

เสถียรภาพของสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ผ่านการห่อหุ้มด้วยโปรตีนรำข้าวเข้มข้นภายใต้สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างและความร้อนที่แตกต่างกัน

Stability of anthocyanin extract from riceberry rice bran encapsulated with rice bran protein concentrate under different pH and heating conditions

สุภาพร พาเจริญ^{1*}
Supaporn Pajareon^{1*}

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเสถียรภาพของสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ (RRBE) สารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ห่อหุ้มด้วยมอลโตเดกซ์ทริน (RRBE กับ MD) และสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ห่อหุ้มด้วยโปรตีนรำข้าวเข้มข้นผสมมอลโตเดกซ์ทรินที่อัตราส่วน 80 ต่อ 20 โดยน้ำหนัก (RRBE กับ RBPc:MD) ภายใต้สภาวะของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความร้อนที่แตกต่างกัน พบว่าค่า pH มีผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินในทุกตัวอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดย pH ที่แอนโทไซยานินมีความคงตัวคือที่ค่า pH เท่ากับ 1 และ 4 แต่ไม่คงตัวที่ค่า pH เท่ากับ 9 โดยที่ค่า pH เท่ากับ 9 ในตัวอย่าง RRBE และตัวอย่าง RRBE กับ RBPc:MD มีการลดลงของแอนโทไซยานินเท่ากับ 42.58 และ 22.57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนั้นอุณหภูมิหรือความร้อน ก็มีผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการให้ความร้อนกับตัวอย่างที่อุณหภูมิ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส มีผลทำให้แอนโทไซยานินสลายตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยแอนโทไซยานินใน RRBE ที่ไม่ห่อหุ้มมีความคงตัวน้อยกว่าใน ตัวอย่าง RRBE กับ RBPc:MD โดยภาพรวมจากผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าการห่อหุ้มสารสกัดจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ด้วยโปรตีนรำข้าวเข้มข้นและมอลโตเดกซ์ทริน ช่วยลดการสูญเสียของแอนโทไซยานินจากผลของค่าความเป็นกรด-ด่างและความร้อนได้

คำสำคัญ: สารสกัดรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ แอนโทไซยานิน โปรตีนรำข้าว ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความร้อน ความคงตัว

Abstract

The objectives of this research were to study the effect of different pH and heating conditions on the stability of anthocyanin extract from riceberry rice bran (RRBE), RRBE encapsulated with maltodextrin (RRBE with MD) and RRBE encapsulated rice bran protein concentrate (RBPc) plus maltodextrin at a ratio of 80:20 by weight (RRBE with RBPc plus MD). The results showed that pH value significantly affected the anthocyanin stability ($p < 0.05$). Anthocyanin was stable at pH 1 and 4; however, it was unstable at pH 9. At pH 9, the losses of anthocyanin in RRBE

¹ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ พระนครศรีอยุธยา

¹ Faculty of Agricultural Technology and Agro-Industry, Rajamangala University of Technology Suvannabhum, Phra Nakhon Si Ayutthaya

* Corresponding author. E-mail: Supapompa24@gmail.com

Received: October 1, 2019; Revised: October 24, 2019; Accepted: November 21, 2019

with RBPC plus MD and RRBE with RBPC plus MD were 42.58 and 22.57, respectively. Temperature or heating levels also significantly affected the anthocyanin stability ($p < 0.05$). After heating at 70, 80 and 90 °C, the results showed that heating at 90 °C, anthocyanin in HRBE was much less stable than that in HRBE encapsulated with RBPC:MD. In overall, the results indicated that encapsulation of HRBE with RBPC:MD could protect against the loss of anthocyanin in HRBE due to the effect of different pH and heating conditions.

Keywords: riceberry rice bran extract, anthocyanin, rice bran protein concentrate, pH, heat, stability

บทนำ

ปัจจุบันข้าวที่มีสารสีเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยชนิดหนึ่งทั้งในเรื่องของตลาดการส่งออก และคุณค่าทางโภชนาการ ซึ่งจะเห็นได้ชัดว่าปัจจุบันผู้บริโภคสมัยใหม่ใส่ใจในสุขภาพกันมากขึ้น แต่เหตุผลที่ผู้บริโภคประสบกับข้าวที่มีสารสีทั้งเมล็ดกันน้อยเนื่องจากเมื่อนำไปหุงแล้วข้าวที่มีสีนั้นยังมีเนื้อสัมผัสที่แข็ง เมื่อพิจารณาให้ละเอียดยิ่งขึ้นแล้วจะพบว่า ยังมีแนวทางที่จะพัฒนาการใช้ประโยชน์จากข้าวที่มีสีให้มากยิ่งขึ้น เพื่อเป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์นวัตกรรมอาหาร และเป็นการเพิ่มทางเลือกให้แก่ผู้บริโภคในการเลือกรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ โดยข้าวที่มีสารสียังเป็นแหล่งสารให้สีที่เรียกว่า แอนโทไซยานิน (anthocyanin) ซึ่งเป็นสารให้สีและมีคุณสมบัติในการต้านการเกิดออกซิเดชัน สามารถนำมาสกัด และใช้ประโยชน์ได้ Hou, Qin, Zhang, Cui, & Ren (2013) ได้ทำการศึกษาการสกัดแอนโทไซยานินจากข้าวดำในส่วนต่างๆ คือ ข้าวทั้งเมล็ด คัพพะ และรำข้าว พบว่าในส่วนของรำข้าวมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุดคือ 7.07 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 1 กรัม และ Abdel-Aal, & Hucl (1999) ได้ทำการศึกษาวิธีการ สกัดแอนโทไซยานินจากส่วนของรำและคัพพะ ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการขัดสีข้าวสาลี โดยการสกัดแอนโทไซยานินสามารถใช้ตัวทำละลาย

ได้หลายตัว เช่น เมทานอล อะซีโตน เอทานอล และน้ำ เพื่อให้ได้แอนโทไซยานินใกล้เคียงกับธรรมชาติ โดยพบว่าเมทานอลมีประสิทธิภาพในการสกัดมากกว่าเอทานอลและน้ำ อย่างไรก็ตามการสกัดโดยใช้น้ำเหมาะสมสำหรับนำมาใช้กับอาหารมากกว่า เนื่องจากมีความปลอดภัยกับผู้บริโภค (Giusti, & Jing, 2008) นอกจากนี้สารให้สียังมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา เช่น เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ด้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidant) สามารถลดอาการอักเสบ (anti-inflammatory) ช่วยปกป้องหลอดเลือดลดคอเลสเตอรอลในเลือด ลดความเสี่ยงของโรคหัวใจและต้านไวรัส เป็นต้น โดยสารสกัดจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่นั้นเป็นสารสกัดจากธรรมชาติซึ่งมีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันโดยแอนโทไซยานิน มีประสิทธิภาพในการต้านการเกิดออกซิเดชันสูงกว่าวิตามินซีและอีถึง 2 เท่า (Wang et al., 2017) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระก็ขึ้นอยู่กับเสถียรภาพของสารดังกล่าว เนื่องจากความร้อนที่สูงทั้งในระหว่างกระบวนการผลิต และการจัดเก็บอาจส่งผลทำให้สมบัติต่างๆ ดังกล่าวสูญเสียได้ เช่น อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อลดอัตราการเสื่อมเสีย หรือเพิ่มเสถียรภาพให้กับสารดังกล่าว (Martynenko, & Chen, 2016) ซึ่งโดยทั่วไปในอุตสาหกรรมใช้การห่อหุ้ม

(encapsulation) เช่น เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray-drying) เพื่อลดปฏิกิริยาของวัตถุที่ถูกเคลือบจากปัจจัยต่างๆ ในสิ่งแวดล้อม โดยชนิดของสารเคลือบ (wall materials) และอัตราส่วนระหว่างวัตถุที่ถูกเคลือบกับสารเคลือบเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการห่อหุ้ม

การห่อหุ้ม คือกระบวนการที่อนุภาค หรือหยดขนาดเล็กถูกล้อมรอบด้วยการเคลือบ (coat) หรือเก็บไว้ภายใน (embed) ในโครงสร้างที่เป็นเนื้อเดียวกันหรือไม่เป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้ได้ลักษณะอนุภาคที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ ทั้งนี้วัตถุที่ถูกเคลือบหรือที่เรียกว่า core นั้น อาจเป็นวัตถุชนิดเดียวหรือมีส่วนประกอบหลากหลายก็ได้ ซึ่งส่วนใหญ่มักเป็นกลี้นหรือสารที่ไม่ละลายน้ำ แต่สารที่ละลายน้ำรวมถึงเชื้อจุลินทรีย์ ก็สามารถนำมาห่อหุ้มได้ ส่วนสารที่ใช้ห่อหุ้มหรือสารเคลือบ ก็อาจมีลักษณะเป็นชั้นเดียวหรือหลายชั้น การประยุกต์ใช้เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย ในการห่อหุ้มสารด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย เกี่ยวข้องกับขั้นตอนต่างๆ ได้แก่ ขั้นตอนการเตรียมของเหลว สารละลาย หรืออิมัลชัน ขั้นตอนการผสมให้เข้ากัน ขั้นตอนการฉีดให้เป็นละอองฝอย และสุดท้ายขั้นตอนการระเหยแห้ง (Ferreira et al., 2016) วัสดุเคลือบส่งผลต่อประสิทธิภาพในการห่อหุ้ม รวมถึงเสถียรภาพของสาร core ใน ระหว่างการจัดเก็บ ทั้งนี้ สารเคลือบที่นิยมใช้จะเป็นกลุ่มสารประกอบของคาร์โบไฮเดรต เช่น สตาร์ช มอลโทเดกซ์ทริน อย่างไรก็ตาม วัสดุเคลือบดังกล่าวขาดคุณสมบัติในเชิงแรงตึงผิว (interfacial) และวัสดุเคลือบที่นิยมยังไม่มีคุณค่าทางโภชนาการ ซึ่งอาจต้องทำการดัดแปรทางเคมีเพื่อเพิ่มสมบัติดังกล่าว ในขณะที่โปรตีนในรำข้าวซึ่งเป็นวัสดุ

เหลือทิ้งทางการเกษตรแต่มีคุณค่าทางโภชนาการ โปรตีนรำข้าวจัดเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพดี และยังจัดเป็น hypoallergenic food protein คือไม่ทำให้เกิดอาการแพ้ (Esmaeili, Rafe, Shahidi, & Hasan-Saraei, 2016) และได้มีการศึกษาการนำโปรตีนรำข้าวเข้มข้นมาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเด็กอ่อน โปรตีนรำข้าวมีกรดอะมิโนที่จำกัด (limiting amino acid) คือทรีโอนีน และไอโซลิวซีน โปรตีนรำข้าวเป็นโปรตีนที่มีปริมาณกรดอะมิโนไลซีนสูงประมาณ 62.70-70.80 มิลลิกรัมต่อกรัมโปรตีน โปรตีนรำข้าวถือเป็นโปรตีนคุณภาพดีเมื่อเปรียบเทียบกับเคซีนซึ่งเป็นโปรตีนจากนม โดยเทียบจากปริมาณ และชนิดของกรดอะมิโนที่จำเป็น (Kaewka, Therakulkait, & Cadwallader, 2009)

Betz, & Kulozik (2011) ได้ศึกษาการห่อหุ้มแอนโทไซยานินโดยใช้โปรตีนหางนมเป็นสารห่อหุ้ม จากผลการทดลองพบว่า สามารถรักษาเสถียรภาพของสารแอนโทไซยานินได้ในระหว่างการเก็บรักษา จากงานวิจัยดังกล่าว จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้ประโยชน์นำมาใช้เป็นวัสดุเคลือบเช่นเดียวกัน ดังนั้น จึงได้ทำการห่อหุ้มโดยใช้โปรตีนรำข้าวเข้มข้นเป็นสารห่อหุ้ม เพื่อตรวจสอบความสามารถในการรักษาเสถียรภาพของสารสำคัญในสารสกัดจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่

การนำสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่มาทำแห้งอยู่ในรูปผงนั้นยังไม่มีข้อมูลด้านเสถียรภาพต่อการใช้งาน ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงเพื่อศึกษาเสถียรภาพของสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวที่มีสีที่ห่อหุ้มด้วยโปรตีนรำข้าวเข้มข้นภายใต้สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง และความร้อนที่แตกต่างกัน ต่อปริมาณแอนโทยานิน สารประกอบฟีนอลิก และคุณสมบัติการต้านการเกิดออกซิเดชัน เพื่อนำไป

ประยุกต์ใช้เติมลงในผลิตภัณฑ์ หรือการบริโภคของผู้บริโภค ซึ่งนอกจากจะเป็นการใช้ รำข้าวที่มีสารสีให้เป็นประโยชน์และเพิ่มมูลค่าของรำข้าวแล้ว ยังเป็นแนวทางและทางเลือกในการนำองค์ความรู้ที่ได้จากโครงการวิจัยไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมและเชิงพาณิชย์ต่อไป

วิธีการศึกษา

1. การศึกษาการเตรียมสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย

1.1 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่

สกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Worsstad, Durst, & Lee (2005) นำรำข้าวไรซ์เบอร์รี่มาผ่านการขัดสีและร่อนหลังจากนั้นสกัดโดยใช้อัตราส่วนระหว่างรำข้าวต่อตัวทำละลายกรดซิตริก 2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่อัตราส่วน 1 ต่อ 5 ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.2 การเตรียมโปรตีนรำข้าวเข้มข้น

1.2.1 การเตรียมรำข้าวสกัดไขมันในห้องปฏิบัติการ

นำรำข้าวสดมาร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh จากนั้นนำมาสกัดด้วยเฮกเซน อัตราส่วนรำข้าวต่อเฮกเซน เป็น 1 ต่อ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรด้วยเครื่องผสมแบบใบกวน ที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 8,000×g อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนมาสกัดซ้ำด้วยเฮกเซนอีก

1 รอบ นำตะกอนที่ได้วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำมาบดแล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh บรรจุในถุงโพลีเอทิลีน จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะถูกนำมาใช้ (ดัดแปลงจากวิธีของ Rafe, & Sadeghian, 2017)

1.2.2 การเตรียมโปรตีนรำข้าวเข้มข้น

นำรำข้าวที่ผ่านการสกัดไขมันจากข้อ 1.2.1 มาสกัดโปรตีนด้วยน้ำกลั่น อัตราส่วนรำข้าวต่อน้ำกลั่นเป็น 1ต่อ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปรับค่า pH เป็น 9.50 ด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล กวนด้วยเครื่องผสมแบบใบกวนที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 นาที โดยควบคุมค่า pH เป็น 9.50 ตลอดระยะเวลาที่ทำการสกัด จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 10,000×g อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสมาปรับค่า pH เป็น 4.50 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มัล แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 15,000×g อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (Rafe, & Sadeghian, 2017) นำตะกอนโปรตีนรำข้าวเข้มข้นที่ได้ไปศึกษาในขั้นตอนถัดไป

1.2.3 การเตรียมการผลิตแอนโทไซยานินแบบผงด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอยโดยศึกษาผลของอัตราส่วนของโปรตีนรำข้าวเข้มข้นร่วมกับมอลโทเด็กซ์ทรีนในการห่อหุ้มสารแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่

นำตัวอย่างสารสกัดจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส แล้วนำมาทำละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปใช้ นำโปรตีนรำข้าว

เข้มข้นที่ได้จากข้อ 1.2.2 มาผสมกับมอลโทเด็คซ์ทริน และสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ได้จากข้อ 1.2.1 นำมาผสมกันในอัตราส่วนของโปรตีนรำข้าวเข้มข้นต่อมอลโทเด็คซ์ทริน ในอัตราส่วน 80:20 หลังจากนั้นจึงห่อหุ้มสารด้วยวิธีทำแห้งแบบพ่นฝอยด้วยเครื่อง ทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยอุณหภูมิลมเข้า 120 องศาเซลเซียส ความดัน 1.80 บาร์ และอัตราการไหลของตัวอย่างเข้าเครื่อง 222 มิลลิลิตรต่อวินาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2. เพื่อศึกษาสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง และการให้ความร้อน ที่มีผลต่อสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ห่อหุ้มด้วยโปรตีนรำข้าวเข้มข้น

2.1 ผลกระทบของค่า pH ต่อเสถียรภาพของการห่อหุ้มสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ด้วยโปรตีนรำข้าวเข้มข้น

นำสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวมีสีที่ห่อหุ้มด้วยโปรตีนรำข้าวเข้มข้นมาละลายน้ำกลั่นและมาปรับ pH ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH ให้เท่ากับ 1, 4, 7 และ 9 โดยใช้อัตราส่วนระหว่างสารสกัดและสารละลายบัฟเฟอร์ในแต่ละ pH เป็น 1.2 ต่อ 100 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เกิดสภาวะสมดุลเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ต่อไป

2.2 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของการห่อหุ้มสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ด้วยโปรตีนรำข้าวเข้มข้น

นำสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวมีสีที่ห่อหุ้มด้วยโปรตีนรำข้าวเข้มข้นมาละลายน้ำกลั่นมาปรับค่า pH เป็น 4 จากนั้นนำสารสกัดทั้งหมดไปให้

ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 120 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3. วิเคราะห์สารปริมาณแอนโทไซยานินและความสามารถในการเกิดออกซิเดชัน

3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (total anthocyanin content) ตามวิธีที่ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Worsstad, Durst, & Lee, (2005) ตรวจวัดปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดโดยวิธี pH-differential โดยปรับระดับความเจือจางของตัวอย่างในสารละลายบัฟเฟอร์ของโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ ที่ pH เท่ากับ 1.0 และ 0.40 โมลาร์ และสารละลายบัฟเฟอร์ของโซเดียมอะซิเตตที่ pH เท่ากับ 4.50 จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รายงานผลในรูปของ monomeric anthocyanins pigment (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง)

3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compounds) ตามวิธีที่ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Floegel, Kim, Chung, Koo, & Chun (2011) ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดตรวจสอบโดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน และรายงานผลเป็น มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกในตัวอย่าง 100 กรัม (มิลลิกรัมแกลลิกอีควิวาเลนต์ต่อ 100 กรัมตัวอย่าง)

3.3 การวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging assay) ตามวิธีที่ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Kong, & Junsoo (2010) โดยศึกษาค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงของสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่เสถียร มีสีม่วงเข้มดูดกลืนแสง

ได้ที่มีความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่สามารถให้อิเล็กตรอนแก่ DPPH แล้วจะเกิดเป็นสารประกอบที่เสถียร ทำให้สีม่วงจางลง ซึ่งตรวจสอบได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง นำสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร จำนวน 50 ไมโครลิตรใน 96-well microplates ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (inhibition) = $A_0 - A_c / A_0 \times 100$

โดย A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของ DPPH
 A_c คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง
 ที่ทำปฏิกิริยากับ DPPH

4. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (complete random design: CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance: ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS for Windows version 16

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

1. ผลของค่า pH ต่อเสถียรภาพของสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ห่อหุ้มด้วยโปรตีนรำข้าวเข้มข้น

นำตัวอย่างทั้งหมด ได้แก่ สารสกัดรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ (RRBE) สารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ห่อหุ้มด้วยมอลโทเดกซ์ทริน (RRBE กับ MD) และสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ห่อหุ้มด้วยโปรตีนรำข้าวเข้มข้น (RRBE กับ RBPc:MD) มาละลายน้ำกลั่นและปรับค่า pH ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ให้ได้ค่า pH เท่ากับ 1, 4, 7 และ 9 ตามลำดับ โดยใช้อัตราส่วนระหว่างสารสกัดและสารละลายบัฟเฟอร์ในแต่ละ pH เป็น 1.20 ต่อ 100 โดยปริมาตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เกิดสภาวะสมดุลเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (TAC) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ตามลำดับ จากผลการทดลอง (Table 1 and 2) พบว่าค่า pH มีผลต่อปริมาณแอนโทไซยานินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยค่า pH ที่เหมาะสมและทำให้แอนโทไซยานินมีความคงตัวมากที่สุด อยู่ในช่วงค่า pH เท่ากับ 1 และ 4 แต่ไม่มีความคงตัว ที่ค่า pH เท่ากับ 9 ตามลำดับ ซึ่งในตัวอย่างสารสกัดจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่พบว่าการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดอยู่ในช่วง 385.47-221.32 มิลลิกรัมไซยานินดินต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ตัวอย่างสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ห่อหุ้มด้วยมอลโทเดกซ์ทรินมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 255.15-180.76 มิลลิกรัมไซยานินดินต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ตัวอย่างสารสกัดจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ห่อหุ้มด้วยโปรตีนรำข้าวเข้มข้นและมอลโทเดกซ์ทริน ในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 มีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด อยู่ในช่วง 259.89-201.22 มิลลิกรัมไซยานินดินต่อ 100

กรัมตัวอย่าง โดยอัตราการลดลงของแอนโทไซยานินที่ค่า pH เท่ากับ 9 มีปริมาณมากที่สุดในตัวอย่งสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ (RRBE) สารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ห่อหุ้มด้วยมอลโตเดกซ์ทริน (RRBE กับ MD) และสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ห่อหุ้มด้วยโปรตีนรำข้าวเข้มข้น (RRBE กับ MD:RBPc) มีค่าลดลงเท่ากับ 42.58, 29.16 และ 22.57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นได้ชัดในตัวอย่งที่ห่อหุ้มด้วยโปรตีนรำข้าวเข้มข้นมีอัตราการลดลงของแอนโทไซยานินน้อยที่สุด ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพในการปกป้องสาระสำคัญ เช่น แอนโทไซยานินได้ จากงานวิจัยของ Devi, Saravanakumar, & Mohandas (2012) ได้ศึกษาผลของค่า pH ที่มีผลต่อความคงตัวของรำซอร์กัม (sorghum) พบว่ามีความคงตัวในสภาวะที่เป็นกรดเนื่องจากอยู่ในรูปแบบของ

flavylium cation ส่วนในสภาวะที่เป็นเบส แอนโทไซยานินจะเปลี่ยนรูปแบบไปเป็น carbinol pseudobase นั้นเอง นอกจากนั้นมีการศึกษาค้นคว้าปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของแอนโทไซยานิน พบว่าปัจจัยทางเคมีและฟิสิกส์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของแอนโทไซยานินมีผลต่อความเสถียรของแอนโทไซยานิน คือ ความเป็นกรด-เบส Palakajornsak (2004) ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินที่สกัดจากเปลือกมังคุด ได้แก่ pH อุณหภูมิและแสง จากการทดลองพบว่าที่ pH ต่ำ (pH 1.0) แอนโทไซยานินจะมีความคงตัวมากกว่าที่ pH สูง (pH 4.0) ที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) แอนโทไซยานินจะมีสภาพคงตัวมากกว่าที่อุณหภูมิสูง (30 องศาเซลเซียส) และในสภาพที่ไม่มีแสงแอนโทไซยานินจะคงตัวมากกว่าที่มีแสง

Table1 Effect of different pH values on bioactive compound and antioxidant property (TPC, TAC and % DPPH).

sample	pH	TPC (mg GAE/100g)	TAC (mg cyanidin/100g)	DPPH (% inhibition)
RRBE	1	325.84±0.12 ^a	385.47±0.65 ^a	87.13±0.86 ^a
RRBE with MD	1	250.47±0.76 ^c	255.15±0.76 ^b	80.00±0.76 ^b
RRBE with RBPc:MD	1	260.43±0.43 ^c	259.89±0.38 ^b	82.9±0.76 ^b
RRBE	4	320.43±0.11 ^a	350.65±0.76 ^a	86.42±0.68 ^a
RRBE with MD	4	250.40±0.98 ^c	251.15±0.43 ^b	79.00±0.68 ^b
RRBE with RBPc:MD	4	260.00±0.55 ^c	257.82±0.19 ^b	82.20±0.23 ^b
RRBE	7	303.23±0.21 ^{ab}	290.45±0.76 ^a	70.56±0.68 ^c
RRBE with MD	7	245.80±0.93 ^d	230.32±0.78 ^b	76.72±0.21 ^b
RRBE with RBPc:MD	7	259.32±0.58 ^c	250.25±0.54 ^b	80.32±0.99 ^b
RRBE	9	301.2±0.45 ^b	221.32±0.73 ^c	59.39±0.32 ^d
RRBE with MD	9	243.12±0.33 ^d	180.76±0.46 ^c	70.21±0.57 ^c
RRBE with RBPc:MD	9	258.02±0.33 ^c	201.22±0.11 ^c	78.45±0.68 ^b

Note: Means ± SD with different letters (a-c) are significantly different (p<0.05).

Table 2 Losses (%) of TPC, TAC and DPPH radical scavenging activity of RRBE, RRBE with MD, RRBE and RBPc : MD (80:20) at various pH value.

sample	pH	TPC (mg GAE/100g)	TAC (mg cyanidin/100g)	DPPH (% inhibition)
RRBE	1	0 ^c	0 ^d	0 ^d
	4	1.66 ^b	9.03 ^c	0.81 ^c
	7	6.93 ^a	24.65 ^b	19.02 ^b
	9	7.50 ^a	42.58 ^a	31.84 ^a
RRBE with MD	1	0 ^{NS}	0 ^c	0 ^b
	4	0.02 ^{NS}	1.57 ^c	1.25 ^b
	7	1.86 ^{NS}	9.73 ^b	4.10 ^{ab}
	9	2.93 ^{NS}	29.16 ^a	8.49 ^a
RRBE with RBPc:MD	1	0 ^{NS}	0 ^b	0 ^b
	4	0.16 ^{NS}	0.80 ^b	0.84 ^b
	7	0.40 ^{NS}	3.71 ^b	3.11 ^a
	9	0.92 ^{NS}	22.57 ^a	5.37 ^a

Note: Means $\pm$ SD with different letters (a-e) are significantly different ($p < 0.05$). NS is non-significant difference.

2. ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของการสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ผ่านการห่อหุ้มด้วยโปรตีนรำข้าวเข้มข้น

นำตัวอย่างทั้งหมด มาละลายน้ำกลั่น จากนั้น สารสกัดทั้งหมดไปให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ TPC, TAC และค่า DPPH radical scavenging activity จาก (Table 3 and 4) พบว่า RRBE มีความคงตัวค่อนข้างน้อยต่อความร้อน น้อยกว่าที่ห่อหุ้มด้วย MD และ RBPc: MD ซึ่งอุณหภูมิที่สูงขึ้นเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากสีแดงไปเป็นสีน้ำตาล สีของแอนโทไซยานินมีความคงตัวที่อุณหภูมิต่ำ โดยการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของแอนโทไซยานิน แบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม คือ การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70, 80 และ

90 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส มีผลทำให้แอนโทไซยานินสลายตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่าลดลงในตัวอย่างสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ห่อหุ้มด้วยมอลโตเดกซ์ทรินและสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ห่อหุ้มด้วยโปรตีนรำข้าวเข้มข้นเท่ากับ 63.3, 25.06 และ 16.07 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยในตัวอย่างห่อหุ้มด้วยโปรตีนรำข้าวเข้มข้นมีการลดลงของแอนโทไซยานินน้อยที่สุด สรุปได้ว่าการห่อหุ้มแอนโทไซยานินโดยใช้โปรตีนรำข้าวเข้มข้นสามารถปกป้องสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีกว่าที่ไม่มีการห่อหุ้ม Jiang et al. (2019) ได้ศึกษาความคงตัวของแอนโทไซยานินจากสารสกัดจากมันม่วงที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส พบว่ามีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เนื่องจากแอนโทไซยานินมีความคงตัวในอุณหภูมิต่ำกว่ามากกว่า และ Nuzhet, & Erdogan (2006) ได้ศึกษาผลของ pH และอุณหภูมิที่ผลในการสกัดสารสกัดจากแครอทสีม่วง (*Daucus carotavar. L.*) พบว่าสามารถสกัดได้ดีที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส โดย Roobha, Saravanakumar, Aravindhan, & Devi (2011) ได้อธิบายไว้ว่าเนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อการสลายตัวของแอนโท-

ไซยานิน ที่อุณหภูมิสูงทำให้โครงสร้างของแอนโทไซยานินเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยจะไปเร่งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชัน (hydrolyzation) ของ 3-glucoside ทำให้ flavylum cation เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็น chalcone ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความคงตัวน้อยและสลายตัวกลายเป็นสารประกอบสีน้ำตาลของสารฟีนอลิกในธรรมชาติที่ไม่สามารถละลายน้ำได้และไม่คงตัว

Table 3 Effect of temperature levels on bioactive compounds and antioxidant property (TPC, TAC and % DPPH).

sample	temperature (°C)	TPC (mg GAE/100g)	TAC (mg cyanidin/100g)	DPPH (% inhibition)
RRBE	70	310.76±0.04 ^a	385.47±0.43 ^a	84.45±0.43 ^c
RRBE with MD	70	287.34±0.21 ^b	223.43±0.21 ^d	78.23±0.97 ^b
RRBE with RBPc:MD	70	301.23±0.45 ^b	220.78±0.76 ^d	82.45±0.11 ^a
RRBE	80	279.43±0.23 ^b	234.10±0.13 ^c	69.19±1.01 ^e
RRBE with MD	80	250.41±0.76 ^c	200.15±0.99 ^b	69.34±0.23 ^d
RRBE with RBPc:MD	80	289.42±0.13 ^b	215.03±0.43 ^b	78.43±0.45 ^{bc}
RRBE	90	233.89±0.43 ^d	141.45±0.33 ^f	42.34±0.76 ^f
RRBE with MD	90	250.11±0.78 ^c	167.43±0.32 ^c	61.68±0.77 ^e
RRBE with RBPc:MD	90	275.21±0.81 ^b	185.30±0.11 ^c	69.11±0.35 ^c

Note: Means ± SD with different letters (a-c) are significantly different (p < 0.05).

Table 4 %loss of TPC, TAC and DPPH scavenging activity of RRBE, RRBE with MD, RRBE with RBPc:MD (80:20) at various temperature before heating.

sample	temperature (°C)	TPC (mg GAE/100g)	TAC (mg cyanidin/100g)	DPPH (% inhibition)
RRBE	70	0 ^c	0 ^c	0 ^c
	80	10.08 ^b	39.27 ^b	18.07 ^b
	90	24.74 ^a	63.30 ^a	49.86 ^a
RRBE with MD	70	0 ^b	0 ^b	0 ^c
	80	12.85 ^a	10.42 ^a	11.36 ^b
	90	12.96 ^a	2.60 ^b	21.16 ^a
RRBE with RBPc:MD	70	0 ^c	39.58 ^b	0 ^b
	80	3.29 ^b	29.65 ^a	4.88 ^b
	90	11.44 ^a	25.45 ^a	16.18 ^a

Note: Means ± SD with different letters (a-c) are significantly different (p < 0.05) at various temperatures.

สรุป

จากการศึกษาเสถียรภาพของสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ห่อหุ้มด้วยโปรตีนรำข้าวเข้มข้นต่อค่า pH และความร้อน พบว่า pH มีผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่า pH ที่เหมาะสมและทำให้แอนโทไซยานินมีความคงตัวมากที่สุด อยู่ในช่วงค่า pH เท่ากับ 1 และ 4 แต่ไม่ความคงตัวที่ค่า pH เท่ากับ 9 โดยที่ pH 9 ในตัวอย่างสารสกัดจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ พบว่ามีการลดลงมากที่สุดคือ 42.58 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในตัวอย่างสารสกัดแอนโทไซยานินจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ห่อหุ้มด้วยมอลโทเด็กซ์ทรีนมีการลดลง 22.57 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในตัวอย่างสารสกัดจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ห่อหุ้มด้วยโปรตีนรำข้าวเข้มข้นและมอลโทเด็กซ์ทรีนในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 มีการลดลงน้อยที่สุดคือ 21.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการห่อหุ้มด้วยโปรตีนรำข้าวสามารถปกป้องสารสำคัญในสารสกัดจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ได้ดีกว่าไม่ห่อหุ้มจากปัจจัยสภาวะการเปลี่ยนแปลงของค่า pH อุณหภูมิหรือความร้อน มีผลต่อความคงตัวของปริมาณแอนโทไซยานินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองการให้ความร้อนที่ อุณหภูมิ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส มีผลทำให้แอนโทไซยานินสลายตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าสารสกัดจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ มีความคงตัวน้อยที่สุด (ลดลง 63.30 เปอร์เซ็นต์) และตัวอย่างสารสกัดจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ห่อหุ้มด้วยโปรตีนรำข้าวเข้มข้นและมอลโทเด็กซ์ทรีนในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 มีความคงตัวของแอนโทไซยานินมากที่สุด (ลดลง 16.07 เปอร์เซ็นต์) โดยการ

ห่อหุ้มด้วยโปรตีนรำข้าวเข้มข้นสามารถปกป้องสารแอนโทไซยานินในสารสกัดจากรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ได้ดีกว่าไม่ห่อหุ้มจากปัจจัยจากอุณหภูมิ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสามารถนำไปประยุกต์ได้ในอุตสาหกรรมอาหารเนื่องจากได้นวัตกรรมของสารห่อหุ้มจากรำข้าวสกัดเข้มข้นเพื่อนำมาป้องกันสารสกัดแอนโทไซยานินในระหว่างกระบวนการผลิตได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าวและหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ข้าวมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์ห่อหุ้มรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Abdel-Aal, E. S. M., & Hucl, P. A. (1999). A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chem*, 76, 350-354.
- Betz, M., & Kulozik, U. (2011). Whey protein gels for the entrapment of bioactive anthocyanins from bilberry extract. *International Dairy Journal*, 21(9), 703-710.
- Devi, P. S., Saravanakumar, M., & Mohandas, S. (2012). The effects of temperature and pH on stability of anthocyanins from red sorghum (*Sorghum bicolor*) bran. *African Journal of Food Science*, 6(24), 567-573.
- Esmaili, M., Rafe, A., Shahidi, S. A., & Hasan-Saraei, A. G. (2016). Functional properties of rice bran protein isolate at different pH levels. *J. Cereal Sci.* 93(1), 58-63.

- Ferreira, C. D., Da Conceição, E. J. L., Machado, B. A. S., Hermes, V. S., De Oliveira Rios, A., Druzian, J. I., & Nunes, I. L. (2016). Physicochemical characterization and oxidative stability of microencapsulated crude palm oil by spray drying. *Food and Bioprocess Technology*, 9(1), 124-136.
- Floegel, A., Kim, D., Chung, S., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal.* 24, 1043-1048.
- Giusti, M. M., & Jing, P. (2008). Analysis of pigments and colorants. In C. Sosaciu, (Ed.), *Food colorants: chemical and functional properties* (pp. 479-506). Boca Raton, Fla: CRC Press.
- Hou, Z., Qin, P., Zhang, Y., Cui, S., & Ren, G. (2013). Identification of anthocyanins isolated from black rice (*Oryza sativa* L.) and their degradation kinetics. *Food Research International*, 50(2), 691-697.
- Jiang, T., Mao, Y., Sui, L., Yang, N., Li, S., Zhu, Z., Wang, C., Yin, S., He, J., & He, Y. (2019). Degradation of anthocyanins and polymeric color formation during heat treatment of purple sweet potato extract at different pH. *Food Chemistry*, 274, 460-470.
- Kaewka, K., Therakulkait, C., & Cadwallader, K. R. (2009). Effect of preparation conditions on composition and sensory aroma characteristics of acid hydrolyzed rice bran protein concentrate. *J. Cereal Sci*, 50, 56-60.
- Kong, S., & Junsoo, L. (2010). Antioxidants in milling fractions of black rice cultivars. *Food Chemistry*, 120, 278-281.
- Martynenko, A., & Chen, Y. (2016). Degradation kinetics of total anthocyanins and formation of polymeric color in blueberry hydrothermodynamic (HTD) processing. *Journal of Food Engineering*, 171, 44-51.
- Nuzhet, T., & Erdogan, F. (2006). Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carotavar.* L.). *Journal of food Engineering*, 76, 579-583.
- Palakajornsak, Y. (2004). *Extraction and stability of anthocyanins from mangosteen peel* (Master's thesis). Silpakorn University, Bangkok.
- Rafe, A., & Sadeghian, A. (2017). Stabilization of Taron and Domesiah cultivars rice bran: Physicochemical, functional and nutritional properties. *Journal of Cereal Science*, 74, 64-71.
- Roobha, J. J., Saravanakumar, M., Aravindhan, K. M., & Devi, P. S. (2011). The effect of light, temperature, pH on stability of anthocyanin pigments in *Musa acuminata* bract. *Res. Plant Biol*, 1, 5-12.
- Wang, L., Zhao, Y., Zhou, Q., Luo, C. L., Deng, A. P., Zhang, Z. C., & Zhang, J. L. (2017). Characterization and hepatoprotective activity of anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L. cultivar Eshu No. 8). *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(3), 607-618.
- Worsltad, R. E., Durst, R. W., & Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends Food Sci. Technol.* 16, 423-428.