สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเมล็ดองุ่นเหลือทิ้งจากการผลิตไวน์ด้วยการออกแบบการทดลองแบบออทอกอนอลอะเรย์

ธวัชชัย ศุภวิทิตพัฒนา[1] และ คำรบ สมะวรรธนะ[2*]
มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ต.พลายชุมพล อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

** Corresponding Author : khamrop.s@psru.ac.th*
[1] ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร
[2] อาจารย์ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร

ข้อมูลบทความ

ประวัติบทความ :
รับเพื่อพิจารณา : 12 พฤษภาคม 2563
แก้ไข : 14 กันยายน 2563
ตอบรับ : 18 กันยายน 2563

คำสำคัญ :
เมล็ดองุ่นเหลือทิ้งจากการผลิตไวน์ / ฟีนอลิก / การต้านออกซิเดชัน / การออกแบบออทอกอนอลอะเรย์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเมล็ดองุ่นเหลือทิ้งจากการผลิตไวน์ด้วยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีออทอกอนอลอะเรย์ L_9 (3^4) โดยมีปัจจัยที่ศึกษาทั้งหมด 4 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นสารละลายเอทานอล (50, 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์) ระยะเวลาในการสกัด (20, 30 และ 40 นาที) สัดส่วนเมล็ดองุ่นบดต่อปริมาณเอทานอล (1:10, 1:20 และ 1:30 w/v) และขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นบด (เมล็ดองุ่นบดทั้งหมด เมล็ดองุ่นบดที่ค้างบนตะแกรง 40 เมช และเมล็ดองุ่นบดที่ผ่านตะแกรง 40 เมช) เมื่อวิเคราะห์ค่า Signal-to-noise ratio (S/N Ratio) พบว่า สภาวะการสกัดเมล็ดองุ่นที่เหมาะสม ประกอบด้วยการใช้สารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (A_2) ระยะเวลาในการสกัด 30 นาที (B_2) สัดส่วนเมล็ดองุ่นบดต่อปริมาณเอทานอลที่ 1:30 (C_3) และขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นบดที่ผ่านตะแกรง 40 เมช (D_3) สภาวะดังกล่าวให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และการต้านอนุมูลอิสระซึ่งประเมินด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS เท่ากับ 65.49±7.43 mg GAE/ g DM 43.78±5.46 mg CE/ g DM 331.64±5.45, 196.00±4.77 และ 423.03±4.98 µmol TE/ g DM ตามลำดับ สารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้ประกอบด้วยแคทีชิน อิพิแคทีชิน และโปรไซยานิดิน บี2 ในปริมาณ 1.61±0.10, 1.01±0.09 และ 0.82±0.07 mg/g DM ตามลำดับ ค่าที่ได้จากการทดลองและค่าจากการทำนายมีค่าใกล้เคียงกัน

Optimum Conditions for Antioxidants Extraction from Grape Seed By-product of Winery Using Orthogonal Array Design

Thawatchai Supavititpattana[1] and Khamrop Samavardhana[2*]
Pibulsongkram Rajabhat University, Plaichumpol, Muang, Phitsanulok 65000

* *Corresponding Author : khamrop.s@psru.ac.th*
[1] *Assistant Professor, Division of Food Science and Technology, Faculty of Food and Agricultural Technology.*
[2] *Lecturer, Division of Food Science and Technology, Faculty of Food and Agricultural Technology.*

Article Info

Article History:
Received: May 12, 2020
Revised: September 14, 2020
Accepted: September 18, 2020

Keywords:
Grape Seed Byproduct from Winery / Phenolic / Antioxidant / Orthogonal Array Design

Abstract

This study aimed to optimize the extraction conditions for grape seed by-product of winery using orthogonal array design L_9 (3^4). Four factors were investigated; these included ethanol concentration (50, 70 and 90%), extraction time (20, 30 and 40 min), solids to ethanol ratio (1:10, 1:20 and 1:30 w/v) and particle size of ground grape seed (whole ground grape seed, ground grape seed above 40-mesh sieve and ground grape seed through 40-mesh sieve). Based on signal-to-noise (S/N) analysis, it was found that the optimum condition was ethanol concentration 70% (A_2), extraction time 30 min (B_2), solids to ethanol ratio 1:30 w/v (C_3) and particle size through 40-mesh sieve (D_3). Total phenolics content, total flavonoids content, antioxidant activities as assessed by DPPH, FRAP and ABTS assays were noted to be 65.49±7.43 mg GAE/g DM, 43.78±5.46 mg CE/g DM, 331.64±5.45, 196.00±4.77 and 423.03±4.98 µmol TE/g DM, respectively. Phenolic compounds viz. catechin, epicatechin and procyanidin B2 were, respectively, noted at 1.61±0.10, 1.01±0.09 and 0.82±0.07mg/g DM in the extract obtained at the optimum condition. The experimental values were close to the predicted values.

1. บทนำ

องุ่นเป็นผลไม้ในวงศ์ *Vitis vinifera* L. ที่มีการเพาะปลูกในหลายประเทศทั่วโลก ส่วนใหญ่นำมาบริโภคสด ผลิตน้ำองุ่น ผลิตไวน์ และอบแห้ง เป็นต้น สำหรับประเทศไทยองุ่นพันธุ์ป๊อกดำ (Black queen) เป็นองุ่นอีกสายพันธุ์หนึ่งที่นิยมปลูกเพื่อนำมาบริโภคสดและนำมาแปรรูปในอุตสาหกรรมไวน์ กระบวนการแปรรูปดังกล่าวทำให้เกิดของเหลือจากกระบวนการผลิตในรูปของกาก (pomace) ซึ่งประกอบไปด้วยก้าน เปลือก และเมล็ด คิดเป็นปริมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ของผลสด เมล็ดองุ่นเป็นของเหลือที่มีปริมาณมากที่สุดของกากองุ่นคิดเป็นปริมาณ 35-52 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักกากทั้งหมด [1] เมล็ดองุ่นยังเป็นแหล่งสำคัญของสารประกอบฟีนอลิกมากถึง 60-70 เปอร์เซ็นต์ และส่วนใหญ่ที่พบเป็นสารในกลุ่มฟลาวานอล เช่น catechin, epicatechin, proanthocyanidins และ tannin [1-2] ซึ่งสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ช่วยยับยั้งการเสื่อมสลายของเซลล์ ลดการอักเสบ [3] มีการศึกษานำสารสกัดจากเมล็ดองุ่นมาใช้ในอาหาร เช่น การยับยั้งการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางประสาทสัมผัสระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เนื้อไก่บดระหว่างการแช่เย็น [4] ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และออกซิเดชันของเนื้อแกะชิ้นรูปสไลด์ [5] การยับยั้งการเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมีกายภาพและประสาทสัมผัสในระหว่างการเก็บของข้าวโพดแผ่น [6] การต้านออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์ขนมปัง [7] เป็นต้น ประกอบกับในปัจจุบันมีการศึกษาการนำของเหลือจากอุตสาหกรรมเกษตรมาใช้ประโยชน์ในการสกัดเป็นสารต้านออกซิเดชัน เนื่องจากของเหลือดังกล่าวเป็นแหล่งที่ดีของสารประกอบฟีนอลิก และสารต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มและการใช้ประโยชน์ให้กับของเหลือจากอุตสาหกรรมเกษตร

การออกแบบการทดลองด้วยวิธีออทอกอนอล อะเรย์ (Orthogonal array design: OAD) หรือวิธีทากูชิ (Taguchi method) เป็นการประยุกต์การออกแบบการทดลองเพื่อใช้ในการลดความผันแปรของผลิตภัณฑ์ โดยทำการเลือกปรับปัจจัยควบคุม (control factor) ซึ่งผลการทดลองจะถูกแปลงให้อยู่ในรูปของอัตราส่วนของ signal-to-noise (S/N Ratio) ซึ่งมีความสำคัญในการหาค่าที่เหมาะสม โดยที่คุณลักษณะของ S/N Ratio สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ small-the-better type problem, nominal-the-better type problem และ larger-the-better type problem ช่วยลดจำนวนของสิ่งทดลอง ประหยัดเวลา ต้นทุนในการทดลอง และให้ผลลัพธ์ที่น่าเชื่อถือ [8-9] มีงานวิจัยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตชัทนีย์พีนัทพร้อมบริโภคและสภาวะการเก็บรักษาที่เหมาะสมด้วยออทอกอนอล อะเรย์ แบบ L_4 (2^3) พบว่าการใช้น้ำส้มสายชูปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ใช้บรรจุภัณฑ์แบบขวดแก้ว เก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส มีผลต่อค่าการเกิดกรดไขมันและค่าการเหม็นหืนต่ำ และมีค่าปริมาณฟีนอลิกและการยอมรับโดยรวมของผู้ทดสอบมีปริมาณที่สูง [9] นอกจากนี้มีการออกแบบการทดลองด้วยออทอกอนอล อะเรย์ มาใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัด พอลิแซ็กคาไรด์จากของเหลือในการหมักถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *Flammulina velutipes* [10] ศึกษาปริมาณฟีนอลิกจากการสกัดเปลือกมันฝรั่งที่เป็นของเหลือจากกระบวนการผลิตด้วยการใช้ไมโครเวฟ [11] ศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จากเชื้อ *Weissella cibaria* [12]

ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ศึกษาสภาวะการสกัดที่เหมาะสมต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS ในการสกัดเมล็ดองุ่นโดยการออกแบบการทดลองแบบออทอกอนอล อะเรย์ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการนำของเหลือจากการผลิตทางอุตสาหกรรมเกษตรมาใช้ประโยชน์ได้ต่อไป

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 วัตถุดิบ

เมล็ดองุ่นสายพันธุ์ป๊อกดำ (*Vitis vinifera var*. Black queen) จากอุตสาหกรรมการผลิตไวน์องุ่นในจังหวัดพิษณุโลก คัดแยกเมล็ดองุ่นจากเปลือกด้วยตะแกรง นำเมล็ดองุ่นมาล้างด้วยน้ำประปาผึ่งเมล็ดองุ่นให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อนแบบชั้น (tray dryer) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนมีความชื้นสุดท้ายที่ 6-7 เปอร์เซ็นต์ นำเมล็ดองุ่นที่ผ่านการอบ 30 กรัม มาบดด้วยเครื่องบด (grinder) ที่ความเร็วต่ำ 7 วินาทีและความเร็วสูง 7 วินาที ทิ้งไว้ให้เย็น 14 วินาที เพื่อป้องกันความร้อนที่เกิดขึ้นแก่ตัวอย่าง จากนั้นบดด้วยวิธีการเดิมอีก 2 ครั้ง นำเมล็ดองุ่นบดมาแยกขนาดของอนุภาค 3 ขนาด ได้แก่ เมล็ดองุ่นบดทั้งหมด เมล็ดองุ่นบดที่ค้างบนตะแกรง 40 เมช (>40) และเมล็ดองุ่นบดที่ผ่าน

ตะแกรงขนาด 40 เมช (<40) จากนั้นนำเมล็ดองุ่นที่ผ่านการบดและแยกขนาดมาสกัดไขมันออกด้วย hexane ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) ด้วยวิธีการ soxhlet เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง นำเมล็ดองุ่นบดที่ผ่านการสกัดไขมันมาระเหยให้แห้งในตู้ดูดควันเป็นเวลา 14 ชั่วโมง บรรจุเมล็ดองุ่นบดในถุงอะลูมิเนียมฟอยด์เก็บที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการศึกษา ดัดแปลงจาก Ghafoor และ Choi [13] และ Bozan และคณะ [14]

2.2 การศึกษาสภาวะการสกัดเมล็ดองุ่นบด

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อสภาวะการสกัด 4 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของเอทานอล (A) ระยะเวลาในการสกัด (B) สัดส่วนเมล็ดองุ่นบดต่อปริมาณเอทานอล (C) และขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นที่ผ่านการบด (D) โดยแต่ละปัจจัยมีระดับที่ใช้ในการศึกษา 3 ระดับ ดังตารางที่ 1

การออกแบบการทดลองสภาวะการสกัดเมล็ดองุ่นที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไวน์ด้วยวิธีออทอกอนอล อะเรย์ (orthogonal array design (OAD)) แบบ L_9 (3^4) [10] ได้จำนวนสิ่งทดลอง 9 สิ่งทดลองดังตารางที่ 2 นำเมล็ดองุ่นบดมาศึกษาตามสภาวะที่ใช้ในการสกัดในแต่ละสิ่งทดลองสกัดด้วยเครื่องอัลตร้าโซนิค (ultrasonic) ตามระยะเวลาในการศึกษา นำสารสกัดในแต่ละสิ่งทดลองไป centrifuge ที่ 2,150 xg อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารสกัดเก็บที่ -18 องศาเซลเซียส และนำกากที่เหลือไปสกัดด้วยขั้นตอนเดิมอีกครั้ง นำสารสกัดที่ได้ทั้งสองครั้งใส่ขวดสีชานำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส [15] ในการนำไปใช้ในการวิเคราะห์สมบัติคุณภาพในด้านปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolics content (TPC)) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoids content (TFC)) และการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS โดยสารสกัดจากเมล็ดองุ่นถูกคำนวณในรูปของน้ำหนักแห้ง

ตารางที่ 1 ปัจจัยและระดับในการศึกษาการสกัดเมล็ดองุ่นที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไวน์

ปัจจัยในการศึกษา	ระดับ		
	1	2	3
A:ความเข้มข้นเอทานอล (เปอร์เซ็นต์)	50	70	90
B:เวลาในการสกัด (นาที)	20	30	40
C:สัดส่วนเมล็ดองุ่นบดต่อปริมาณเอทานอล (w/v)	1:10	1:20	1:30
D:ขนาดอนุภาคของเมล็ดอุ่นที่ผ่านการบด	เมล็ดองุ่นบดทั้งหมด (ground)	เมล็ดองุ่นบดที่ค้างบนตะแกรง 40 เมช (>40)	เมล็ดองุ่นบดที่ผ่านตะแกรง 40 เมช (<40)

ตารางที่ 2 การออกแบบการทดลองด้วยวิธีออทอกอนอล อะเรย์ ในการสกัดเมล็ดองุ่นที่เหลือทิ้งจากการผลิตไวน์

สิ่งทดลอง	ปัจจัยในการสกัด			
	A	B	C	D
1	1 (50)	1 (20)	1 (1:10)	1 (ground)
2	1 (50)	2 (30)	2 (1:20)	2 (>40)
3	1 (50)	3 (40)	3 (1:30)	3 (<40)

ตารางที่ 2 การออกแบบการทดลองด้วยวิธีออทอกอนอล อะเรย์ ในการสกัดเมล็ดองุ่นที่เหลือทิ้งจากการผลิตไวน์ (ต่อ)

สิ่งทดลอง	ปัจจัยในการสกัด			
	A	B	C	D
4	2 (70)	1 (20)	2 (1:20)	3 (<40)
5	2 (70)	2 (30)	3 (1:30)	1 (ground)
6	2 (70)	3 (40)	1 (1:10)	2 (>40)
7	3 (90)	1 (20)	3 (1:30)	2 (>40)
8	3 (90)	2 (30)	1 (1:10)	3 (<40)
9	3 (90)	3 (40)	2 (1:20)	1 (ground)

หมายเหตุ

A คือความเข้มข้นสารละลายเอทานอล (เปอร์เซ็นต์)

B คือระยะเวลาในการสกัด (นาที)

C คือสัดส่วนเมล็ดองุ่นบดต่อปริมาณเอทานอล (w/v)

D คือขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นบด

2.3 การวิเคราะห์สมบัติของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไวน์

2.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolics content (TPC)) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ประยุกต์ตามวิธีวิเคราะห์ของ Luque-Rodrıguez และคณะ [16]

ปิเปตสารสกัดองุ่นปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteau 0.25 N ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร เทียบกับ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกกับกราฟมาตรฐาน กรดแกลลิค (gallic acid) ที่ความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รายงานผลเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิคต่อน้ำหนักเมล็ดองุ่นแห้ง 1 กรัม (mg gallic acid equivalent /g dry matter; mg GAE/g DM)

2.3.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoids content; TFC) ด้วยวิธี aluminium chloride colorimetric method ประยุกต์ตามวิธีวิเคราะห์ของ Yang และคณะ [17]

นำสารสกัด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปราศจากอิออน (DI water) ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายโซเดียมไนไตรต์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายอลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเวลา 6 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นปราศจากอิออนปริมาตร 775 ไมโครลิตร นำมาผสมให้เข้ากันและวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร เทียบกับ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์กับกราฟมาตรฐานแคทีชิน (catechin) ที่ความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รายงานผลเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลย์ของแคทีชินต่อน้ำหนักเมล็ดองุ่นแห้ง 1 กรัม (mg catechin equivalent /g dry matter; mg CE/g DM)

2.3.3 ตรวจวัดสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

2.3.3.1 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical)

นำสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 3.8 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง และเติมตัวอย่างสารสกัดปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เทียบกับ blank โดยใช้แอบโซลูทเมทานอลแทนตัวอย่าง นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณการต้านอนุมูลอิสระโดยคำนวณเทียบจากกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ (trolox) รายงานผลเป็นหน่วยไมโครโมลสมมูลย์ของโทรลอกซ์ต่อน้ำหนักเมล็ดองุ่นแห้ง 1 กรัม (μmol trolox equivalent/g dry matter; μmol TE/g DM) [18]

2.3.3.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric Reducing Antioxidation Power (FRAP)

เตรียมสารละลาย acetate buffer pH 3.6, 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) ในสารละลาย 40 mM ของ HCl และ 20 mM ของ ferric chloride แล้วนำมาผสมกันในสัดส่วน 10 : 1 : 1 (v/v/v) ตามลำดับ จะได้สารละลาย FRAP reagent นำสารละลาย FRAP reagent จำนวน 3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมสารสกัดปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 4 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ โดยคำนวณเทียบจากกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ (trolox) รายงานผลเป็นหน่วยไมโครโมลสมมูลย์ของโทรลอกซ์ต่อน้ำหนักเมล็ดองุ่นแห้ง 1 กรัม (μmol trolox equivalent/g dry matter; μmol TE/g DM) [18]

2.3.3.3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS (2, 2'–azobis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)

เตรียม ABTS stock solution โดยผสมสารละลาย 7.0 mM ABTS กับ 2.45 mM โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ในอัตราส่วน 2:1 เก็บในที่มืดสภาวะอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ ABTS radical cation ก่อนนำมาใช้ให้ทำการเจือจาง ABTS ด้วยเอทานอลให้มีค่าดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.700±0.030 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ปิเปตสารละลาย ABTS 3.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ปิเปตสารสกัดปริมาตร 35 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 734 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณการต้านอนุมูลอิสระโดยคำนวณเทียบจากกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ (trolox) รายงานผลเป็นหน่วยไมโครโมลสมมูลย์ของโทรลอกซ์ต่อน้ำหนักเมล็ดองุ่นแห้ง 1 กรัม (μmol trolox equivalent/g dry matter; μmol TE/g DM) [18]

2.4 การทดลองทวนสอบและยืนยันสภาวะการสกัดเมล็ดองุ่นที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไวน์ที่เหมาะสม

เลือกสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดเมล็ดองุ่นที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไวน์ในแต่ละระดับของแต่ละปัจจัยด้วยการออกแบบการทดลองแบบออทอกอนอล อะเรย์ ที่มีต่อสมบัติด้านปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS ในปริมาณสูงสุด เพื่อนำค่าที่ได้จากค่าการทำนายมายืนยันผลความถูกต้องของสภาวะการสกัดเมล็ดองุ่น และคำนวณหาค่าความคลาดเคลื่อนระหว่างค่าที่ได้จากการทำนายและค่าที่ทดลองอีกครั้ง ดังสมการที่ 1 [19]

ความคลาดเคลื่อน (เปอร์เซ็นต์ ; %E) =

$$\frac{1}{\text{จำนวนตัวอย่างทดลอง}}\left[\frac{\text{ค่าจากการทดลอง}-\text{ค่าจากการทำนาย}}{\text{ค่าจากการทดลอง}}\right] x\ 100 \quad (1)$$

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วย HPLC

นำสารสกัดเมล็ดองุ่นบดที่ผ่านการเลือกกระบวนการสกัดที่เหมาะสมมาวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่ม flavan-3-ols ได้แก่ แคทีชิน (catechin) อิพิแคทีชิน (epicatechin) และโปรไซยานิดิน บี2 (procyanidin B2) ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) ใช้คอลัมน์ C18 ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 100A ตรวจวัดสารด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีสภาวะการทดสอบแบบ isocratic ใช้ mobile phase เป็นกรดอะซิติก

เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (phase A) และอะซิโตไนไตรล์เข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ (phase B) และใช้สัดส่วนของ A:B เท่ากับ 90:10 ฉีดตัวอย่างปริมาณ 10 ไมโครลิตร ให้มีอัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที คำนวณหาปริมาณของสารแต่ละชนิดจากกราฟมาตรฐานที่ได้จากการเตรียม calibration curve ของ catechin, procyanidin B2 และ epicatechin ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10, 30 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดัดแปลงจาก Hatzidimitriou และคณะ [20]

2.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

การออกแบบการทดลองสภาวะการสกัดเมล็ดองุ่นที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไวน์ด้วยวิธีออทอกอนอล อะเรย์แบบ L_9 (3^4) ใช้ในการคำนวณหาค่า S/N Ratio โดยคำนวณค่าอัตราส่วน S/N Ratio ชนิดของค่าตอบสนองที่มากที่สุดคือค่าที่ดีที่สุด (larger-the-better) ดังสมการที่ 2 [11]

S/N Ratio แบบ larger-the-better

$$S/N = -10 \log \left[\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}\frac{1}{yi^2}\right] \quad (2)$$

เมื่อ

S/N คือ อัตราส่วนของ S/N ในแต่ละสิ่งทดลอง
n คือ จำนวนการทดลองซ้ำในแต่ละสิ่งทดลอง
yi คือ ค่าตอบสนองในแต่ละครั้งของการทดลองของแต่ละสิ่งทดลอง

3. ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาสภาวะการสกัดเมล็ดองุ่นที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไวน์

การศึกษาหาสภาวะการสกัดของเมล็ดองุ่นที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไวน์โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีออทอกอนอล อะเรย์ L_9 จำนวน 9 สิ่งทดลอง มีปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล เวลาในการสกัด สัดส่วนเมล็ดองุ่นบดต่อปริมาณเอทานอล และขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นที่ผ่านการบดที่มีต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS ซึ่งได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3 พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด มีปริมาณอยู่ระหว่าง 16.34-60.96 mg GAE/g DM ปริมาณฟีนอลิกจากการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yilmaz และ Toledo [21] พบว่าปริมาณฟีนอลิกของเมล็ดองุ่นสายพันธุ์ Chardonay, Merlot และMuscadine ที่เหลือจากการผลิตไวน์มีค่า 52.67, 38.45 และ 32.12 mg GAE/g DM ตามลำดับ เมล็ดองุ่นสายพันธุ์ Cabernet Sauvignon และ Purple grape มีปริมาณฟีนอลิกมีค่า 99.28 และ 15.79 mg GAE/g DM ตามลำดับ ซึ่งปริมาณฟีนอลิกที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ วิธีการสกัด เป็นต้น [22] ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอยู่ระหว่าง 10.21-41.26 mg CE/g DM การต้านอนุมูลอิสระวัดด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS มีค่าอยู่ระหว่าง 50.65-292.59, 33.78-188.97 และ 62.66-368.15 µmol TE/g DM ตามลำดับ

สิ่งทดลองที่สามารถสกัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระวัดด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS ที่สูงสุดคือ สิ่งทดลองที่ 3 ที่มีสภาวะการสกัดด้วยการใช้สารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการสกัดที่ 40 นาที มีสัดส่วนเมล็ดองุ่นบดต่อปริมาณเอทานอลที่ 1:30 และขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นบดผ่านตะแกรง 40 เมช โดยในสภาวะดังกล่าวสกัดฟีนอลิกทั้งหมดได้ปริมาณ 60.96 mg GAE/g DM ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมีค่า 41.26 mg CE/g DM สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระวัดด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS มีค่า 292.59, 188.97 และ 368.15 µmol TE/g DM ตามลำดับ และสิ่งทดลองที่ 6 มีสมบัติในด้านดังกล่าวน้อยที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสภาวะที่ใช้ในการสกัดที่แตกต่างกันระหว่างสิ่งทดลองที่ 3 และ 6 ได้แก่ ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลที่เพิ่มจาก 50 เป็น 70 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนเมล็ดองุ่นบดต่อปริมาณเอทานอลลดลงจาก 1:30 เป็น 1:10 และขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นบดผ่านตะแกรง 40 เมช เป็นเมล็ดองุ่นบดค้างบนตะแกรง 40 เมช ซึ่งปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธี ที่เพิ่มขึ้น โดยปริมาณของสารละลายที่เพิ่มขึ้นจาก 1:10 เป็น 1:30 ช่วยในการกระจายพลังงานของอัลตร้าโซนิคให้เคลื่อนที่ในสารละลายระหว่างการสกัดช่วยในการถ่ายเทมวลสาร [23-24] และขนาดของอนุภาคที่เล็กลงช่วยเพิ่มพื้นผิวและประสิทธิภาพของสารสกัดให้เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยลด

ระยะทางของสารประกอบที่ได้จากการสกัดไปสู่ผิวหน้าได้เร็วขึ้น [25-26]

จากผลการออกแบบการทดลองด้วยวิธี ออทอกอนอล อะเรย์ นำมาหาระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS โดยหาอัตราส่วนของ signal-to-noise (S/N Ratio) ของระดับต่างๆ ในแต่ละปัจจัยที่ใช้ทดลองจำนวน 9 สิ่งทดลอง ซึ่งสมบัติของสารสกัดที่ศึกษาทุกค่าให้มีปริมาณมากเป็นหลัก ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้การคำนวณแบบค่ามากกว่าให้ผลดี (larger-the-better type) ตามสมการที่ 2 ในสภาวะการสกัดดังกล่าวจะทำให้ได้สมบัติในด้านต่างๆ ของสารสกัดสูงสุด ดังตารางที่ 4

จากตารางที่ 4 พบว่าค่า S/N Ratio ของสมบัติสารสกัดเมล็ดองุ่นบดที่มีต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS มีค่าอยู่ระหว่าง 24.26-35.70, 20.18-32.31, 34.09-49.32, 30.57-45.53 และ 35.94-51.32 ตามลำดับ จากนั้นนำค่า S/N Ratio ของแต่ละระดับในแต่ละปัจจัยมาหาค่าเฉลี่ยเพื่อหาผลต่าง (R) ซึ่งค่าผลต่างของ S/N Ratio ของปัจจัยที่มีค่ามากที่สุดในแต่ละสมบัติของสารสกัดเมล็ดองุ่นบดแสดงให้เห็นว่าในปัจจัยนั้นมีผลต่อสมบัติที่ศึกษา โดยได้ค่าเฉลี่ย S/N Ratio และผลต่างของ S/N Ratio ดังตารางที่ 5

จากตารางที่ 5 ทำให้ทราบถึงอิทธิพลของปัจจัยที่มีต่อสภาวะการสกัดเมล็ดองุ่นบดโดยพิจารณาจากค่า R ซึ่งปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาที่มีค่า R สูงสุดจะมีผลต่อค่าตอบสนองนั้นๆ มากที่สุด จากการศึกษาพบว่าปัจจัยด้านขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นบดมีผลต่อค่า R ของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS มากที่สุด มีค่าเท่ากับ 10.63, 11.12, 14.05, 13.46 และ 13.87 ตามลำดับ เนื่องมาจากขนาดอนุภาคที่มีขนาดเล็กช่วยเพิ่มพื้นที่ในการสัมผัสกับตัวทำละลายทำให้สารละลายสามารถแพร่กระจายและเกิดการถ่ายเทมวลสารในกระบวนการสกัดได้ดีกว่าขนาดอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ [27] นอกจากนี้ขนาดอนุภาคที่เล็กใช้ระยะเวลาในการถ่ายเทมวลสารที่สั้นลงส่งผลให้การถ่ายเทมวลของตัวถูกละลายระหว่างเฟสได้มากขึ้น [28-29] ปัจจัยที่มีอิทธิพลรองลงมาได้แก่ สัดส่วนเมล็ดองุ่นบดต่อปริมาณเอทานอลที่เหมาะสมในการสกัด ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและระยะเวลาในการสกัด อิทธิพลของปัจจัยที่มีต่อปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสอดคล้องกับสภาวะการสกัดฟีนอลิก เนื่องมาจากฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มองค์ประกอบหนึ่งของฟีนอลิก เมื่อปริมาณฟีนอลิกสูงปริมาณฟลาโวนอยด์ก็จะสูงตามไปด้วย ทำให้มีความสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกโดยตรงส่งผลให้มีสภาวะการสกัดที่สอดคล้องกัน การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS มีอิทธิพลของปัจจัยที่สอดคล้องกับสภาวะการสกัดฟีนอลิก โดยการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธีมีความสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เมื่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงส่งผลให้การต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธีสูงตามไปด้วย ซึ่งค่าเฉลี่ยของ S/N Ratio ที่ระดับของแต่ละปัจจัยที่มีค่าเฉลี่ยสูงสุดแสดงถึงระดับที่เหมาะสมซึ่งระดับของแต่ละปัจจัยดังกล่าวจะถูกเลือกมาเป็นสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้สารสกัดเมล็ดองุ่นมีสมบัติในด้านต่างๆ ที่ต้องการได้สูงสุด

สภาวะการสกัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดเมล็ดองุ่นที่เหมาะสม พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลจาก 50 เป็น 70 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมีค่าเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ทั้งปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมีค่าลดลง โดยทั่วไปสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มที่มี hydroxylated aglycone forms ในโครงสร้างมากมักละลายได้ดีในตัวทำละลายแอลกอฮอล์ ขณะที่สารประกอบฟีนอลิกกลุ่มที่มีขั้วมักถูกสกัดออกมาได้ด้วยน้ำ [30] ซึ่งสอดคล้องกับ Wang และคณะ [31] พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอล เนื่องจากความเข้มข้นของเอทานอลที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อความเป็นขั้ว (polarity) ของสารละลายเอทานอลที่เปลี่ยนแปลงความเป็นขั้วของตัวทำละลายเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ได้ปริมาณสารสกัด ชนิดและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน ซึ่งมีผลต่อความเป็นขั้วที่เหมือนกับสารประกอบฟีนอลิกทำให้ถูกสกัดออกมาได้ง่ายเมื่อความเป็นขั้วของสารละลายและฟีนอลิกเหมือนกัน [23, 32-33] ปัจจัยด้านระยะเวลาในการสกัดที่เพิ่มขึ้นจาก 20 เป็น 30 นาที มีผลต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณ ฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อระยะเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นเป็น 40 นาที มีผลต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่มีค่าลดลง ซึ่งระยะเวลา

ในการสกัดที่เพิ่มขึ้นทำให้เกิดการออกซิเดชั่นของสารสกัดต่อสภาวะแวดล้อม เช่น ออกซิเจน และแสง มีผลต่อปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่ลดลง [32, 34] ปัจจัยด้านสัดส่วนเมล็ดองุ่นบดต่อปริมาณเอทานอลมีผลต่อแนวโน้มปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของสารละลายเพิ่มขึ้น ด้านของขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นบดโดยขนาดอนุภาคเมล็ดองุ่นบดผ่านตะแกรง 40 เมช เป็นระดับที่มีผลต่อปริมาณฟีนอลิกสูงสุด รองลงมาได้แก่ ขนาดอนุภาคเมล็ดองุ่นบดทั้งหมด และ ขนาดอนุภาคเมล็ดองุ่นบดที่ค้างบนตะแกรง 40 เมช

จากข้อมูลดังกล่าว พบว่าสภาวะการสกัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด มีสภาวะการสกัดที่เหมาะสมเดียวกันด้วยการใช้สารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (A_2) ระยะเวลาในการสกัดที่ 30 นาที (B_2) สัดส่วนเมล็ดองุ่นบดต่อปริมาณเอทานอลที่ 1:30 (C_3) และขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นบดที่ผ่านตะแกรง 40 เมช (D_3) ดังตารางที่ 5

การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เป็นการทดสอบความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมของสารต้านอนุมูลอิสระแก่อนุมูลของ DPPH วิธี ABTS เป็นการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูล ABTS ที่ถูกออกซิไดซ์ด้วย $K_2S_2O_8$ [35] และวิธี FRAP เป็นการวัดค่า total antioxidant activity ด้วยกลไกการลดลงของ ferric-tripyridyl-triazine complex ไปเป็นสารประกอบ ferrous จึงเป็นการวัดค่า total reducing power ของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS มีสภาวะการสกัดที่เหมาะสมสอดคล้องกันคือสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (A_2) ระยะเวลาในการสกัดที่ 30 นาที (B_2) สัดส่วนเมล็ดองุ่นบดต่อปริมาณเอทานอลที่ 1:30 (C_3) และขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นบดที่ผ่านตะแกรง 40 เมช (D_3) ดังตารางที่ 5 จากปัจจัยที่ใช้ในการศึกษา พบว่าปัจจัยด้านขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นที่ผ่านการบดที่มีระดับแตกต่างกันมีผลต่อค่า S/N Ratio ของการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธี มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปัจจัยอื่น โดยขนาดอนุภาคเมล็ดองุ่นบดที่ผ่านตะแกรง 40 เมช เป็นระดับที่มีผลต่อการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมาได้แก่ ขนาดอนุภาคเมล็ดองุ่นบดทั้งหมด และขนาดอนุภาคเมล็ดองุ่นบดที่ค้างบนตะแกรง 40 เมช ส่วนปัจจัยที่มีผลต่อค่า S/N Ratio รองลงมาได้แก่ สัดส่วนปริมาณเมล็ดองุ่นบดต่อปริมาณเอทานอล ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล และระยะเวลาในการสกัด ตามลำดับ เป็นปัจจัยหลักที่สอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

จากการศึกษาสภาวะการสกัดเมล็ดองุ่นบดที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัย (Q) พบว่าใช้สารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (A_2) ระยะเวลาในการสกัดที่ 30 นาที (B_2) สัดส่วนเมล็ดองุ่นบดต่อปริมาณเอทานอลที่ 1:30 (C_3) และขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นบดที่ผ่านตะแกรง 40 เมช (D_3) เป็นสภาวะการสกัดที่เหมาะสมต่อสมบัติในด้านปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS เพื่อใช้ในการทำนายปริมาณของสมบัติในด้านต่างๆ ด้วยโปรแกรม และยืนยันสภาวะการสกัดที่ได้จากการทำนายต่อไป

ตารางที่ 3 ผลการทดลองการสกัดเมล็ดองุ่นบดจากการออกแบบการทดลองวิธีออทอกอนอล อะเรย์

สิ่งทดลอง	ปัจจัย				สมบัติของสารสกัด				
	A	B	C	D	TPC (mg GAE/ g DM)	TFC (mg CE/ g DM)	DPPH (μmol TE/g DM)	FRAP (μmol TE/g DM)	ABTS (μmol TE/g DM)
1	1	1	1	1	24.33	14.31	72.73	49.10	80.64
2	1	2	2	2	16.89	11.39	52.89	33.78	62.66
3	1	3	3	3	60.96	41.26	292.59	188.97	368.15
4	2	1	2	3	58.49	40.00	288.10	171.77	352.15

ตารางที่ 3 ผลการทดลองการสกัดเมล็ดองุ่นบดจากการออกแบบการทดลองวิธีออทอกอนอล อะเรย์ (ต่อ)

สิ่งทดลอง	ปัจจัย				สมบัติของสารสกัด				
	A	B	C	D	TPC (mg GAE/ g DM)	TFC (mg CE/ g DM)	DPPH (μmol TE/g DM)	FRAP (μmol TE/g DM)	ABTS (μmol TE/g DM)
5	2	2	3	1	32.86	23.75	161.69	96.38	184.66
6	2	3	1	2	16.34	10.21	50.65	38.48	65.34
7	3	1	3	2	18.43	12.21	57.59	40.19	79.87
8	3	2	1	3	56.01	40.10	234.03	168.02	303.64
9	3	3	2	1	28.08	19.52	84.23	58.96	108.66

หมายเหตุ

A คือความเข้มข้นสารละลายเอทานอล (เปอร์เซ็นต์)

B คือระยะเวลาในการสกัด (นาที)

C คือสัดส่วนเมล็ดองุ่นบดต่อปริมาณเอทานอล (w/v)

D คือขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นบด

ตารางที่ 4 ค่า S/N Ratio ของสมบัติสารสกัดเมล็ดองุ่นบดจากการออกแบบการทดลองวิธีออทอกอนอล อะเรย์

สิ่งทดลอง	ปัจจัย				S/N Ratio				
	A	B	C	D	TPC	TFC	DPPH	FRAP	ABTS
1	1	1	1	1	27.72	23.12	37.23	33.82	38.13
2	1	2	2	2	24.55	21.13	34.47	30.57	35.94
3	1	3	3	3	35.70	32.31	49.32	45.53	51.32
4	2	1	2	3	35.34	32.04	49.19	44.70	50.93
5	2	2	3	1	30.33	27.51	44.17	39.68	45.33
6	2	3	1	2	24.26	20.18	34.09	31.70	36.30
7	3	1	3	2	25.31	21.73	35.21	32.08	38.05
8	3	2	1	3	34.96	32.06	47.39	44.51	49.65
9	3	3	2	1	28.97	25.81	38.51	35.41	40.72

ตารางที่ 5 วิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยด้วยค่า S/N Ratio เฉลี่ยของสมบัติสารสกัดเมล็ดองุ่นบด

สมบัติของสารสกัด	ปัจจัยในการศึกษา	K_1	K_2	K_3	R	Q
TPC (mg GAE/g DM)						
	A	29.33	29.98	29.75	0.65	A_2
	B	29.46	29.95	29.64	0.49	B_2
	C	28.98	29.62	30.45	1.46	C_3
	D	29.01	24.71	35.34	10.63	D_3
TFC (mg CE/g DM)						
	A	25.52	26.58	26.53	1.06	A_2
	B	25.63	26.90	26.10	1.27	B_2
	C	25.12	26.33	27.19	2.07	C_3
	D	25.48	21.01	32.14	11.12	D_3
DPPH (µmol TE/g DM)						
	A	40.34	42.49	40.37	2.14	A_2
	B	40.54	42.01	40.64	1.46	B_2
	C	39.57	40.72	42.90	3.33	C_3
	D	39.97	34.59	48.63	14.05	D_3
FRAP (µmol TE/g DM)						
	A	36.64	38.69	37.33	2.05	A_2
	B	36.87	38.25	37.55	1.39	B_2
	C	36.68	36.89	39.10	2.42	C_3
	D	36.30	31.45	44.91	13.46	D_3
ABTS (µmol TE/g DM)						
	A	41.80	44.19	42.81	2.39	A_2
	B	42.37	43.64	42.78	1.27	B_2
	C	41.36	42.53	44.90	3.54	C_3
	D	41.39	36.76	50.63	13.87	D_3

K_1 คือค่า S/N Ratio เฉลี่ยของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS ของแต่ละปัจจัยในระดับต่ำ

K_2 คือค่า S/N Ratio เฉลี่ยของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS ของแต่ละปัจจัยในระดับกลาง

K_3 คือค่า S/N Ratio เฉลี่ยของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS ของแต่ละปัจจัยในระดับสูง

R คือผลต่างของค่าเฉลี่ย S/N Ratio ของแต่ละปัจจัย = ($K_{max} - K_{min}$)

Q คือระดับที่เหมาะสมในการสกัดเมล็ดองุ่นในแต่ละปัจจัยต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษา

3.2 การทวนสอบและยืนยันสภาวะการสกัดเมล็ดองุ่นที่เหลือทิ้งจากการผลิตไวน์ที่เหมาะสม

นำสภาวะการสกัดที่เหมาะสมจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีออทอกอนอล อะเรย์ ด้วยโปรแกรม Minitab พบว่าค่าที่ได้จากการทำนายต่อสมบัติด้านปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS มีค่า 62.92 mg GAE/g DM, 45.01 mg CE/g DM, 327.05 µmol TE/g DM, 204.48 µmol TE/g DM และ 401.32 µmol TE/g DM ตามลำดับ (ตารางที่ 6) จากนั้นนำสภาวะการสกัดที่เหมาะสมดังกล่าวมาใช้ในการสกัดเมล็ดองุ่นบดอีกครั้งเพื่อยืนยันผลการทดลอง พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 65.49±7.43 mg GAE/g DM ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 43.78±5.46 mg CE/g DM การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS มีค่า 331.64±5.45, 196.00±4.77 และ 423.03±4.98 µmol TE/g DM ตามลำดับ ดังตารางที่ 6 เมื่อพิจารณาค่าความคลาดเคลื่อนระหว่างค่าจากการทำนายและค่าจากการทดลองมีค่าความคลาดเคลื่อนอยู่ระหว่าง -1.43 ถึง 1.69 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH และ ABTS ที่ได้จากการทดลองมีปริมาณมากกว่าค่าที่ได้จากการทำนายทำให้ค่าความคลาดเคลื่อนเป็นบวกสำหรับปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ได้ค่าทำนายที่มากกว่าค่าจากการทดลองจึงส่งผลให้ค่าความคลาดเคลื่อนติดลบ

นอกจากนี้ได้นำสภาวะการสกัดเมล็ดองุ่นที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไวน์ที่เหมาะสมมาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ แคทีชิน อิพิแคทีชิน และโปรไซยานิดิน บี2 ด้วยเครื่อง HPLC จากการศึกษาพบว่ามีปริมาณแคทีชินเท่ากับ 1.61±0.10 mg/g DM ปริมาณอิพิแคทีชิน เท่ากับ 1.01±0.09 mg/g DM และโปรไซยานิดิน บี2 เท่ากับ 0.82±0.07 mg/g DM จากการศึกษาของ Chedea และคณะ [2] และ Carrera และคณะ [36] พบว่าแคทีชินเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่พบมากที่สุดคิดเป็นสัดส่วน 48-51 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นอิพิแคทีชินปริมาณ 29-31 เปอร์เซ็นต์ และโปรไซยานิดิน บี2 ปริมาณ 20-22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกดังกล่าวน้อยกว่าการศึกษาของ Bozan และคณะ [14] พบว่า ปริมาณของแคทีชิน อิพิแคทีชิน และ โปรไซยานิดิน บี2 ของเมล็ดองุ่นสดสายพันธุ์ Merlot, Carbenet Sauvignon, Cinsault, Alphonso Lavallee, Papaz Karasi, Muscat, Hamburg, Ada Karasi และ Senso มีค่าอยู่ระหว่าง 4.71-23.8 mg/g DM 2.49-16.88 mg/g DM และ 0.41-1.60 mg/g DM ตามลำดับ ปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ขององุ่น สถานที่เพาะปลูก สภาพอากาศ และอีกสาเหตุหลักของการลดลงที่พบจากการศึกษานี้เกิดมาจากในระหว่างการหมักและระยะเวลาในการหมักของกากองุ่นที่อยู่ในน้ำไวน์เป็นเวลานานทำให้เกิดการชะของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ลงสู่น้ำไวน์ทำให้เหลือปริมาณที่พบในเมล็ดองุ่นลดลง [37-39]

ตารางที่ 6 ค่าทำนาย ค่าจากการทดลอง และค่าความคลาดเคลื่อนในสภาวะการสกัดเมล็ดองุ่นบดที่เหมาะสม

สมบัติสารสกัด	สภาวะการสกัดที่เหมาะสม*				ค่าทำนาย	ค่าทดลอง	%E
	A	B	C	D			
TPC					62.92	65.49±7.43	1.30
TFC					45.01	43.78±5.46	-0.92
DPPH	2 (70)	2 (30)	3 (1:30)	3 (<40)	327.05	331.64±5.45	0.46
FRAP					204.48	196.00±4.77	-1.43
ABTS					401.32	423.03±4.98	1.69

หมายเหตุ

*สภาวะการสกัดที่เหมาะสมของฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด DPPH, FRAP และ ABTS ใช้สภาวะการสกัดเดียวกัน

A คือสารละลายเอทานอลที่มีความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์)

B คือระยะเวลาในการสกัด (นาที)

C คือสัดส่วนเมล็ดองุ่นบดต่อปริมาณเอทานอล (w/v)

D คือขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นบด

4. สรุป

การออกแบบการทดลองด้วยวิธีออทอกอนอล อะเรย์ สามารถนำมาใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเมล็ดองุ่นเหลือทิ้งจากการผลิตไวน์ โดยขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นบดเป็นปัจจัยที่มีผลต่อสมบัติของสารสกัดเมล็ดองุ่นมากที่สุด มีสภาวะการสกัดที่เหมาะสมด้วยการใช้สารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (A_2) ระยะเวลาในการสกัดที่ 30 นาที (B_2) สัดส่วนเมล็ดองุ่นบดต่อปริมาณเอทานอลที่ 1:30 (C_3) และขนาดอนุภาคของเมล็ดองุ่นบดที่ผ่านตะแกรง 40 เมช (D_3) เมื่อทวนสอบและยืนยันสภาวะการสกัดมีค่าความคลาดเคลื่อนอยู่ระหว่าง -1.43 ถึง 1.69

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณวิสาหกิจชุมชนวังพิกุลไวน์ ที่อนุเคราะห์เมล็ดองุ่นที่ใช้เป็นวัตถุดิบในงานวิจัยนี้ รวมถึงสาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในเรื่องเครื่องมือและวัสดุทางวิทยาศาสตร์สำหรับการวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

1. Maier, T., Schieber, A., Kammerer, D.R. and Carle, R., 2009, "Residues of Grape (*Vitis vinifera* L.) Seed Oil Production as a Valuable Source of Phenolic Antioxidants," *Food Chemistry*, 112 (3), pp. 551-559.

2. Chedea, V.S., Braicu, C. and Socaciu, C., 2010, "Antioxidant/prooxidant Activity of Polyphenolic Grape Seed Extract," *Food Chemistry*, 121 (1), pp. 132-139.

3. Arct, J. and Pytkowska, K., 2008, "Flavonoids as Components of Biologically Active Cosmeceuticals," *Clinics in Dermatology*, 26 (4), pp. 347-357.

4. Brannan, R.G., 2009, "Effect of Grape Seed Extract on Descriptive Sensory Analysis of Ground Chicken During Refrigerated Storage," *Meat Science*, 81 (4), pp. 589-595.

5. Reddy, G.V.B., Sen, A.R., Nair, P.N., Reddy, K.S., Reddy, K.K. and Kondaiah, N., 2013, "Effects of Grape Seed Extract on the Oxidative and Microbial Stability of Restructured Mutton Slices," *Meat Science*, 95 (2), pp. 288–294.

6. Rababah, T.M., Yücel, S., Ereifej, K.I., Alhamad, M.N., Al-Mahasneh, M.A., Yang, W., Muhammad, A.H. and Ismaeal, K., 2010, "Effect of Grape Seed Extracts on the Physicochemical and Sensory Properties of Corn Chips During Storage," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88 (5), pp. 631-637.

7. Peng, X., Ma, J., Cheng, K.W., Jiang, Y., Chen, F. and Wang, M., 2010, "The Effects of Grape Seed Extract Fortification on the Antioxidant Activity and Quality Attributes of Bread," *Food Chemistry*, 119 (1), pp. 49-53.

8. Kanlayakrit, W., Chantra, J. and Booranasawet-tatham, S., 2008, "Optimum Condition for Production of Lookpang-lao in Lab Scale by Taguchi Method," *Proceedings of 46th Kasetsart University Annual Conference: Agro-Industry*, pp. 371-379. (In Thai)

9. Chandrasekar, V., Kannan, K., Priyavarshini, R. and Gayathri, R., 2015, "Application of Taguchi Method in Optimization of Process Factors of Ready to Eat Peanut *(Arachis hypogaea)* Chutney," *International Food Research Journal*, 22 (2), pp. 510-516.

10. Shi, M., Yang, Y., Guan, D., Zhang, Y. and Zhang, Z., 2012, "Bioactivity of the Polysaccharides from Fermented Soybean Curd Residue by *Flammulina velutipes*," *Carbohydrate Polymer*, 89 (4), pp. 1268-1276.

11. Wu, T., Yan, J., Liu, R., Marcone, M.F., Aisa, H.A. and Tsao, R., 2012, "Optimization of Microwave-assisted Extraction of Phenolic from Potato and Its Downstream Waste using Orthogonal Array Design," *Food Chemistry*, 133 (4), pp. 1292-1298.

12. Yu, Y.J., Chen, Z., Chen, P.T. and Ng, I.S., 2018, "Production, Characterization and Antibacterial Activity of Exopolysaccharide from a Newly Isolated *Weissella*

cibaria under Sucrose Effect," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126 (6), pp. 769–777.

13. Ghafoor, K. and Choi, Y.H., 2009, "Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidants from Grape Peel through Response Surface Methodology," *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52 (2), pp. 295-300.

14. Bozan, B., Tosun, G. and ÖZcan, D., 2008, "Study of Polyphenol Content in the Seeds of Red Grape (*Vitis vinifera* L.) Varieties Cultivated in Turkey and Their Antiradical Activity," *Food Chemistry*, 109 (2), pp. 426-430.

15. Spigno, G., Tramelli, L. and Faveri, D.M.D., 2007, "Effects of Extraction Time, Temperature and Solvent on Concentration and Antioxidant Activity of Grape Marc Phenolics," *Journal of Food Engineering*, 81 (1), pp. 200-208.

16. Luque-Rodrıguez, J.M., Luque de Castro, M.D. and Perez-Juan, P., 2007, "Dynamic Superheated Liquid Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Red Grape Skins of Winemaking Residues," *Bioresource Technology*, 98 (14), pp. 2705–2713.

17. Yang, J., Martinson, T.E. and Liu, R.H., 2009, "Phytochemical Profiles and Antioxidant Activities of Wine Grapes," *Food Chemistry*, 116 (1), pp. 332-339.

18. Samavardhana, K., Supawititpattana, P., Jitrepotch, N., Rojsuntornkitti, K. and Kongbangkerd, T., 2015, "Effects of Extracting Conditions on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity from Different Grape Processing Byproducts," *International Food Research Journal*, 22 (3), pp. 1169-1179.

19. Hussain, A.I., Chatha, S.A.S., Noor, S., Arshad, M.U., Khan, Z.A., Rathore, H.A. and Sattar, M.Z.A., 2012, "Effect of Extraction Techniques and Solvent Systems on the Extraction of Antioxidant Components from Peanut (*Arachishypogaea* L.) Hulls," *Food Analytical Methods*, 5 (4), pp. 890-896.

20. Hatzidimitriou, E., Nenadis, N. and Tsimidou, M.Z., 2007, "Changes in the Catechin and Epicatechin Content of Grape Seeds on Storage under Different Water Activity (a_w) Conditions," *Food Chemistry*, 105 (4), pp. 1504-1511.

21. Yilmaz, Y. and Toledo, R.T., 2006, "Oxygen Radical Absorbance Capacities of Grape/wine Industry Byproducts and Effect of Solvent Type on Extraction of Grape Seed Polyphenols," *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (1), pp. 41-48.

22. Xu, C., Zhang, Y., Wang, J. and Lu, J., 2010, "Extraction, Distribution and Characterization of Phenolic Compounds and Oils in Grape Seeds," *Food Chemistry*, 122 (3), pp. 688-694.

23. Tabaraki, R., Heidarizadi, E. and Benvidi, A., 2012, "Optimization of Ultrasonic Assisted Extraction of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Antioxidants by Response Surface Methodology," *Separation and Purification Technology*, 98 (1), pp. 16-23.

24. Tao, Y., Wu, D., Zhang, Q.A. and Sun, D.W., 2014, "Ultrasound-assisted Extraction of Phenolics from Wine Lees: Modeling, Optimization and Stability of Extracts During Storage," *Ultrasonics Sonochemistry*, 21 (2), pp. 706-715.

25. Chan, E.W.C., Lye, P.Y., Tan, L.N., Eng, S.Y., Tan, Y.P. and Wong, Z.C., 2012, "Effects of Drying Method and Particle Size on the Antioxidant Properties of Leaves and Teas of *Morusalba, Lagerstroemia speciosa* and *Thunbergia laurifolia," Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 18 (1), pp. 45-472.

26. Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Diaz-Rubio, M.E., Serrano, J., Goñi , I. and Saura-Calixto, F., 2008, "Update Methodology to Determine Antioxidant Capacity in Plant Foods, Oil and Beverages: Extraction, Measurement and Expression of Results," *Food Research International*, 41 (3), pp. 274-285

27. Durling, N.E., Catchpole, O.J., Grey, J.B., Webby, R.F., Mitchell, K.A., Foo, L.Y. and Perry, N.B., 2007, "Extraction of Phenolics and Essential Oil from Dried Sage (*Salvia officinalis*) Using Ethanol-water Mixtures," *Food Chemistry*, 101 (4), pp. 1417-1424.

28. Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., and Velić, D., 2007, "Study of Solid-liquid Extraction Kinetics of Total Polyphenols from Grape Seeds," *Journal of Food Engineering*, 81 (1), pp. 236-242.

29. Qu, W., Pan, Z. and Ma, H., 2010, "Extraction Modeling and Activities of Antioxidants from Pomegranate Marc," *Journal of Food Engineering*, 99 (1), pp. 16-23.

30. Arts, I.C.W. and Hollman, P.C.H., 1998, "Optimization of a Quantitative Method for the Determination of Catequins in Fruits and Legumes," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (12), pp. 5156–5162.

31. Wang, R., Chen, P., Jia, F., Tang, J. and Ma, F., 2012, "Optimization of Polysaccharides from *Panax japonicas C.A. Meyer* by RSM and Its Anti-oxidant Activity," *International Journal of Biological Macromolecules*, 50 (2), pp. 331-336.

32. Chew, K.K., Khoo, M.Z., Ng, S.Y., Thoo, Y.Y., Wan Aida, W.M. and Ho, C.W., 2011, "Effect of Ethanol Concentration, Extraction Time and Extraction Temperature on the Recovery of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of *Orthosiphon stamineus* Extracts," I*nternational Food Research Journal*, 18 (4), pp. 1427-1435.

33. Gong, Y., Hou, Z., Gao, Y., Xue, Y., Liu, X. and Liu, G., 2012, "Optimization of Extraction Parameters of Bioactive Components from Defatted Marigold (*Tagetes erecta* L.) Residue Using Response Surface Methodology," *Food and Bioproducts Processing*, 90 (1), pp. 9-16.

34. Sai-Ut, S., Benjakul, S., Kraithong, S. and Rawdkuen, S., 2015, "Optimization of Antioxidants and Tyrosinase Inhibitory Activity in Mango Peels Using Response Surface Methodology," *LWT-Food Science and Technology*, 64 (2), pp. 742-749.

35. Halee, A. and Rattanapun, B., 2017, "Study of Antioxidant Efficacies of 15 Local Herbs," *KMUTT Research and Development Journal*, 40 (2), pp. 283-293. (In Thai)

36. Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M. and Barroso, C.G., 2012, "Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Grapes," *Analytica Chimica Acta*, 732 (1), pp. 100–104.

37. Gonzales-Manzano, S., Rivas-Gonzalo, J.C. and Santos-Buelga, C., 2004, "Extraction of Flavan-3-ols from Grape Seed and Skin into Wine Using Simulated Maceration," *Analytica Chimica Acta*, 513 (1), pp. 283–289.

38. Ginjom, I., D'Arcy, B., Caffin, N. and Gidley, M., 2011, "Phenolic Compound Profiles in Selected Queensland Red Wines at All Stages of the Winemaking Process," *Food Chemistry*, 125 (3), pp. 823-834.

39. Puértolas, E., Hemández-Orte, P., Sladaña, G., Álvarez, I. and Raso, J., 2010, "Improvement of Winemaking Process Using Pulsed Electric Fields at Pilot-plant Scale, Evolution of Chromatic Parameters and Phenolic Content of Cabenet Sauvignon Red Wines," *Food Research International*, 43 (3), pp. 761-766.