที่เติมวิตามินซีในระดับต่างๆ ระหว่างการ เก็บรักษาไม่พบจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และราตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 24 สัปดาห์ แสดงว่า น้ำเฝ้า ดังกล่าวยังไม่เกิดการเสื่อมเสียเนื่องจากจุลินทรีย์

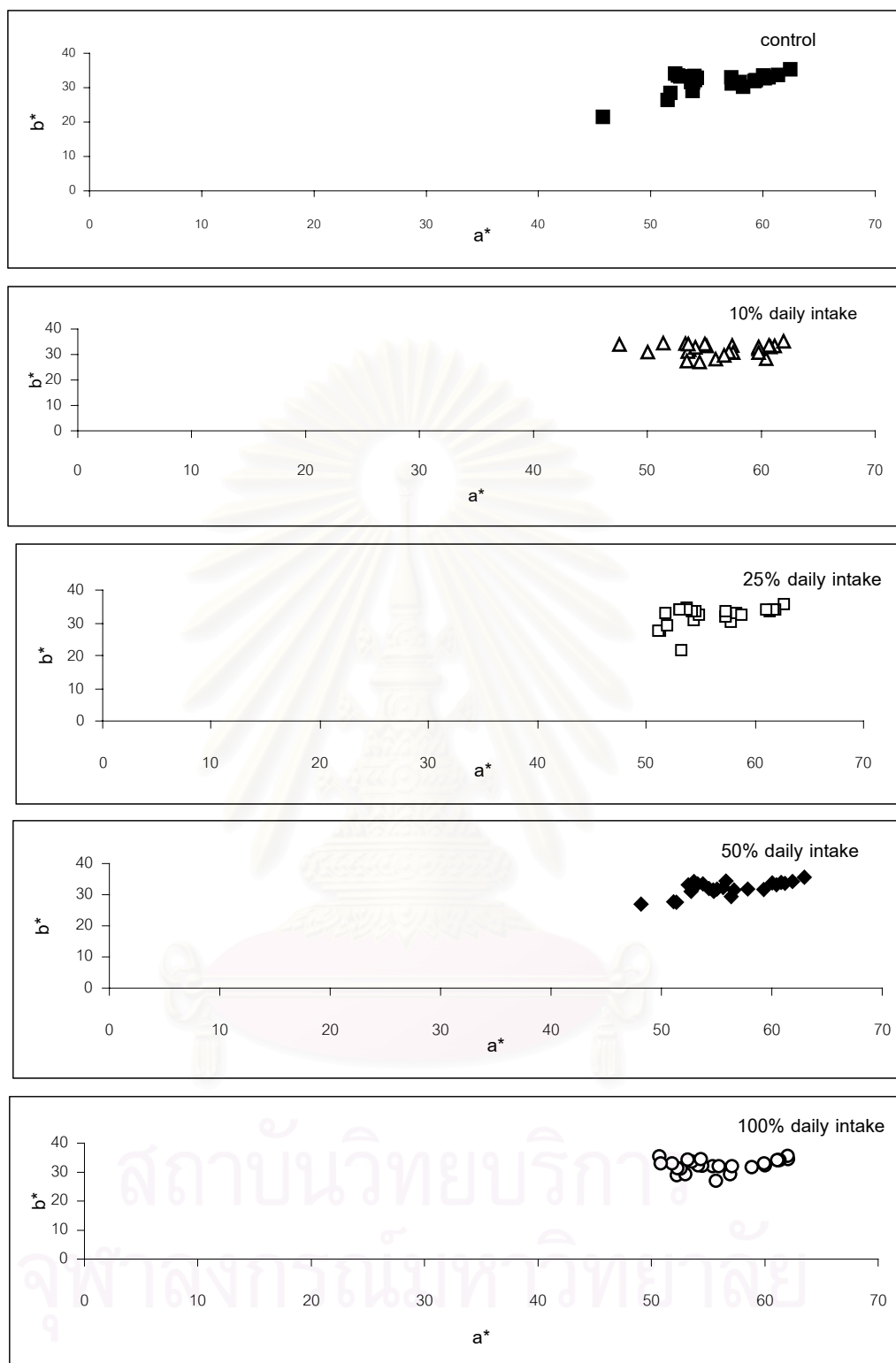
จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าสามารถเติมวิตามินซีเพื่อเป็นการเพิ่มคุณค่าทาง อาหารให้กับน้ำเฝ้าได้ถึง 100% ของปริมาณที่แนะนำให้บริโภคต่อวัน (31.58 mg/ 100 ml) โดย ปริมาณวิตามินซีที่เติมไม่มีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์แต่อย่างใด เมื่อเทียบกับ control แต่จะส่ง ผลให้ผลิตภัณฑ์มีวิตามินซีสำหรับผู้บริโภค

สถาบันนวัตกรรมการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.25 ระดับความพอใจต่อสีแดงและสีโดยรวมตัวของน้ำเฝ้าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา

ระยะ เวลา (เดือน)	ปริมาณวิตามินซีที่เติม (% daily intake)									
	0		10		25		50		100	
	สีแดง ^{ns}	สีโดยรวม ^{ns}	สีแดง ^{ns}	สีโดยรวม ^{ns}	สีแดง ^{ns}	สีโดยรวม ^{ns}	สีแดง ^{ns}	สีโดยรวม ^{ns}	สีแดง ^{ns}	สีโดยรวม ^{ns}
0	7.58±1.08	7.21±1.14	6.87±1.41	6.73±1.19	6.72±1.24	6.79±1.71	6.82±1.41	6.65±1.38	6.87±1.31	6.84±1.28
1	7.07±1.20	6.93±1.26	6.27±1.26	6.33±1.21	6.03±1.19	6.27±1.60	6.40±1.35	6.30±1.76	6.30±1.15	6.23±1.14
2	6.23±1.22	6.33±1.21	6.03±1.19	6.27±1.60	6.03±1.27	5.97±1.52	6.17±1.18	6.27±1.41	6.73±1.49	6.60±1.48
3	6.20±1.32	6.17±1.51	7.00±1.50	6.03±1.40	6.23±1.27	6.40±1.22	5.33±1.52	5.67±1.34	6.13±0.82	6.27±1.11
4	5.83±1.46	6.00±1.58	7.33±1.31	6.23±1.30	6.00±1.34	6.23±1.33	5.67±1.47	5.97±1.30	5.90±0.71	6.03±1.07
5	6.03±1.19	6.27±1.60	6.17±1.18	6.03±1.61	6.00±1.39	6.17±1.51	6.23±1.36	6.17±1.46	6.23±0.86	6.20±1.30
6	6.20±1.32	6.17±1.51	7.00±1.37	6.03±1.40	6.23±1.28	6.40±1.22	5.33±1.52	5.67±1.35	6.13±0.82	6.27±1.11

ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)



รูปที่ 4.17 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า a^* และ b^* ของน้ำเฝ้าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 น้ำคั้นที่ได้จากผลเม่ามี pH 3.5 ± 0.1 ของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 17.6 ± 0.3 °Brix แอนโทไซยานินทั้งหมด 17.62 ± 2.23 mg/100 ml สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 311 ± 0.36 mg/100 ml ตรวจพบ PPO ซึ่งมี activity $2,734 \pm 446$ units/mg protein และตรวจไม่พบวิตามินซี

5.1.2 crude PPO ในน้ำเม่ามี optimum pH ที่ 6.5 เสถียรภาพของเอนไซม์ต่ำเมื่อป่มที่ช่วง pH 3.0-9.0 อุณหภูมิ 0°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง optimum temperature ที่ 20°C และมีเสถียรภาพต่อความร้อนดีเมื่อป่มที่อุณหภูมิ $0-60^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 10 นาที โดยที่อุณหภูมิ 60°C ยังมี PPO activity เหลืออยู่ถึง $82.39 \pm 1.02\%$

5.1.3 การเติมวิตามินซีในระหว่างการคั้นน้ำเม่า พบว่าทุกสิ่งทดลองมี PPO activity แอนโทไซยานินทั้งหมด สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด กรดที่ไตเตรตได้ทั้งหมด และค่าสีไม่แตกต่างจากชุดการทดลองควบคุมซึ่งไม่มีการเติมวิตามินซีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่ PPO activity มีแนวโน้มลดลงเมื่อเติมวิตามินซีในปริมาณที่สูงขึ้น ขณะที่น้ำเม่าที่ได้จะมีวิตามินซีเพิ่มขึ้นเป็น 4.01 ± 0.8 , 6.08 ± 0.97 , 10.40 ± 1.03 และ 13.56 ± 1.93 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

5.1.4 อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อน้ำเม่า 25% คือ 85°C 10 นาที

5.1.5 การสลายตัวของแอนโทไซยานินในน้ำเม่า 25% (pH 3.1) ที่บรรจุในขวดแก้วใส ขนาด 300 ml ซึ่งมี headspace 10 ml แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เป็นเวลา 24 สัปดาห์ เป็นแบบ first order โดยมีค่าคงที่ของการสลายตัว (k) เท่ากับ 8.80×10^{-3} ต่อวัน ค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานินเท่ากับ 79 วัน ค่า ΔE^* และ ค่า ΔH^* ของน้ำเม่าเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษา แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสีเมื่อเทียบกับตัวอย่างเริ่มต้น รวมทั้งเกิดการเปลี่ยนแปลงของเจดสีในระหว่างการเก็บรักษาด้วย ทางด้านจุลชีววิทยาตรวจไม่พบจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และรา และตัวอย่างได้รับความชอบในด้านสีแดงและ สีโดยรวมอยู่ในช่วงชอบเล็กน้อยถึงชอบปานกลางตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา

5.1.6 การเติมวิตามินซีลงไปน้ำเม่า 25% ให้มีปริมาณคงเหลือหลังการพาสเจอร์ไรส์ 0, 10, 25, 50 และ 100% daily intake ต่อขวด (190 ml) แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าสามารถเติมวิตามินซีในน้ำเม่าได้ถึง 100% daily intake ต่อขวด โดยไม่มีผลต่อคุณภาพของน้ำเม่าในระหว่างการเก็บรักษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

การสลายตัวของแอนโทไซยานินในน้ำเฝ้าทุกตัวอย่างเป็นแบบ first order ซึ่งมีค่า k เท่ากับ 8.00×10^{-3} , 8.20×10^{-3} , 9.30×10^{-3} , 1.02×10^{-2} และ 1.09×10^{-2} ต่อวันตามลำดับ และมีค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานินเท่ากับ 86, 84, 74, 68 และ 63 วันตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการเติมวิตามินซีในปริมาณที่สูงขึ้นจะทำให้ค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานินในผลิตภัณฑ์ยิ่งลดลง ค่า ΔE^* และ ค่า ΔH^* ของน้ำเฝ้าเพิ่มขึ้นตลอดเวลาระหว่างการเก็บรักษา แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสีเมื่อเทียบกับตัวอย่างเริ่มต้น รวมทั้งเกิดการเปลี่ยนแปลงของเฉดสีในระหว่างการเก็บรักษาด้วย ทางด้านจุลชีววิทยาตรวจไม่พบจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และราตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา เมื่อน้ำเฝ้าดังกล่าวไปประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส พบว่าน้ำเฝ้าได้รับความชอบต่อสีแดงและสีโดยรวมอยู่ในช่วงชอบเล็กน้อยถึงชอบปานกลางตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาในทุกตัวอย่าง

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิเคราะห์คุณภาพของน้ำเฝ้าที่พบว่าน้ำเฝ้ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ถึง 331.00 ± 0.36 mg/100 ml จึงเป็นไปได้ว่าน้ำเฝ้าจะมีสารที่มีสมบัติเป็นแอนติออกซิแดนทอยู่สูง ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาคุณสมบัติการเป็นแอนติออกซิแดนทต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- นิภาภรณ์ ลักษณะสมยา. 2541. การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในอาหารบางชนิดโดยวิธี HPLC. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 3: 347-357.
- บุศรารัตน์ สายเชื้อ. 2545. แอนโทไซยานินจากกระเจี๊ยบแดง *Hibiscus sabdariffa* L. เพื่อใช้เป็นสีผสมอาหาร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปัญญาภัทร ธาระนิช. 2541. น้ำผลไม้: อุตสาหกรรมเกษตรที่ยังมีคู่แข่งทางสดใส [On line]. Available from: <http://www.tfb.co.th> [2001, June 23]
- วิทยาศาสตร์บริการ, กรม. 2539. รายงานผลการวิเคราะห์ทดสอบผลเม่า. กรุงเทพมหานคร: กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ. (เอกสารไม่ตีพิมพ์)
- อร่าม คุ่มกลาง และ วินัย แสงแก้ว. 2543. งานประดิษฐ์คิดค้นจากพืชตระกูลเม่า Stilaginaceae. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ครุสภาลาดพร้าว.

ภาษาอังกฤษ

- A.O.A.C. 1995. Official Methods of Analysis. 16th ed. Vol. 2. Washington: Association of Official Analytical Chemists.
- Bates, R. P.; Morris, J. R.; and Crandall, P. G. 1996. Principles and Practices of Small and Medium Scale Fruit Juice Processing [On line]. Available from: <http://www.fao.org/DOCREP/005/Y2515E/y2515e03.htm#PO0> [2002, July 23]
- Brouillard, R. 1982. Chemical structure of anthocyanins. In P. Markakis, ed., Anthocyanins as Food Colors. pp. 1-40. New York: Academic Press.
- Cash, J. N., Sistrunk, W. A., and Stutte, C. A. 1976. Characteristics of concord grape polyphenoloxidase involved in juice color loss. Journal of Food Science. 41: 1398-1402.
- Cemeroglu, B.; Velioglu, S.; and Isik, S. 1994. Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. Journal of Food Science. 59(6): 1216-1218.

- Choi, M. H., Kim, G. H. and Lee, H. S. 2002. Effect of ascorbic acid on color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. Food Research International. 35: 753-759.
- Cochran, W. C. and Cox, G. M. 1992. Experimental Design. New York: John Wiley & Son.
- Do, J. Y.; Potewiratananond, S.; Salunke, D. K.; and Rahman, A. R. 1976. Freez dehydrated compressed sour cherries, II Stability of anthocyanins during storage. Journal of Food Technology. 11: 256-272.
- Du, C. T. and Francis, F. J. 1973. Anthocyanins of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). Journal of Food Science. 38: 810-813.
- Duangmal, K. and Owusu-Apenten, R. K. 1999. A comparative study of polyphenoloxidase from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). Food Chemistry. 64: 351-359.
- Fennema, O. R. 1996. Food Chemistry. 3rd ed. New York: Marcel Dekker. Inc.
- Folin, O. and Ciocalteu, V. 1927. On tyrosine and tryptophane determination in protein. Journal of Biological Chemistry. 27: 2527-2532
- Francis, F. J. 1982. Analytical of anthocyanins. In P. Makakis, ed., Anthocyanins as Food Colors. pp. 182-208. New York: Academic Press.
- Francis, F. J. 1989. Food colorants : anthocyanins. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 28(4): 273-314.
- Freedman, L. and Francis, F. J. 1984. Effect of ascorbic acid on color of jellies. Journal of Food Science. 49(4): 1212-1213.
- Fuleki, T. and Francis, F. J. 1968a. Quantitative methods for anthocyanins.
1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. Journal of Food Science. 33: 72-77.
- Fuleki, T. and Francis, F. J. 1968b. Quantitative methods for anthocyanins.
2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. Journal of Food Science. 33: 78-83.
- Garcia-Viguera, C. and Bridle, P. 1999. Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavylum salts with ascorbic acid. Food Chemistry. 64: 21-26.

- Garzon, G. A. and Wrolstad, R. E. 2002. Comparison of the stability of pelargonidin-based anthocyanins in strawberry juice and concentrate. Journal of Food Science. 67: 1288-1299.
- Gregory, J. F. 1996. Vitamins. In O. R. Fennema, ed. Food Chemistry. 3rd ed. pp. 531-616. New York: Marcel Dekker.
- Hunt, R. W. G. 1998. Measuring colour. 3rd ed. London: Fountan Press.
- Iyengar, R. and McEvily, A. J. 1992. Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods. Trends in Food Science & Technology. 3: 60-64.
- Iversen, C. K. 1999. Black currant nectar: effect of processing and storage on anthocyanins and ascorbic acid content. Journal of Food Science. 64(1): 37-41.
- Kirca, A. and Cemeroglu, B. 2003. Degradation kinetics of anthocynins in blood orange juice and concentrate. Food Chemistry. 81: 583-587.
- Kotecha, P. M. and Madhavi, D. L. 1995. Berries. In D. K. Salunkhe and S.S. Kadam, eds., Handbook of Fruit Science and Technology. pp. 315 – 334. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Markakis, P. 1982. Stability of anthocyanins in foods. In P. Markakis, ed., Anthocyanins as Food Colors. pp. 163-180. New York: Academic Press
- Martinez, M. V. and Whitaker, J. R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. Trends in Food Science & Technology. 6: 195-199.
- Mazza, G. and Miniati, E. 1993. Anthocyanins in Fruit, Vegetables, and Grains. Florida: CRC Press.
- Peterson, G. L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. Analytical Biochemistry. 83: 346 – 356.
- Patil, V. K., Chakrawar, V. R., Nawadkar, P. R. and Shinde, G.S. 1995. Grape. In D. K. Salunkhe and S. S. Kadam, eds., Handbook of Fruit Science and Technology. pp. 39 – 66. New York: Marcel Dekker.
- Peng, S. and Jay-Allemand, C. 1991. Use of antioxidants in extraction of tannins from walnut plants. Journal of Chemical Ecology. 17: 887-896. Cited in Waterman, P. G. and Mole, S. 1994. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. London: Blackwell Science Publication.

- Riichiro, O.; Shinobu, K.; Seiichi, O.; and Seinosuke, U. 1995. Storage stability and thermal stability of hordeumin, an anthocyanin pigment from barley. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 59(4): 746-748.
- Roos, Y. H., 1995. Phase Transition in Foods. California: Academic Press.
- Scopes, R. K. 1994. Protein Purification Principles and Practice. 3rd ed. New York: Springer.
- Siddiq, M.; Arnold, J. F.; Sinha, N. K.; and Cash, J. N. 1994. Effect of polyphenol oxidase and its inhibitors on anthocyanin changes in plum juice. Journal of Food Processing and Preservative. 18(1): 75-84.
- Siddiq, M.; Sinha, N. K.; and Cash, J. N. 1992. Characterization of polyphenoloxidase from Stanley plums. Journal of Food Science. 57(5): 1177-1179.
- Skrede, G., Wrolstad, R. E., Lea, P. and Enersen, G. 1992. Color stability of strawberry and blackcurrant syrups. Journal of Food Science. 57(1): 172-177.
- Skrede, G., Wrolstad, R. E. and Durst, R. W. 2000. Changes in anthocyanins and polyphenolic during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). Journal of Food Science. 65(2): 357-364.
- Somers, T. C. 1971. The polymeric nature of wine pigments. Phytochemistry. 10: 2175-2186.
- Spayd, S. E.; Nagel, C. W.; Haysynen, C. D.; and Drake, S. R. 1984. Color stability of apple juice and pear juice blended with fruit juice containing anthocyanins. Journal of Food Science. 49: 411-416.
- Tulyathan, V.; Duangmal, K.; and Thunpittayakut, C. 1993. Anthocyanin extractive from blue pea flowers (*Clitoria ternatea* L.). Thailand Journal of Agricultural and Science. 26: 171-183.
- Von-Elbe, J. H. and Schwartz, S. J. 1996. Colorants. In O. R. Fennema, ed. Food Chemistry. 3rd ed. pp. 651-722. New York: Marcel Dekker.
- Waterman, P. G. and Mole, S. 1994. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. London: Blackwell Science Publication.
- Whitaker J. R. 1972. Principles of Enzymology for the Food Sciences. New York: Marcel Dekker.

- Whitaker J. R. 1996. Enzymes. In O. R. Fennema, ed. Food Chemistry. 3rd ed. pp. 431-530. New York: Marcel Dekker.
- Williams, S. R. 1988. Basic Nutrition and Diet Therapy. St. Luis: Times Mirror/Mosby College Publishing.
- Wrolstad, R. E. 2000. Anthocyanins. In G. L. Lauro and F. J. Francis (eds.), Natural Food Colorants Science and Technology. pp. 237-255. Chicago : IFC Basic Symposium Series.
- Yueming, J. 2000. Role of anthocyanins, polyphenol oxidase and phenols in lychee pericarp browning. Journal of the Science of Food and Agriculture. 80: 305-310.
- Zemel, G. P.; Sims, C. A.; Marshall, M. R.; and Balaban, M. 1990. Low pH inactivation of polyphenoloxidase in apple juice. Journal of Food Science. 55(2): 562-563.
- Zulin, S.; Lin, M.; and Francis, F. J. 1992. Stability of anthocyanins from *Tradescantia pallida*. Journal of Food Science. 57(3) : 758-760.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

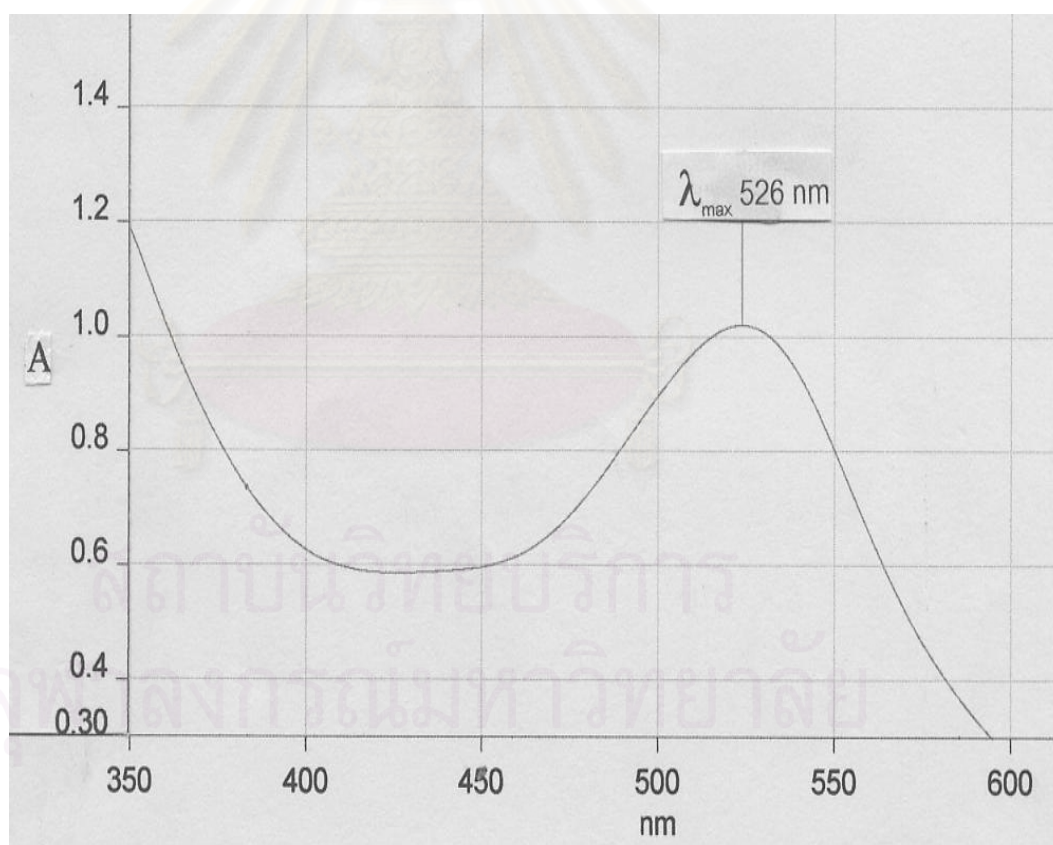
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.

ก 1. การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ดัดแปลงจากวิธีการของ Fuleki และ Francis (1968a)

นำคั้นจากผลเม่า 5 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ในขวดวัดปริมาตรโดยใช้น้ำกลั่น เพื่อให้ค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ที่วัดได้อยู่ในช่วง 0.3 - 0.8 เก็บไว้ในที่มืดนาน 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดสมดุลของโครงสร้าง (forms) ต่าง ๆ ของแอนโทไซยานิน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเครื่อง spectrophotometer

การหาความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดทำโดย นำน้ำเม่าเจือจางที่ผ่านการเก็บไว้ในที่มืด 2 ชั่วโมงมาแล้วข้างต้น มา scan ที่ความยาวคลื่น 350 – 700 นาโนเมตร ผลการทดลองพบว่าความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของน้ำเม่าคือ 526 นาโนเมตร (รูปภาคผนวก ก 1)



รูปภาคผนวก ก 1 Absorption spectrum ของแอนโทไซยานินในน้ำเม่า

คำนวณปริมาณแอนโทไซยานิน ในน้ำคั้นที่ได้จากผลเม่าตามสูตรที่ (1)

$$T_{Acy} = O.D. \times \frac{100}{SV} \times \frac{1}{E_{1cm}^{1\%}} \times 100 \quad (1)$$

โดยที่

T_{Acy} คือ ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (มิลลิกรัมแอนโทไซยานินต่อน้ำเม่า 100 มิลลิลิตร)

O.D. คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากสารละลายสกัดที่เจือจางแล้ว

SV คือ ปริมาตรของน้ำเม่าที่ใช้ก่อนปรับให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นหน่วยเป็น มิลลิลิตร

$E_{1cm}^{1\%}$ คือ ค่า Extinction coefficient ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ค่า $E_{1cm}^{1\%}$ ของผลแครนเบอร์รี่ซึ่งมีค่า

เท่ากับ

982 (Fuleki และ Francis, 1968a)

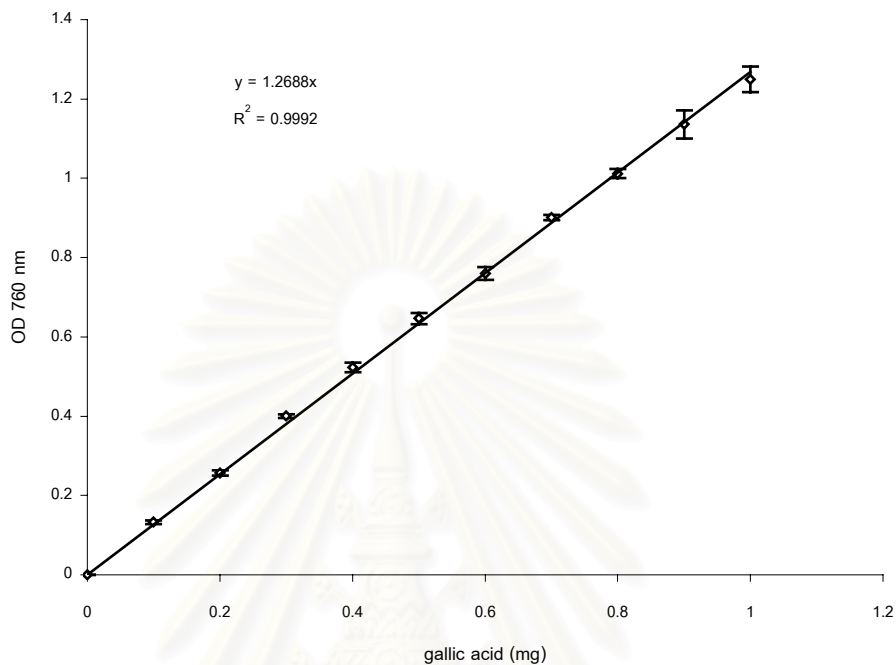
ก 2. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin–Ciocalteu (Folin และ Ciocalteu, 1927)

ใส่ตัวอย่างน้ำเม่า 0.1 ml ลงในขวดวัดปริมาตรที่มี deionized water อยู่ 60 – 75 ml แก้วขวดวัดปริมาตรเพื่อให้เกิดการผสมกัน เติม Folin–Ciocalteu reagent ลงไป 5 ml แก้วขวดวัดปริมาตรเพื่อผสมกันอีกครั้ง ภายใน 1 - 8 นาที เติมสารละลาย sodium carbonate ความเข้มข้น 20% w/v ลงไป 15 ml ผสมให้เข้ากันก่อนปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วย deionized water ผสมอีกครั้งก่อนเก็บไว้ 2 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดสี (เริ่มต้นจับเวลาทันทีที่เติมสารละลาย sodium carbonate) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ โดยใช้กราฟมาตรฐานที่เตรียมจาก gallic acid ซึ่งทราบความเข้มข้นที่แน่นอน (รูปภาคผนวก ก 2)

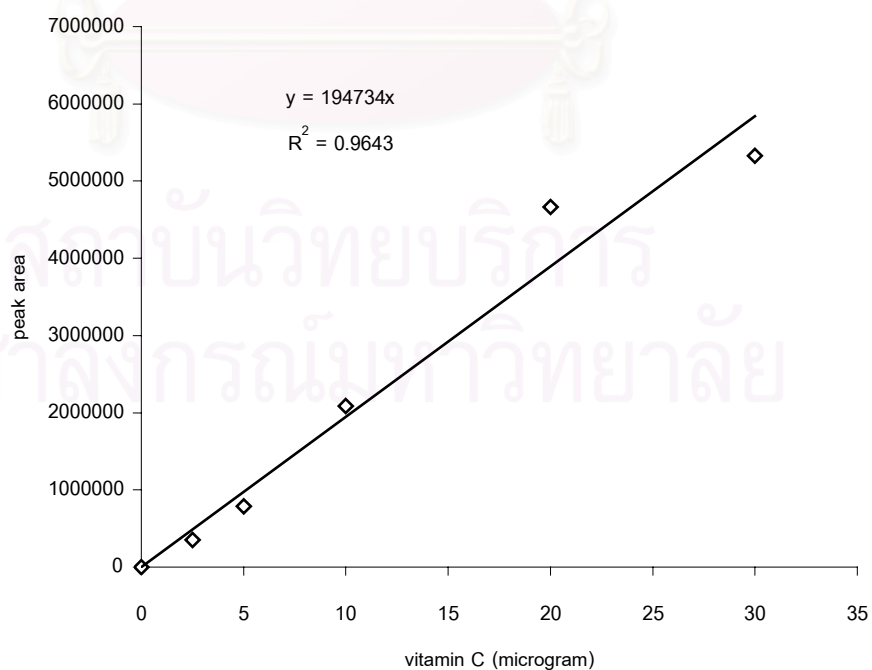
ก 3. การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีการของ นิภาภรณ์ ลักษณะสมยา (2541)

ตัวอย่างน้ำเม่า 5 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วยสารละลาย 3% *m*-phosphoric acid ในขวดวัดปริมาตร กรองสารละลายตัวอย่างเจือจางที่ได้ด้วย membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ column 5 μ m Lichrocard Lichrospher 100 RP18 (Merck) ขนาด 125 x 4 มิลลิเมตร ที่มี potassium hydrogen phatate ความเข้มข้น 0.3 mM ในสารละลาย *o*-phosphoric acid ความเข้มข้น 0.35 v/v เป็น mobile phase อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น

248 นาโนเมตร นำพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ที่ได้มาคำนวณปริมาณวิตามินซี โดยใช้กราฟมาตรฐานที่เตรียมจากสารละลายวิตามินซีที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (รูปภาคผนวก ก 3)



รูปภาคผนวก ก 2 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด



รูปภาคผนวก ก 3 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี

ก 4. การเตรียม crude enzyme

นำส่วนไซที่ได้จากการสกัดน้ำเอนไซม์โดยใช้ผลเอนไซม์ 100 กรัม มาตกตะกอนโปรตีนด้วย ammonium sulphate ที่ 80% saturation (ใช้ ammonium sulphate 516 กรัมต่อน้ำเอนไซม์ 1 ลิตร) (Scopes, 1994) ที่อุณหภูมิ 0°C นำไปปั่นเหวี่ยงใน refrigerated centrifuge (อุณหภูมิ 4°C) ความเร็ว 10,000 x *g* เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอน (pellet) ที่ได้มาละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 M pH 7.0 จำนวน 2 มิลลิลิตร เก็บ crude enzyme ที่อุณหภูมิ 0°C ก่อนนำไปวิเคราะห์ PPO activity ต่อไป

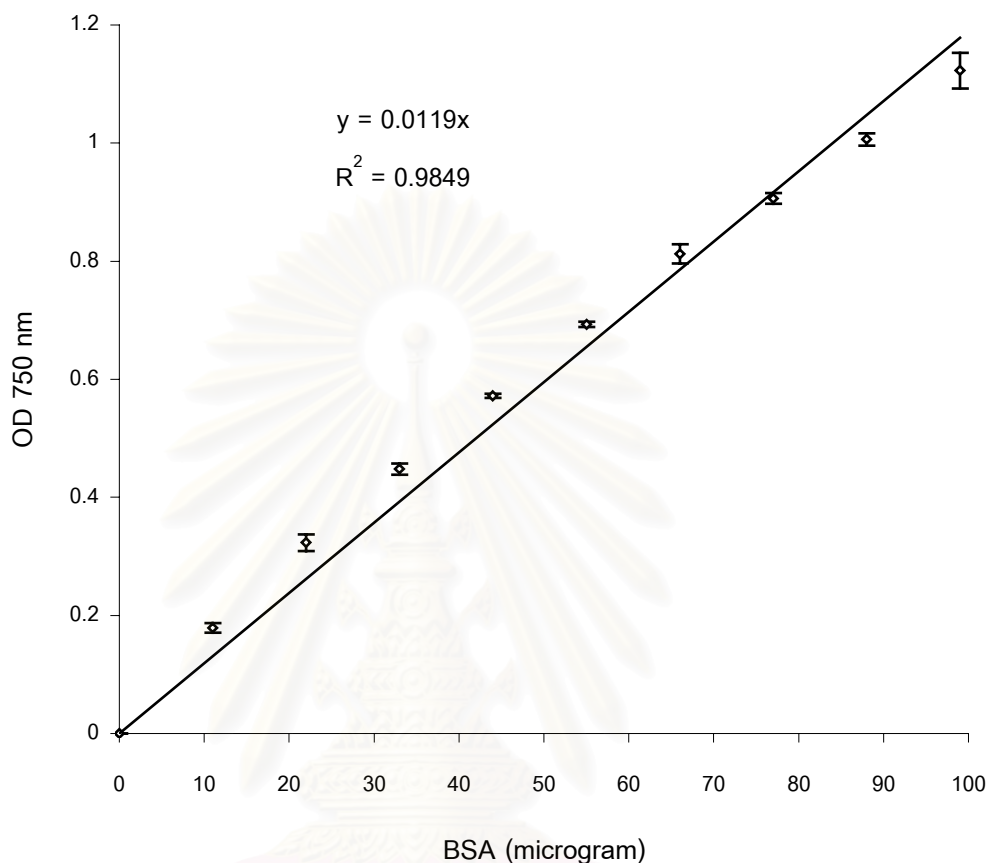
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 7.0 สำหรับละลายตะกอนโปรตีนในการเตรียม crude enzyme เตรียมจากละลาย potassium dihydrogen phosphate ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และสารละลาย dipotassium hydrogen phosphate ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปรับให้มี pH เท่ากับ 7.0

ก 5. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี modified Lowry (Peterson, 1977)

เตรียมสารละลาย reagent A ด้วยการผสมสารละลาย copper tartrate carbonate (CTC) (เตรียมโดยค่อย ๆ เติมสารละลาย sodium carbonate ความเข้มข้น 20% w/v ลงในสารละลาย copper sulphate-tartrate ขณะที่คนตลอดเวลา ให้สารละลายสุดท้ายที่ได้มี copper sulphate pentahydrate ความเข้มข้น 0.1% w/v potassium tartrate ความเข้มข้น 0.2% w/v และ sodium carbonate ความเข้มข้น 10% w/v), sodium dodecyl sulphate (ความเข้มข้น 10% w/v), sodium hydroxide (ความเข้มข้น 0.8 N) และน้ำกลั่นในปริมาตรที่ เท่ากัน จากนั้นเตรียมสารละลาย reagent B โดยการเจือจางสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent (ความเข้มข้น 2.0 N) ด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1 ต่อ 5

เปิด crude enzyme จำนวน 50 μ l ใส่ลงใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ml ด้วยน้ำกลั่น เติมสารละลาย sodium deoxycholate (DOC) ความเข้มข้น 0.15% w/v จำนวน 100 μ l ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer ทิ้งไว้ 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย trichloroacetic acid 72% w/v จำนวน 100 μ l ผสมให้เข้ากันอีกครั้งก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 x *g* เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใส (supernatant) ที่เติมสารละลาย reagent A 1 ml ลงใน Eppendorf tube ที่มีตะกอนโปรตีนอยู่ ผสมให้เข้ากันก่อนทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย reagent B จำนวน 0.5 ml ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง ก่อนทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้เกิดสี นำสารละลายที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร คำนวณปริมาณโปรตีนโดยใช้กราฟมาตรฐานที่

เตรียมได้จากสารละลาย bovin serum albumin (BSA) ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (รูปภาคผนวก ก 4)



รูปภาคผนวก ก 4 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ก 6. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ (ช่วง pH 3.0 – 9.0) สำหรับการศึกษ optimum pH และ pH stability ของ crude PPO ในน้ำเม่า

6.1 สารละลายบัฟเฟอร์ช่วง pH 3.0 – 6.5

ใช้สารละลาย citric acid – Na_2HPO_4 buffer ที่เตรียมจากสารละลาย citric acid ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และสารละลาย disodium hydrogen phosphate ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปรับให้มี pH ตามต้องการ

6.2 สารละลายบัฟเฟอร์ช่วง pH 6.5 – 8.0

ใช้สารละลาย phosphate buffer ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ที่เตรียมจากสารละลาย disodium hydrogen phosphate ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และสารละลาย sodium dihydrogen phosphate ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปรับให้มี pH ตามต้องการ

6.3 สารละลายบัฟเฟอร์ช่วง pH 8.0 – 9.0

ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Clark และ Lubs solution pH 8.0 – 10.2 ความเข้มข้น 0.1 M ที่เตรียมจากสารละลายผสมระหว่าง potassium chloride และ boric acid ความเข้มข้น 0.1 M และสารละลาย sodium hydroxide ความเข้มข้น 0.1 M ปรับให้มี pH ตามต้องการ

ก 7. การคำนวณค่าของการเปลี่ยนแปลงสี ค่า Hue angle ค่า Chroma และ ค่า Hue difference ตามวิธีการของ Hunt (1998)

7.1 คำนวณค่าการเปลี่ยนแปลงสีตามสูตรที่ (2)

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (2)$$

โดยที่

ΔL^* = ค่า L^* ของน้ำเม่า 25% หลังการพาสเจอร์ไรส์ - ค่า L^* ของน้ำเม่า 25% ก่อนการพาสเจอร์ไรส์

Δa^* = ค่า a^* ของน้ำเม่า 25% หลังการพาสเจอร์ไรส์ - ค่า a^* ของน้ำเม่า 25% ก่อนการพาสเจอร์ไรส์

Δb^* = ค่า b^* ของน้ำเม่า 25% หลังการพาสเจอร์ไรส์ - ค่า b^* ของน้ำเม่า 25% ก่อนการพาสเจอร์ไรส์

7.2 คำนวณค่า Hue angle ตามสูตรที่ (3)

$$h^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*) \quad (3)$$

7.3 คำนวณค่า Chroma ตามสูตรที่ (4)

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad (4)$$

7.4 คำนวณค่า Hue difference ตามสูตรที่ 5

$$\Delta H^* = [(\Delta E^*)^2 - (\Delta L^*)^2 - (\Delta C^*)^2]^{1/2} \quad (5)$$

ก 8. การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดด้วยวิธี pH differential (Fuleki และ Francis, 1968b)

เตรียมสารละลายน้ำเม่าเจือจางที่มีน้ำเม่า 5 มิลลิลิตรรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 เก็บไว้ในที่มืด 2 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสง

สูงสุดด้วยเครื่อง spectrophotometer สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและ pH ที่ใช้ (รูปภาคผนวก ก 5) เลือก pH ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดและต่ำที่สุด (ในการทดลองนี้เลือกใช้ค่า pH 1.0 และ 4.5) เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด คำนวณปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดตามสูตรที่ (6)

$$T_{Acy} = \frac{\Delta O.D. \times 10}{Avg.E_{cm}^{1\%}} \times 100 \quad (6)$$

โดยที่

T_{Acy} = ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในน้ำเม่า (มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)

$\Delta O.D.$ = $T_{O.D.}(pH \text{ ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด}) - T_{O.D.}(pH \text{ ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำสุด})$

$T_{O.D.}$ = $O.D. \times (100 / SV)$

SV คือ ปริมาตรน้ำเม่าที่ใช้ก่อนปรับให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (มิลลิลิตร)

$Avg.E_{cm}^{1\%}$ คือ ค่าเฉลี่ยของค่า Extinction coefficient ของแอนโทไซยานิน ซึ่งการทดลอง

นี้ใช้ค่า $Avg.E_{cm}^{1\%}$ ของผลแคเรนเบอร์รี่ที่มีค่าเท่ากับ 982 (Fuleki และ

Francis, 1968a)

สารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0, 1.5 และ 2.0 ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Clark และ Lubs (pH 1.0-2.2) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ซึ่งเตรียมจากสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปรับให้มี pH ตามต้องการ

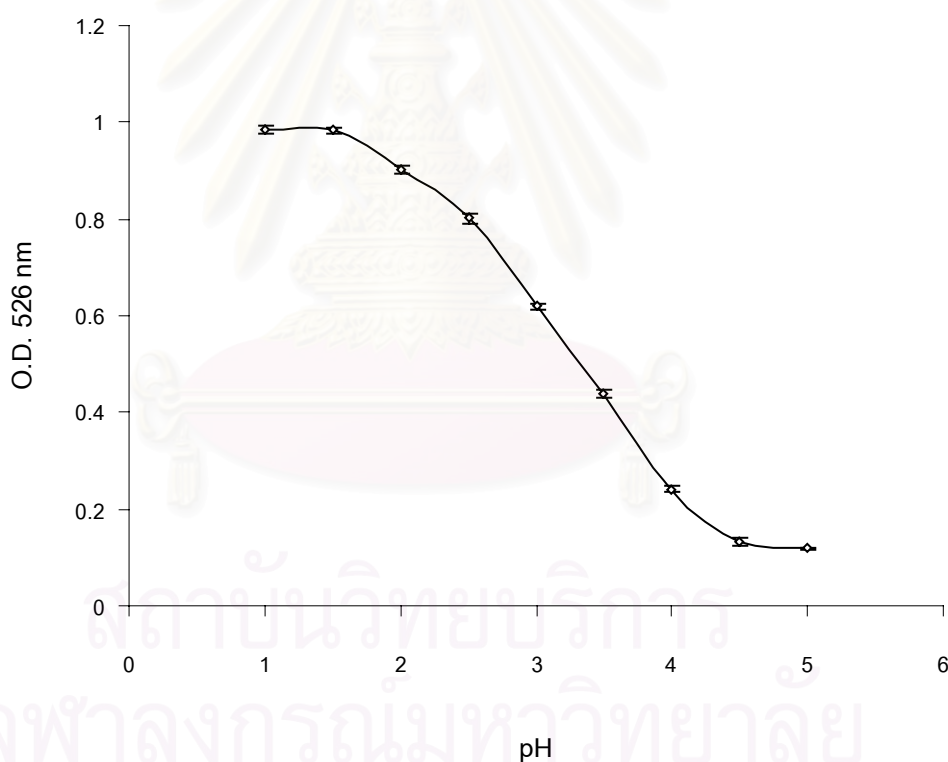
สารละลายบัฟเฟอร์ pH 2.5, 3.0 และ 3.5 ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Clark และ Lubs (pH 2.2-4.0) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ซึ่งเตรียมจากสารละลาย potassium hydrogen phthalate ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปรับให้มี pH ตามต้องการ

สารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.0, 4.5 และ 5.0 ใช้สารละลาย acetic acid-sodium acetate buffer ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ซึ่งเตรียมจากสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และสารละลายโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปรับให้มี pH ตามต้องการ

ก 9. การวิเคราะห์ดัชนีการสลายตัวของแอนโทไซยานินตามวิธีการของ Fuleki และ Francis (1986b) และ Chulkyoon และ Hettiarachchy (1991)

น้ำเฝ้า 25% 5 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH ตามที่เลือกไว้ในข้อ ก 8 เก็บไว้ในที่มืด 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเครื่อง spectrophotometer คำนวณปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดด้วยวิธี single pH ตามสูตรที่ (1) โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายน้ำเฝ้าเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด คำนวณปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดด้วยวิธี pH differential ตามสูตรที่ (6) คำนวณดัชนีการสลายตัวของแอนโทไซยานินตามสูตรที่ (7)

$$\text{Degradation Index} = \frac{\text{TAcy by the single pH method}}{\text{TAcy by the pH differential method}} \quad (7)$$



รูปภาคผนวก ก 5 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำเฝ้า 25% ที่ความยาวคลื่น 526 nm

ในช่วง pH 1.0 – 5.0

ก 10. การวิเคราะห์ความเข้มสีทั้งหมดตามวิธีการของ Somers (1971) และ Spayd และคณะ (1984)

เจือจางน้ำเม่า 25% ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 5 เก็บไว้ในที่มีด 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420, 520 และ 700 นาโนเมตร คำนวณความเข้มสีทั้งหมดตามสูตรที่ (8)

$$\text{Total Color Density (O.D. units)} = [(O.D._{420} + O.D._{520}) - 2(O.D._{700})] \quad (8)$$

ก 11. การวิเคราะห์ปริมาณสีพอลิเมอร์ตามวิธีการของ Somers (1971) และ Spayd และคณะ (1984)

นำน้ำเม่า 25% มาทำปฏิกิริยากับสารละลายโปตัสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 20% w/v ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420, 520 และ 700 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสีพอลิเมอร์ ตามสูตรที่ (9)

$$\text{Polymeric Color (O.D. units)} = [(O.D._{420} + O.D._{520}) - 2(O.D._{700})] \quad (9)$$

ก 12. การวิเคราะห์ค่าคงที่ของการสลายตัวของแอนโทไซยานิน ตามวิธีการของ Roos (1995) คำนวณหาค่าคงที่ของการสลายตัวของแอนโทไซยานิน ตามสูตรที่ (10)

$$\ln (TAc_y / TAc_0) = -kt \quad (10)$$

โดยที่

TAc_0 คือ ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในน้ำเม่า 25% ก่อนการเก็บรักษา

TAc_y คือ ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในน้ำเม่า 25% หลังการเก็บรักษาไว้

เป็นเวลา t ที่อุณหภูมิห้อง

k คือ ค่าคงที่ของการสลายตัวของแอนโทไซยานิน (ต่อหน่วยเวลา)

ก 13. การวิเคราะห์ค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานิน ตามวิธีการของ Roos (1995)

นำค่า k ที่ได้จากข้อ ก 12 มาคำนวณค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานินตามสูตรที่ (11)

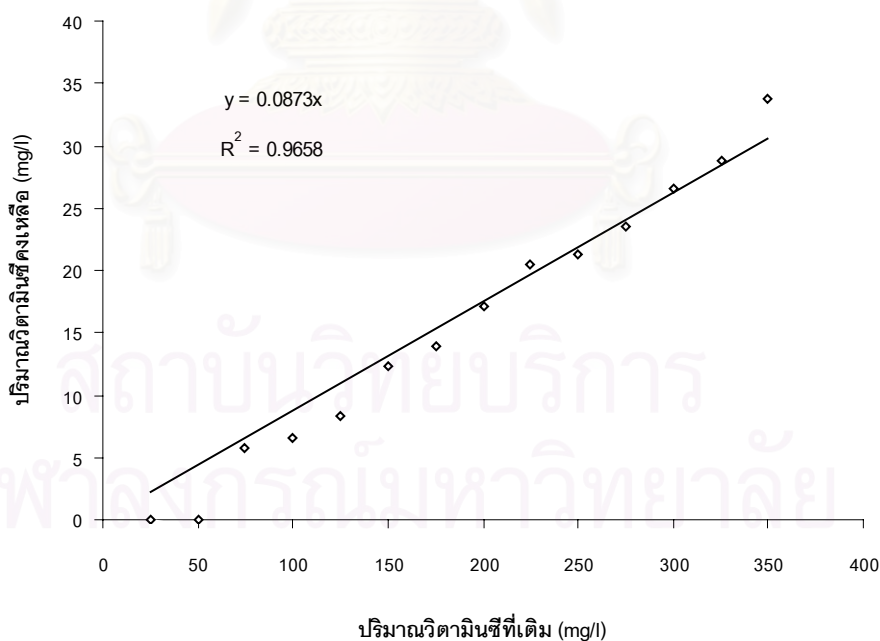
$$t_{1/2} = \ln 0.5 / k \quad (11)$$

โดยที่

$t_{1/2}$ คือ ค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานิน (หน่วยเวลา)

ก 14. การหาปริมาณวิตามินซีที่ต้องเติมในน้ำเฝ้า 25% หลังการพาสเจอร์ไรส์ เพื่อให้มีปริมาณวิตามินซีคงเหลือในน้ำเฝ้าตามที่ต้องการ

เตรียมน้ำเฝ้า 25% พาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส 10 นาที เติมวิตามินซีในปริมาณ 0 – 350 mg/l ทันทีหลังการพาสเจอร์ไรส์ ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีคงเหลือตามวิธีการในข้อ ก 3 คำนวณปริมาณวิตามินซีที่ต้องเติม จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณวิตามินซีที่เติม และปริมาณวิตามินซีคงเหลือ (รูปภาคผนวก ก 6)



รูปภาคผนวก ก 6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณวิตามินซีที่เติม และปริมาณวิตามินซีคงเหลือหลังการพาสเจอร์ไรส์ในน้ำเฝ้า 25%

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวก ข 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของการเติมวิตามินซีเพื่อยับยั้ง PPO activity ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในน้ำเฝ้า

Source of variance	df	MS
ปริมาณวิตามินซีที่เติม	4	1.89×10^{-2}
Error	10	4.23×10^{-2}

ตารางภาคผนวก ข 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของการเติมวิตามินซีเพื่อยับยั้ง PPO activity ต่อปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ทั้งหมดในน้ำเฝ้า

Source of variance	df	MS
ปริมาณวิตามินซีที่เติม	4	2.18×10^{-3}
Error	10	2.61×10^{-3}

ตารางภาคผนวก ข 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของการเติมวิตามินซีเพื่อยับยั้ง PPO activity ต่อปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในน้ำเฝ้า

Source of variance	df	MS
ปริมาณวิตามินซีที่เติม	4	2.59
Error	10	1.97

ตารางภาคผนวก ข 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของการเติมวิตามินซีเพื่อยับยั้ง PPO activity ต่อ PPO activity ในน้ำเฝ้า

Source of variance	df	MS
ปริมาณวิตามินซีที่เติม	4	183,614.08
Error	10	72,958.04

ตารางภาคผนวก ข 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของการเติมวิตามินซีเพื่อยับยั้ง PPO activity ต่อปริมาณวิตามินซีคงเหลือในน้ำเฝ้า

Source of variance	df	MS
ปริมาณวิตามินซีที่เติม	4	79.09
Error	10	1.30

ตารางภาคผนวก ข 6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของการเติมวิตามินซีเพื่อยับยั้ง PPO activity ต่อค่า L^* ในน้ำเฝ้า

Source of variance	df	MS
ปริมาณวิตามินซีที่เติม	4	9.21×10^{-2}
Error	10	7.74×10^{-2}

ตารางภาคผนวก ข 7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของการเติมวิตามินซีเพื่อยับยั้ง PPO activity ต่อค่า a^* ในน้ำเฝ้า

Source of variance	df	MS
ปริมาณวิตามินซีที่เติม	4	8.46
Error	10	7.92

ตารางภาคผนวก ข 8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของการเติมวิตามินซีเพื่อยับยั้ง PPO activity ต่อค่า b^* ในน้ำเฝ้า

Source of variance	df	MS
ปริมาณวิตามินซีที่เติม	4	7.53×10^{-2}
Error	10	5.91×10^{-2}

ตารางภาคผนวก ข 9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดของน้ำเฝ้า 25%

Source of variance	df	MS
อุณหภูมิ	2	1.32
เวลา	2	0.72
อุณหภูมิ x เวลา	4	0.72
Error	18	0.44

ตารางภาคผนวก ข 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ ปริมาณยีสต์ และราของน้ำเฝ้า 25%

Source of variance	df	MS
อุณหภูมิ	2	0.00
เวลา	2	0.00
อุณหภูมิ x เวลา	4	0.00
Error	18	0.00

ตารางภาคผนวก ข 11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ PPO activity ของน้ำเฝ้า 25%

Source of variance	df	MS
อุณหภูมิ	2	1,333.10
เวลา	2	742.72
อุณหภูมิ x เวลา	4	742.72
Error	18	7.92

ตารางภาคผนวก ข 12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ ปริมาณแอนติไธยานินทั้งหมดของน้ำเฝ้า 25%

Source of variance	df	MS
อุณหภูมิ	2	190.19
เวลา	2	11.12
อุณหภูมิ x เวลา	4	1.37
Error	18	6.74

ตารางภาคผนวก ข 13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ ค่า DI ของน้ำเฝ้า 25%

Source of variance	df	MS
อุณหภูมิ	2	9.96×10^{-3}
เวลา	2	1.49×10^{-3}
อุณหภูมิ x เวลา	4	4.59×10^{-4}
Error	18	2.92×10^{-3}

ตารางภาคผนวก ข 14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ
ค่า TCD ของน้ำเฝ้า 25%

Source of variance	df	MS
อุณหภูมิ	2	2.02×10^{-3}
เวลา	2	1.26×10^{-3}
อุณหภูมิ x เวลา	4	6.96×10^{-5}
Error	18	1.47×10^{-3}

ตารางภาคผนวก ข 15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ
ค่า PC ของน้ำเฝ้า 25%

Source of variance	df	MS
อุณหภูมิ	2	4.68×10^{-3}
เวลา	2	1.21×10^{-3}
อุณหภูมิ x เวลา	4	4.59×10^{-4}
Error	18	6.45×10^{-5}

ตารางภาคผนวก ข 16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ
ค่า L* ของน้ำเฝ้า 25%

Source of variance	df	MS
อุณหภูมิ	2	10.44
เวลา	2	2.43
อุณหภูมิ x เวลา	4	0.18
Error	18	0.87

ตารางภาคผนวก ข 17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ
ค่า a* ของน้ำเฝ้า 25%

Source of variance	df	MS
อุณหภูมิ	2	9.07
เวลา	2	1.05
อุณหภูมิ x เวลา	4	7.59×10^{-2}
Error	18	5.76

ตารางภาคผนวก ข 18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ
ค่า b^* ของน้ำเฝ้า 25%

Source of variance	df	MS
อุณหภูมิ	2	28.10
เวลา	2	7.00
อุณหภูมิ x เวลา	4	0.43
Error	18	3.07

ตารางภาคผนวก ข 19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ
ค่า h^o ของน้ำเฝ้า 25%

Source of variance	df	MS
อุณหภูมิ	2	8.53
เวลา	2	2.78
อุณหภูมิ x เวลา	4	0.26
Error	18	1.50

ตารางภาคผนวก ข 20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อต่อ
ค่า C^* ของน้ำเฝ้า 25%

Source of variance	df	MS
อุณหภูมิ	2	24.70
เวลา	2	4.15
อุณหภูมิ x เวลา	4	0.19
Error	18	6.76

ตารางภาคผนวก ข 21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือในน้ำเฝ้าที่
บรรจุในขวดแก้วใสระหว่างการเก็บรักษา

Source of variance	df	MS
เวลา	24	1,655.17
Error	50	192.82

ตารางภาคผนวก ข 22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า DI ในน้ำเฝ้าที่บรรจุในขวดแก้วใส
ระหว่างการเก็บรักษา

Source of variance	df	MS
เวลา	24	2.83
Error	50	0.19

ตารางภาคผนวก ข 23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า TCD ในน้ำเฝ้าที่บรรจุในขวดแก้วใส
ระหว่างการเก็บรักษา

Source of variance	df	MS
เวลา	24	0.39
Error	50	0.38

ตารางภาคผนวก ข 24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า PC ในน้ำเฝ้าที่บรรจุในขวดแก้วใส
ระหว่างการเก็บรักษา

Source of variance	df	MS
เวลา	24	2.62
Error	50	0.20

ตารางภาคผนวก ข 25 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า L* ในน้ำเฝ้าที่บรรจุในขวดแก้วใส
ระหว่างการเก็บรักษา

Source of variance	df	MS
เวลา	24	10.35
Error	50	9.96

ตารางภาคผนวก ข 26 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า a* ในน้ำเฝ้าที่บรรจุในขวดแก้วใส
ระหว่างการเก็บรักษา

Source of variance	df	MS
เวลา	24	38.97
Error	50	3.48

ตารางภาคผนวก ข 27 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า b^* ในน้ำเฝ้าที่บรรจุในขวดแก้วใส
ระหว่างการเก็บรักษา

Source of variance	df	MS
เวลา	24	15.27
Error	50	5.93

ตารางภาคผนวก ข 28 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า h° ในน้ำเฝ้าที่บรรจุในขวดแก้วใส
ระหว่างการเก็บรักษา

Source of variance	df	MS
เวลา	24	5.68
Error	50	2.06

ตารางภาคผนวก ข 29 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า C^* ในน้ำเฝ้าที่บรรจุในขวดแก้วใส
ระหว่างการเก็บรักษา

Source of variance	df	MS
เวลา	24	35.43
Error	50	0.59

ตารางภาคผนวก ข 30 การวิเคราะห์ความแปรปรวนคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านสีแดง
ของน้ำเฝ้าที่บรรจุในขวดแก้วใสระหว่างการเก็บรักษา

Source of variance	df	MS
ผู้ทดสอบ	29	1.82
เดือน	6	5.36
Error	174	4.05

ตารางภาคผนวก ข 31 การวิเคราะห์ความแปรปรวนคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้าน
สีโดยรวมของน้ำเฝ้าที่บรรจุในขวดแก้วใสระหว่างการเก็บรักษา

Source of variance	df	MS
ผู้ทดสอบ	29	1.97
เดือน	6	1.71
Error	174	2.03

ตารางภาคผนวก ข 32 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณวิตามินซีคงเหลือในน้ำแม่ที่เติม
วิตามินซี 10% daily intake ระหว่างการเก็บรักษา

Source of variance	df	MS
เวลา	8	3.57
Error	18	3.13×10^{-3}

ตารางภาคผนวก ข 33 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณวิตามินซีคงเหลือในน้ำแม่ที่เติม
วิตามินซี 25% daily intake ระหว่างการเก็บรักษา

Source of variance	df	MS
เวลา	8	20.91
Error	18	8.99×10^{-2}

ตารางภาคผนวก ข 34 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณวิตามินซีคงเหลือในน้ำแม่ที่เติม
วิตามินซี 50% daily intake ระหว่างการเก็บรักษา

Source of variance	df	MS
เวลา	8	65.55
Error	18	0.29

ตารางภาคผนวก ข 35 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณวิตามินซีคงเหลือในน้ำแม่ที่เติม
วิตามินซี 100% daily intake ระหว่างการเก็บรักษา

Source of variance	df	MS
เวลา	8	71.59
Error	18	1.07

ตารางภาคผนวก ข 36 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณออกซิเจนในน้ำแม่ที่ไม่เติม
วิตามินซี (control) ระหว่างการเก็บรักษา

Source of variance	df	MS
เวลา	8	1.76
Error	18	0.16

ตารางภาคผนวก ข 37 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณออกซิเจนในน้ำแม่ที่เติม
วิตามินซี 10% daily intake ระหว่างการเก็บรักษา

Source of variance	df	MS
เวลา	8	1.84
Error	18	7.89×10^{-2}

ตารางภาคผนวก ข 38 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณออกซิเจนในน้ำแม่ที่เติม
วิตามินซี 25% daily intake ระหว่างการเก็บรักษา

Source of variance	df	MS
เวลา	8	1.80
Error	18	5.11×10^{-2}

ตารางภาคผนวก ข 39 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณออกซิเจนในน้ำแม่ที่เติม
วิตามินซี 50% daily intake ระหว่างการเก็บรักษา

Source of variance	df	MS
เวลา	8	1.86
Error	18	3.42×10^{-2}

ตารางภาคผนวก ข 40 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณออกซิเจนในน้ำแม่ที่เติม
วิตามินซี 100% daily intake ระหว่างการเก็บรักษา

Source of variance	df	MS
เวลา	8	1.29
Error	18	5.19×10^{-2}

ตารางภาคผนวก ข 41 การวิเคราะห์ความแปรปรวนคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านสีแดง
ของน้ำแม่ที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา

Source of variance	df	MS
ผู้ทดสอบ	29	12.37
เดือน	6	1.97
ปริมาณวิตามินซีที่เติม	4	15.03
เดือน x ปริมาณวิตามินซีที่เติม	24	5.96
Error	986	7.21

ตารางภาคผนวก ข 42 การวิเคราะห์ความแปรปรวนคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้าน
สีโดยรวมของน้ำเฝ้าที่เติมวิตามินซีระหว่างการเก็บรักษา

Source of variance	df	MS
ผู้ทดสอบ	29	6.13
เดือน	6	2.95
ปริมาณวิตามินซีที่เติม	4	2.81
เดือน x ปริมาณวิตามินซีที่เติม	20	1.54
Error	986	1.72



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

ชื่อผู้ทดสอบ _____ วันที่ _____

คำชี้แจง กรุณาประเมินคุณภาพทางด้านสีของตัวอย่างน้ำผลไม้ (น้ำเม่า) ต่อไปนี้ โดยระบุความชอบของท่านที่มีต่อสีแดงและลักษณะของสีโดยรวม โดยใช้เกณฑ์การให้คะแนนดังนี้

- 9 = ชอบมากที่สุด
 8 = ชอบมาก
 7 = ชอบปานกลาง
 6 = ชอบเล็กน้อย
 5 = รู้สึกเฉยๆ
 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย
 3 = ไม่ชอบปานกลาง
 2 = ไม่ชอบมาก
 1 = ไม่ชอบมากที่สุด

ตัวอย่าง	สีแดง	ลักษณะของสีโดยรวม

ข้อเสนอแนะ

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายเสกสรร วงศ์ศิริ เกิดวันที่ 28 กันยายน 2516 ที่จังหวัดลำพูน สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเกษตรศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตลำปาง เมื่อปีการศึกษา 2538 และเข้ารับราชการในสังกัดสถาบันวิจัยและพัฒนาการเกษตรสกลนคร ในปีเดียวกัน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย