ส่วนที่ 2 **รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์**

โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2553

โครงการวิจัยรหัส ว-ท(ด)121.53

ชื่อโครงการ การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มแอนโทไซยานินส์สูงจากข้าวกล้องที่มีสีเข้ม

Production of high anthocyanins beverage from dark color hulled rice

นางสาวช่อลัดดา เที่ยงพุก[1] และวินัศ ภูมินาถ[1]

Miss Chowladda Teangpook[1] and Mr.Winus Puminat[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาลักษณะทางกายภาพและเคมีของข้าวกล้องที่มีสีเข้ม 3 พันธุ์ คือข้าวเหนียวดำ ข้าวหอมนิล ข้าวสังข์หยด เนื่องจาก ปริมาณแอนโทไซยานินส์ เป็นลักษณะสำคัญที่ให้สี และสารแอนติออกซิแดนท์ ซึ่งข้าวเหนียวดำมีปริมาณสูงมากกว่าพันธุ์อื่น จึงเลือกพันธุ์นี้มาศึกษา สภาวะที่เหมาะสมการสกัดข้าวเหนียวดำด้วยน้ำและสารละลายกรดซิตริกพบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิ 30-46° C และ ความเข้มข้นของกรด 0-0.1 % ของปริมาตรน้ำ และเวลาเขย่าที่ระดับ 180 strokes/นาที เป็น 15 นาที โดยใช้น้ำหนักข้าว ต่อปริมาตรน้ำคงที่ที่ 1: 2 สภาวะที่เหมาะสมของการสกัดข้าวเหนียวดำด้วยด้วยเอนไซม์อะไมเลส คือ อุณหภูมิ 70.33° C เวลาเขย่าที่ระดับ 83 strokes/นาที เป็น 39.47 นาที และ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.01 % ของปริมาตรน้ำ และ pH 6 โดยใช้ปริมาณข้าว ต่อน้ำคงที่ที่ 1: 2 และ นำสารสกัดด้วยเอนไซม์มาทำเครื่องดื่ม สูตรที่คนยอมรับมากที่สุด คือ น้ำสกัดข้าว 65% น้ำสกัดใบเตย (10%) 20% น้ำเชื่อมน้ำตาลทราย (36%) 15% นำมาบรรจุในขวดแก้วทรงสูง ขนาด 220 มล. สามารถเก็บได้ไม่เกิน 4 เดือนที่อุณหภูมิห้อง โดยมีปริมาณแอนโทไซยานินส์ลดลง

คำสำคัญ: ข้าวเหนียวดำ เครื่องดื่ม แอนโทไซยานินส์

ABSTRACT

Physical and chemical properties of dark brown rice with 3 varieties as black glutinous rice varieties, Black horm nin and Sang yod were studied. The glutinous rice has high anthocyanins than other varieties so this variety was selected. Optimization of extraction of black glutinous rice with water and citric acid was temperature 30-46°C, shaking (speed 180 strokes/นาที) 15 minutes with 1:2 of rice: water by weight and 0-0.1% of concentration of citric acid. The optimum condition of glutinous rice extract with the enzyme amylase was the temperature of 70.33° C with shaking at (speed 83 strokes/min) 39.47 min and enzyme concentration of 0.01% of the volume of water and 6 of pH of water, the amount of rice: water was kept constant at 1: 2. The developing beverage of rice from enzyme extraction were 65% rice extraction, 20% pandan extraction (10%) 15%syrup (36% sucrose) in 220 ml tall glass bottle. The product can be collected not over than 4 months at room temperature but the anthocyanins content were decreased.

Key words: anthocyanins, beverage, black glutinous rice

[1]สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[1]Institute of Food Research and Product Development Kasetsart University

บทนำ

ปัจจุบันอากาศร้อนมากขึ้นทุกขณะ อาหารที่ให้ความสะดวก สามารถรับประทานดับกระหายคลายร้อนได้ทันทีจึงเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย อาหารที่กล่าวถึงก็คือเครื่องดื่มนั่นเอง เครื่องดื่มบางประเภทดื่มแล้วได้คุณค่าทางโภชนาการ เช่น น้ำผลไม้ สมุนไพร เครื่องดื่มที่ทำจากนม บางประเภทดื่มแล้วไปกระตุ้นระบบประสาท เช่น เครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ ชา กาแฟ และบางประเภทดื่มเพื่อให้ดับความกระหาย ได้แก่ น้ำผลไม้ น้ำอัดลม น้ำแร่ เป็นต้น ส่วนเครื่องดื่มจากข้าวกล้อง ยังมีไม่มากนัก และมักใช้ข้าวกล้องสีน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ เช่น น้ำข้าวกล้องผสมธัญพืชตราหมี่เจียง (นิรนาม 1, 2544) และที่ทำจากข้าวกล้องสีเข้ม คือ เครื่องดื่มข้าวหอมนิล (นิรนาม 2, มปป.) ซึ่งข้าวกล้องสีเข้มนี้จะมี สารแอนโทไซยานินส์ ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วย แอนโทไซยานินส์ จึงได้รับการศึกษามาก อาทิ การสกัดแอนโทไซยานินส์จากกากองุ่น โดยใช้ตัวทำละลายต่างกัน ซึ่งพบว่าเมธานอลเป็นตัวสกัดที่ดีที่สุด คือสกัดได้มากกว่าเอธานอล 20 % มากกว่าน้ำ 73% และการสกัด ด้วยเมธานอลที่มี 10% HCL จะให้ปริมาณรงควัตุถสูงที่สุด ส่วนการใช้กรดอินทรีย์ในเมธานอลเป็นตัวทำละลายพบว่ากรดซิตริกเป็นตัวสกัดที่ดีที่สุด รองลงมา คือ กรดตาร์ตาริก ฟอร์มิก อะซิติก และโพรพิโอนิกตามลำดับ แต่การสกัดด้วยแอลกอฮอล์ต้องป้องกันการระเหยไปในบรรยากาศ ดังนั้นจึงอาจใช้น้ำเป็นตัวสกัดแทน และควรมีกรดอะซิติกด้วยเพราะให้ประสิทธิภาพดีที่สุด ตามด้วยกรดซิตริก ตาร์ตาริก และไฮโดรคลอริก ถึงแม้ว่าการสกัดด้วยสารละลายกรดในน้ำมีประสิทธิภาพในการสกัดต่ำกว่าการสกัดด้วยเมธานอลและเอธานอล แต่การเลือกตัวทำละลายควรพิจารณาถึงความปลอดภัย การติดไฟ การกัดกร่อน ราคา Solven recovery เป็นต้น (Metivier และคณะ 1980) Bronnum-Hansen และคณะ (1985) ได้ศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดแอนโทไซยานินส์จากผล elderberry โดยใช้ 0.1 M HCL, HCL ในแอลกอฮอล์ และสารละลายกรดซิตริก 0.01-20 % พบว่า 0.1 M HCL มีประสิทธิภาพในการสกัดดีที่สุด

ในประเทศไทย มีข้าวกล้องที่มีสีเข้มอยู่หลายสี ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 2 ประเภทตามลักษณะสีที่มองเห็น คือ ข้าวกล้องแดงจะมีเมล็ดสีแดง และข้าวกล้องที่มีเมล็ดสีม่วง เช่น ข้าวหอมนิล เป็นต้น

ตารางที่ 1 คุณค่าทางโภชนาการของข้าว น้ำหนัก 100 กรัม

องค์ประกอบ	ข้าวสังข์หยด	ข้าวมันปู	ข้าวหอมมะลิขาว	ข้าวหอมมะลิกล้อง
ความชื้น (กรัม)	9.4	12.8	11.8	13.5
พลังงาน (กิโลแคลอรี)	366	362	357	354
โปรตีน (กรัม)	8.3	6.2	5.4	7.6
ไขมัน (กรัม)	1.4	3.3	1.0	1.8
คาร์โบไฮเดรต (กรัม)	80.0	76.9	81.5	76.0
ใยอาหาร (กรัม)	0.9	0.9	0.1	0.7
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	-	65	29	16
ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม)	165	99	74	246
เหล็ก (มิลลิกรัม)	0.52	0.2	0.6	2.8
วิตามินบี 1 (มิลลิกรัม)	0.18	0.37	0.10	0.34
วิตามินบี 2 (มิลลิกรัม)	0.06	0.96	0.05	0.07
ไนอะซิน (มิลลิกรัม)	5.64	2.2	1.2	5.0

ที่มา : บริบูรณ์ (2542) และกองโภชนาการ (2547)

ข้าวแดง หมายถึง ข้าวที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดข้าวกล้องสีแดง ข้าวแดงที่พบมี 2 ชนิด ชนิดแรกเป็นข้าวแดงที่ขึ้นปนกับข้าวขาวในนา เรียกว่าข้าวป่า จัดเป็นวัชพืช ส่วนชนิดที่สอง คือ ข้าวที่ปลูกไว้รับประทาน ได้แก่ ข้าวมันปู เป็นข้าวเจ้าพันธุ์พื้นเมืองที่รู้จักกันมานานในภาคกลางแถบจังหวัดสระบุรี และนครนายก เปลือกหุ้มเมล็ดมีสีแดงเข้ม ขนาดและรูปร่างเมล็ดยาวเรียว ข้าวแดงอีก 2 ชนิดที่นิยมปลูกในภาคกลาง คือ ข้าวประดู่แดงและข้าวดอกมะขาม เป็นข้าวที่มีขนาดเมล็ดสั้นกว่าข้าวมันปู นอกจากนี้ยังมีข้าวสังข์หยด ซึ่งเป็นข้าวแดงที่ปลูกในภาคใต้ มีลักษณะเมล็ดยาวเรียวคล้ายข้าวมันปู เมื่อหุงสุกแล้วมีลักษณะค่อนข้างนุ่ม ข้าวแดงมีคุณค่าทางอาหารสูงกว่าข้าวกล้องหรือข้าวสารธรรมดา เมื่อเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการของข้าวสังข์หยด ข้าวมันปู ข้าวขาวและข้าวกล้องหอมมะลิ ในตารางที่ 1 พบว่าข้าวมันปูมีใยอาหาร แคลเซียม วิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 สูงกว่าข้าวขาวและข้าวกล้องหอมมะลิ ส่วนข้าวสังข์หยด มีปริมาณไนอะซินสูงช่วยในการทำงานของระบบประสาทและผิวหนัง (รสิตา, 2550) นอกจากนี้สีข้าวแดงยังเป็นรงควัตถุ ประเภทฟลาวานอยด์ชนิดแอนโทไซยานินส์ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ แอนโทไซยานินส์ในข้าวส่วนใหญ่ที่มักพบมี 2 ชนิด คือ Cyanidin และ Peonidin โดยข้าวที่อยู่ในกลุ่มอินดิกา ได้แก่ ข้าวไทย จะพบแอนโทไซยานินส์ทั้ง 2 ชนิด สำหรับข้าวที่อยู่ในกลุ่มจาปอนิกา ได้แก่ ข้าวญี่ปุ่น จะพบแอนโทไซยานินส์พวก Malvidin (Reddy, 1996) ข้าวไทยมักพบแอนโทไซยานินส์ที่มีลักษณะสีแดงหรือม่วงดำ คือ Cyanidin 3-O-B-D-glucoside (Ichikawa, 2001)

ข้าวก่ำ เป็นข้าวเหนียวดำ ที่มีประโยชน์สูงทั้งทางด้านโภชนาการและยารักษาโรค คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ได้รวบรวมและอนุรักษ์พันธุกรรมของข้าวก่ำพื้นเมืองของไทยและได้รับอนุมัติตั้งเป็นหน่วยวิจัยข้าวก่ำอยู่ภายใต้การดูแลของสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปัจจุบันคณะทำงานได้รวบรวมได้ 42 พันธุ์ จากข้าวนาดำและข้าวไร่ พันธุ์ที่ได้รับการรับรองตามพระราชบัญญัติพันธุ์พืช พ.ศ. 2518 โดยกองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร เมื่อวันที่ 18 มีนาคม พ.ศ. 2518 มี 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ก่ำดอยสะเก็ดและพันธุ์อมก๋อย เปลือกหุ้มเมล็ดข้าวก่ำมีสีม่วง ที่เรียกว่าแอนโทไซยานินส์ และ Gamma Oryzanol ซึ่งสารตัวหลังนี้มีคุณสมบัติต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น แล้วยังสามารถลดคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และเพิ่มระดับไขมัน HDL ในเลือดยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร และยับยั้งการรวมตัวของเกล็ดเลือด ลดน้ำตาลในเลือด และเพิ่มระดับของฮอร์โมนอินซูลินของคนเป็นโรคเบาหวานชนิดที่สอง (นิรนาม 3, 2550)

ข้าวหอมนิล เป็นข้าวที่ศูนย์ พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศูนย์ไบโอเทค) และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พัฒนาร่วมกับประเทศจีน แต่ได้กลายพันธุ์จากข้าวเหนียวเป็นข้าวเจ้า เมื่อปลูกในประเทศไทย จึงนำต้นที่กลายพันธุ์มาผสมกับข้าวขาวดอกมะลิ จนได้ข้าวหอมนิลที่อุดมไปด้วยคุณค่ากว่าข้าวที่ปลูกทั่วไป ดร.สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง ผู้อำนวยการศูนย์ไบโอเทค เผยว่า ข้าวพันธุ์นี้มี Proanthocyanidin ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพดีกว่าวิตามินซี อี และเบตาแคโรทีน มี วิตามินอี บี คอมเพล็กซ์ และแอนโทไซยานินส์ ที่ช่วยทำให้เส้นผมดำ นุ่ม ไม่แตกปลาย ทำให้การไหลเวียนของเส้นเลือดฝอยดีขึ้น ช่วยบำรุงรากผมให้แข็งแรง กระตุ้นให้ผมมีสีเข้มขึ้น ชะลอการเกิดผมหงอกก่อนวัย นอกจากนี้ ยังมีน้ำมันคุณภาพสูงมาก มีธาตุเหล็กที่รับประทานแล้ว ร่างกายดูดซับธาตุเหล็กได้เลย (ดวงแก้ว, 2546)

ดังนั้นจึงสมควรวิจัยนำข้าวกล้องสีเข้มมาแปรรูปให้เป็นผลิตภัณฑ์หลากหลายมากขึ้น โดยเฉพาะเครื่องดื่ม ซึ่งจะเป็นการเพิ่มมูลค่าข้าวของไทย และมีผลิตภัณฑ์ทางเลือกที่ดีมากขึ้นให้แก่ผู้บริโภค ได้ข้อมูลการวิจัยเกี่ยวกับข้าวกล้องที่มีสีเข้ม ได้สูตร และกรรมวิธีการผลิตเครื่องดื่มข้าวกล้องที่มีสีเข้มในบรรจุภัณฑ์ขวดแก้ว ดังนั้นวัตถุประสงค์ของโครงการ คือ ศึกษาสูตร และกรรมวิธีการผลิตเครื่องดื่มข้าวกล้องที่มีสีเข้มโดยการสกัดข้าวกล้องสีเข้มด้วยน้ำ และกรดซิตริก และเอนไซม์อะไมเลส ศึกษาสารอาหารของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ ตลอดจนอายุการเก็บที่อุณหภูมิห้อง

วิธีวิจัย

อุปกรณ์

1) เครื่องชั่งอิเล็กทรอนิค 2 ตำแหน่ง (Satorius)

2) เครื่องเขย่า Heto

3) เครื่องวัดสี Spectraflash 600 plus, Data color International

4) เครื่อง pH meter

5) เครื่องระเหยตัวทำละลาย Buchi Syncro® Analyst

6) เครื่อง UV-Vis spectrophotometer, UV1601 Shimadzu double beam quartz cell 10mm volume 3.5 ml wavelength scanning 160-3200nm/min

7) เครื่อง Centrifuge และ ขวดสีชา

วัตถุดิบและสารเคมี

1) ข้าวหอมนิล จากเครือข่ายเกษตรอินทรีย์ จังหวัดสุรินทร์ เก็บเกี่ยวเมื่อ ม.ค.52

2) ข้าวสังข์หยดจากวิสาหกิจชุมชนบ้านเขากลาง อ. ควนขนุน จังหวัดพัทลุง

3) ข้าวเหนียวดำ ตราธัญญาพร ซื้อจากกลุ่มกสิกรรมบ้านรัตนะ จังหวัดสุรินทร์ แต่เป็นข้าวไร่จากจังหวัดเพชรบูรณ์

4) กรดซิตริก เอนไซม์อัลฟาอะไมเลส (Termamyl® SC) จากบริษัท Brenntag (Thailand) Co Ltd

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ลักษณะทางกายภาพและเคมีของข้าวกล้องที่มีสีเข้ม วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized complete block design, RBCD) ทำ 3 ซ้ำ โดยนำข้าวกล้องดิบที่มีสีเข้ม ซึ่งสามารถหาได้ในประเทศไทย มาไม่ต่ำกว่า 3 พันธุ์ ตรวจลักษณะความกว้าง ความยาว ความหนา ปริมาตร วัดสี วัดความชื้น ปริมาณอะไมโลส และปริมาณแอนโธไซยานินส์ นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยโปรแกรมสำเร็จรูป ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เพื่อเลือกพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมในการนำมาแปรรูป 1 พันธุ์ โดยคำนึงถึงความเป็นไปได้ในแง่การปลูกเชิงพาณิชย์ ประกอบด้วย นำพันธุ์ข้าวที่เลือกมาบดละเอียดด้วยเครื่องบด pin mill (Aipine, Augsburg) เก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18°C ถึง -20°C

2. กรรมวิธีการสกัดที่เหมาะสมด้วยน้ำและกรดซิตริก

นำพันธุ์ข้าวที่บดละเอียดแล้ว มาศึกษากรรมวิธีการสกัดที่เหมาะสม ศึกษา 3 ปัจจัยในแผนการทดลองแบบ Box Benhagen คือ 1) อุณหภูมิ 30 45 และ 60°C 2) เวลาเขย่า 0 30 และ 60 นาที และ 3) ความเข้มข้นของกรด 0 0.2 และ 0.4 % ของปริมาตรน้ำ ดังตารางที่ 2 ที่ปริมาณข้าว ต่อน้ำ 1: 2 ของน้ำหนักต่อปริมาตร และระดับการเขย่า 180 strokes/นาที หลังจากนั้นนำมาเหวี่ยง ที่ 4500 rpm 15 นาที นำส่วนใส มาวัดปริมาตร วัดค่าสี ค่า pH ค่าของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total soluble solid, TSS) หน่วยเป็น °Brix ปริมาณแอนโทไซยานินส์ นำข้อมูลมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Minitab 15

ตารางที่ 2. Box-behnken design for experimental run with different combination of variables.

	Coded values			ค่าจริง		
สิ่งทดลอง	X1	X2	X3	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของกรด (%)

1	-1	0	-1	30	30	0
2	1	0	-1	60	30	0
3	0	1	-1	45	60	0
4	1	0	1	60	30	0.4
5	-1	-1	0	30	0	0.2
6	1	-1	0	60	0	0.2
7	-1	1	0	30	60	0.2
8	1	1	0	60	60	0.2
9	0	-1	-1	45	0	0
10	0	-1	1	45	0	0.4
11	0	1	-1	45	60	0
12	0	1	1	45	60	0.4
13	0	0	0	45	30	0.2
14	0	0	0	45	30	0.2
15	0	0	0	45	30	0.2

3. กรรมวิธีการสกัดที่เหมาะสมด้วยเอนไซม์อะไมเลส

นำพันธุ์ข้าวที่บดละเอียดแล้ว มาศึกษา 4 ปัจจัยในแผนการทดลองแบบ Box Benhagen คือ 1) อุณหภูมิ 55 75 และ 95°C 2) เวลาเขย่า 30 60 และ 90 นาที 3) ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.01 0.06 และ 0.11 % ของปริมาตรน้ำสกัด และ 4) pH ของน้ำ 5 6 7 ดังตารางที่ 3 ปริมาณข้าว ต่อน้ำคงที่ที่ 1: 2 และระดับการเขย่า 180 strokes/นาที หลังจากนั้นนำมาเหวี่ยง ที่ 4500 rpm 15 นาที วัดผลและนำมาวิเคราะห์ เช่นเดียวกับ ข้อ 2.

4. การพัฒนาสูตรเครื่องดื่ม นำสารสกัดจากวิธีที่เหมาะสมมาพัฒนาเป็นเครื่องดื่ม โดยศึกษาปัจจัยสารให้ความหวาน เกลือ และ /หรือผลไม้ ในปริมาณที่เหมาะสม นำผลิตภัณฑ์มาประเมินการยอมรับทางประสาทสัมผัส การตรวจสอบทางกายภาพ และเคมี โดยเฉพาะปริมาณแอนโทไซยานินส์ เพื่อเลือกสูตรที่ดีที่สุด 1 สูตร

ตารางที่ 3. Box-behnken design for experimental run with different combination of variables.

	Coded values				ค่าจริง			
สิ่งทดลอง	X1	X2	X3	X4	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของเอนไซม์ (%)	pH
1	1	1	0	0	95	90	0.06	6
2	0	1	0	-1	75	90	0.06	5
3	-1	1	0	0	55	90	0.06	6
4	0	0	0	0	75	60	0.06	6
5	0	-1	-1	0	75	30	0.01	6
6	1	0	-1	0	95	60	0.01	6
7	1	0	0	-1	95	60	0.06	5
8	0	0	0	0	75	60	0.06	6

9	0	0	1	-1	75	60	0.11	5
10	0	0	-1	1	75	60	0.01	7
11	1	0	0	1	95	60	0.06	7
12	0	1	-1	0	75	90	0.01	6
13	0	0	0	0	75	60	0.06	6
14	0	0	-1	-1	75	60	0.01	5
15	1	0	1	0	95	60	0.11	6
16	-1	0	-1	0	55	60	0.01	6
17	-1	0	0	1	55	60	0.06	7
18	0	-1	0	-1	75	30	0.06	5
19	0	-1	1	0	75	30	0.11	6
20	-1	-1	0	0	55	30	0.06	6
21	1	-1	0	0	95	30	0.06	6
22	0	1	1	0	75	90	0.11	6
23	-1	0	1	0	55	60	0.11	6
24	0	0	1	1	75	60	0.11	7
25	0	1	0	1	75	90	0.06	7
26	0	-1	0	1	75	30	0.06	7
27	-1	0	0	-1	55	60	0.06	5

5. การศึกษาอายุการเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 เดือน นำสารสกัดที่มีปริมาณแอนโทไซยานินส์สูงมาทำเครื่องดื่ม และนำสูตรที่ได้รับการยอมรับ 1 สูตร นำมาบรรจุในขวดแก้วและฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และเวลา 2 ระดับ นำผลิตภัณฑ์มาประเมินทางประสาทสัมผัสแบบความชอบ เพื่อเลือก 1 สูตร แล้ว นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง 4 เดือน โดยตรวจสอบทางกายภาพ และเคมี ความปลอดภัยทางจุลินทรีย์ ความชอบทางประสาทสัมผัสทุก 2 เดือน และปริมาณสารอาหาร (ไขมัน โปรตีน เถ้า คาร์โบไฮเดรต ใยอาหาร) เฉพาะในเดือนที่ 0

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินส์ด้วยวิธี pH differential method (Giusti and Wrolstad, 2005**)** นำตัวอย่างที่สกัด มาปรับ pH ที่สภาวะบัปเฟอร์กรด pH 1และ pH 4.5 แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 513 nm และ 700 nm วัดค่า OD จากสารละลายที่ได้ คำนวณเป็นปริมาณสารแอนโ ทไซยานินส์ชนิด cyanidin-3-glucoside.

$$\% \text{ ปริมาณ monomeric anthocyanin pigment (mg/l)} = \frac{A^* MW * DF * 1000}{\varepsilon}$$

A = Difference of Absorbance at pH 1 และ pH 4.5

$(Abs_{513nm} - Abs_{700nm})$ pH 1 - $(Abs_{513nm} - Abs_{700nm})$ pH 4.5

DF = Dilution Factor =13.5

MW = molecular weight cyanidin-3-glucoside (449.2)

ε = molar absorptivity (26900 l/mol.cm)

ผลและวิจารณ์

1. ลักษณะทางกายภาพและเคมีของข้าวกล้องที่มีสีเข้ม

ตารางที่ 4. ขนาดและลักษณะของข้าวกล้องสีเข้ม

พันธุ์ข้าว	ความกว้าง	ความยาว	ปริมาณเต็มเมล็ด	ปริมาณเมล็ดสีขาว	ปริมาณเมล็ดหัก
เหนียวดำ	1.75 มม	6.8 มม	89.02%	2.67%	8.31%
หอมนิล	1.91 มม.	7.65 มม.	96.59 %	3 %	0.41%
สังข์หยด	1.4 มม	5.65 มม	93.78%	4.15	2.07%

โดยทั่วไป ข้าวเหนียวดำ มีสีม่วงเข้ม ข้าวหอมนิลมีสีม่วงลักษณะแบน และข้าวสังข์หยดมีสีส้มเมล็ดเล็ก

ตารางที่ 5. ร้อยละของคุณค่าทางอาหารของข้าวกล้องสีเข้ม

พันธุ์ข้าว	ความชื้น	โปรตีน (N × 5.7)	ไขมัน	เถ้า	เส้นใยหยาบ
เหนียวดำ	11.53	7.36	3.63	1.26	2.23
หอมนิล	12.90	9.54	3.78	1.47	2.14
สังข์หยด	13.30	7.15	3.26	1.37	2.51

จากคุณค่าทางอาหาร พบว่าทั้งสามพันธุ์ มีไขมัน เถ้า และเส้นใยหยาบใกล้เคียงกัน แต่โปรตีนข้าวพันธุ์หอมนิลมีค่ามากกว่าพันธุ์อื่น

ตารางที่ 6 ปริมาณแอนโทไซยานินซ์และอะไมโลส

พันธุ์ข้าว	แอนโทไซยานินซ์[1] (mg /100g)	Cyanidin-3- glucoside chloride (mg)/100g [2]	ปริมาณอะไมโลส %
เหนียวดำ	348.98	157.86	1.54
หอมนิล	19.62	10.33	11.29
สังข์หยด	Not detect	9.3	8.97

1 สกัดด้วยน้ำ และวิเคราะห์ด้วย spectrophotometer

2 สกัดด้วยน้ำ และวิเคราะห์ด้วย HPLC (วิธีในภาคผนวก)

ข้อมูลที่ได้ยังไม่ใช่ปริมาณแอนโทไซยานินส์ทั้งหมด เพราะใช้น้ำสกัด โดยการคนและกรองผ่านกระดาษกรองเท่านั้น แต่ก็สามารถเปรียบเทียบในระหว่างพันธุ์ได้ ซึ่งข้าวเหนียวดำมีปริมาณสูงมาก จึงเลือกพันธุ์นี้มาทำเป็นเครื่องดื่มต่อไป

2. กรรมวิธีการสกัดที่เหมาะสมด้วยน้ำและกรดซิตริก

ผลการสกัดด้วยสารละลายกรด ได้สมการผลตอบสนองของ ค่า แอนโทไซยานินส์ ค่า TSS pH ปริมาตร และค่าสี ดังตารางที่ 7 ซึ่งเป็นค่าที่น่าเชื่อถือได้ เพราะค่า Lack-of-Fit ไม่แตกต่าง และค่า R-Sq เกิน 70% ดังตารางที่ 8 และพบว่า ค่าแอนโทไซยานินส์ มีความสัมพันธ์เชิงบวก กับค่า pH และปริมาตร เท่านั้น ในตารางที่ 9

ตารางที่ 7. The coefficients of regression equations fit for response variables.

ตัวแปร	แอนโทไซยานินส์	TSS	pH	ปริมาตร	L*	a*
ค่าคงที่	267.792	15.7125	5.98125	-1.5750	12.3538	-17.899
X1	7.476	-0.5300	0.01200	1.1867	-0.5887	0.613

X2	1.990	-0.1789	0.00350	0.2943	-0.1426	0.613
X3	-140.533	1.3833	-5.13500	11.8042	66.0308	137.878
X1 X1	-0.104	0.0061	-0.00014	-0.0122	0.0068	-0.003
X2 X2	-0.130	0.0008	-0.00009	-0.0022	0.0064	0.009
X3 X3	-63.817	-1.6833	2.53500	1.2833	-6.3283	-34.328
X1 X2	0.011	0.0041	-0.00006	-0.0058	-0.0003	-0.017
X1 X3	1.227	0.0167	0.00167	-0.3183	-0.8300	-1.429
X2 X3	4.379	-0.0033	0.00567	-0.0333	-0.6043	-0.705

X 1 = Temperature X2 = Time X3 = Concentration

ตารางที่ 8 ค่า R-Sq ของผลตอบสนอง

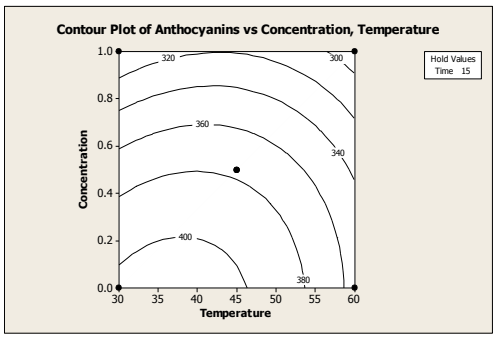
ตัวแปร	แอนโทไซยานินส์	TSS	pH	ปริมาตร	L*	a*
R-Sq	70.41%	95.34%	99.89%	83.33%	96.58%	93.05%
R-Sq(pred)	0.00%	33.13%	99.03%	0.00%	88.37%	74.95%
R-Sq(adj)	17.14%	86.95%	99.69%	53.32%	90.42%	80.55%
Lack-of-Fit(P)	0.184	0.174	0.671	0.13	0.976	0.969

ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าผลตอบสนอง

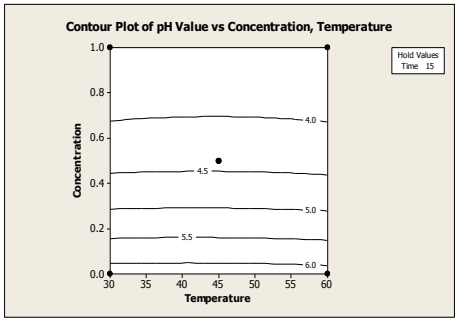
	An*	L*	a*	b*	C*	h*	pH	TSS	V**
An	1								
L*	-0.4238	1							
a*	-0.3165	0.9508	1						
b*	-0.4268	0.9952	0.9571	1					
c*	-0.3502	0.9707	0.9968	0.9770	1				
h*	-0.0502	0.3330	0.1849	0.3254	0.2229	1			
pH	0.5399	-0.5930	-0.7100	-0.6136	-0.6916	0.2445	1		
TSS	-0.3783	-0.3376	-0.3572	-0.3473	-0.3571	-0.5859	-0.1685	1	
V	0.4766	0.3416	0.3595	0.3499	0.3605	0.3912	0.2349	-0.8685	1

An* แอนโทไซยานินส์ และ V** = ปริมาตร (ml)

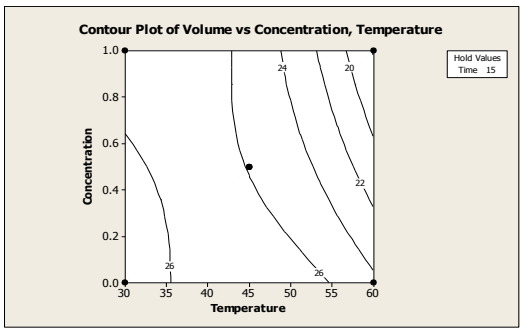
จากการทำแผนภาพคอนทัวร์ ดังภาพที่ 1 พบว่า เมื่อ ความเข้มข้นของกรดมากขึ้น และ อุณหภูมิเพิ่มขึ้น ค่าแอนโทไซยานินส์ลดลง ดังภาพ a สำหรับค่า pH แสดงในภาพ b พบว่า มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของกรดมากขึ้น แต่มีค่าคงที่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น สภาวะที่เหมาะสมจากการนำกราฟซ้อนทับกัน เฉพาะแอนโทไซยานินส์ pH กับปริมาตร เท่านั้น เพราะ pH กับปริมาตร มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับแอนโทไซยานินส์ ซึ่งเป็นค่าที่สำคัญที่สุด ได้ผลดังภาพ d พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิ 30-46° C ความเข้มข้นของกรด 0-0.1 % ของปริมาตรสารละลาย และเวลาแช่ 15 นาที ซึ่งจะเห็นว่าการใช้กรดซิตริกสกัด ให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้น้ำสกัด ดังนั้นเพื่อเป็นการประหยัดกว่า จึงควรใช้น้ำ และอุณหภูมิห้อง



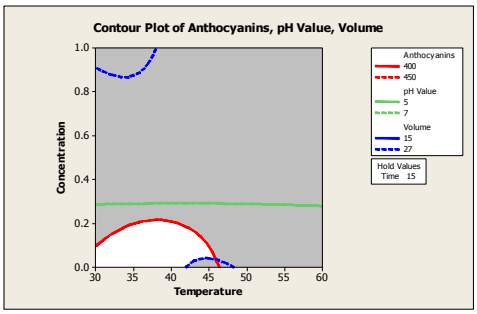
a



b



C



d

ภาพที่ 1 ภาพ a b c แสดงคอนทัวร์ของแอนโทไซยานินส์ pH และ ปริมาตร และ d คือ การซ้อนทับกราฟที่เวลา 15 นาที

3. กรรมวิธีการสกัดที่เหมาะสมด้วยเอนไซม์อะไมเลส

ตารางที่ 10. The coefficients of regression equations fit for response variables.

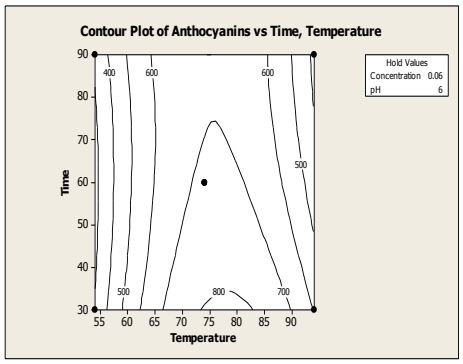
ตัวแปร	แอนโทไซยานินส์	TSS	ปริมาตร	b*
ค่าคงที่	714.073**	25.1667**	21.5000**	-0.020000
X1	87.795 **	9.8333**	-0.5417	0.184167*
X2	-53.051 **	-0.3750	-0.0083	0.021667
X3	30.336	0.2083	1.3500*	0.062500
X4	7.635	-0.5000	-0.2333	-0.071667
X1 X1	-350.126**	-8.2708**	-2.7000**	0.705000**
X2 X2	38.377	0.5417	0.8500	0.141250
X3 X3	-75.245**	0.4167	-1.7375*	-0.002500
X4 X4	-3.244	0.1042	0.0125	0.003750
X1 X2	-56.553	0.8750	-1.6750	-0.167500
X1 X3	63.803*	-0.5000	2.3750	0.047500
X1 X4	18.435	0.6250	0.3250	-0.012500
X2 X3	-31.976	-0.5000	-0.3750	0.047500
X2 X4	32.213	-0.5000	-0.1250	-0.050000
X3 X4	-27.802	-0.3750	0.0000	0.032500

X 1 = Temperature X2 = Time X3 = Concentration X4 = pH

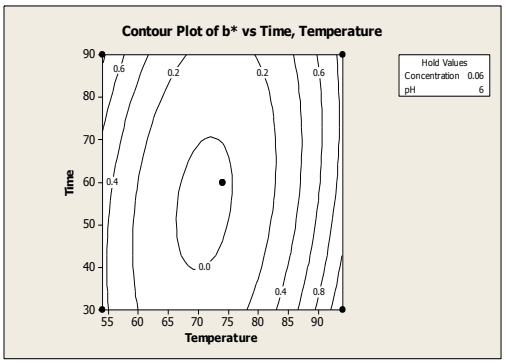
** ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 และ* ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 11 ค่า R-Sq ของผลตอบสนอง

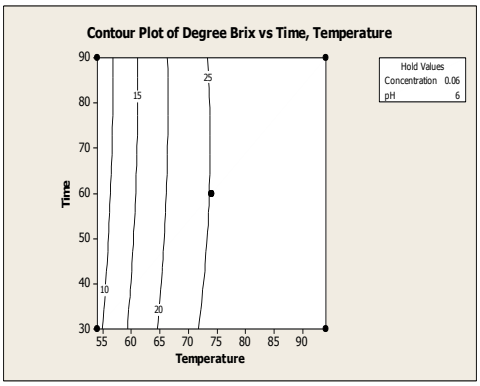
ตัวแปร	แอนโทไซยานินส์	TSS	ปริมาตร	b*
R-Sq	96.49%	98.14%	79.91%	80.30%
R-Sq (pred)	81.65%	90.97%	0.00%	0.00%
R-Sq (adj)	92.39%	95.96%	56.46%	57.31%
Lack-of-Fit (P)	0.563	0.778	0.267	0.109



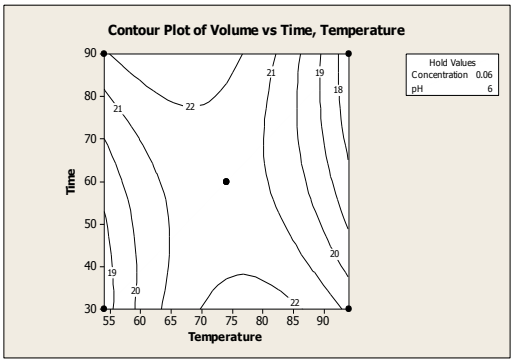
a



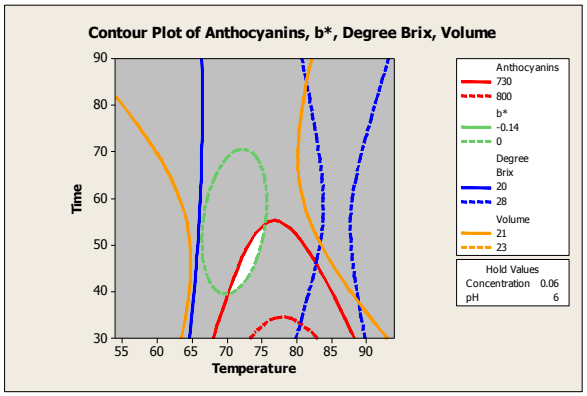
b



c



d



e

ภาพที่ 2 ภาพ a, b, c และ d แสดงคอนทัวร์ของแอนโทไซยานินส์, b* Color, TSS และ ปริมาตร และ e คือการซ้อนทับกราฟ ที่ความเข้มข้นเอนไซม์ 0.06% และ pH =6

ผลการสกัดด้วยสารละลายไซม์ ได้สมการผลตอบสนองของ ค่า แอนโทไซยานินส์ ค่า TSS pH ปริมาตร และค่าสีเฉพาะ b* เพราะว่าค่าสี L* และ a* ไม่น่าเชื่อถือ ดังตารางที่ 10 ค่าเหล่านี้เป็นค่าที่น่าเชื่อถือได้ เพราะ Lack-of-Fit ไม่แตกต่าง และค่า R-Sq เกิน 70% ดังตารางที่ 11 จากการทำแผนภาพคอนทัวร์ ดังภาพที่ 2 พบว่าการซ้อนทับกันของกราฟ แอนโทไซยานินส์ b* ค่าของแข็งที่ละลายน้ำได้ (°Brix) และปริมาตร ที่ความเข้มข้นของ

เอนไซม์ 0.06% และ pH =6 พบจุดตัด 3 จุด คือ 1) 70.33 °C เวลา 39.47 นาที 2) 72.67°C เวลา 47.24 นาที และ 3) 75.33°C เวลา 55.14 นาที จึงนำ 3 จุดนี้มาทำการทดลอง 2 ซ้ำในแผนการทดลอง แบบ CRD ที่ความเข้มข้น 0.06% และ pH =6 ระดับการเขย่า 180 strokes/นาที ได้ผล ดังตารางที่ 12 พบว่าแต่ละจุดให้ค่าไม่ต่างกัน จึงเลือกจุดที่ 1 มาศึกษาเพราะ ใช้อุณหภูมิต่ำสุด ศึกษาวิธีการเขย่า 3 ระดับ คือ 0 90 และ 180 strokes/นาที ทำ 2 ซ้ำในแผนการทดลอง แบบ CRD ได้ผล ดังตารางที่ 1 3 พบว่า จากค่าสถิติ การเขย่าให้ผลต่างกัน และเนื่องจากเป็นปัจจัยเชิงปริมาณ จึงสามารถศึกษาแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโทไซยานินส์ได้โดยใช้การวิเคราะห์พหุนามออร์โธกอนอล (อนันต์ชัย, 2539) โดยได้ฟังก์ชันพื้นผิวตอบสนองในเทอมของระดับการเขย่า ซึ่งเป็นตัวแปรธรรมชาติ ดังนี้ $\bar{Y}i. = 600.79+25.018\ N\ -0.15\ N^2$ การหาระดับที่เหมาะสมของการเขย่า ที่จะทำให้ได้แอนโทไซยานินส์สูงสุด กระทำโดยการหาอนุพันธ์ ของ $\bar{Y}i.$ เทียบกับ N แล้วให้เท่ากับ 0 จากนั้นแก้สมการเพื่อหาค่า N จะได้ 83.39

ตารางที่ 12 Volume (ml), TSS (°Brix) ค่า pH ค่าแอนโทไซยานินส์ (A, mg/1000g) ค่าสี (L* a* b*) ที่จุดตัดต่างกัน (ค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

จุดตัด	Volume	TSS	pH	A	L*	a*	b*
1	30.00± 0.71[a]	24.60± 0.28[a]	6.16± 0.02[a]	718.54± 51.14[a]	0.14± 0.01[b]	0.58± 0.11[b]	0.08± 0.01[b]
2	33.75± 1.77[a]	25.10± 0.14[a]	6.14± 0.04[a]	862.81± 9.21[a]	0.20± 0.04[b]	0.64± 0.09[b]	0.2± 0.02[ab]
3	30.38± 1.94[a]	24.30± 1.84[a]	6.13± 0.07[a]	693.03± 99.54[a]	0.36± 0.02[a]	1.72± 0.44[a]	0.35± 0.13[a]

ตารางที่ 13 Volume (ml), TSS (°Brix) ค่า pH ค่าแอนโทไซยานินส์ (A, mg/1000g) ค่าสี (L* a* b*) ที่การเขย่า (strokes/นาที) ต่างกัน (ค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

การเขย่า	Volume	TSS	pH	A	L*	a*	b*
0	34.00± 0.2[a]	23.90± 0.2[a]	6.08± 0.03[a]	939.50± 14.85[b]	0.22± 0.02[a]	0.95± 0.16[a]	-0.05± 0.19[a]
90	32.75± 0.4[a]	20.90± 0.24[a]	6.07± 0.04[a]	1016.02± 18.95[a]	0.23± 0.03[a]	1.04± 0.09[a]	-0.05± 0.020[a]
180	33.50± 0.4[a]	25.30± 0.25[a]	6.09± 0.05[a]	829.40± 29.14[c]	0.14± 0.04[a]	0.46± 0.018[b]	-0.14± 0.29[a]

4. การพัฒนาสูตรเครื่องดื่ม

เนื่องจากการใช้เอนไซม์ ให้ค่าแอนโทไซยานินส์สูงกว่าการใช้น้ำและกรดมากประมาณ 2 เท่า จึงเลือกการสกัดโดยใช้เอนไซม์ ในการทำเครื่องดื่ม โดยจะสกัด 2 รอบ รอบที่สอง ไม่ใส่เอนไซม์ แต่ใส่น้ำเท่ากันกับครั้งแรก นำสารละลายที่ได้มาทำเครื่องดื่ม ในการพัฒนาสูตรวางแผนการทดลองแบบ Mixture Design โดยกำหนดขอบเขตให้ น้ำสกัดข้าว 50-100 % น้ำต้มสกัดใบเตย (10%) 0-40% และน้ำเชื่อมน้ำตาลทราย (36%) 10-20 %

จึงทำได้ 5 สูตร คือ

สูตรที่ 1 น้ำสกัดข้าว 80 % น้ำสกัดใบเตย 0 % น้ำเชื่อมน้ำตาลทราย 20 %

สูตรที่ 2 น้ำสกัดข้าว 90 % น้ำสกัดใบเตย 0 % น้ำเชื่อมน้ำตาลทราย 10 %

สูตรที่ 3 น้ำสกัดข้าว 50 % น้ำสกัดใบเตย 30 % น้ำเชื่อมน้ำตาลทราย 20 %

สูตรที่ 4 น้ำสกัดข้าว 50 % น้ำสกัดใบเตย 40 % น้ำเชื่อมน้ำตาลทราย 10 %

สูตรที่ 5 น้ำสกัดข้าว 65 % น้ำสกัดใบเตย 20 % น้ำเชื่อมน้ำตาลทราย 15 %

ได้ผลการทดสอบพบว่า ผู้ชิมชอบสูตรที่ 5 มากที่สุด และได้คะแนนปานกลาง ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 การประเมินอัตราความชอบของเครื่องดื่ม (MEAN ± Std deviation)

สูตรที่	1	2	3	4	5
สี	5.35±1.18^{a}	5.17±1.07^{a}	5.37±1.12^{a}	5.04±1.36^{a}	5.30±1.36^{a}
กลิ่น	4.77±1.18^{a}	4.74±0.77^{a}	5.17±0.99^{a}	4.85±1.19^{a}	5.07±1.19^{a}
กลิ่นรส	4.83±1.00^{bc}	4.91±086^{bc}	5.22±0.77^{ab}	4.57±1.05^{c}	5.52±1.05^{a}
เนื้อสัมผัส	5.31±1.19^{ab}	5.04±1.22^{a}	5.52±1.22^{a}	5.00±0.87^{b}	5.56±0.87^{a}
ความชอบรวม	5.23±0.99^{ab}	5.19±0.90^{ab}	5.35±1.10^{ab}	4.96±1.17^{b}	5.59±1.17^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยตามแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกัน มีค่าแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

กากเอนไซม์หลังการสกัดครั้งที่ 1 มีแอนโท 563 มก./1000 ก. (นน.สด) แต่หลังจากสกัดครั้งที่ 2 ไม่พบเลย เนื่องจากแอนโทไซยานินส์ไม่ทนต่อความร้อน (วิญญู มมป.)

5. การศึกษาอายุการเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 เดือน

นำเครื่องดื่มสูตรที่ 5 มาบรรจุในขวดแก้ว บรรจุร้อนที่อุณหภูมิ 80- 90° C ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 116°C เวลา 30 นาที เปรียบเทียบที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่าไม่แตกต่างกันทุกลักษณะ ดังตารางที่ 15 จึงเลือกเฉพาะที่ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 116°C เวลา 30 นาที ซึ่งมีความชื้น 83.54% ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่ม ตลอดระยะเวลา 4 เดือน แสดงในตารางที่ 16 พบว่าผู้ชิมชอบน้อยลงเหลือเพียงชอบเล็กน้อยเท่านั้น แต่ไม่พบอันตรายทางจุลินทรีย์ คือ ไม่พบ *Clostridium Botulinum* ซึ่งเป็นตัวสำคัญของอาหารที่มีกรดต่ำ

ตารางที่ 15 การประเมินอัตราความชอบของเครื่องดื่มในการฆ่าเชื้อต่างกัน (MEAN ± Std deviation)

อุณหภูมิ	สี	กลิ่น	กลิ่นรส	เนื้อสัมผัส	ความชอบรวม
116 °C	5.82±1.18^{a}	5.53±1.07^{a}	5.65±1.12^{a}	6.0±1.36^{a}	5.71±1.36^{a}
121 °C	5.59±1.18^{a}	5.82±0.77^{a}	5.76±0.99^{a}	5.82±1.19^{a}	5.74±1.19^{a}

ตารางที่ 16 การประเมินอัตราความชอบของเครื่องดื่มในระหว่างการเก็บ (MEAN ± Std deviation)

เดือนที่	สี	กลิ่น	กลิ่นรส	เนื้อสัมผัส	ความชอบรวม
0	5.82±1.18^{a}	5.53±1.07^{a}	5.65±1.12^{a}	6.0±1.36^{a}	5.71±1.36^{a}
2	5.36±1.18^{ab}	5.04±0.77^{b}	5.23±0.99^{a}	5.50±1.19^{a}	5.23±1.19^{b}
4	5.29±1.18^{b}	4.74±0.77^{c}	5.17±0.99^{a}	4.85±1.19^{a}	5.07±1.19^{c}

ส่วนปริมาณแอนโทไซยานินส์ในเดือนที่ 0 มี 137.20 mg/L เดือนที่ 2 มี 99.02 mg/ L และเดือนที่ 4 มี 85.06 mg/ L และเดือนที่ 6 เหลือ 4.08 mg/ L ซึ่งลดลงมากตามลำดับ ส่วนค่าสี และ pH ในตารางที่ 16 พบว่า ค่า pH ไม่เปลี่ยนแปลง แต่ค่าสีมีค่าเพิ่มขึ้น ทุกค่า คือ มีสีคล้ำขึ้น อาจเนื่องจาก ปฏิกิริยาเมลลาร์ด หรือ ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Zamora and Hidalgo, 2005 และ Francis, 2000d) เพราะผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อแล้ว แต่บรรจุในขวดแก้วใส ซึ่งแม้จะเก็บในที่มืด อุณหภูมิห้องประมาณ 27-32℃ แต่ก็อาจได้รับแสง จึงทำให้มีสีคล้ำ

ตารางที่ 17 ค่าสี และ pH ของเครื่องดื่มในระหว่างการเก็บ

เดือนที่	L*	a*	b*	c*	h*	pH
0	4.54±0.99^{a}	14.35±1.00^{a}	6.90±1.11^{a}	15.92±4.85^{b}	25.68±2.3^{a}	6.02±2.3^{a}
2	6.31±1.21^{b}	16.63±1.22^{b}	9.68±0.98^{b}	19.25±2.13^{b}	30.21±1.99^{b}	5.95±2.3^{a}
4	8.82±0.95^{a}	17.43±1.05^{a}	13.49±0.89^{a}	22.04±2.10^{c}	37.75±1.98^{a}	5.88±2.3^{a}

สรุปและเสนอแนะ

สภาวะที่เหมาะสมการสกัดข้าวเหนียวดำด้วยน้ำและสารละลายกรดซิตริกพบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิ 30-46 °C และ ความเข้มข้นของกรด 0-0.1 % ของปริมาตรน้ำ และเวลาเขย่าที่ระดับ 180 strokes/นาที เป็น 15 นาที โดยใช้ปริมาณข้าวต่อน้ำคงที่ที่ 1: 2 สภาวะที่เหมาะสมของการสกัดข้าวเหนียวดำด้วยด้วยเอนไซม์อะไมเลส คือ อุณหภูมิ 70.33 ° C แขย่าที่ระดับ 83 strokes/นาที เป็นวลา 39.47 นาที และ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.01 % ของปริมาตรน้ำ และ pH 6 โดยใช้ปริมาณข้าวต่อน้ำคงที่ที่ 1: 2 โดยได้ปริมาณแอนโทไซยานินส์มากกว่าการสกัดด้วยน้ำและกรดซิตริกมาก สูตรเครื่องดื่มที่คนยอมรับมากที่สุด คือ น้ำสกัดข้าวด้วยเอนไซม์ 65% น้ำต้มสกัดใบเตย (10%) 20% น้ำเชื่อมน้ำตาลทราย (36%) 15% นำมาบรรจุในขวดแก้วทรงสูง ขนาด 220 มล. สามารถเก็บได้ไม่ต่ำกว่า 4 เดือนที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งเครื่องดื่มข้าวนี้ดื่มง่าย เหมาะกับการผลิตเชิงพาณิชย์ และควรศึกษาการบรรจุในกล่องเตตระแพคแบบ UHT เพื่อไม่ให้ถูกแสง และอาจจะมีแอนโทไซยานินส์เหลือมากขึ้น เพราะใช้ความร้อนสูง ระยะเวลาสั้น ส่วนกากที่เหลือสามารถนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆ เช่น สังขยา เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

กองโภชนาการ. 2547. คุณค่าทางโภชนาการของข้าวพันธุ์สังข์หยดพัทลุงเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าวเล็บนกปัตตานี. กรุงเทพมหานคร กรมอนามัย.

ดวงแก้ว ผุงเพิ่มตระกูล 2546 สกัด ข้าวหอมนิล" ผลิตแชมพูลดปัญหาผมหงอก-ร่วง-กระด้าง หนังสือพิมพ์ไทยรัฐ ฉบับวันจันทร์ที่ 22 กันยายน หน้า 7

บริบูรณ์ สัมฤทธิ์. 2542. ข้าวแดงหอม และมาตรฐานการปลูก. กรุงเทพมหานคร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

นิรนาม 1. 2544 น้ำข้าวกล้อง ผลิตภัณฑ์พื้นบ้าน วารสารกรมส่งเสริมอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม เดือนกันยายน-ตุลาคม

นิรนาม 2 มปป. Available from http://www.tarad.com/nokkakung/product.detail.php?id=851108 Accessed on 20/8/2008

นิรนาม 3. 2550. ข้าวก่ำ-ข้าวเหนียวดำ ขุมทรัพย์ทรัพยากรไทยที่ใกล้สูญพันธุ์ ข่าวสด 23ม.ค. หน้า 24

รสิตา โอสถานนท์ . 2550 ข้าวแดง อาหารเพื่อสุขภาพ อาหาร ปีที่ 37 ฉ. 1 หน้า 39-42

วิญญู โชครุ่งกาญจน์ ประสงค์ ศิริวงศ์วิไลชาติ เอกพันธ์ แก้วมณีชัย มมป. การศึกษาความคงตัวของแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุด *h*ttp://www.surdi.su.ac.th/sc73_t.htm Accessed on 12/10/2007

AOAC. 2000 Official Methods of Analysis. The Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia.

Bronnum-Hansen, K.,Jacobsen, F., and J.M. Flink. 1985. Anthocyanin colourants from elderberry (Sambucus nigra L.).1. Process considerations for production of the liquid extract. Journal of Food Technology. (20): 703-711.

Francis, F. J. 2000d. Enzymatic browning. Encyclopedia of Food Science and Technology (1) : 208-272.

Ichikawa, H. 2001. Antioxidant Activity of Anthocyanin Extract from Purple Black Rice. (on line). Available URL: http: //\\B7\my%20documents\Etrez%20 PubMed. Htm

Giusti, M.M. and R.E. Wrolstad. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: R.E. Wrolstad, T.E. Acree, E.A. Decker, M.H. Penner, D.S. Reid, S.J. Schwartz, C.F. Shoemaker, D. Smith and P. Sporns, Editors, Handbook of food analytical chemistry: Pigments, colorants, flavors, texture, and bioactive food components, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey (2005).

Meltiver, R.P., F.J. Francis and F.M. Clydesdale. 1980. Solvent extractionof anthocyanins from wine pomace. Journal of Food Science. (40): 1099-1100

Mozetic, B.; P.Trebse, and ,J. Hribar. 2002. Determination and Quantitation of Anthocyanins and Hydroxycinnamic Acids in Different Cultivars of Sweet Cherries (Prunus avium L.) from Nova Gorica Region (Slovenia) Food Technol. Biotechnol. (40): 207-212.

Reddy, A.R. 1996. Genetic and Molecular Analysis of the Anthocyanin PigmentationPathway in Rice. (on line.) Available URL :http: www. PubMed.com

http://ittm.dtam.moph.go.th/product_champion/herb2.htm

Tananuwong, K. and W. Tewaruth. 2010. Extraction and application of antioxidants from black glutinous rice LWT - Food Science and Technology. 43(3): 476-481.

Zamora, R. and F. J. Hidalgo. 2005. Coordinate contribution of lipid oxidation and Maillard reaction to the non-enzymatic food browning. Cri. Rev. Food Sci. Nutri. (45): 49-59.

ภาคผนวก

การวิเคราะห์ Cyanidin-3- glucoside chloride (Kurananim Chloride) โดย HPLC

1. เตรียมสารมาตรฐาน Cyanidin-3- glucoside chloride 500 ppm.,1000 ppm 2500 ppm และ 5000 ppm. ปริมาตร 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น deionize นำสารละลายที่ได้กรองด้วย membrane filter ขนาด ϕ 0.45 μm
2. ชั่งตัวอย่าง 1-2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 ml ปิดจุกให้แน่น เขย่าให้ละลายเข้ากันเครื่อง Vortex mixer 1 นาที สกัดสารตัวอย่างด้วยเครื่อง ultrasonic 15 นาที เขย่าด้วยเครื่อง Vortex mixer 1 นาที ทิ้งให้ตะกอนนอนก้น นำสารละลายใส มาเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge 4500 rpm 20 นาที ดูดของเหลวใสมากรอง ด้วย membrane filter ขนาด ϕ 0.45 μm
3. นำตัวอย่างฉีดเข้าเครื่อง HPLC. ครั้งละ 5μL. ชะด้วยความเร็วของตัวทำละลายที่ flow rate 0.9 มิลลิลิตร/นาที ใช้ ODS Hypersil particle size 5μm. ID 4.6 mm Length 250 mm เป็น Column โดยมี Mobile phase เป็น Acetronitrile : 5% Formic acid:น้ำกลั่น deionized ในอัตราส่วน 25 :50:25 ตรวจวัดพีคของสารละลายที่ได้ด้วย Diode array spectrophotometer detector ที่ความยาวคลื่น 520 nm.ใช้เวลาในการแยกประมาณ 8 นาที
4. การทำ calibration cruve สารละลายมาตรฐาน Cyanidin-3- glucoside chloride
โดยใช้ความเข้มข้นระดับต่างๆ 0 ppm., 500 ppm.,1000 ppm. และ 2500 ppm นำมา plot เป็น calibration graph สำหรับใช้เทียบหาความเข้มข้นของตัวอย่างที่ไม่ทราบต่อไป
5. การควบคุมคุณภาพ โดยตรวจสอบ Linear calibration cruve วิเคราะห์ซ้ำ ตรวจ recovery ตรวจสอบ retention time ของสารที่ตรวจวัดต้องอยู่ในช่วงที่กำหนดและสม่ำเสมอ หา % RSD ศึกษาความแม่นยำของการวิเคราะห์
6. การคำนวน (Calculation)

$$\text{ความเข้มข้น,ppm.} = \frac{C * V1 * 1000}{Wt * V2}$$

C = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่อ่านค่าได้จากกราฟ (มิลลิกรัม)

V1 = ปริมาตรสารละลายที่สกัดจากตัวอย่าง (มิลลิลิตร) Wt =น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

V2 = ปริมาตรสารละลายที่ฉีดเข้าเครื่อง HPLC (มิลลิลิตร)