บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

วิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experimental research) เพื่อศึกษากรรมวิธีการผลิตสีปรุงแต่งอาหารจากรำข้าวเหนียวดำซึ่งมีฤทธิ์ในการเสริมสุขภาพ โดยศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของรำข้าวเหนียวดำที่นำมาทำการวิจัย ได้แก่ ปริมาณความชื้นและของแข็งรวม เถ้า ปริมาณโปรตีน ไขมัน เส้นใยอาหารดิบ และคาร์โบไฮเดรต และการศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ชีวภาพของรำข้าวเหนียวดำ ได้แก่ แกมมาออริซานอล แอลฟาโทโคเฟอรอล สารประกอบฟีนอล และแอนโธไซยานิน แล้วศึกษากรรมวิธีการผลิตสีปรุงแต่งอาหารจากรำข้าวเหนียวดำต่อคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสีปรุงแต่งอาหารเพื่อคัดเลือกไปศึกษาความคงตัวต่อการเก็บรักษา ได้แก่ ร้อยละผลผลิตของสารสกัด ค่าสี (ความสว่าง ความเข้มสีและค่ามุมของสี)ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ ความสามารถในการละลาย และปริมาณแอนโธไซยานิน รวมถึงศึกษาความคงตัวของสีปรุงแต่งอาหารจากกรรมวิธีต่าง ๆ (ที่ได้คัดเลือกมา) ในระหว่างการเก็บรักษาได้แก่ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (แอลฟาโทโคเฟอรอล แกมมาออริซานอล สารประกอบฟีนอล และแอนโธไซยานิน) การศึกษาการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (total antioxidant capacity, $ABTS^{\bullet+}$ radical scavenging activity และ FRAP method) และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพเมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต (ได้แก่ พีเอช ปริมาณกรด ค่าความเข้มสี ค่าความสว่าง และค่ามุมของสี) โดยดำเนินการวิจัยตามลำดับ ดังต่อไปนี้

1. แผนการวิจัย
2. เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย
3. วิธีดำเนินการทดลอง
4. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

แผนการวิจัย

1. การทดลองที่ 1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นในรำข้าวเหนียวดำ ได้แก่ ปริมาณความชื้นและของแข็งรวม เถ้า ปริมาณโปรตีน ไขมัน เส้นใยอาหารดิบ และคาร์โบไฮเดรต และการศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ชีวภาพของรำข้าวเหนียวดำ ได้แก่ แกมมาออริซานอล

แอลฟาโทโคเฟอรอล สารประกอบฟีนอล และแอนโธไซยานิน โดยทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ โดยแสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2. การทดลองที่ 2 กรรมวิธีการผลิตสีปรุงแต่งอาหารประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

2.1 ขั้นตอนที่ 1 การคัดเลือกสภาวะการผลิตสีปรุงแต่งอาหารจากรำข้าวเหนียวดำมา 6 สิ่งทดลองจากทั้งหมด 16 สิ่งทดลอง โดยการศึกษาดังนี้

2.1.1 การศึกษาปริมาณผลผลิตของสีปรุงแต่งอาหาร ค่าความสว่างของสี ค่าความเข้มสี ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ ความสามารถในการละลายของผงสีปรุงแต่งอาหาร และวิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานิน โดยแต่ละสิ่งทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ ออกแบบการทดลองแบบ Factorial experiment in Completely Random Design (4×4) ชนิดอิทธิพลแบบกำหนด (Fixed Effect Model) มี 2 ปัจจัย คือ วิธีการสกัดและปริมาณมอลโตเด็กซ์ตริน ดังนี้

2.1.1.1 วิธีการสกัด 4 วิธี ได้แก่

2.1.1.1.1 รำข้าวสกัดโดยใช้เอทานอล

2.1.1.1.2 รำข้าว 40 กรัมสกัดโดยเอนไซม์

2.1.1.1.3 รำข้าว 50 กรัมสกัดโดยเอนไซม์

2.1.1.1.4 รำข้าว 60 กรัมสกัดโดยเอนไซม์

2.1.1.2 ปริมาณมอลโตเด็กซ์ตริน 4 ระดับ ได้แก่

2.1.2.2.1 ไม่เติมมอลโตเด็กซ์ตริน

2.1.2.2.2 เติมมอลโตเด็กซ์ตริน 2% (w/v)

2.1.2.2.3 เติมมอลโตเด็กซ์ตริน 3% (w/v)

2.1.2.2.4 เติมมอลโตเด็กซ์ตริน 4% (w/v)

2.1.2 การศึกษาค่ามุมของสี แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.2 ขั้นตอนที่ 2 การคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมสีปรุงแต่งอาหาร หลังจากการศึกษาความคงตัวต่อการเก็บรักษาทุก ๆ สัปดาห์เป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (แอลฟาโทโคเฟอรอล แกมมาออริซานอล แอนโธไซยานิน และสารประกอบฟีนอล) การศึกษาการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (total antioxidant capacity, $ABTS^{+}$ radical scavenging activity และ FRAP method) และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าสี (ค่าความสว่าง ค่าความเข้มสีและค่ามุมของสี) โดยแต่ละสิ่งทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซึ่งออกแบบการทดลองแบบ Factorial experiment in Completely Random Design (6×7) ชนิดอิทธิพลแบบกำหนด (Fixed Effect Model) มี 2 ปัจจัย คือ กรรมวิธีการผลิตสีปรุงแต่งอาหาร และระยะเวลาการเก็บรักษา ได้แก่

2.2.1 กรรมวิธีการผลิตสีปรุงแต่งอาหาร 6 กรรมวิธี ได้แก่

2.2.1.1 รำข้าว 50 กรัมสกัดโดยเอนไซม์ เติมมอลโตเด็กซ์ตริน 2%

2.2.1.2 รำข้าว 50 กรัมสกัดโดยเอนไซม์ เติมมอลโตเด็กซ์ตริน 3%

2.2.1.3 รำข้าว 50 กรัมสกัดโดยเอนไซม์ เติมมอลโตเด็กซ์ตริน 4%

2.2.1.4 รำข้าว 60 กรัมสกัดโดยเอนไซม์ เติมมอลโตเด็กซ์ตริน 2%

2.2.1.5 รำข้าว 60 กรัมสกัดโดยเอนไซม์ เติมมอลโตเด็กซ์ตริน 3%

2.2.1.6 รำข้าว 60 กรัมสกัดโดยเอนไซม์ เติมมอลโตเด็กซ์ตริน 4%

2.2.2 ระยะเวลาการเก็บรักษา 7 ระดับ ได้แก่

2.2.2.1 สัปดาห์ที่ 0

2.2.2.2 สัปดาห์ที่ 1

2.2.2.3 สัปดาห์ที่ 2

2.2.2.4 สัปดาห์ที่ 3

2.2.2.5 สัปดาห์ที่ 4

2.2.2.6 สัปดาห์ที่ 5

2.2.2.7 สัปดาห์ที่ 6

3. การทดลองที่ 3 การวิเคราะห์ผลการประยุกต์ใช้สีปรุงแต่งอาหารในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสี (ค่าความเข้มสี ค่าความสว่าง และค่ามุมของสี) และการเปลี่ยนแปลงพีเอชและปริมาณกรดในโยเกิร์ตที่เติมสีปรุงแต่งอาหาร (สีปรุงแต่งอาหารที่ผลิตจากกรรมวิธีที่เหมาะสม) แต่ละสิ่งทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยออกแบบการทดลองแบบ Factorial experiment in Completely Random Design (4×8) ชนิดอิทธิพลแบบกำหนด (Fixed Effect Model) มี 2 ปัจจัย คือ ระดับความเข้มข้นของสีและระยะเวลาเก็บรักษา ดังนี้

3.1 ระดับความเข้มข้นของสีปรุงแต่งอาหาร (ผลิตจากกรรมวิธีที่เหมาะสม) 4 ระดับ

3.1.1 ไม่เติมสีปรุงแต่งอาหาร

3.1.2 ความเข้มข้นของสี 2% (w/v)

3.1.3 ความเข้มข้นของสี 3% (w/v)

3.1.4 ความเข้มข้นของสี 4% (w/v)

3.2 ระยะเวลาการเก็บรักษา 8 ระดับ

3.2.1 วันที่ 0

3.2.2 วันที่ 3

3.2.3 วันที่ 6

3.2.4 วันที่ 9

3.2.5 วันที่ 12

3.2.6 วันที่ 15

3.2.7 วันที่ 18

3.2.8 วันที่ 21

เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

วัตถุดิบ

1. ข้าวเหนียวดำพันธุ์พื้นเมืองจาก อ. บรบือ จ. มหาสารคาม
2. น้ำนมสดพาสเจอร์ไรส์

อุปกรณ์และเครื่องมือในการวิเคราะห์

1. เครื่องแก้วต่าง ๆ
2. เครื่องให้ความร้อน (Wellab)
3. เครื่องชั่งละเอียด (Mettler Toledo)
4. เครื่องระเหยสุญญากาศ (Buchi R-114)
5. เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drier)
6. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง UV- spectrophotometer (Spectronic Gcnesys 5, USA)
7. เครื่องวัดค่าสี (Minolta Croma Meter CR-300)
8. เครื่อง High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Shimadzu LC-20AD, Japan) Phenomenex Column (C18, 4 μm, 4.60 × 150 mm, USA)
9. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer)
10. ถ้วยใส่ตัวอย่าง (Moisture can)
11. ถ้วยใส่เถ้า Crusible (VELP Scientifice)
12. เตาเผาเถ้า Muffle furnace (Carbolite)
13. เครื่องวิเคราะห์ไขมัน Soxhlet Extractor (Buchi E-816, Switzerland)
14. เครื่องวิเคราะห์โปรตีน (Gerhardt)
15. เครื่องวิเคราะห์เส้นใย
16. เครื่องปั่นหวี่ยงความเร็วสูง (Rotina 48R)
17. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1, 4 และ 42
18. กระดาษกรอง Whatman ขนาด 0.45 μm
19. ตัวกรอง Syringe Filter Membrane ขนาด 0.2 และ 0.45 μm
20. เครื่องวัดพีเอช pH meter (Mettler Toledo)

21. ถุงอลูมิเนียมฟอยด์

22. ถ้วยพลาสติก

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีน

1.1 Sulfuric acid (Caro erba)

1.2 Boric acid (Caro erba)

1.3 Sodium hydroxide (Univar)

1.4 Hydrochloric acid (Caro erba)

1.5 Potassium sulphate (Univar)

1.6 Copper sulphate (BDH)

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ไขมัน

2.1 Petroleum ether (BDH)

3. สารเคมีที่ใช้ในการวิคราะห์เส้นใย

3.1 n-octanol (BDH)

3.2 Potassium hydroxide (BDH)

3.3 Acetone (BDH)

4. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแกมมาออริซานอล (γ-oryzanol)

4.1 Ethyl acetate (BDH)

4.2 Sodium chloride (Caro erba)

4.3 Potassium hydroxide (Caro erba)

4.4 Ascorbic acid (Caro erba)

4.5 Ethanol (BDH)

4.6 Methanol (BDH)

4.7 Hexane (BDH)

5. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (total phenolic - compound)

5.1 Folin - Ciocalteu Reagent (Fluka)

5.2 Sodium carbonate (Caro erba)

5.3 Gallic acid (Fluka)

6. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแอลฟาโทโคเฟอรอล (tocopherols)

6.1 Methanol (BDH)

6.2 Hexane (BDH)

6.3 Ethyl acetate (BDH)

6.4 Potassium hydroxide (Caro erba)

7. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์แอนโธไซยานิน (anthocyanin)

7.3 Potassium chloride buffer pH 1.0

7.4 Sodium acetate buffer pH 4.5

8. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

8.1 Gallic acid (Fluka)

8.2 BHT (3-tert-butyl-4-hydroxylanisole) (Fluka)

8.3 Sulfuric acid (Caro erba)

8.4 2,2-azino-bis(3-ethyl-benzthiazolin-6-sulfonic acid) (ABTS)

8.5 Sodium phosphate (Caro erba)

8.6 Potassium ferricyanide (Caro erba)

8.7 Ammonium molybdate (Caro erba)

8.8 Ethanol (BDH)

8.9 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ)

8.10 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid (trolox)

8.11 Ferrous chloride (Caro erba)

9. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารสกัด

9.1 Ethanol (BDH)

9.2 เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (type XII-A from *Bacillus licheniformis* (500 KU))

9.3 เอนไซม์โปรติเอส (type II from *Aspergillus oryzae* (0.140 units/mg))

9.4 Maltodextrin (Maldex 100® DE = 4-7, Alrich)

10. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เตรียมโยเกิร์ต

10.1 The commercial probiotic dairy starter ABT-5, Chr. Hansens

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวเหนียวดำ

ทำการเตรียมตัวอย่างรำข้าวเหนียวดำ โดยนำข้าวเปลือกของข้าวเหนียวดำมาทำการกะเทาะเปลือกและแยกแกลบออก ซึ่งจะได้เป็นข้าวกล้อง จากนั้นนำข้าวกล้องไปขัดสีอีกรอบจะได้

ส่วนที่เป็นรำข้าวเหนียวดำ ทำการคงสภาพ รำข้าวโดยนำรำข้าวเหนียวดำไปให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำอุณหภูมิ 121 องศา-เซลเซียส นาน 15 นาที รำข้าวที่ผ่านการคงสภาพแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาและวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

1.1 การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นในรำข้าวเหนียว (AOAC. 2000) ได้แก่ วิเคราะห์ความชื้น ไขมัน โปรตีน เส้นใยอาหารดิบ เถ้า และคาร์โบไฮเดรต (รายละเอียดดังภาคผนวก ข)

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

1.2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณแกมมาออริซานอล (γ-oryzanol)

ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง ดัดแปลงจาก Ryynanen. (2003 : 11-26)

ขั้นตอน saponification โดยชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม ใส่ในหลอดฝาเกลียว (screw cap) ขนาด 30 มิลลิลิตร เติมกรดแอสคอร์บิค (ascorbic acid) 0.1 กรัม เอทานอล (ethanol) 15 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ปั่นผสมด้วยเครื่องผสมแล้วเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 นาที โดยในระหว่างการต้มให้นำออกมาปั่นผสมด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixer) ทุก ๆ 5 นาที เมื่อครบเวลาให้นำออกมาทำให้เย็นด้วยน้ำเย็นจัด

ขั้นตอนการสกัดโดยใส่น้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตรและเอทานอล (ethanol) 2.5 มิลลิลิตรลงในหลอดที่ทำให้เย็นแล้วจากขั้นตอน saponification หลังจากนั้นเทสารในหลอดลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมสารละลายผสมของเฮกเซน (n-hexane) และเอทิลอะซีเตท (ethyl acetate) ในอัตราส่วน 8 : 2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) เป็นเวลา 10 นาที นำมาดูดเอาส่วนใสที่ต้องการที่อยู่ด้านบนใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมเฮกเซน : เอทิลอะซีเตท (8 : 2) ลงในขวดรูปชมพู่เดิม แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก ทำเช่นเดิมจนครบ 3 ครั้ง จากนั้นนำสารที่สกัดมาใส่ในกรวยแยก (funnel) ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แล้วเขย่าประมาณ 10 รอบ เพื่อล้างกำจัดสารที่ละลายได้ในน้ำออก โดยการปล่อยน้ำที่แยกชั้นอยู่ด้านล่างทิ้งไป ทำเช่นเดิมจนครบ 3 ครั้ง แล้วปล่อยสารสกัดลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำสารสกัดที่ได้ไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ แล้วละลายสารสกัดแห้งที่ได้ด้วยเมทานอล (methanol) 5 มิลลิลิตร จะได้สารสกัดสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

ขั้นตอนการวิเคราะห์ ดัดแปลงจาก Chen. (2005 : 319-331) ; Gimeno และคณะ (2001 : 315-322)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สำคัญโดยวิธี HPLC (Shimadzu CL10) ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีด 20 ไมโครลิตร ผ่าน security guard- column และ

คอลัมน์ Phenomenex® C18-reversed-phase column ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร, 4 ไมโครเมตร ที่ควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ตัวทำละลายเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วย เมทานอล บิวทานอลและน้ำ (92 : 4 : 4 (v/v)) อัตราการไหล (flow rate) 1 มิลลิลิตรต่อนาทีนาน 12 นาที หลังจากนั้นทำการเปลี่ยนอัตราส่วน เมทานอล บิวทานอล และน้ำ เป็น 92 : 5 : 3 (v/v) และอัตราการไหลเป็น 1.5 มิลลิลิตรต่อนาทีเป็นเวลา 13 นาที รวมระยะเวลาตลอดการวิเคราะห์นาน 25 นาที สารที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ติดตามวัดค่าการดูดกลืนแสงโดย UV - detector ที่ความยาวคลื่น 292 นาโนเมตร ผลการทดลองที่ได้เปรียบเทียบ retention time และ peak areas กับ external standards (γ-oryzanol)

1.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณแอลฟาโทโคเฟอรอล (α- tocopherols)

การเตรียมสารสกัดตัวอย่าง ดัดแปลงจาก Ryynanen (2003 : 11-26)

ขั้นตอน saponification โดยชั่งตัวอย่างรำข้าว 0.5 กรัม ใส่ในหลอดฝาเกลียว (Screw cap) ขนาด 30 มิลลิลิตร กรดแอสคอร์บิค (ascorbic acid) 0.1 กรัม เอทานอล (ethanol) l5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ปั่นผสมด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixer) แล้วเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 นาที โดยในระหว่างการต้มให้นำออกมาปั่นผสมด้วยเครื่องเขย่า ทุก ๆ 5 นาที เมื่อครบเวลาให้นำออกมาทำให้เย็นด้วยน้ำเย็นจัด

ขั้นตอนการสกัด โดยเติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร และเอทานอล (ethanol) 2.5 มิลลิลิตรลงในหลอดที่ทำให้เย็นแล้วจากขั้นตอน saponification หลังจากนั้นเทสารในหลอดลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมสารละลายผสมของเฮกเซน (n- hexane) และเอทิลอะซีเตท (ethyl acetate) ในอัตราส่วน 8 : 2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) เป็นเวลา 10 นาที นำมาดูดเอาส่วนใสที่ต้องการที่อยู่ด้านบนใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้น เติมเฮกเซน : เอทิลอะซีเตท (8 : 2) ลงในขวดรูปชมพู่เดิม แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก ทำเช่นเดิมจนครบ 3 ครั้ง จากนั้นนำสารที่สกัดมาใส่ในกรวยแยก (funnel) ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แล้วเขย่าเป็นรูปเลข 8 ประมาณ 10 รอบ เพื่อล้างกำจัดสารที่ละลายได้ในน้ำออก โดยการปล่อยน้ำที่แยกชั้นอยู่ด้านล่างทิ้งไป ทำเช่นเดิมจนครบ 3 ครั้ง แล้วปล่อยสารสกัดลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำสารสกัดที่ได้ไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ แล้วละลายสารสกัดแห้งที่ได้จากการระเหยด้วยเมทานอล (methanol) 5 มิลลิลิตร จะได้สารสกัดสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

วิธีการวิเคราะห์ ปรับปรุงจาก Chen. (2005 : 319-331) ; Gimeno และคณะ (2001 : 315-322)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สำคัญโดยวิธี HPLC (Shimadzu CL10) ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีด 20 ไมโครลิตร ผ่าน security guard- column และคอลัมน์ Phenomenex® C18-reversed-phase column ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร, 4 ไมโครเมตร ที่ควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ตัวทำละลายเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วย เมทานอล บิวทานอลและน้ำ (92 : 4 : 4 (v/v)) อัตราการไหล (flow rate) 1 มิลลิลิตรต่อนาที นาน 12 นาที หลังจากนั้นทำการเปลี่ยนอัตราส่วน เมทานอล บิวทานอล และน้ำ เป็น 92 : 5 : 3 (v/v) และอัตราการไหลเป็น 1.5 มิลลิลิตรต่อนาทีเป็นเวลา 13 นาที รวมระยะเวลาตลอดการวิเคราะห์นาน 25 นาที สารที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ติดตามวัดค่าการดูดกลืนแสงโดย UV-detector ที่ความยาวคลื่น 325 นาโนเมตร ผลการทดลองที่ได้เปรียบเทียบ retention time : peak areas กับ external standards (α - tocopherol)

1.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอล (total phenolic compound by the folin - ciocalteu method) ปรับปรุงจากวิธีของ Iqbal และคณะ (2005 : 361-367)

ขั้นตอนการวิเคราะห์ โดยเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน แล้วดูดมา 0.2 มิลลิลิตร เติมสาร folin-ciocalteu ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร และเติม 7% ของโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น (deionized) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 2 ชั่วโมง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้กรดแกลลิคเป็นสารมาตรฐาน

1.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานิน (Lee. and others. 2005 : 1269)

ทำการชั่งตัวอย่างปริมาณ 2 กรัม ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตรด้วย 0.1% HCl ใน 90% เมทานอล เจือจางสารละลายของสารสกัดด้วยบัฟเฟอร์พีเอช 1.0 (potassium chloride, 0.025 โมลาร์) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรให้ได้ค่าอยู่ระหว่าง 0.2-1.4 ใช้ระดับความเจือจางนี้ในการเตรียมตัวอย่างสารละลาย 2 ตัวอย่างคือตัวอย่างที่ปรับปริมาตรด้วยบัฟเฟอร์พีเอช 1.0 และบัฟเฟอร์พีเอช 4.5 (sodium acetate, 0.4 โมลาร์) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงเวลา 20-50 นาทีหลังการเตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยสารละลายแต่ละชนิดวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร และ 700 นาโนเมตร

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH\ 4.5}$$

$$\%\ w/w = \frac{A \times MW \times DF \times V}{L \times \varepsilon \times Wt} \times 100$$

เมื่อ

A = ค่าการดูดกลืนแสง

ε = ค่าการดูดกลืนแสงของ Cyd-3-glu (26,900)

MW = น้ำหนักโมเลกุลแอนโธไซยานิน (449.2)

DF = ระดับความเจือจาง

V = ปริมาตรสุดท้าย (mL)

Wt = น้ำหนักตัวอย่าง (mg)

L = ความหนาของเซลล์ (1 cm)

การทดลองที่ 2 การศึกษากรรมวิธีการผลิตสีปรุงแต่งอาหาร

2.1 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีเบื้องต้นของผงสีปรุงแต่งอาหาร

2.1.1 แผนการศึกษามีดังนี้

2.1.1.1 ทำการสกัดรำข้าวเหนียวดำโดยใช้เอทานอลและเอนไซม์ (ในการสกัดโดยใช้เอนไซม์ทำการแปรปริมาณรำข้าวเป็น 3 ระดับคือ 40, 50 และ 60 กรัม)

2.1.1.2 สารละลายของสารสกัดที่ได้นำมาเติมสารให้ความคงตัวชนิดมอลโตเด็กซ์ตรินที่ระดับ 0, 2%, 3% และ 4% (w/v) แล้วทำแห้งแบบเยือกแข็งเพื่อบดให้เป็นผงสีปรุงแต่งอาหาร

2.1.1.3 สีปรุงแต่งอาหารผงที่ผลิตได้นำมาวิเคราะห์ดังต่อไปนี้ เพื่อคัดเลือกกรรมวิธีที่เหมาะสมเพียง 6 กรรมวิธี ได้แก่ ปริมาณผลผลิตของสีปรุงแต่งอาหาร ค่าความสว่าง ความเข้มสีและค่ามุมของสี ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้และความสามารถในการละลายน้ำ และวิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานิน

2.1.2 วิธีการวิเคราะห์ดังนี้

2.1.2.1 การเตรียมรำข้าวเหนียวดำสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย ปรับปรุงจากวิธีของ Duangmal และคณะ. (2008 : 1437-1445)

รำข้าวเหนียวดำที่ได้จากการขัดสีนำมาสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย 95% เอทานอล : น้ำ อัตราส่วนเป็น 1:1 ปรับพีเอชเป็น 2.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ ใช้อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายเป็น 1:5 เวลาในการสกัด 3 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนที่เป็นสารละลายไปกรองโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วนำสารละลายของสารสกัดมาเติมมอลโต-

เด็กซ์ตริน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 2%, 3% และ 4% (w/v) เพื่อเป็นสารให้ความคงตัว จากนั้นทำแห้งโดยใช้การแช่เยือกแข็ง (freeze dried) ตัวอย่างสารสกัดที่แห้งแล้วบดให้ละเอียด ได้ลักษณะที่เป็นผงแล้วเก็บไว้เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

2.1.2.2 การเตรียมรำข้าวเหนียวดำสกัดโดยใช้เอนไซม์ ปรับปรุงจากวิธีของ Sungsopha, Moong-ngam และ Kanesakoo. (2009 : 3653-3662)

รำข้าวเหนียวดำที่ได้จากการขัดสีนำมาสกัดโดยใช้ปริมาณรำข้าว 40, 50 และ 60 กรัม เติมน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร นำไปต้มเพื่อย่อยส่วนผสมแล้วเติมสารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 0.15% เพื่อทำให้เอนไซม์คงสภาพ จากนั้นค่อย ๆ ปรับอุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึง 37±2 องศาเซลเซียส แล้วทำการเติมเอนไซม์โปรตีเอส 1 กรัม (140 ยูนิต) พีเอช 7.5 ทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้เอนไซม์โปรติเอสย่อยโมเลกุลของโปรตีนให้มีขนาดเล็กลงและละลายน้ำได้มากขึ้น เมื่อครบเวลาปรับอุณหภูมิเป็น 65±2 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์อะไมเลส 0.25 มิลลิลิตร (16,129 ยูนิต) พีเอช 6.9 ทิ้งไว้ 60 นาที เพื่อให้เอนไซม์ทำการย่อยสลายโมเลกุลแป้ง จากนั้นปรับพีเอชให้เป็น 2.5 เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์และปรับพีเอชของสารสกัดให้เท่ากับข้อ 2.1.2.1 ทำการกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกกากออกแล้วกรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง นำสารละลายของสารสกัดแต่ละสภาวะมาเติมมอลโตเด็กซ์ตริน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 2%, 3% และ 4% (w/v) เพื่อใช้เป็นสารให้ความคงตัว แล้วทำให้แห้งโดยใช้การแช่เยือกแข็ง (freeze dried) ตัวอย่างสารสกัดที่แห้งแล้วบดให้ละเอียด ได้ลักษณะที่เป็นผงแล้วเก็บไว้เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

2.1.2.3 การวัดปริมาณผลผลิตของสารสกัด วัดปริมาณสารสกัดผง (สีปรุงแต่งอาหาร) ที่ได้เทียบกับปริมาณตัวอย่างเริ่มต้น

$$\%\text{yield} = \frac{(W_{powder} - W_{MD})}{W_{BRB}} \times 100$$

เมื่อ

W_{powder} = น้ำหนักของสารสกัดผง

W_{MD} = น้ำหนักของมอลโตเด็กซ์ตริน

W_{BRB} = น้ำหนักของรำข้าวเหนียวดำ

2.1.2.4 การวัดค่าสี ใช้ตัวอย่างสีปรุงแต่งอาหารมาทำการวัดค่าสีด้วยเครื่อง Minolta Croma Meter CR-300 โดยวัดค่าความสว่าง (L*) ค่าความเข้มสี (C*) และค่ามุมของสี (H)

2.1.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานิน (Lee. and others. 2005 : 1269) โดยการวิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานินด้วยวิธี pH differential method (รายละเอียดดังข้อ 1.2.4)

2.1.2.6 การวัดค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ โดยเครื่อง a_w meter

2.1.2.7 การวิเคราะห์ความสามารถในการละลาย ปรับปรุงจากวิธีของ Torre-Gutierrero และคณะ (2008 : 1138-1114)

ทำการชั่งน้ำหนักตัวอย่างสารสกัดผง 1 กรัม ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 30 วินาทีที่อุณหภูมิห้อง นำตัวอย่างสารละลาย 40 มิลลิลิตรไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 2,120 × g เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนที่เป็นของเหลวด้านบน 10 มิลลิลิตรไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสนาน 4 ชั่วโมงจนน้ำหนักคงที่แล้วชั่งน้ำหนักเพื่อวัดความสามารถในการละลาย ดังนี้

$$\% \text{ solubility} = \frac{\text{น้ำหนักอบแห้ง} \times 100}{10 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

2.2 การศึกษาความคงตัวต่อการเก็บรักษาผงสีปรุงแต่งอาหารทั้ง 6 วิธีที่คัดเลือกมาจากตอนที่ 1

2.2.1 แผนการศึกษา ดังนี้

ทำการคัดเลือกกรรมวิธีการผลิตที่เหมาะสมที่สุดเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต โดยเลือกกรรมวิธีการผลิตที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 มา 6 กรรมวิธี นำสีปรุงแต่งอาหารที่ผลิตได้จากกรรมวิธีดังกล่าวมาเก็บรักษาโดยบรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยด์แบบสุญญากาศ เก็บรักษาไว้ในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์โดยมีการสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์ทุก ๆ สัปดาห์ โดยวิเคราะห์คุณสมบัติดังต่อไปนี้

2.2.1.1 ศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ แอลฟาโทโคเฟอรอล แกมมาออริซานอล สารประกอบฟีนอลและแอนโธไซยานิน

2.2.1.2 ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ total antioxidant capacity, $ABTS^{\bullet+}$ radical scavenging activity และ FRAP method

2.2.1.3 ศึกษาค่าสีของสีปรุงแต่งอาหาร ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงค่าความสว่าง ค่าความเข้มสีและค่ามุมของสี

2.2.2 วิธีการวิเคราะห์

2.2.2.1 การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสีปรุงแต่งอาหาร (ตามวิธีที่ศึกษาในรำข้าวเหนียวดำ ข้อ 1.2)

2.2.2.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

2.2.2.2.1 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูอิสระโดยวิธี total antioxidant capacity (Desgubta. and De. 2004 : 219-224)

นำสารละลายตัวอย่างมา 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดซัลฟูริค (sulfuric acid) ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต (sodium phosphate) ความเข้มข้น 28 มิลลิโมลาร์ และแอมโมเนียมโมลิบเดท (ammonium molybdate) ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ อย่างละ 1 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 659 นาโนเมตร เปรียบเทียบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระกับ บีเอชที กรดแกลลิค และแอลฟาโทโคเฟอรอล

2.2.2.2.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลิสระโดยวิธี $ABTS^{\bullet+}$ radical scavenging activity ปรับปรุงจากวิธีของ Esteve, Zulueta และ Frigoala (2008 : 310-316)

หลักการเป็นการตรวจวิเคราะห์ความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระสามารถตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS เป็นกลไกในการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งเป็นวิธีการวัดความสามารถในการขจัดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน

วิธีการเตรียมสารละลายอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ โดยใช้ ABTS 25 มิลลิลิตร (7 มิลลิโมลาร์) กับ 440 ไมโครลิตรของ $K_2S_2O_8$ (140 มิลลิโมลาร์) จากนั้นนำสารละลายเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (เพื่อให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระ) สารละลายที่ได้จะมีสีน้ำเงิน จากนั้นนำสารละลายมาเจือจางด้วยเอทานอลหรือบัพเฟอร์ (พีเอช 7.4) จนได้ค่าการดูดกลืนแสง 0.70±0.02 นำสารสกัดตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ปริมาณ 2 มิลลิลิตร (A_o) ทันทีจากนั้นทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 6 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ คำนวณกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระจากสมการ

$$\% \text{ inhibition activity} = \frac{[A_e - A_o)]}{A_e} \times 100$$

A_e = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ที่ไม่มีตัวอย่าง

A_o = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ที่เติมตัวอย่าง

ทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารที่สามารถจับกับ $ABTS^{\bullet+}$ ได้ 50% (50% inhibition concentration, IC_{50}) โดยนำค่าร้อยละของการยับยั้งและค่าความเข้มข้นไปพล็อตกราฟ และหาค่าความสัมพันธ์แบบลอการิทึ่ม สมการที่ได้นำมาคำนวณปริมาณสารที่ใช้ในการยับยั้ง $ABTS^{\bullet+}$ ได้ 50%

2.2.2.2.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลิสระโดยวิธี Ferric reducing/ antioxidant power (FRAP) method (Salluca and others. 2008 : 58-61)

หลักการเป็นการตรวจวิเคราะห์ความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระสามารถตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP ซึ่งเป็นกลไกในการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปรีดิวซ์สารอื่น โดยเป็นการวัดความสามารถรวมในการรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe^{3+}- TPTZ (ferric tripyridyl triazine) ซึ่งมีสีเหลืองให้อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}- TPTZ ที่มีสีน้ำเงิน

วิธีการวิเคราะห์โดยนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมกับ FRAP reagent (บัฟเฟอร์อะซีเตท : TPTZ : $FeCl_3$ ในอัตราส่วน 10 : 1 : 1) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 90 ไมโครลิตร ทิ้งไว้นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

2.2.2.3 การศึกษาค่าสีของผงสีปรุงแต่งอาหารระหว่างการเก็บรักษา

ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าสีของผงสีปรุงแต่งอาหารระหว่างการเก็บรักษา โดยการวัดค่าสีในระบบ CIELAB ใช้ตัวอย่างสีปรุงแต่งอาหารจากรำข้าวมาทำการวัดค่าสีด้วยเครื่อง Minolta Croma Meter CR-300 ได้แก่ การวัดค่าความสว่าง (L*) ค่าความเข้มสี (C*) และค่ามุมของสี (h)

3. การทดลองที่ 3 การศึกษาการประยุกต์ใช้สีปรุงแต่งอาหารจากรำข้าวเหนียวดำ (สีที่ผลิตจากกรรมวิธีที่เหมาะสมที่สุด) ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต

เป็นการประยุกต์ใช้สีปรุงแต่งอาหารที่ผลิตจากกรรมวิธีที่คัดเลือกได้หลังจากการศึกษาความคงตัวต่อการเก็บรักษา (คัดเลือกได้จากข้อ 2.2) มาประยุกต์ใช้ในโยเกิร์ต โดยศึกษาระดับความเข้มข้นของสีที่เหมาะสมในโยเกิร์ต เมื่อเก็บรักษาโยเกิร์ตไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 21 วัน โดยทำการสุ่มตัวอย่างออกมาวัดวิเคราะห์ทุก ๆ 3 วันของการเก็บรักษา ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.1 การผลิตโยเกิร์ต

3.1.1 นำน้ำนมสดมาเติมสีผสมอาหารที่เตรียมจากรำข้าวเหนียวดำ โดยแปรปริมาณการเติมสีเป็น 4 ระดับ (เทียบเคียงสีให้อยู่ในระหว่างสีของโยเกิร์ตทางการค้าแอคทิเวียกลิ่นบลูเบอรี่) คือเติมปริมาณ 0.2%, 0.4%, 0.6% โดยน้ำหนัก และตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมสีผสมอาหาร

3.1.2 ทำการฆ่าเชื้อด้วยวิธีพาสเจอร์ไรซ์เซชั่น ที่อุณหภูมิประมาณ 63 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

3.1.3 ทำให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 45 องศาเซลเซียส

3.1.4 ทำการเติมเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติค (The commercial probiotic dairy starter ABT-5, Chr. Hansens) โดยใช้ในอัตราส่วนของเชื้อ 1 กรัม ต่อน้ำนม 5 ลิตร หรือ 0.02% (w/w) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 40-42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จนพีเอชลดลงถึง 4.5- 4.6 แล้วหยุดกระบวนการหมักโดยเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 21 วัน

3.2 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโยเกิร์ต

ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่ได้จะนำมาวิเคราะห์ ดังนี้

3.2.1 วัดค่าพีเอช (pH) โดยใช้ pH meter เปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างโยเกิร์ตที่เติมสารสกัดจากข้าวเหนียวดำ ที่ระดับต่าง ๆ ทุก ๆ 3 วันจนครบ 21 วัน

3.2.2 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดของโยเกิร์ต (Fabro and others. 2006 : 859-861) โดยวิธีการไตเตรต ทุก ๆ 3 วันจนครบ 21 วัน โดยนำตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตรเติมฟีนอฟทาลีนอินดิเคเตอร์ 3 หยด ไตเตรตกับโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.111 นอร์มอล จนเปลี่ยนเป็นสีชมพู โดยปริมาณกรดสามารถคำนวณโดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{Lactic acid (mg/ 100 mL of milk)} = \frac{(Vg \times N \times 90 \times 100)}{Vm}$$

เมื่อ Vg = ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ไป

N = ความเข้มข้นของ NaOH

Vm = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้

3.2.3 การประเมินค่าสีในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตด้วยเครื่อง Minolta Croma Meter CR-300 โดยวัดค่าความสว่าง (L*) ค่าความเข้มสี (C*) และค่ามุมของสี (h) เปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างโยเกิร์ตที่เติมสารสกัดจากข้าวเหนียวดำที่ระดับต่าง ๆ ทุก ๆ 3 วันจนครบ 21 วัน

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

สถิติที่ใช้ในการวิจัยข้อมูลดังนี้

1. สถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ร้อยละ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
2. สถิติที่ใช้ทดสอบสมมุติฐานของการศึกษากรรมวิธีการผลิตสีปรุงแต่งอาหารจาก

รำข้าวเหนียวดำแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 สถิติที่ใช้ทดสอบสมมุติฐานของการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีเบื้องต้นของผงสีปรุงแต่งอาหารโดยวิธีการสกัดมี 4 ระดับ และปริมาณมอลโตเด็กซ์ตรินมี 4 ระดับ สถิติทดสอบที่ใช้ คือ F-test วิเคราะห์แบบแปรปรวนสองทาง (Two-way ANOVA) การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ ตามวิธีของ Scheffe ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 11.0

ขั้นตอนที่ 2 สถิติที่ใช้ทดสอบสมมุติฐานของการศึกษาความคงตัวต่อการเก็บรักษาผงสีปรุงแต่งอาหาร (6 ระดับ) ระหว่างการเก็บรักษา (7 ระดับ) สถิติที่ใช้คือ F-test วิเคราะห์แบบแปรปรวนสองทาง (Two-way ANOVA) การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ ตามวิธีของ Scheffe ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 11.0

3. สถิติที่ใช้ทดสอบสมมติฐานของการศึกษาการประยุกต์ใช้สีปรุงแต่งอาหารในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต โดยศึกษาระดับความเข้มของสีปรุงแต่งอาหาร 4 ระดับ ระหว่างการเก็บรักษา (8 ระดับ) สถิติที่ใช้คือ F-test วิเคราะห์ความแปรปรวนสองทาง (Two-way ANOVA) ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ ตามวิธีของ Scheffe ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 11.0