แอนโทไซยานินและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของไวน์สีชมพู ที่ผลิตจากดอกไม้ท้องถิ่นและมะเกี๋ยง

Anthocyanin and Antioxidant Activity of Pink Wine Produced from Local Flowers and Ma-kiang Berries (*Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*)

เกียรติศักดิ์ ทำสะอาด[1], เกวลิน วาริน[1] และ นักสิทธิ์ ปัญโญใหญ่[1*]

Kiattisak Thamsaad[1], Kaevarin Varin[1] and Naksit Panyoyai[1*]

[1]คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ศูนย์แม่ริม ตำบลสะลวง อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ 50330

[1]Faculty of Agricultural Technology, Chiang Mai Rajabhat University, Mae-Rim Campus, Mae-Rim District, Chiang Mai, 50330

*Corresponding author: naksit_pan@cmru.ac.th

Received: 6 June 2022; Accepted: 18 July 2022; Published: 1 December 2022

บทคัดย่อ

แอนโทไซยานินเป็นพฤกษเคมีสำคัญพบในดอกไม้และผลไม้ซึ่งให้สีในไวน์ชมพู งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เปรียบเทียบแอนโทไซยานินและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของไวน์ชมพูโดยใช้ดอกไม้ท้องถิ่น (ชบาแดง กุหลาบแดง บัวชมพู และกระเจี๊ยบ) แล้วคัดเลือกดอกไม้ที่หมักได้ไวน์ที่มีแอลกอฮอล์สูงสุดคือ กระเจี๊ยบมาผสมมะเกี๋ยงแล้วหมัก จากนั้นเปรียบเทียบยีสต์ 3 สายพันธุ์ (Montrachet, Cote des Blances, และ Premier Cuvee) การหมักดำเนินการที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 15 วัน วิเคราะห์แอนโทไซยานิน ฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH, ABTS, และ FRAP) และปริมาณของแข็งละลายน้ำได้ทั้งหมด ค่าพีเอช ค่าสี (L*, a* และ b*) และแอลกอฮอล์ พบว่า ไวน์ชมพูหมักโดยใช้ดอกไม้ท้องถิ่นมีปริมาณแอลกอฮอล์ในช่วง 6-12% ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด 7.7-14.2 °Brix และค่าพีเอช 2.70-3.19 แอนโทไซยานินในไวน์เรียงตามลำดับจากมากไปน้อยคือ ชบา กระเจี๊ยบ บัวชมพู และกุหลาบแดง ไวน์ชบามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด การเปรียบเทียบสายพันธุ์ยีสต์ในการหมักไวน์กระเจี๊ยบผสมมะเกี๋ยง ปริมาณแอลกอฮอล์ในช่วง 5-9% ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด 8.4-12.0 °Brix และค่าพีเอช 2.90-3.03 ไวน์กระเจี๊ยบผสมมะเกี๋ยงหมักด้วยยีสต์ สายพันธุ์ Premier Cuvee มีแอนโทไซยานิน ฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากกว่ายีสต์สองสายพันธุ์ คือ Montrachet และ Cote des Blances

คำสำคัญ: ไวน์สีชมพู; ดอกไม้ท้องถิ่น; มะเกี๋ยง; แอนโทไซยานิน; ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ABSTRACT

Anthocyanin is an important phytochemical found in flowers and fruits that gives the colour of pink wine. The objectives of this study were to compare anthocyanin and antioxidant activity of pink wine using (1) local flowers (hibiscus, red rose, pink lotus, and roselle) and (2) the flower wine with the highest alcohol content. Roselle was mixed with Ma-kiang berries to compare wine fermentation using different yeast starters (Montrachet, Cote des Blances, and Premier Cuvee). The wine process was fermented at 30°C for 15 days and then the wine was analysed anthocyanin, total phenolic compound, flavonoid, antioxidant activities (DPPH, ABTS,

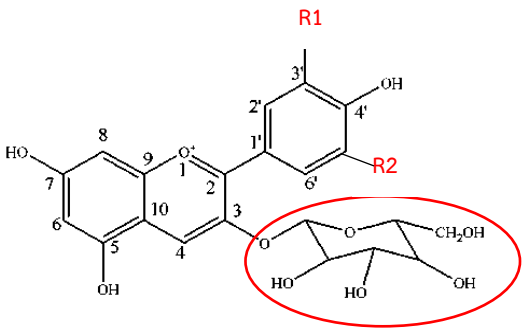
and FRAP), total soluble solids, pH, colour (L*, a* and b*) and alcohol content. It was found that pink wine fermented using the local flowers had alcohol content in the range of 6-12%, total soluble solid (TSS) 7.7-14.2 °Brix, and pH 2.70-3.18. The anthocyanin content in the pink wine, in descending order, was hibiscus, roselle, pink lotus, and red rose. Pink winemaking using different yeast strains had alcohol content in 5-9%, TSS 8.4-12.0 °Brix, and pH 2.90-3.03. Roselle/Ma-kiang berries wine fermented with Premier Cuvee had a higher content of anthocyanin, total phenolic compound, flavonoid, and all antioxidant activities than the two strains, Montrachet and Cote des Blances.

Keywords: pink wine; local flowers; Ma-kiang berries; anthocyanin; antioxidant activity

คำนำ

แอนโทไซยานินเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่พบในดอกไม้ ผักและผลไม้ที่มีสีม่วง ทั้งผล ดอก ใบ และเปลือก สารพฤกษเคมีนี้พบว่ามีโครงสร้างทางเคมีมากกว่า 600 ชนิด (Chaiyasut *et al*., 2016) โดยมีโครงสร้างหลักคือ ไซยานิดิน-3-ไกลโคไซด์ (Cyanidin-3-glucoside) ที่มีโครงสร้างพบในธรรมชาติแตกต่างกันอีก 6 ชนิด ได้แก่ เพลาโกนิดิน (pelargonidin) ไซยานิดิน (cyanidin) เดลฟินิดิน (delphinidin) พีโอนิดิน (peonidin) พีทูนิดิน (petunidin) และ มัลวิดิน (malvidin) (Figure 1) มักพบในไวน์องุ่น (Han *et al.*, 2017) และ พืชอีกหลายชนิด เช่น เปลือกมังคุด มะหลอด มะเกี๋ยง (Patthamakanokporn *et al.,* 2008)

มะเกี๋ยง เป็นพืชที่ขึ้นในเขตพื้นที่จังหวัดทางภาคเหนือของประเทศไทย พืชชนิดนี้ให้ผลสีม่วง (Figure 2a) ให้รสเปรี้ยว การออกผลในช่วงกรกฎาคมถึงสิงหาคม พืชท้องถิ่นนี้ได้รับการส่งเสริมในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา ฯ สยามบรมราชกุมารี ผลมะเกี๋ยงเป็นแหล่งที่ดีของแอนโทไซยานิน ซึ่งมีรายงานการวิจัยว่า ช่วยต้านการเสื่อมของไตที่ถูกทำลายด้วยโลหะหนัก (Poontawee, Natakankitkul and Wongmekiat, 2016) กระตุ้นการทำงานเม็ดเลือดขาวให้กำจัดสิ่งแปลกปลอม (Srivanthana *et al*., 2007) และต้านความชรา ลดความเครียด และการเสื่อมของระบบประสาท (Prasanth *et al.*, 2019) เนื่องจากมะเกี๋ยงเป็นพืชตามฤดูกาล ดังนั้น การแปรรูปมะเกี๋ยงให้เป็น ไวน์ น้ำผลไม้ แยม โยเกิร์ต จึงเป็นทางเลือกในการเพิ่มมูลค่าพืชอนุรักษ์ในท้องถิ่นและให้มีผลิตภัณฑ์หลากหลาย



(a) glycoside

Anthocyanidin	R1	R2
pelargonidin	H	H
cyanidin	OH	H
delphinidin	OH	OH
peonidin	OCH_3	H
petunidin	OCH_3	OH
malvidin	OCH_3	OCH_3

(b)

Figure 1 Chemical structure of (a) cyanidin-3-glycoside and (b) six common anthocyanidins found in nature.

นอกจากนี้แอนโทไซยานินยังพบในดอกไม้รับประทานได้หลายชนิด เช่น ชบาแดง (hibiscus) กุหลาบแดง (red rose) บัวชมพู (pink lotus) และ กระเจี๊ยบ (roselle) (Figure 2(b)-2(e)) ดอกไม้เหล่านี้เป็นพืชท้องถิ่นและบางชนิด เช่น ดอกชบาหรือราชินีดอกไม้เมืองร้อน (queen of tropical flower) กำลังเป็นที่นิยมในตลาดอาหารแห่งอนาคต และในการแปรรูปผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มไวน์ไทยมีการนำดอกไม้ที่มีแอนโทไซยานินมาผสมกับผลไม้เช่น หม่อนเพื่อให้เกิดสีสันและการยอมรับทางประสาทสัมผัส (Sirikhansaeng, Saenkhol and Chumsena, 2020) ดอกไม้จึงเป็นวัตถุดิบหนึ่งที่ตลาดอาหารให้ความสนใจนำมาใช้ประโยชน์ ทั้งนี้ ประเทศไทยยังมีผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจากดอกไม้ไม่มากจึงเป็นที่มาของการพัฒนาไวน์จากดอกไม้ท้องถิ่นต่าง ๆ ให้มีทางเลือกชนิดผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มมากขึ้น และการนำดอกไม้ไปผสมกับผลไม้ที่เป็นแหล่งแอนโทไซยานิน เช่น มะเกี๋ยง หม่อน ซึ่งมีการนำไปแปรรูปเป็นไวน์จะเพิ่มคุณค่าในด้านพฤกษเคมีต่าง ๆ ในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากดอกไม้ไทยและผลไม้ท้องถิ่นมากขึ้น

งานวิจัยเรื่องนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแอนโทไซยานินและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของไวน์จากดอกไม้ท้องถิ่น และไวน์จากดอกไม้ผสมกับพืชอนุรักษ์มะเกี๋ยง รวมทั้งวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับค่าทางกายภาพและเคมีของผลิตภัณฑ์

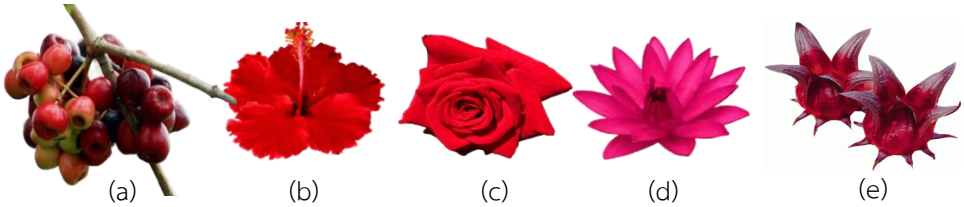


Figure 2 Sources of anthocyanins, (a) Ma-kiang, (b) hibiscus, (c) red rose, (d) pink lotus, and (e) roselle.

อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัตถุดิบ

ดอกไม้ (ชบาแดง กุหลาบแดง บัวชมพู และกระเจี๊ยบ) และมะเกี๋ยงได้มาจากเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช ดอกไม้นำมาคัดแยกดอกที่ช้ำ สีซีดออกไป ล้างดอกที่ได้คุณภาพให้สะอาด แล้วผ่านการอบแห้งด้วยตู้อบพลังงานแสงอาทิตย์จนมีความชื้นสุดท้ายไม่เกิน 10% ส่วนมะเกี๋ยงนำมาคัดเฉพาะลูกที่มีสีแดง ไม่มีรอยช้ำ ล้างให้สะอาด สะเด็ดน้ำให้แห้ง

2.การเตรียมวัตถุดิบ

การเตรียมน้ำดอกไม้ ให้นำดอกไม้แห้งมาชั่งปริมาณ 100 กรัม มาห่อด้วยผ้าขาวบางจากนั้นนำไปต้มน้ำดื่มปริมาณ 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ใช้ทัพพีคั้นน้ำสีแดงออกมาจากดอกไม้แห้ง ต้มต่อนาน 20 นาที วัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดในน้ำดอกไม้เริ่มต้นแล้วจึงเติมน้ำตาลทรายขาวเพื่อปรับปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดให้เท่ากับ 20 °Brix เริ่มจากการคำนวณปริมาณน้ำตาลทรายขาวที่ต้องเติมลงในน้ำดอกไม้แต่ละชนิดโดยใช้วิธีการของเพียร์สัน (Pearson square) โดยใช้น้ำตาลทรายประมาณ 1 กิโลกรัม ส่วนน้ำมะเกี๋ยงให้แกะเอาเฉพาะเนื้อ ชั่งน้ำหนักให้ได้ 200 กรัม ต้มกับน้ำดื่ม 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วกรองเอาเฉพาะน้ำ วัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดในน้ำมะเกี๋ยง คำนวณปริมาณน้ำตาลทรายขาวที่ต้องเติมลงไป โดยใช้น้ำตาลทรายประมาณ 600 กรัม

การปรับปริมาณของแข็งในน้ำหมักค่อย ๆ เติมน้ำตาลทรายลงไปแล้วต้มจนน้ำตาลละลายหมด ปรับปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ของน้ำหมักให้ได้ 20 °Brix และ ค่าพีเอช คือ 3.2 โดยใช้กรดซิทริกเกรดอาหาร ทิ้งน้ำหมักไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงนำใส่ในถังหมักพลาสติกขนาด 6 ลิตร ที่ฆ่าเชื้อด้วยการเติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ ความเข้มข้น 0.02% ลงไปเพื่อป้องกันการเน่าเสียของน้ำดอกไม้และน้ำมะเกี๋ยงจากจุลินทรีย์ปนเปื้อนชนิดอื่น ๆ ก่อนเริ่มต้นการหมัก

3.การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้นและการหมักไวน์

การเตรียมกล้ายีสต์โดยการแบ่งน้ำมะเกี๋ยงที่เตรียมไว้หมักปริมาณ 200 มิลลิลิตร มาใส่ในขวดพลาสติกแล้วจุกด้วยสำลี จากนั้นแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง ได้แก่

การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดของดอกไม้ในการผลิตไวน์ชมพู เปรียบเทียบวัตถุดิบ 4 ชนิด ชบาแดง กุหลาบแดง บัวชมพู และกระเจี๊ยบ ใช้ยีสต์สำเร็จรูปทางการค้า *Saccharomyces cerevisiae* var. Davis#522 (Montrachet) (Belgium) ปริมาณ 3 กรัม ละลายในน้ำหมัก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง รอจนยีสต์เจริญจึงนำไปใส่ลงในน้ำหมักบรรจุในถังหมักนาน 15 วัน ปิดด้วยแอร์ล็อก (airlock) จากนั้นทำการไซฟอน (siphon) กรอง (racking) แล้วนำไปพาสเจอร์ไรซ์ 62 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็น 45 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 เดือน กรองให้ใสแล้วบรรจุในขวดแก้วใส ก่อนนำไวน์ไปวิเคราะห์ทางกายภาพและเคมีได้แก่ ปริมาณของแข็งละลายน้ำได้ทั้งหมด ค่าพีเอช ปริมาณแอลกอฮอล์ ค่าสีในหน่วย CIELAB พฤกษเคมี (แอนโทไซยานิน ฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์) และ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ จากนั้นคัดเลือกดอกไม้ที่หมักไวน์ได้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงที่สุดไปผสมกับน้ำมะเกี๋ยงหมักไวน์ด้วยสายพันธุ์ยีสต์ต่าง ๆ ต่อไป

การทดลองที่ 2 ศึกษาสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมในการผลิตไวน์ดอกไม้ผสมมะเกี๋ยง (สัดส่วนน้ำดอกไม้ ต่อ น้ำมะเกี๋ยง คือ 1 ต่อ 5) เปรียบเทียบชนิดของยีสต์ *Saccharomyces* spp. ทางการค้า 3 สายพันธุ์จากเบลเยียม ได้แก่ Davis#522 (Montrachet), Devis#750 (Cote des Blances), Devis#796 (Premier Cuvee) โดยทำการเติมปริมาณยีสต์ อุณหภูมิ เวลาหมัก และการจัดการหลังหมักเช่นเดียวกับการทดลองตอนที่ 1 แล้วนำไปวิเคราะห์ทางกายภาพและเคมีไวน์ต่อไป

4.การวิเคราะห์ทางกายภาพและเคมีไวน์

4.1การวิเคราะห์ทางกายภาพและเคมีของไวน์

การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งละลายน้ำได้ทั้งหมดใช้ ดิจิทัล รีแฟรกโทมิเตอร์ (ATAGO3803, Japan) การวิเคราะห์ค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอช (Mettler Toledo, USA) การวัดปริมาณแอลกอฮอล์ใช้แอลกอฮอล์ รีแฟรกโทมิเตอร์ (ATC, China) การวัดค่าสีในหน่วย CIELAB (L*,a*,b*) ด้วยเครื่องวัดสี (Konika Minolta CR400, Japan)

4.2 การวิเคราะห์พฤกษเคมีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของไวน์ (ดัดแปลงจากวิธีของ Du *et al.,* 2012) ได้แก่

การวิเคราะห์แอนโทไซยานินใช้วิธีวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าพีเอชที่ 1 และ 4.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 และ 700 นาโนเมตร คำนวณปริมาณแอนโทไซยานินในรูปไซยานิดิน-3-ไกลโคไซด์ในหน่วยมิลลิกรัม ต่อ 100 มิลลิลิตรไวน์ การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกใช้สารละลายโฟลิน (Folin-Ciocalteu reagent) วัดการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิค (gallic acid) เป็นมาตรฐานคำนวณปริมาณกรดแกลลิคในหน่วยมิลลิกรัม ต่อ 100 มิลลิลิตรไวน์ การวิเคราะห์สาร ฟลาโวนอยด์ใช้การวัดการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร โดยใช้เควอเซทิน (quercetin) เป็นมาตรฐานคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ในหน่วยมิลลิกรัม ต่อ 100 มิลลิลิตรไวน์

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 3 วิธี ได้แก่

1. วิธี DPPH โดยนำไวน์ทำปฏิริยากับ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร คำนวณร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ %DPPH scavenging activity

2. วิธี ABTS โดยนำไวน์ทำปฏิริยากัยสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตและ ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) ให้เป็นอนุมูลอิสระ $ABTS^{\cdot+}$ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร คำนวณร้อยละการต้านอนุมูลอิสระเทียบน้ำกลั่นและสารละลายวิตามินซี

3. วิธี FRAP วัดความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กของแอนติออกซิแดนซ์ โดยใช้สาร TPTZ (2,4,6-**Tris(2-pyridyl)**-s-triazine) ในรูป Fe^{3+} ทำปฏิกิริยากับไวน์เปลี่ยนเป็น Fe^{2+} มีสีม่วงที่ดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร คำนวณการต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารละลายโทรล็อก (Trolox)

5.การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองทั้งสองการทดลองวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) เพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางกายภาพและเคมีของไวน์สีชมพูที่ทดสอบตัวอย่างละ 5 ซ้ำ การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างไวน์แต่ละชนิดใช้วิธีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญน้อยที่สุด (Least Significant Difference, LSD) ที่ความเชื่อมั่น 95 % ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistix 8

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและกายภาพของไวน์สีชมพูจากดอกไม้ 4 ชนิด ได้แก่ ดอกชบาแดง ดอกกุหลาบแดง ดอกบัวชมพู ดอกกระเจี๊ยบ หมักนาน 15 วัน จาก Table1 พบว่า ของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดของไวน์ทุกตัวอย่างลดลงจากเริ่มต้น 20 °Brix เหลือ 7.7-14.2 °Brix ทุกตัวอย่างมีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% โดยไวน์กระเจี๊ยบมีของแข็งที่ละลายน้ำได้ต่ำสุด คือ 7.7% ส่วนไวน์ชบามีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้มากที่สุดคือ 14.2% ซึ่งส่วนใหญ่ของแข็งเป็นน้ำตาล แอลกอฮอล์ในไวน์สีชมพูเมื่อสิ้นสุดการหมักมีค่าอยู่ในช่วง 6-12% แตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ไวน์กระเจี๊ยบมีแอลกอฮอล์มากที่สุด 12% ไวน์ชบาการหมักเกิดน้อยทำให้ได้แอลกอฮอล์ต่ำสุด คือ 6% ค่าพีเอชลดลงในทุกตัวอย่างจาก 3.2 เหลือ 2.7-3.19 ในขณะที่ค่าความสว่างของไวน์ ค่าสีแดงและค่าสีเหลืองแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ไวน์ชบามีความสว่างน้อย (L*) ที่สุด แต่มีความเป็นสีแดง (a*) และสีเหลือง (b*) มากที่สุด ดังเห็นได้ชัดเจนใน Figure 3 รองลงมาคือไวน์กระเจี๊ยบ ส่วนไวน์กุหลาบแดงและไวน์บัวชมพูมีค่าสีแดงและค่าสีเหลืองไม่แตกต่างกันทางสถิติ สีของไวน์ชมพูนี้ได้มาจากการต้มสกัดเอารงควัตถุที่ให้สีคือแอนโทไซยานินออกมาในน้ำหมัก รงควัตถุนี้พบในดอกไม้ ชบาแดง กุหลาบแดง บัวชมพู และกระเจี๊ยบ ซึ่งปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดออกมาได้ในน้ำหมักไวน์ขึ้นกับปริมาณแอนโทไซยานินในวัตถุดิบดอกไม้และกรรมวิธีการต้มสกัด

Table 1 Chemical and physical characteristics of pink wine made from local flowers

Pink wine	Total solid (°Brix)	pH	Alcohol content (%)	Lightness (L*)	Redness (a*)	Yellowness (b*)
Hibiscus	14.2±0.2[a]	3.19±0.10[a]	6±0.2[d]	34.33±0.12[c]	0.97±0.23[a]	-3.66±0.07[a]
Red rose	10.4±0.3[c]	2.90±0.02[b]	11±0.1[b]	35.05±0.21[a]	0.60±0.03[c]	-3.01±0.15[c]
Lotus	13.1±0.2[b]	2.92±0.11[b]	8±0.3[c]	34.59±0.14[b]	0.66±0.02[c]	-2.92±0.16[c]
Roselle	7.7±0.1[d]	2.70±0.13[c]	12±0.2[a]	34.94±0.31[b]	0.79±0.02[b]	-3.21±0.18[b]

Note: 1. Mean (5 replicates)±standard deviation

2. Mean values followed by the different letter in the same column were significantly different at 95% confidence level by LSD test.

Figure 3 Colour shades of pink wine made from local flowers/Ma-kiang/starters (a) hibiscus/Montrachet (b) red rose/Montrachet (c) lotus/Montrachet (d) roselle/ Montrachet (e) Ma-kiang/roselle/Montrachet (f) Ma-kiang/roselle/Cote des Blances and (g) Ma-kiang/roselle/Premier Cuvee

การหมักไวน์ดอกไม้ 4 ชนิด ได้แก่ ชบาแดง กุหลาบแดง บัวชมพู และกระเจี๊ยบ พบว่า กระบวนการหมักไวน์ให้เกิดแอลกอฮอล์ ยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลในน้ำหมักทำให้ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดลดลง โดยน้ำตาลเปลี่ยนเป็นกรดอินทรีย์ทำให้ค่าพีเอชลดลงจนกลายเป็นแอลกอฮอล์ในที่สุด โดยปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการลดลงของปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด นอกจากนี้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่มากขึ้นเพิ่มตามระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (Sirikhansaeng, Saenkhol, and Chumsena, 2020) ทั้งนี้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักด้วยดอกไม้แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน อธิบายได้จากสารในดอกไม้ตามธรรมชาติ เช่น สารสกัดจากกระเจี๊ยบช่วยต้านการเกิดออกซิเดชันของเซลล์ *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 ทำให้เซลล์ยีสต์ชะลอการเสื่อมสภาพ (Sarima, Astuti, and Meryandini, 2019) ในขณะที่สารสกัดดอกชบาแดงด้วยแอลกอฮอล์กลับมีฤทธิ์ต้านการเจริญของยีสต์ *Candida albicans* (Darwish, and Aburjai, 2011) และมีรายงานว่าในดอกกุหลาบแดงมียีสต์ป่าที่ช่วยในการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ในไวน์ได้ (Hisatomi and Toyomura, 2021)

ปริมาณแอนโทไซยานิน ฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ในไวน์แปรรูปจากชบาแดงมีปริมาณมากที่สุด ซึ่งสารที่กล่าวมามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทดสอบด้วยการต้านอนุมูล DPPH, ABTS และการรีดิวส์ TPTZ พบว่า ไวน์แปรรูปจากชบาแดงมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือไวน์กระเจี๊ยบ บัวชมพู และกุหลาบแดง ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 2

Table 2 Phytochemical content and antioxidant activities of pink wine made from local flowers

Pink wine	Anthocyanin (mg/100 ml)	Phenolic compounds (mg/100 ml)	Flavonoids (mg/100 ml)	DPPH (%)	ABTS (%)	FRAP (μTrolox/ 100 ml)
Hibiscus	75.16±0.65^{a}	160.23±0.01^{a}	83.50±0.65^{a}	88.24±0.25^{a}	98.01±0.24^{a}	197.41±0.53^{a}
Red rose	20.21±0.43^{d}	48.03±0.03^{d}	24.40±0.33^{d}	57.24±0.32^{d}	63.87±0.35^{d}	177.75±0.56^{c}
Lotus	23.13±0.22^{c}	53.43±0.02^{c}	28.50±0.47^{c}	69.76±0.46^{c}	78.01±0.85^{c}	186.16±0.48^{b}
Roselle	29.24±0.38^{b}	80.70±0.05^{b}	34.60±0.82^{b}	75.63±0.33^{b}	83.89±0.61^{b}	171.58±0.30^{d}

Note: 1. Mean (5 replicates)±standard deviation

2. Mean values followed by the different letter in the same column were significantly different at 95% confidence level by LSD test.

ไวน์ดอกชบาแดงมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ABTS และ FRAP สูงกว่าไวน์ดอกไม้อีก 3 ชนิด ซึ่งพบว่าไวน์ 3 ชนิด ลำดับผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH สอดคล้องกับ ABTS แต่ทั้งสองวิธีผลการทดสอบไม่สัมพันธ์กับ FRAP อาจเนื่องจาก วิธีวิคราะห์ FRAP มีการปรับค่าพีเอชของระบบการทำปฏิกิริยาในสภาวะกรด (pH 3.5) ทำให้แอนโทไซยานินจ่ายอิเล็คตรอนหรือรีดิวส์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ได้ อย่างไรก็ตามสภาวะที่เป็นกรดมากขึ้นส่งผลต่อความเสถียรของแอนโทไซยานินด้วย เพราะ แอนโทไซยานินเสถียรในช่วงค่าพีเอช 1-4.5 ซึ่ง Table 1 รายงานค่าพีเอชของไวน์จากมากไปน้อยคือ ชบาแดง ดอกบัว กุหลาบแดง และกระเจี๊ยบ ดังนั้น ค่าพีเอชของไวน์ชบาแดงจึงใกล้เคียงกับสภาวะการรีดิวส์ Fe^{3+} มากที่สุด นอกจากนี้มีรายงานว่าความสัมพันธ์ของวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างอาหารและไวน์ ความสัมพันธ์ค่าปริมาณแอนโทไซยานินและปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดให้ค่าสัมประสิทธิ์สเปียร์แมน (Spearman's correlation) กับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS มากกว่าการรีดิวส์ตามวิธี FRAP และวิธีทดสอบต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ (Han *et al.,* 2017; Loypimai, 2012)

จากการทดลองตอนที่ 1 ไวน์ดอกชบาเป็นไวน์ที่มีปริมาณแอนโทไซยานิน ฟีนอลิก ฟลาโว-นอยด์ รวมทั้งฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด แต่ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นจากการหมักไวน์น้อย ในขณะที่ดอกกระเจี๊ยบเมื่อนำมาหมักไวน์แล้วได้แอลกอฮอล์สูงที่สุดจากปฏิกิริยาการหมักไวน์ ดังนั้นจึงได้คัดเลือกดอกกระเจี๊ยบไปผสมกับมะเกี๋ยงแล้วหมักไวน์ในการทดลองตอนที่ 2 ทั้งนี้ มะเกี๋ยงเป็นพืชที่มีสารแทนนิน (tannin) ที่ให้รสฝาดเฝื่อนในไวน์ (Prasanth *et al.,* 2020) ซึ่งมีรายงานว่าแทนนินมีผลต่อการยังยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (Wauters, Iserentant, and Verachtert, 2001) ดังนั้น ในที่นี้จึงผสมน้ำกระเจี๊ยบต่อน้ำมะเกี๋ยงในสัดส่วน 1 ต่อ 5 เพราะในน้ำมะเกี๋ยงผสมกับดอกกระเจี๊ยบมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดประมาณ 12 °Brix ทำให้ใช้ปริมาณน้ำตาลใช้ในปรับปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดน้อยกว่าการหมักไวน์ดอกไม้เพียงชนิดเดียวถึง 40% การหมักไวน์นาน 15 วันด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 3 สายพันธุ์ ศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างแอลกอฮอล์

Table 3 เมื่อสิ้นสุดการหมักของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดลดลงจากเริ่มต้น 20 °Brix เหลือในช่วง 9-12 °Brix และค่าพีเอชของไวน์ทุกตัวอย่างลดลงจากพีเอชน้ำหมักเริ่มต้น 3.5 เหลือ ในช่วง 2.92-3.03 ในขณะที่แอลกอฮอล์ในวันที่ 15 อยู่ในช่วง 5-9% โดยไวน์ชมพูที่หมักด้วยสายพันธุ์ Montrachet ให้แอลกอฮอล์สูงที่สุด 9% ส่วนไวน์ชมพูที่หมักสายพันธุ์ Premier Cuvee ให้แอลกอฮอล์ต่ำที่สุด 5% ไวน์ที่หมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ Montrachet มีความเป็นสีแดงน้อยกว่าสายพันธุ์ที่เหลือซึ่งแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (Figure 3) การหมักไวน์น้ำกระเจี๊ยบผสมน้ำมะเกี๋ยงด้วยยีสต์ *Saccharomyces* spp. ได้แก่ Davis#522 (Montrachet), Devis#750 (Cote des Blances), Devis#796 (Premier Cuvee) พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดลดลงเช่นเดียวกับค่าพีเอชลดลง แต่ปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นคล้ายกับการหมักไวน์ดอกไม้ที่กล่าวไปก่อนหน้านี้ ทั้งนี้สปีชีร์ของยีสต์ *Saccharomyces* spp. มีผลต่อการสร้างแอลกอฮอล์ด้วย เช่น Montrachet และ Cote des Blances เป็น *Saccharomyces cerevisiae* เหมือนกันที่ทนแอลกอฮอล์ได้สูงสุด 13% แต่สายพันธุ์ Montrachet หมักแอลกอฮอล์ได้เร็วกว่า การหมักเกิดฟองปานกลาง ส่วนสายพันธุ์ Cote des Blances ให้ไวน์ที่มีน้ำตาลเหลืออยู่ที่ประมาณ 12% ส่วน Premier Cuvee เป็น *Saccharomyces bayanus* หมักแอลกอฮอล์ได้เร็วเช่นเดียวกับ Montrachet แต่ด้วยอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการหมักเฉลี่ยคือ 14 องศาเซลเซียสตามที่ทางการค้าระบุจึงทำให้สภาวะไม่เหมาะกับการเจริญเติบโตของยีสต์

Table 3 Chemical and physical characteristics of pink wine made from Ma-kiang berries and roselle using different yeast starters

Pink wine	Total solid (°Brix)	pH	Alcohol content (%)	Lightness (L*)	Redness (a*)	Yellowness (b*)
Montrachet	9.0±0.5^{b}	2.92±0.01^{b}	9±0.2^{a}	34.50±0.24^{c}	0.77±0.22^{c}	3.13±0.12^{a}
Cote des Blance	12.0±0.3^{a}	3.03±0.02^{a}	5±0.3^{c}	35.84±0.33^{a}	0.85±0.11^{b}	2.99±0.20^{a}
Premier Cuvee	8.4±0.4^{c}	3.00±0.13^{a}	7±0.5^{b}	35.46±0.12^{b}	0.95±0.23^{a}	2.70±0.16^{b}

Note: 1. Mean (5 replicates)±standard deviation

2. Mean values followed by the different letter in the same column were significantly different at 95% confidence level by LSD test.

Table 4 phytochemical content and antioxidant activities of pink wine made from Ma-kiang berries and roselle using different yeast starters

Pink wine	Anthocyanin (mg/ 100 ml)	Phenolic compounds (mg/ 100 ml)	Flavonoids (mg/ 100 ml)	DPPH (%)	ABTS (%)	FRAP (μTrolox/ 100ml)
Montrachet	15.63±0.25^{c}	36.21±0.02^{b}	18.80±0.52^{c}	73.40±0.12^{c}	82.92±0.65^{c}	121.58±0.22^{b}
Cote des Blances	16.60±0.28^{b}	36.02±0.03^{c}	20.10±0.61^{b}	74.60±0.15^{b}	87.33±0.85^{b}	119.91±0.45^{c}
Premier Cuvee	18.67±0.33^{a}	38.13±0.04^{a}	22.10±0.73^{a}	79.00±0.22^{a}	91.94±0.24^{a}	128.15±0.26^{a}

Note: 1. Mean (5 replicates)±standard deviation

2. Mean values followed by the different letter in the same column were significantly different at 95% confidence level by LSD test.

Table 4 แสดงปริมาณแอนโทไซยานินในไวน์กระเจี๊ยบผสมมะเกี๋ยงที่หมักด้วยยีสต์ 3 ชนิด พบว่า Premier Cuvee เป็นสายพันธุ์ที่หมักไวน์แล้วรักษาปริมาณแอนโทไซยานินไว้ได้มากที่สุดแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% รวมทั้งสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ส่วนไวน์ที่หมักด้วยสายพันธุ์ Cote des Blances ให้ไวน์ที่มีปริมาณแอนโทไซยานิน ฟลาโวนอยด์และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS สูงกว่าไวน์ที่หมักด้วยสายพันธุ์ Montrachet แต่ ปริมาณฟีนอลิก และ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของไวน์ที่หมักด้วยสายพันธุ์ Montrachet มีมากกว่า

แอนโทไซยานินจัดเป็นฟลาโวนอยด์ชนิดหนึ่งให้สีในไวน์ชมพูมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยสามารถจับกับอนุมูลอิสระ เช่น DPPH และ ABTS ด้วยการจ่ายอิเล็คตรอนให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้น (Loypimai, 2012) ปริมาณแอนโทไซยานินที่ให้สีแดงในไวน์จึงสอดคล้องกับค่าสีแดง (a*) ที่มากตามไปด้วย การศึกษานี้จึงให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาไวน์องุ่นแดงของ Han *et al.* (2017) นอกจากนี้ สายพันธุ์ของยีสต์ที่มีความสามารถในการดูดซับเอาแอนโทไซยานินไปสัมผัสกับเซลล์ทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินลดลงเมื่อการหมักสิ้นสุด (Echevevrrigaray *et al*., 2020) ยีสต์ไม่สามารถทนแอลกอฮอล์ได้แล้วตกตะกอน เช่น Montrachet เกิดการหมักได้เร็วกว่าสายพันธุ์อื่นอาจดูดซับแอนโทไซยานินออกจากน้ำไวน์ได้มากทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีน้อยแต่กลับมีปริมาณแอลกอฮอล์มาก

สรุป

แอนโทไซยานินและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของไวน์จากดอกไม้ท้องถิ่นที่นำมาศึกษาพบว่า ไวน์ดอกชบาแดงมีแอนโทไซยานินและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระปริมาณมากที่สุด คือ 6% จัดเป็น Wine coolers รองลงมาคือไวน์กระเจี๊ยบ แต่ไวน์กระเจี๊ยบมีแอลกอฮอล์มากที่สุด (12% โดยปริมาตร) จัดเป็น Table wine ที่มีแอลกอฮอล์ในช่วง 8-14% เมื่อเลือกดอกกระเจี๊ยบผสมกับมะเกี๋ยงแล้วหมักไวน์ พบว่า การหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Premier Cuvee รักษาปริมาณแอนโทไซยานินและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่าสายพันธุ์อื่น แต่ปริมาณแอลกอฮอล์น้อยกว่าหมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ Montrachet ที่มีแอลกอฮอล์มากที่สุด (9% โดยปริมาตร) ซึ่งปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้สอดคล้องกับที่กำหนดโดยมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนไวน์ผลไม้ (มผช. 2/2546) และไวน์สมุนไพร (มผช. 31/2546) (ไม่เกิน 15 % โดยปริมาตร) และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำและค่าพีเอชเท่ากับ 9% และ 2.92 ตามลำดับ ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ให้กับการบริการวิชาการแปรรูปไวน์จากพืชอนุรักษ์พันธุกรรม คือ กรณีไวน์ดอกไม้เสนอไวน์ดอกชบาแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* Davis#522 (Montrachet) และไวน์มะเกี๋ยงผสมดอกกระเจี๊ยบ หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* Devis#796 (Premier Cuvee) ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับการสนับสนุนทุนเพื่อสร้างและถ่ายทอดองค์ความรู้พัฒนาท้องถิ่นจากโครงการพัฒนาแหล่งเรียนรู้วัฒนธรรมเกษตรตามปรัชญาเศรษฐกิจพอเพียง คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ และโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา ฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

Chaiyasut, C., Siramurathi, B. S., Pengkumsri, N., Sirilun, S., Peerajan, S., Chaiyasut, K. and Kesika, P. 2016. Anthocyanin profile and its antioxidant activity of widely used fruits, vegetables, and flowers in Thailand. Asian J. Pharm. Clin. Res., 9(6): 218-224.

Darwish, R. M. and Aburjai, T. A. 2011. Antimicrobial activity of some medicinal plants against different Candida species. Jordan J. Pharm Sci., 4(1): 70-80.

Du, B., He, B., Shi, P., Li, F., Li, J. and Zhu, F. 2012. Phenolic content and antioxidant activity of wine grapes and table grapes. J. Med. Plant Res., 6(17): 3381-3387.

Echevevrrigaray, S., Scariot, F., J., Menegotto, M. and Delamare, A. P. L. 2020. Anthocyanin adsorption by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation is associated to the loss of yeast cell wall/membrane integrity. Int. J. Food Microbiol., 2:314:108383.

Han, F. Ju, Y., Rusm, X., Zhao, X., Yue, X., Zhuang, X., Qin, M. and Fang, Y. 2017. Color, anthocyanin, and antioxidant characteristics of young wines produced from spine grapes (*Vitis davidii* Forex) in China. Food Nutri. Res., 61:1, 1339552,

Hisatomi, T. and Toyomura, K. 2021. Isolation, Identification, and characterization of wild yeast budding yeast from rose flowers in Fukuyama city, Hiroshima, Japan, and their application in bread and wine production. Mycoscience., 62Z6X: 382-389.

Loypimai, P. 2012. Total antioxidant capacity assessment in vitro. J. Sci. Technol. MSU. 31(2): 164-170.

Poontawee, W., Natakankitkul, S. and Wongmekiat, O. 2016. Protective effect of *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* Fruit extract against oxidative renal damage caused by cadmium. Molecules, 21, 133.

Patthamakanokporn, O. Puwastein, P., Nitithamyong, A. and Sirichakwal, P. P. 2008. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. J. Food Compos. Anal., 21: 241-248.

Prasanth, M. I. Brimsom, J. M., Chuchawankul, S., Sukprasansap, M. and Tencomnao, T. 2019. Antiaging, stress resistance, and neuroprotective efficacies of *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* fruit extracts using Caenorhabditis elegans model. Oxid. Med. Cell longev., ID7024785.

Prasanth, M. I, Sivamaruthi, B. S., Sukprasansap, M., Chuchawankul, S., Tencomnao, T. and Chiyasut, C. 2020. Functional properties and bioactivities of *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* berry plant: a review. Food Sci. Technol., 40 (Suppl 2)

Sarima, R. I. A. and Meryandini, A. 2019. Modulation of aging in yeast *Saccharomyces cerevisiae* by roselle petal extract (*Hibiscus sabdariffa* L.). Am. J. Biochem. Biotech., 15(1):23.32

Sirikhansaeng, P., Saenkhol, N. and Chumsena, L. 2020. The study of chemical properties and sensory test of roselle wine and roselle mix mulberry wine. RMUTTO R. J., 13(1): 111-119.

Srivanthana, B., Treesangsri, W., Boriboontrakul, B., Niumsakul, S. and Chavalittumrong, P. 2007. *In vitro* effects of Thai medicinal plants on human lymphocyte activity. Songklanakarin J. Sci. Technol., 29(sppl.1): 17-28.

Thai Industrial Standard Institute. 2003. Thai Community Product Standard, Fruit wine (TCPS 2/2546). Bangkok, Ministry of Industry.

Thai Industrial Standard Institute. 2003. Thai Community Product Standard, Herbal wine (TCPS 31/2546). Bangkok, Ministry of Industry.

Wauters, T., Iserentant, D. and Verachtert, H. 2001. Sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to tannic acid is due to iron deprivation. Can. J. Microbiol. 47(4): 290-293.