บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรม

1. เม่าและองค์ประกอบของเม่า

เม่า หรือมะเม่า (Antidesma sp.) อยู่ใน Family Stilaginaceae ปลูกมากในภูมิอากาศอบอุ่นของแอฟริกา อินโดนีเซีย และมหาสมุทรแปซิฟิก (Morton, 1987) ส่วน Hoffmann (2005) รายงานว่า เม่าเป็นพืช Genus Antidesma อยู่ใน Family Euphorbiaceae และ subfamily Phyllanthaceae มีการกระจายตัวอยู่ระหว่างแอฟริกาใต้ ถึงเกาะแปซิฟิก และจากหิมาลายาถึงออสเตรเลียเหนือ โดยมีศูนย์กลางความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ที่แถบมาเลเซีย โดยใน *Genus Antidesma* มีประมาณ 100 สายพันธุ์ ต้นเม่ามีความสูงประมาณ 6-12 เมตร จัดเป็นไม้พุ่ม เจริญเติบโตเป็นลำต้นเดี่ยวสูง 6-12 เมตร การเรียงตัวของใบเป็นแบบสลับ ขอบใบเรียบรูปร่างของใบเป็นลักษณะรูปหอกยาว 3-6 นิ้ว ผิวใบด้านบนมีลักษณะมันวาวกว่าด้านใต้ใบ มีลักษณะการออกดอกแบบแยกเพศ ไม่มีกลีบดอกชั้นใน ออกดอกเป็นช่อตรงปลายยอดมีลักษณะช่อผลคล้ายพริกไทย ระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงกรกฎาคม และผลสุกในเดือนสิงหาคมถึงตุลาคม มีลักษณะค่อนข้างกลม มีความกว้างและยาวประมาณ 0.8-1.0 เซนติเมตร ภายใน 1 ผลประกอบด้วย 1 เมล็ดและมีเปลือกแข็ง ผลดิบมีสีเขียวอ่อนหรือสีเขียวเข้ม เมื่อผลเข้าสู่ระยะการสุกเปลือกจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีแดงและดำเมื่อสุกเต็มที่ (อร่ามและวินัย, 2540) มีกลิ่นหอม ออกผลเป็นช่อเหมือนพวงองุ่น เมื่อยังดิบมีรสเปรี้ยวคล้ายผลครานเบอรรี่ (Cranberry) และเมื่อสุกเต็มที่มีความเปรี้ยวลดลงและหวานเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อย (Morton, 1987) เม่าเป็นพืชผสมข้าม มีต้นที่มีดอกตัวผู้แยกจากต้นที่มีดอกตัวเมีย สามารถติดเมล็ดได้ทั้งที่มีการผสมเกสร และไม่มีการผสมเกสร จึงมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง หากปลูกด้วยเมล็ดมีโอกาสที่จะได้ต้นตัวผู้มากถึงร้อยละ 60 การขยายพันธุ์ที่ดีที่สุดจึงเป็นการเปลี่ยนยอด ซึ่งได้เม่าลักษณะดีตรงตามความต้องการ จึงได้เผยแพร่ฝึกอบรมให้แก่เกษตรกรและผู้สนใจ ซึ่งได้รับการตอบรับเป็นอย่างดีในหมู่ผู้บริโภค ทำให้มีธุรกิจการแปรรูปน้ำผลไม้และการปลูกสร้างสวนเม่าเพิ่มมากขึ้นทั้งในพื้นที่จังหวัดสกลนครและจังหวัดใกล้เคียง (กรรณิการ์และคณะ, 2549)

สำหรับเม่าที่พบในประเทศไทย จัดเป็นพืชท้องถิ่นที่สามารถขึ้นได้ทั่วทุกภูมิภาค พบประมาณ 18 สายพันธุ์ และมีชื่อเรียกในแต่ละท้องถิ่นแตกต่างกันไป เช่น เม่า มะเม่า หมากเม่า มักเม่า เม่าสร้อย ส้มเม่า และมังเม่า เป็นต้น (เต็ม, 2523) ปลูกมากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แถบจังหวัดสกลนคร อุดรธานี กาฬสินธุ์ มุกดาหาร และนครพนม โดยเฉพาะในพื้นที่แถบเทือกเขาภูพาน พบว่าพันธุ์เม่าหลวง (*Antidesma thwaitesanum Müell.*) ได้รับความนิยมในการนำมาแปรรูปเป็นเครื่องดื่มชนิดต่าง ๆ เมื่อผลสุกมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 13-25 ^{o}Brix (อร่ามและวินัย, 2543) กลูโคส 28.5 กรัม/ลิตร และฟรุคโตส 27.0 กรัม/ลิตร ปริมาณกรดทั้งหมด (เทียบกับกรดซิตริก) 21.6 กรัม/ลิตร ประกอบด้วยกรดซิตริค

(Citric acid) กรดทาร์ทาริค (Tartaric acid) กรดซัคซินิค (Succinic acid) กรดมาลิค (Malic acid) และกรดชิกิมิค (Shikimic acid) ดังนี้ 14.6, 3.2, 0.99, 0.35 และ 0.002 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (Jitjaroen, 2007) และมีแอนโธไซยานิน 311 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร (เสกสรร, 2546) มีการบริโภคเม่าเป็นอาหารมานานในหลายประเทศ ส่วนใหญ่จะบริโภคผลสด โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย และมีการนำมาปรุงรสคล้ายกับส้มตำที่เรียกว่า ตำหมากเม่า หรือใช้เปลือกต้นหรือใบมาโขลกรวมกับพริกสด และน้ำปลาร้า เรียกว่าตำเมี่ยง นิยมรับประทานในฤดูร้อนโดยฝาดจากเปลือกต้นและใบ จะช่วยลดอาการท้องเสียได้

มะเม่ามีคุณค่าทางโภชนาการสูง อุดมไปด้วยวิตามินบี1 บี2 ซี และอี ตลอดจนกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายถึง 18 ชนิด (กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, 2547) นอกจากนี้ยังมีสารให้สีแดงกลุ่มแอนโธไซยานิน (Anthocyanin) และสารประกอบกลุ่มฟีนอล (Phenolic compounds) ซึ่งสารกลุ่มนี้เป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ (เสกสรร, 2546) สาทิสรัตน์ (2539) ได้พัฒนาเครื่องดื่มผลไม้ผสมจากผลเม่า พบว่าเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ส่งผลให้เกษตรกรหันมาปลูกต้นมะเม่าและรวมกลุ่มกันผลิตผลิตภัณฑ์ที่ทำจากมะเม่ามากขึ้น จนสามารถรวมกลุ่มเป็นชมรมหมากเม่าสกลนคร ที่มีเกษตรกรเป็นผู้ประกอบการเป็นสมาชิกไม่น้อยกว่า 40 ราย สมาชิกกลุ่มเกษตรกรสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตที่มีคุณภาพได้เฉลี่ย 120 ตันต่อปี และนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ตามความต้องการของตลาดผู้บริโภคไวน์เม่าร้อยละ 20 น้ำเม่าและน้ำเม่าผสมพร้อมดื่มร้อยละ 60 ผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เช่น แยมเม่า ร้อยละ 20 ในปี 2548 สามารถผลิตน้ำมะเม่าออกสู่ตลาด 120,000 ขวด และผลิตเพิ่มมากขึ้นทุกปี โดยปี 2551 ผลิตได้ถึง 300,000 ขวด และสามารถเก็บเกี่ยวผลเม่าได้ประมาณ 300-400 ตัน (คณพ, 2551)

Boyom *et al*. (2002) วิจัยการเพาะเลี้ยงเซลล์และสกัดสารออกฤทธิ์ของ *Antidesma membranaceum* พบว่ามีสาร Isoquinoline alkaloid ที่เรียกว่า Antidesmone ซึ่งมีสรรพคุณในการยับยั้ง *Trypanosoma cruzi* ซึ่งเป็นพาหะของ Chagas desease เป็นโรคพยาธิที่ก่อให้เกิดการอักเสบของอวัยวะที่หมู่เกาะ Mauritius ใช้ใบของ Antidesma เพื่อรักษาอาการเป็นไข้ ปวดศรีษะ และอาการคลื่นไส้ กัมมาลและคณะ (2546) ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย พบว่า ผลมะเม่ามีศักยภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและมีฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV ได้ วิภพและคณะ (2549) ศึกษาการแยกบริสุทธิ์สารโพลีฟีนอลในไวน์เม่าและศึกษาประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและการชักนำการตายแบบอาปอปโตซีสในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดและมะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กที่ไวและดื้อต่อยา พบว่า ผงไวน์เม่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาได้ดีกว่าเซลล์ที่ไวต่อยา 2 เท่า Bringmann *et al*. (2002) วิจัยการเพาะเลี้ยงเซลล์และสกัดสารออกฤทธิ์ของ *Antidesma membranaceum* พบว่า มีสาร Isoquinoline alkaloid ที่เรียกว่า Antidesmone ซึ่งมีสรรพคุณในการยับยั้ง *Trypanosoma cruzi* และเป็นพาหะของ Chagas desease เป็นโรคพยาธิที่ก่อให้เกิดการอักเสบของอวัยวะ โดยที่หมู่เกาะ Mauritius มีการใช้ใบของ Antidesma เพื่อรักษาอาการเป็นไข้ ปวดศรีษะ และอาการคลื่นไส้ ส่วนในประเทศกัมพูชาใช้เปลือกต้นผสมกับยาสูบรักษาบาดแผลของสัตว์เลี้ยง และใช้เปลือกไม้ของ Antidesma ร่วมกับเปลือก

ไม้ชนิดอื่น ๆ ต้มดื่มแก้อาการท้องเสีย และใช้ยอดอ่อนต้มกับรากมะละกอใช้แก้ปัญหารอบเดือนของผู้หญิง (Narod, 2004)

2.ไวน์และองค์ประกอบของไวน์

ไวน์ (Wine) หรือสุราผลไม้ หมายถึงเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักน้ำผลไม้ด้วยเชื้อยีสต์ โดยทั่วไปผลไม้ที่ใช้ทำไวน์คืออองุ่น อย่างไรก็ตามผลไม้ทุกชนิดจะใช้ทำไวน์ได้โดยมักนิยมบอกชื่อผลไม้ไว้ด้วย เช่น ไวน์สับปะรด และไวน์กระเจี๊ยบ เป็นต้น ไวน์ประกอบด้วย เอธิลแอลกอฮอล์หรือเอทานอล น้ำตาล คาร์โบไฮเดรต กรดอินทรีย์ รงควัตถุ สารให้กลิ่นรส วิตามินและแร่ธาตุต่าง ๆ การหมักน้ำองุ่นให้กลายเป็นไวน์นั้นเป็นวิธีตามธรรมชาติ โดยยีสต์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติบนผิวองุ่นทำให้สามารถหมักเป็นแอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้อาจเติมยีสต์เข้าไปอีกเพื่อช่วยกระบวนการหมัก ไวน์แดงทำจากองุ่นแดงหมักที่อุณหภูมิ 21-29 °ซ นานประมาณ 2 สัปดาห์ ส่วนไวน์ขาวทำจากองุ่นขาวหมักที่อุณหภูมิ 10-15 °ซ นานประมาณ 3-6 สัปดาห์ (สุปราณี, 2548)

2.1 บทบาทของยีสต์และสายพันธุ์ยีสต์ต่อคุณภาพไวน์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งพบทั่วไปในธรรมชาติ โดยยีสต์ที่ใช้ในการหมักไวน์หรือที่เรียกว่าไวน์ยีสต์ (Wine yeast) มักจะถูกใช้ในรูปของส่า ยีสต์ส่วนใหญ่มีความสามารถในการสร้างแอลกอฮอล์แตกต่างกันออกไปตามสายพันธุ์ ยีสต์ที่นิยมใช้ในการหมักแอลกอฮอล์คือยีสต์ในสกุล *Saccharomyces* โดยทั่วไปยีสต์จะมีการเจริญ 2 ลักษณะคือ สภาพที่มีอากาศยีสต์จะใช้น้ำตาลไปในการเจริญเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่สภาพไม่มีอากาศยีสต์จะใช้น้ำตาลเพื่อสร้างแอลกอฮอล์ ดังนั้นในการหมักแอลกอฮอล์การควบคุมปริมาณอากาศที่ยีสต์ได้รับจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อปริมาณของแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้ ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตไวน์เป็นยีสต์ที่มีลักษณะเฉพาะ คือสามารถทนต่อแอลกอฮอล์และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่มีความเข้มข้นสูงกว่ายีสต์ปกติ ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ และทำให้ไวน์มีกลิ่นรสที่ดี ที่ใช้งานโดยทั่วไปมี 3 รูปแบบ คือ ยีสต์ผง (Active dry yeast) ยีสต์น้ำ และยีสต์บนวุ้น (เจริญ, 2544) สำหรับยีสต์สดเลี้ยงในอาหารวุ้นเอียง ยีสต์เลี้ยงในน้ำผลไม้ที่ใช้เป็นวัตถุดิบหลัก การจะทราบว่าเป็นยีสต์ที่มีคุณภาพดีมากน้อยเพียงใด สามารถตรวจสอบได้เมื่อนำไปใช้ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์แล้วสังเกตได้ดังนี้ (Wanphen, 2007)

1. มีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์อย่างสมบูรณ์ คือเหลือน้ำตาลในผลิตภัณฑ์ต่ำมาก หรือที่เรียกว่า Dryness โดยทั่วไปไม่ควรเหลือน้ำตาลเกิน 5 มิลลิกรัม/ลิตร

2. มีอัตราเร็วในการหมักอย่างเหมาะสม เพราะถ้าหากช้าเกินไปจะทำให้เกิดการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ สภาวะเช่นนี้จะมีผลทำให้องค์ประกอบในน้ำหมักเกิดสภาพการออกซิไดซ์ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพต่ำลง เช่น เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หรือมีกลิ่นอับ แต่ถ้าหากการหมักเกิดเร็วเกินไป มีการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงมาก ก็จะพาเอาสารให้กลิ่นรสที่ยีสต์สร้างขึ้นออกไปจากภาชนะ

หมักด้วย นอกจากนี้ยังอาจทำให้อุณหภูมิของน้ำหมักและบรรยากาศรอบ ๆสูงขึ้นและเป็นสาเหตุทำให้การหมักยุติกะทันหันก่อนที่น้ำตาลทั้งหมดจะเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์

3. มีความทนทานต่อปริมาณแอลกอฮอล์ได้สูงถึงร้อยละ 16-17 (โดยปริมาตร) และทนทานต่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูงถึง 20-24 ^{o}Brix

4. ทนทานต่ออุณหภูมิสูง และไม่ถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อนหรือความเย็น

5. มีระยะ Lag phase หรือระยะพักตัวสั้น นั่นหมายถึงว่ามีความสามารถที่จะเริ่มการหมักได้อย่างรวดเร็วได้ภายใน 24-48 ชั่วโมง

6. สามารถทำนายพฤติกรรมการหมักได้ เช่น ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก และปริมาณแอลกอฮอล์ที่จะได้รับในผลิตภัณฑ์ เป็นต้น จากพฤติกรรมการหมักทำให้สามารถวิเคราะห์ปัญหาที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างการหมักและแก้ไขได้ทันท่วงที

7. ไม่ถูกทำลายได้ง่ายด้วยจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Killer factor) และมีความทนทานต่อ สารประกอบซัลเฟอร์ทั้งชนิดที่เติมลงไป และที่สร้างขึ้นเองในระหว่างการหมัก

8. สร้างสารให้กลิ่นรสที่ไม่ดีในปริมาณน้อยที่สุด เช่น กลิ่นก๊าซไข่เน่า กลิ่นกะหล่ำปลี และกลิ่นหัวหอม เป็นต้น ขณะเดียวกันก็สร้างกลิ่นรสที่ดีแก่ผลิตภัณฑ์ และให้คุณลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพและกระบวนการหมักของยีสต์

เชื้อยีสต์สำหรับหมักไวน์หรือสุรา นอกจากจะต้องเป็นสายพันธุ์ที่มีคุณลักษณะดีแล้ว ยังต้องอาศัยสารอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เพื่อเสริมสร้างความแข็งแกร่งให้แก่ยีสต์จนสามารถผลิตแอลกอฮอล์และกลิ่นรสได้ตามที่ต้องการ (วันเพ็ญ, 2550)

1. สารอาหาร ได้แก่ สารประกอบไนโตรเจน วิตามิน แร่ธาตุ และน้ำตาล เพื่อให้เพียงพอต่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ของยีสต์ในระหว่างการหมัก ดังต่อไปนี้

สารประกอบไนโตรเจน การหมักสุราจากวัตถุดิบที่มีไนโตรเจนต่ำ เช่น กากน้ำตาลหรือน้ำอ้อย น้ำผลไม้ต่าง ๆ ซึ่งส่วนมากแล้วมักจะเอาน้ำมาเจือจาง ทำให้สารที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ลดต่ำลงไปอีก หรือวัตถุดิบเก็บเกี่ยวในขณะที่มีความสุกมากเกินไป หรือในปีนั้นเกิดการแห้งแล้งมาก ก็เป็นสาเหตุทำให้ผลไม้นั้นมีปริมาณไนโตรเจนต่ำกว่าปกติได้ ส่วนปริมาณไนโตรเจนที่จะเติมเท่าใดจึงจะเหมาะสมนั้น ควรได้จากการทดลองหรือขอคำแนะนำจากผู้เชี่ยวชาญ เพราะถ้าหากเติมน้อยไป ก็จะทำให้ยีสต์เกิดหยุดชะงักการหมักในขณะที่ยังไม่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นแอลกอฮอล์ได้หมด แต่ถ้าหากเติมมากเกินไปนอกจากจะสิ้นเปลืองทำให้ต้นทุนสูงขึ้นแล้ว สารประกอบไนโตรเจนที่เหลือหลังการหมักอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ ตัวอย่าง เช่น ไวน์กระท้อน ไวน์มะเม่า และไวน์กล้วย สามารถเติมแอมโมเนียมฟอสเฟตได้ถึง 300-1000 มิลลิกรัม/ลิตร (Jitjaroen, 2007) ทั้งนี้ยังต้องพิจารณา

เหตุผลอื่น ๆ ประกอบอีก เช่น ความสุกของผลไม้ ปริมาณการเจือจางกับน้ำก่อนการหมัก และปริมาณที่กฎหมายของแต่ละประเทศกำหนด เป็นต้น

วิตามิน สำหรับการหมักไวน์หรือสุรา ที่ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นเหม็นอับของสารประกอบพวกคาร์บอนิลสูง สารในกลุ่มนี้ เช่น อะเซทัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) ไพรูเวต (Pyruvate) และแอลฟ่า-คีโตกลูทาเรต (α-Ketoglutarate) สาเหตุอาจเกิดเนื่องจากขาดวิตามินบางชนิดที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ (Cofactor) เช่น วิตามินบี 1 (Thiamine hydrochloride) ตามกฎหมายสามารถเติมได้ในปริมาณไม่เกิน 0.6 มิลลิกรัม/ลิตร จะสามารถช่วยลดปริมาณสารกลุ่มนี้โดยเฉพาะ Pyruvate และ α-Ketoglutarate ไปได้มากถึงร้อยละ 60-70 ทำให้การหมักเป็นไปอย่างสมบูรณ์และเร็วขึ้น และยังทำให้มีปริมาณของซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระเหลืออยู่มากขึ้น ซึ่งสารนี้จำเป็นต่อการป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์

น้ำตาล ถ้าน้ำหมักมีปริมาณน้ำตาลน้อยเกินไป ก็จะได้ปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำ สามารถปรับได้โดยการเติมน้ำตาลให้มีความเข้มข้นสูงถึง 20-24 °Brix ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* จะมีจุดเด่นคือทนทานต่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูงที่ระดับดังกล่าวได้ และสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงถึงร้อยละ 14-16 (โดยปริมาตร) แต่ถ้าหากปริมาณน้ำตาลมากเกินกว่านี้ยีสต์กลุ่มนี้จะเจริญเติบโตได้อย่างช้า ๆ ทำให้เกิดภาวะที่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เจริญแทรกซ้อนได้ เช่น แบคทีเรียชนิดที่ผลิตกรดอะซิติก มีผลทำให้เกิดรสเปรี้ยวของน้ำส้มสายชูในผลิตภัณฑ์

Yeast hull เป็นสารอาหารสำหรับใช้ในการหมักซึ่งช่วยให้กระบวนการหมักนั้นดีและสมบูรณ์ Yeast hull ทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมและกระตุ้นให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มีคุณสมบัติหลายอย่างที่สามารถแก้ไขปัญหาสภาวะการหมักที่ไม่เหมาะสม เช่น น้ำหมักมีน้ำตาลสูง มีสารอาหารที่ช่วยในการเจริญของยีสต์ต่ำ เพิ่มความอดทนของยีสต์ที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำได้ หรือสภาพที่มีสารเคมีตกค้างที่ติดไปกับผลอุ่นได้ โดยทั่วไปแล้ว Yeast hull ประกอบไปด้วย ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ ที่สามารถดูดซับกรดไขมันและยับยั้งผลกระทบที่อาจเกิดขึ้น เมื่อ Yeast hull ถูกเติมเข้าไปในน้ำหมัก เซลล์ของมันจะเข้าไปดูดซับกรดไขมันและเผาผลาญสารอาหารที่จะก่อให้เกิดการขัดขวางการหมัก ทำให้การหมักนั้นสมบูรณ์ยิ่งขึ้น (Murli, 2007)

2. อุณหภูมิ อุณหภูมิระหว่างการหมักที่พอเหมาะต่อการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces* คือ 20-25 °ซ ถ้าหากอุณหภูมิต่ำเกินไป ยีสต์จะเจริญได้ไม่ดี การหมักจะใช้เวลานานเกินไป แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไป ทำให้การหมักเกิดขึ้นอย่างรุนแรงมาก ทำให้สารให้กลิ่นรสระเหยออกไปพร้อมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ หรือยีสต์อาจจะสร้างแอลกอฮอล์ที่มีโมเลกุลสูง (Higher alcohol) หรือที่เรียกว่าฟูเซลออยล์ (Fusel oil) ซึ่งมีกลิ่นคล้ายน้ำมันเบนซิน นอกจากนี้แล้วการหมักอาจจะยุติอย่างกะทันหันทำให้ยังมีน้ำตาลเหลืออยู่มากและผลิตภัณฑ์ได้รับแอลกอฮอล์ต่ำ ดังนั้นการควบคุมอุณหภูมิจึงมีความสำคัญมากต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ ปัจจุบันมีการผลิตยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง ๆ ได้และให้กลิ่นรสที่ดีต่อผลิตภัณฑ์

3. ความเป็นกรดและพีเอช น้ำหมักที่มีปริมาณกรดที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์โดยทั่วไปสามารถวัดได้อย่างง่าย ๆ ในรูปของพีเอช น้ำหมักที่ดีควรมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.0-3.5 ถ้าหากต่ำกว่านี้สามารถปรับได้ด้วยการเติมกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น กรดซิตริก กรดทาร์ทาริก และกรดมาลิก เป็นต้น นอกจากจะเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์แล้ว ยังทำให้การทำงานของสารประกอบซัลเฟอร์ไดออกไซด์เพื่อทำลายเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งจะเติมลงในน้ำหมักก่อนและหลังการหมักให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพอีกด้วย

4. การเจริญเติบโตของเชื้อปนเปื้อน ก่อนการหมักจะเริ่มขึ้น ควรฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนอื่น ๆ ในน้ำหมัก ที่อาจทำลายสารอาหารที่สำคัญและจำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ก่อนที่จะเติมเชื้อยีสต์ เช่น การต้ม หรือการเติมด้วยสารประกอบซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อให้ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่

ปัจจุบันยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ นิยมใช้ในรูปยีสต์ผง เพราะใช้ง่าย สะดวกในการขนส่ง ให้คุณภาพผลิตภัณฑ์ที่สม่ำเสมอ เก็บรักษาง่าย สามารถต่อเชื้อใช้ได้อีกหลายรุ่น และไม่ปนเปื้อนจากเชื้ออื่น ๆ ง่าย อย่างไรก็ตามสิ่งที่ควรตระหนักไว้เสมอคือยีสต์สายพันธุ์หนึ่งอาจจะเจริญได้ดีในน้ำหมักที่ทำจากวัตถุดิบชนิดหนึ่ง แต่อาจจะไม่เหมาะกับวัตถุดิบอีกชนิดหนึ่งก็ได้ ดังนั้นจึงควรได้มีการศึกษาอย่างจริงจังหรือปรึกษาผู้เชี่ยวชาญก่อนที่จะตัดสินใจใช้ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดใดก็ตาม เพื่อให้เหมาะกับชนิดของไวน์ ปัจจุบันมียีสต์ทางการค้าที่จำหน่ายหลากหลาย (ตารางที่ 2.1 และรูปที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างสายพันธุ์ยีสต์หรือรหัสทางการค้าสำหรับเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

เครื่องดื่ม	วัตถุดิบ	รหัสทางการค้า	คุณสมบัติสายพันธุ์ยีสต์
ไวน์	องุ่น กล้วย กระท้อน ผลไม้อื่น ๆ	G 74 (Geisenheim 74)	สายพันธุ์ *S. cerevisiae* พัฒนาโดย Geisenheim research institute ประเทศเยอรมันนี เลี้ยงอยู่ในน้ำองุ่น (หรือน้ำผลไม้) ทนทานต่ออุณหภูมิสูง
ไวน์	องุ่นขาว กล้วย กระท้อน มะเม่า ผลไม้อื่น ๆ น้ำผลไม้เข้มข้นคืนรูป	SIHA 3	สายพันธุ์ *S. cerevisiae* ใช้ได้ดีกับน้ำหมักที่ยุติการหมักแบบกระทันหัน เหมาะกับอุณหภูมิหมักช่วงกว้าง 10-35 ^{o}ซ สามารถเริ่มต้นการหมักได้รวดเร็ว และเจริญได้ดีเหนือยีสต์ป่า ไวน์มีความใส สร้างสารให้กลิ่นอบอวลตามชนิดผลไม้ที่ใช้ทำ
ไวน์	องุ่นขาว	Enoferm M1	ทนทานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ มีความแข็งแรง และสามารถเริ่มต้นการหมักได้อย่างรวดเร็ว สร้างสารให้กลิ่นพวกเอสเทอร์ ในขณะที่สร้างสารให้กลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ต่ำมาก

เครื่องดื่ม	วัตถุดิบ	รหัสทางการค้า	คุณสมบัติสายพันธุ์ยีสต์
ไวน์	แอปเปิ้ล ผลไม้อื่น ๆ	Viniferm C2	เป็นสายพันธุ์ *S. cerevisiae* ที่ทนทานต่อความเข้มข้นของน้ำตาล และแอลกอฮอล์สูง ทนทานที่อุณหภูมิหมักได้สูงถึง 40 °ซ สามารถทำงานได้ดีแม้แต่ในน้ำผลไม้ที่เจือจางมาก ๆ และมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์เหลือต่ำ น่าจะนำมาทดลองใช้กับผลไม้เขตร้อนได้
ไวน์	องุ่น น้ำผึ้ง ผลไม้อื่น ๆ	KIV-1116	ทนทานต่อแอลกอฮอล์ได้ถึงร้อยละ 14 เจริญเติบโตได้ดีเหนือยีสต์ป่าเหมาะกับน้ำหมักที่ยุติการหมักแบบกะทันหัน
ไวน์	องุ่นแดง องุ่นขาว ผลไม้อื่น ๆ	Montrache	เป็นสายพันธุ์ *S. cerevisiae* มีความแข็งแรง ทนทานต่อแอลกอฮอล์สูง ทำให้การหมักเกิดได้อย่างสมบูรณ์ ทนทานต่อสารประกอบซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระ สร้างสารให้กลิ่นหลากหลายชนิด แต่ไม่เหมาะกับน้ำองุ่น หรือน้ำผลไม้ที่มีความข้น
ไวน์ขาว ไวน์สีชมพู ไวน์แดง ไอซ์ไวน์ (Ice wine)	องุ่น	Lalvin V1116	เมื่อหมักที่อุณหภูมิ 16 °ซ และเติมสารอาหารเสริมที่เหมาะสมแล้วจะสร้างสารให้กลิ่นและคงอยู่ในไวน์ได้นานกว่า Prise de Mousse (EC 1118) เป็นยีสต์สายพันธุ์ที่ดีมากอันหนึ่งที่สามารถสร้างสารให้กลิ่นหอมสดชื่นของดอกไม้นานาชนิด เช่น Isoamyl acetate, Hexyl acetate, Phenyl ethyl acetate เป็นสายพันธุ์ที่นับว่ามีความทนทานมากในสภาวะที่น้ำหมักที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ เช่น มีความข้นมาก อุณหภูมิต่ำ หรือมีกรดไขมันที่จำเป็น เป็นต้น เป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจนำมาทดลองใช้กับไวน์ผลไม้เขตร้อนชื้น
ไวน์และไวน์แบบมีฟอง (Sparkling wine)	องุ่น ผลไม้อื่น ๆ	EC 1118 (Prise de Mousse)	สายพันธุ์ *S. cerevisiae bayanus* เจริญได้ดีเหนือยีสต์ป่าเหมาะที่จะใส่ไปในไวน์ที่ยุติการหมักแบบกระทันหัน หมักได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ ทนทานแอลกอฮอล์ได้สูงถึงร้อยละ 18 ตกตะกอนได้ดี แต่ถ้าน้ำหมักมีสารอาหารที่จำเป็นต่อยีสต์ต่ำ ยีสต์จะสร้างซัลเฟอร์ไดออกไซด์ได้มากถึง 30 มิลลิกรัม/ลิตร และจะไปยับยั้งการทำงานของ Lactic acid bacteria ที่จำเป็นในขั้นตอนต่อไป
เหล้าขาว	ข้าว	ยีสต์ลูกแป้ง	ช่วยย่อยแป้งได้บางส่วนให้เป็นน้ำตาล ทนต่ออุณหภูมิสูง เจริญได้ดีในข้าว ให้กลิ่นรสที่ดี
สุรากลั่น	ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาล	Danstil 46 EDV	ต้นกำเนิดมาจากฝรั่งเศส เป็นพันธุ์ยีสต์ที่คัดแยกได้จากโมลาสของหัวผักกาด เริ่มต้นการหมักได้เร็ว ทนน้ำตาลที่ความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 20

เครื่องดื่ม	วัตถุดิบ	รหัสทางการค้า	คุณสมบัติสายพันธุ์ยีสต์
สุรากลั่น	ผลไม้ต่าง ๆ	Danstil CM	กิจกรรมหลักคือให้การทำงานของ Proteolytic คือเปลี่ยนสารประกอบพวกเพคติน ที่ทำให้เกิดความขุ่นในผลิตภัณฑ์ สร้างสารให้กลิ่นพวกเอสเทอร์ ที่ได้จากกรดไขมันโมเลกุลต่ำซึ่งให้กลิ่นของผลไม้หลาย ๆ ชนิด
สุรากลั่นผลไม้	ผลไม้	KIV-1116	เกิดการหมักเร็ว ทนแอลกอฮอล์สูงร้อยละ 14 สร้างสารให้กลิ่นรสของผลไม้
รัม	โมลาส	SC 90 (Seagram collection number 90)	เป็นยีสต์สด คัดเลือกได้จากโมลาสของโรงสุราซีแกรม ทนทานต่ออุณหภูมิและความเข้มข้นน้ำตาลสูง หมักได้ดีที่ 30-35 °ซ สร้างกลิ่นรสดีตามสไตล์สุราจากโรงงาน
รัม	โมลาสจากน้ำอ้อยพืชผักต่าง ๆ	*Danstil 493 EDV*	คัดแยกได้จากโมลาสของน้ำอ้อย ให้รสชาติที่กลมกล่อมแก่เครื่องดื่มตามชนิดของวัตถุดิบที่นำมาทำ สร้างสารให้กลิ่นจำพวกเอทธิลเอสเทอร์ ลดการสร้างสารพวกอัลดีไฮด์และพวกฟูเซลออยล์ เช่น เอมิลแอลกอฮอล์
วอดก้า	น้ำตาล น้ำตาลสด	EC 1118	ทนแอลกอฮอล์สูงร้อยละ 16 หมักได้เร็วกว่า K1V-1116 เหมาะสำหรับทำไวน์ที่จะใช้กลั่น

ที่มา : วันเพ็ญ, ยีสต์และหัวเชื้อสุราที่น่าเชื่อถือ *ใน* คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ (2550)

รูปที่ 2.1 ตัวอย่างยีสต์เชิงพาณิชย์สำหรับทำไวน์และสุรา
ที่มา : Reed and Nagodawithana (1991)

2.3 บทบาทของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ต่อคุณภาพไวน์

ซัลเฟอร์ไดออกไซด์เป็นสารที่ใช้เติมลงในอาหาร เพื่อทำหน้าที่ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล (Browning reaction) และยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เมื่ออยู่ในอาหารจะมีสองรูปแบบ คือ แบบที่รวมตัวเข้ากับสารประกอบต่าง ๆ หรือรูปที่ถูกตรึง (Bound form) จนไม่สามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นได้อีก เช่น รวมเข้ากับสารประกอบกลุ่มคาร์บอนิลต่าง ๆ เกิดเป็นสารประกอบของแอลฟา-ไฮดรอกซีซัลโฟเนท (α-Hydroxysulfonate) และอยู่ในรูปแบบของซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระ (Free form) หรือ Hydrogensulphate ion สารประกอบทั้งสองรูปแบบจะสามารถเปลี่ยนรูปไปมาระหว่างกันได้ (Equilibrium) (Ribéreau-Gayon *et al*., 2002) ในมุมมองของอุตสาหกรรมอาหารยังคงมีความจำเป็นที่จะต้องลดปริมาณการใช้สารซัลเฟอร์ไดออกไซด์ให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสม (Beech and Jarvis, 1989) และให้มีปริมาณต่ำที่สุด แต่ต้องให้มีสารซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์มากเพียงพอและในปริมาณที่กฎหมายกำหนด ปริมาณที่เติมจะมากน้อยเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น การใช้ผลไม้ที่มีความสุกงอมมากหรือผิวผลไม้เป็นรอยขีดข่วน หรือถูกแมลงกัดเจาะเสียหายมากก็ยิ่งมีความจำเป็นที่จะต้องเพิ่มปริมาณการเติมสารซัลเฟอร์ไดออกไซด์ให้มากขึ้นเพื่อควบคุมประสิทธิภาพการทำงาน (Peynaud and Sapis, 1972)

การผลิตไวน์ยังคงมีการใช้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เพื่อทำหน้าที่ทั้งทางเคมีและชีววิทยาคือป้องกันการเกิดออกซิเดชันที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล ส่วนหน้าที่ทางชีววิทยาคือจำกัดการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียกรดอะซิติกและแบคทีเรียกรดแลคติก รวมทั้งยับยั้งการเจริญของยีสต์บางชนิด เช่น *Saccharomyces ludig* และ *Sacchramyces bailii* แสดงความไวต่อซัลเฟอร์ไดออกไซด์มากกว่า องค์กรที่ควบคุมในเรื่องของไวน์พยายามลดการใช้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ โดยมีข้อบังคับให้ระบุว่ามีการใช้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์บนฉลากเพราะมีผู้บริโภคบางรายไวต่อซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทำให้มีอาการแพ้บางอย่าง แต่การแทนที่ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในการทำไวน์นั้นทำได้ยากเนื่องจากซัลเฟอร์ไดออกไซด์มีหน้าที่หลายอย่าง การเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ขณะบีบองุ่นให้แตกหรือในน้ำองุ่น ทำให้การหมักเป็นไปอย่างช้า ๆ โดยเฉพาะเมื่อใช้ความเข้มข้นสูง ระดับของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เติมอยู่ระหว่าง 50-200 มิลลิกรัม/ลิตร และยังขึ้นกับปัจจัยอีกหลายอย่าง เช่น ความสุกขององุ่น พีเอช และหน้าที่ต่าง ๆ ของสารประกอบที่อยู่ในไวน์ (Reed and Nagodawithana, 1991)

แม้ว่าองค์การอาหารและยา (FDA) จะรับรองความปลอดภัยในการใช้สารซัลเฟอร์ไดออกไซด์ก็ตาม แต่อาจมีผู้บริโภคบางรายมีอาการแพ้สารชนิดนี้ ดังนั้นบางประเทศจึงได้มีการควบคุมปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์ เช่น สหรัฐอเมริกา กำหนดให้ระบุปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์บนฉลากในกรณีที่มีปริมาณเกินกว่า 10 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนมาตรฐานของ AOAC (Association of Official Analytical Chemists) กำหนดให้มีค่าปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทั้งหมดได้ไม่เกิน 350 มิลลิกรัม/ลิตร (Zoecklein *et al*., 1995) สถาบันอาหารได้สุ่มตัวอย่างไวน์นำเข้าจากประเทศสหรัฐฯ ฝรั่งเศส ชิลี ออสเตรเลีย จำนวน 5 ยี่ห้อ เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ตกค้าง ผลปรากฏว่า ตรวจพบ 64.64, 95.13, 52.32, 38.05 และ 142.69 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยทุกตัวอย่างพบซัลเฟอร์ไดออกไซด์ตกค้าง แต่ยังไม่เกินมาตรฐานที่กำหนดไว้ในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (ไวน์: มอก. 2089-2544) ของกระทรวงอุตสาหกรรม ซึ่งกำหนดให้ไวน์ที่ผลิตในประเทศและนำเข้ามีซัลเฟอร์ไดออกไซด์เป็นวัตถุเจือปนในไวน์ได้ไม่เกิน 300 มิลลิกรัม/ลิตร (กระทรวงสาธารณสุข, 2550)

Jitjaroen (2007) ทำการวิจัยไวน์ผลไม้เขตร้อนชื้น พบว่า การใช้ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เหมาะสมมีผลทำให้ไวน์มีกลิ่นรสดี โดยสายพันธุ์ยีสต์และชนิดของสารอาหารเสริมมีผลต่อปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เติมลงหลังการหมัก ปริมาณที่เหมาะสมคือ 60-70 มิลลิกรัม/ลิตร โดยยังมีสารซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระเหลืออยู่ไม่น้อยกว่า 30 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเป็นปริมาณมากเพียงพอที่จะทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และยังช่วยรักษาสีแดงในไวน์มะเม่าได้ดีโดยไม่ถูกฟอกสี

2.4 บทบาทของสารประกอบคาร์บอนิลต่อกระบวนการผลิตไวน์

สารประกอบคาร์บอนิลหลักมีอยู่ 3 ชนิดที่สามารถรวมตัวเข้ากับซัลเฟอร์ไดออกไซด์ คือ Acetaldehyde, Pyruvate และ α-Ketoglutarate ยีสต์สามารถสร้างสารเหล่านี้ได้ในระหว่างกระบวนการหมัก (Whiting and Coggin, 1960) เกิดเป็นสารประกอบไบซัลไฟท์ (Hydroxysulfonic

acids) (Zoecklein *et al*., 1995) Acetaldehyde จัดเป็นสารที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในไวน์ได้มากที่สุด (Burrough, 1975) ทำให้ไวน์มีกลิ่นออกซิไดส์หรือกลิ่นฉุน สำหรับการหมักไวน์ที่ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นเหม็นอับของสารประกอบพวกคาร์บอนิลสูง สารในกลุ่มนี้ เช่น Acetaldehyde, Pyruvate และ α-Ketoglutarate สาเหตุอาจเกิดเนื่องจากการขาดวิตามินบางชนิดที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ (Cofactor) เช่น ไทอามีน (Thiamine pyrophosphate) ซึ่งทำหน้าที่เป็น cofactor สำหรับเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลชัน (Enzyme decarboxylation) เกิดเป็นเอทธานาล (Ethanal) ก่อนที่จะถูกรีดิวส์เป็นเอทานอลในระหว่างการหมักแอลกฮอล์ (Ribéreau-Gayon *et al*., 2000) น้ำผลไม้ที่ขาดไทอามีนจะมีการสร้างไพรูเวทในระหว่างการหมักแบบไร้ออกซิเจนของไวน์องุ่นและไวน์แอปเปิ้ล นอกจากนี้มีรายงานว่าในน้ำหมักสังเคราะห์ที่มีการเติมไทอามีน จะลดการสร้างไพรูเวทลงถึงร้อยละ 80 ในขณะที่การหมักไวน์ที่มีการเติมไทอามีน 0.2-0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่ว่าจะเป็นช่วงใดของการหมักก็ตามสามารถลดไพรูเวตได้เช่นกัน การศึกษาการหมักไวน์แอปเปิ้ลด้วยยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces uvarum* และเติมไทอามีนลงไปด้วยจะสร้างไพรูเวท ไม่ว่าในน้ำผลไม้ที่มีปริมาณไนโตรเจนต่ำหรือสูงก็ตามประมาณไม่เกินร้อยละ 85 รองลงมาคือ 2-Oxoglutarate (Whiting, 1976) ดังนั้น การเติมไทอามีนจึงถือเป็นหลักสำคัญที่มีความสามารถในการลดปริมาณของสารที่สามารถเข้าไปรวมได้กับซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (Sulphite-reacting substances) (Cantarelli, 1989) งานวิจัยของ Whiting (1976), Wurdig (1989) และ Beech (1993) ได้สนับสนุนเพิ่มเติมว่า นอกจากการเติมไทอามีนและหรือแพนโททีเนตจะช่วยลดการสะสม Pyruvate และ Acetaldehyde แล้วยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ด้วย โดยการเติมไทอามีนยังมีอิทธิพลต่อความเร็วของการหมักอีกด้วย (Delfini and Formica, 2001) การเพิ่มสารอาหารเสริมเพื่อการเจริญเติบโตของยีสต์ร่วมกับไทอามีนในไวน์มะเม่า ทำให้มีปริมาณ Pyruvate, Acetaldehyde และ α-Ketoglutarate รวมถึง Sulfur binding capacity ลดลงหลังการหมัก ไวน์ที่ได้มีกลิ่นของผลไม้และรสชาติดี (Jitjaroen, 2007)

คณะวิจัยของสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ รายงานการศึกษาโรงงานต้นแบบผลิตไวน์จากผลิตผลเกษตรให้ได้มาตรฐานสำหรับผู้ผลิตรายย่อย และได้ทำการพัฒนาสูตรไวน์ผลไม้ชนิดต่าง ๆ แก่โรงงาน เพื่อสร้างความหลากหลายในผลิตภัณฑ์ พบว่า การพัฒนาสูตรไวน์ เช่น ไวน์ลูกยอ ไวน์มะเม่า และไวน์องุ่นป่า (ส้มโก่ย) มีขั้นตอนการผลิต คือเริ่มจากการคั้นน้ำผลไม้และปรับให้มีความหวาน 23 ^{o}Brix ที่พีเอช 3.5 จากนั้นใส่โปแตสเซียมเมตาไบซัลไฟท์ (Potassium metabisulfile) 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงก่อนการเติมสตาร์ทเตอร์ โดยมีการใช้ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์เริ่มต้นเหมือนกันทุกสูตรการผลิต ปัญหาหลัก ๆ ที่พบในไวน์ผลไม้ที่ศึกษาได้แก่ คุณภาพของวัตถุดิบ ขาดแคลนเครื่องมือในการผลิต วิธีการวิเคราะห์และควบคุมคุณภาพ ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ยีสต์ สารอาหารเสริมการเจริญของยีสต์ และอุณหภูมิการหมัก พบว่าไวน์สับปะรดของโรงงานมีปัญหาคือสับปะรดมีความฉ่ำเกินไป ทำให้ได้ไวน์ที่มีความหวาน ถ้าหากไวน์ยังมีการหมักไม่หยุดนิ่งจะทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นได้ นอกจากนี้ การหมักที่อุณหภูมิสูงเกินไป ทำให้กลิ่นรสของไวน์ไม่ดี

และไวน์หยุดการหมักเร็วเกินไป คณะวิจัยได้แนะแนวทางการทำไวน์สับปะรดคือ ควรหมักที่อุณหภูมิ 20 °ซ และควรใช้ยีสต์ผงในการผลิตไวน์แทนยีสต์ขนมปัง (มหาวิทยาลัยมหิดล, 2550)

2.5 บทบาทของสารประกอบไนโตรเจนต่ออัตราการหมักไวน์

การเจริญเติบโตของยีสต์ สามารถอธิบายได้จาก Kinetic parameters ตามช่วงระยะการเจริญต่าง ๆ ของยีสต์ ได้แก่ Lag phase, Exponential phase, Stationary phase และ Decline phase ซึ่งจะมีผลอันเนื่องมาจากแหล่งไนโตรเจนเฉพาะต่ออัตราการเจริญ (Linear phase) เมื่อระยะการเจริญของยีสต์เข้าสู่ Decline phase เป็นช่วงที่มีน้ำหนักของเซลล์ยีสต์ (Biomass) สูงสุด โดยอัตราสูงสุดของการหมัก (Fermentation rate) คือ 21 CO_2 กรัม/ลิตร/วัน เมื่อมีปริมาณไนโตรเจนที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ได้ (Assimilable nitrogen) ที่ระดับ 300 กรัม/ลิตร ปริมาณไนโตรเจนมีผลกระทบต่อการเจริญของยีสต์และการหมักที่มีกลไกเกิดขึ้นแตกต่างกันไป การให้สารอาหารเสริมที่มีส่วนผสมหลายชนิด จะสามารถกระตุ้นการเจริญของยีสต์ได้ดีกว่าการใช้สารอาหารเสริมที่มีส่วนประกอบเพียงชนิดเดียว และยังสามารถกระตุ้นระบบการส่งผ่านของสารอาหารต่าง ๆ (Transport system) ได้ดีขึ้นในช่วงระยะสุดท้ายของการหมัก ซึ่งปกติถือว่าเป็นช่วงที่ยีสต์จะถูกยับยั้งการเจริญอันเนื่องมาจากปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูงขึ้นมาก ปกติอัตราการหมักจะสูงขึ้นแบบยกกำลังตามปริมาณที่เพิ่มขึ้นของไนโตรเจนที่ยีสต์นำไปใช้ในการเจริญได้จริง (Assimilable nitrogen) ถ้าหากมีปริมาณต่ำกว่า 140 มิลลิกรัม/ลิตร อัตราการหมักจะเกิดไม่สมบูรณ์เพียงพอเมื่อเปรียบเทียบกับที่ปริมาณ 400 มิลลิกรัม/ลิตร จะมีอัตราการเจริญของยีสต์ที่เข้มแข็งมาก และยังสามารถลดระยะเวลาการหมักให้สั้นลงได้ ถ้าหากมีปริมาณมากกว่านี้ ก็จะมีมวลยีสต์ (Yeast biomass) สูงขึ้นและส่งผลให้มีอัตราการหมักสูงขึ้นด้วย (Henschke and Jiranek, 1992)

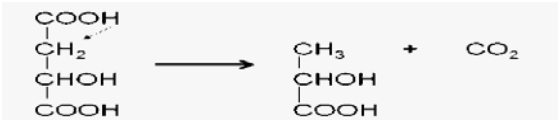
Boulton (1980) รายงานเกี่ยวกับอิทธิพลของสารประกอบไนโตรเจนที่มีบทบาทต่อกลไกที่เกิดขึ้นในการหมัก ถ้ามีปริมาณไนโตรเจนต่ำในขณะที่เริ่มต้นการหมักจะทำให้ยีสต์มีการใช้ไนโตรเจนหมดไปอย่างรวดเร็ว และมีผลทำให้อัตราการเจริญเข้าสู่ระยะ Decline phase เร็วเช่นกัน ถ้าปริมาณไนโตรเจนสูงในช่วงเริ่มต้นการหมักจะทำให้ยืดระยะการเข้าสู่ช่วง Decline phase ให้ช้าลง ปกติแล้วความเข้มข้นของแอลกอฮอล์จะมีความสัมพันธ์กับปริมาณไนโตรเจนที่มีในขณะเริ่มต้นการหมัก ซึ่งจะมีผลเกี่ยวพันถึงความสามารถในการรอดชีวิตของยีสต์ในสภาวะที่มีแอลกอฮอล์สูงโดยเฉพาะช่วงท้ายของการหมัก อย่างไรก็ตามการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นในน้ำหมัก และในสภาวะที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงจะช่วยรักษาช่วงระยะของการหมักที่มีการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงสุดไว้ให้นานขึ้น ส่วนการหมักเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนระดับกลางก็จะให้ผลกระทบที่เป็นกลาง ๆ ในขณะที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนต่ำจะลดอัตราการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และทำให้อัตราสูงสุดของการหมักลดลงด้วย (Henschke and Jiranek, 1992)

แอมโมเนียมฟอสเฟตถูกใช้ในการผลิตไวน์อย่างแพร่หลายภายใต้กฎหมายของยุโรป (European wine regulation) อนุญาตให้ใช้ได้ถึง 1000 มิลลิกรัม/ลิตร (WSB guide to EU wine regulations, 2006) การใช้ไนโตรเจนปริมาณมากเกินไป จะทำให้มีไนโตรเจนส่วนที่ยีสต์ไม่สามารถนำไปใช้ได้ (Non-assimilated residual nitrogen) ในช่วงสุดท้ายของการหมักและเหลือตกค้างอยู่ในไวน์ปริมาณมาก ซึ่งอาจส่งผลให้มีปริมาณ Higher alcohols เอสเทอร์ของ Higher alcohols และเอทธิลคาร์บาเมต (Ethyl carbamate) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (Ribereau-Gayon *et al*., 2000)

Van Buren *et al*. (1974) รายงานว่าภายหลังการหมักไวน์แดงจะมีความเข้มของสีลดลงประมาณร้อยละ 30 เช่นเดียวกับ Powers *et al*. (1980) และ Sterns (1987) พบว่า กระบวนการหมักมีผลทำให้แอนโธไซยานินและความเข้มของสีลดลง ในขณะที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลเพิ่มขึ้น

2.6 บทบาทของการหมักไวน์แบบมาโลแลคติก

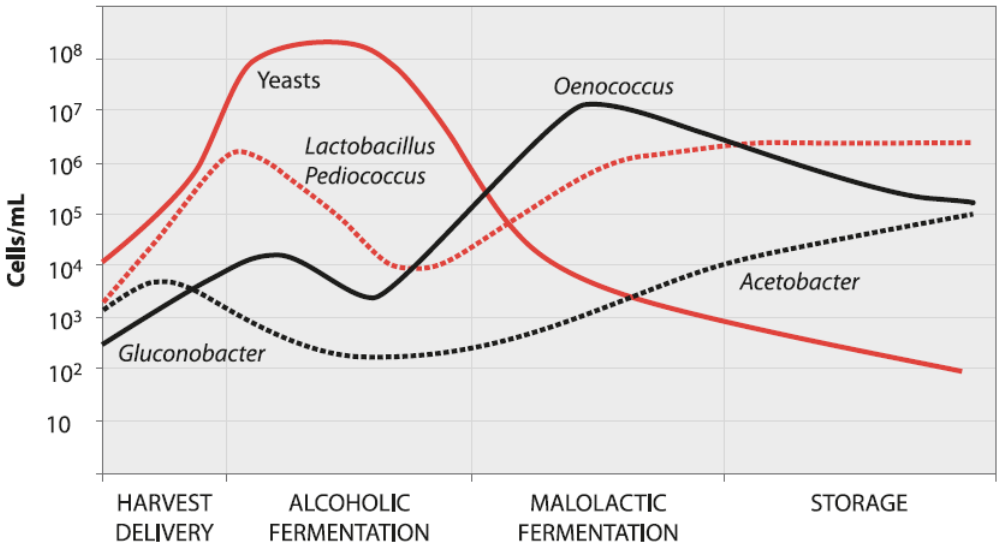
การหมักไวน์แบบมาโลแลคติก (Malolactic Fermentation; MLF) เป็นการหมักที่เกิดเป็นครั้งที่สอง (Secondary fermentation) หมายถึง การที่แลคติกแอซิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria) เปลี่ยนกรดมาลิกซึ่งให้รสเปรี้ยวที่ค่อนข้างกระด้าง (คล้ายรสฝาดในแอปเปิ้ล) ให้กลายเป็นกรดแลคติก (เป็นกรดที่ให้รสนุ่มนวลในน้ำนมและผลิตภัณฑ์) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลของกรดมาลิกประกอบด้วยกรดไดคาร์บอกซิลิก (Dicarboxylic acid) คือมีกลุ่มคาร์บอกซิลิก (-COOH) ซึ่งมีสภาพเป็นกรดอยู่สองกลุ่ม (แตกตัวให้โปรตอน 2 ตัว ซึ่งเป็นกรดแรง) ส่วนกรดแลคติกเป็นกรดโมโนคาร์บอกซิลิก คือมีกลุ่มคาร์บอกซิลิก (-COOH) ซึ่งมีสภาพเป็นกรดอยู่หนึ่งกลุ่ม (แตกตัวให้โปรตอน 1 ตัว ซึ่งเป็นกรดที่อ่อนกว่า) จึงทำให้ปริมาณความเป็นกรดลดลงและมีค่าพีเอชสูงขึ้น (รูปที่ 2.2) เป็นประโยชน์มากในการผลิตไวน์จากน้ำองุ่นที่ปลูกในบริเวณที่มีอุณหภูมิต่ำซึ่งจะมีความเป็นกรดสูง นอกจากนี้ยังให้กลิ่นรสเฉพาะของแบคทีเรีย เช่น กลิ่นคล้ายเนยของไดอะเซทิล (Diacetyl) ไวน์แดงที่มีคุณภาพสูงหลายชนิดต้องผ่านการหมักแบบมาโลแลคติก (Bisson, 2012)



รูปที่ 2.2 สมการการหมักแบบมาโลแลคติก (Malolactic Fermentation)

มีแลคติกแอซิดแบคทีเรียเพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถเจริญได้ในไวน์ เนื่องจากไวน์มีสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเหล่านี้ เช่น ไวน์มีความเป็นกรดสูง (พีเอชประมาณ 3.5) มีน้ำตาล แอลกอฮอล์ และมักเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สำคัญใน

ไวน์ ได้แก่ Oenococcus oeni (หรือ Leuconostoc oenos) และ Lactobacillus spp. บทบาทของการหมักแบบมาโลแลคติกคือการเปลี่ยนกรดมาลิกซึ่งพบทั่วไปในผลไม้ เช่น องุ่น และ แอปเปิ้ล เป็นต้น ให้เป็นกรดแลคติก มีผลทำให้ไวน์มีความเป็นกรดลดลงและมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยปรับปรุงคุณภาพกลิ่นรสให้มีความนุ่มนวลและซับซ้อนมากขึ้น การหมักแบบมาโลแลคติกสามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ หรืออาจต้องการให้เกิดขึ้นในกระบวนการผลิต ส่วนใหญ่มักทำการหมักแบบมาโลแลคติกในการผลิตไวน์แดง แต่ก็สามารถทำในไวน์ขาวได้เช่นกัน เช่น ไวน์ขาวจากองุ่นพันธุ์ชาดอนเน่ (Chardonnay), เซอวิยอง บลองซ์ (Sauvignon blanc) และพินอร์ นัวร์ (Pinot gris) เป็นต้น แต่จะไม่ทำในการผลิตไวน์หวาน การผลิตไวน์ขาวจากองุ่นพันธุ์ริสลิ่ง (Riesling), เกอเวอซทรามิเนอร์ (Gewürztraminer) และ มุสคาท (Muscat) โดยผู้ผลิตอาจใช้วิธีการผลิตไวน์ในถังไม้โอ๊คหรือในขวดเพื่อให้ไวน์มีรสชาตินุ่มนวลขึ้นตามธรรมชาติ ซึ่งใช้เวลานานกว่าแทนการหมักแบบมาโลแลคติกก็ได้



รูปที่ 2.3 วงจรการเจริญเติบโตของแลคติกแอซิดแบคทีเรียในระหว่างการหมักและการบ่มไวน์
ที่มา : Morenzoni (2005)

การหมักแบบมาโลแลคติก สามารถเกิดได้เองตามธรรมชาติตราบเท่าที่ยังมีสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของมาโลแลคติกแบคทีเรีย (Malolactic bacteria) และยังไม่มีการสร้างกรดอะซิติกในปริมาณที่มากจนไปยับยั้งการเจริญของมาโลแลคติกแบคทีเรีย Wibowo *et al.* (1985) อธิบายการเจริญของแลคติกแอซิคแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ในระหว่างการหมักไวน์ (รูปที่ 2.3) หลังจากบดองุ่นแล้วน้ำองุ่นเริ่มต้นจะมีแลคติกแอซิคแบคทีเรีย 10^3-10^4 cfu/ml สายพันธุ์ที่พบในระยะนี้คือ Lactobacillus plantarum และ Lactobacillus casei และ Leuconostoc oenos (Oenococcus oeni) และ Pediococcus cerevisiae เล็กน้อย โดยทั่วไปแบคทีเรียเหล่านี้จะไม่ตายหรือเพิ่มปริมาณในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์แม้ว่าบางครั้งอาจจะมีโอกาส (เช่น ค่าพีเอชสูง) มีบางสายพันธุ์ที่ไม่ต้องการให้เกิดขึ้น

อาจเพิ่มปริมาณเซลล์ได้เล็กน้อย นอกจากนี้ความไวต่อแอลกอฮอล์อาจใช้อธิบายปริมาณเซลล์ที่ลดลงได้ด้วย ภายหลังจากระยะ Lag phase (เป็นช่วงระยะการปรับตัวของเซลล์แบคทีเรียที่จะมีการปรับตัวแตกต่างกันออกไป ขึ้นกับองค์ประกอบของไวน์) เซลล์ที่รอดชีวิตจะเริ่มแบ่งตัวจนกระทั่งถึงจุดสูงสุดแล้ว ก็จะเริ่มมีการย่อยสลายตัวของกรดมาลิก มาโลแลคติกแบคทีเรียที่รอดชีวิตหลังจากการหมักมาโลแลคติกสมบูรณ์แล้วจะขึ้นกับเงื่อนไขหรือข้อจำกัดขององค์ประกอบในไวน์ การเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะนำไปสู่การสูญเสียเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิต นอกจากนี้ค่าพีเอชก็มีความสำคัญอย่างมาก ไวน์ที่มีค่าพีเอชต่ำแลคติกแอซิดแบคทีเรียจะตายเพิ่มขึ้นในขณะที่พีเอชสูงกว่า 3.5 แลคติกแอซิดแบคทีเรียอาจเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ไม่เพียงแต่ Oenococcus oeni แต่ยังมีแบคทีเรียบางชนิดสามารถเจริญได้ถึง 10^6–10^8 cfu/cell จนเป็นสาเหตุทำให้ไวน์เสียได้ เช่น Pediococcus และ Lactobacillus ดังนั้นในสภาวะที่ไวน์มีค่าพีเอชสูงอาจจำเป็นต้องทำให้ไวน์มีความคงตัวเร็วขึ้น

ส่วนใหญ่แล้วจะทำการหมักแบบมาโลแลคติกก็ต่อเมื่อการหมักด้วยยีสต์ (Primary fermentation) ได้ยุติลงแล้ว (ขณะนั้นไวน์มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดประมาณ 0 ^{o}Brix) เพราะหากทำในขณะที่มีน้ำตาลและยีสต์กำลังใช้สารอาหารส่วนใหญ่อยู่ แบคทีเรียจะสามารถย่อยน้ำตาล และสร้างกรดที่ระเหยได้ (Volatile acidity) โดยกิจกรรมของการหมักแบบมาโลแลคติกสามารถดูได้จากการสร้างฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อีกทางหนึ่งด้วย และเมื่อยุติการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แล้ว ก็แสดงว่าการหมักแบบมาโลแลคติกได้ยุติลงเช่นกัน ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 1 ถึง 3 เดือน

Morenzoni (2005) ชี้ให้เห็นถึงปัจจัยทางกายภาพและสิ่งแวดล้อมหลัก ๆ ที่ถูกนำมาพิจารณาก่อนจะเริ่มทำการหมักแบบมาโลแลคติกนั้นมี 4 ประการคือ ค่าพีเอช แอลกอฮอล์ อุณหภูมิและซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เช่น หากก่อนการเติมมาโลแลคติกแบคทีเรียในไวน์ที่มีปริมาณแอลกอฮอล์สูงแต่มีค่าพีเอชต่ำ อาจทำให้มาโลแลคติกแบคทีเรียไม่เจริญ ส่วนสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของมาโลแลคติกแบคทีเรีย ได้แก่ พีเอชมากกว่า 3.2 ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ต่ำกว่า 10 มิลลิกรัม/ลิตร อุณหภูมิสูงกว่า 18 ^{o}ซ และแอลกอฮอล์ต่ำกว่าร้อยละ 13 (%vol.)

ดังนั้นการหมักไวน์แบบมาโลแลคติกให้ประสบความสำเร็จนั้น จำเป็นต้องมีความเข้าใจเกี่ยวกับการควบคุมกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและกลไกของมาโลแลคติกแบคทีเรียในไวน์ สิ่งที่สำคัญคือการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความเหมาะสมมากที่สุด การเลือกระยะเวลาที่ถูกต้องและเหมาะสมที่สุดในการเติมมาโลแลคติกแบคทีเรีย เพื่อให้แน่ใจว่ามาโลแลคติกแบคทีเรียสายพันธุ์นี้จะเจริญได้ดี และมีเกิดการหมักอย่างสมบูรณ์ในระยะเวลาที่คาดการณ์ไว้

2.7 ประโยชน์ของการหมักแบบมาโลแลคติก

การหมักแบบมาโลแลคติกมีผลกระทบอย่างมากต่อกลิ่นรสของไวน์ ผู้ผลิตจะเลือกทำการหมักแบบมาโลแลคติกด้วยเหตุผลหลัก 3 ประการคือ เพื่อลดความเป็นกรด เพื่อไม่ให้ไวน์เน่าเสียจากแบคทีเรีย และเพื่อปรับปรุงคุณภาพกลิ่นรส (Bisson, 2012)

การลดความเป็นกรด (Deacidification) เป็นการลดความปริมาณของกรดคาร์บอกซิลิกลง จะทำกับไวน์หรืออ่อนหลังการเก็บเกี่ยวแล้วแต่ยังมีความเป็นกรดสูง สามารถลดปริมาณกรดลงได้ประมาณ 1 ถึง 3 กรัม/ลิตร (เทียบกับกรดทาร์ทาริก) ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นประมาณ 0.1-0.3 หน่วย เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมากในการผลิตไวน์เพราะหากไวน์มีค่าพีเอชต่ำ (ต่ำกว่า 3.5) เมตาบอลิซึมของแลคติกแอซิดแบคทีเรียจะมีผลทำให้ไวน์มีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจนถึงระดับที่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่น ๆ อีกหลายชนิด

การทำให้จุลินทรีย์มีความคงตัว (Microbial stability) จุลินทรีย์อื่น ๆ จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตอันเนื่องมาจากแบคทีเรียที่ใช้ในการหมักแบบมาโลแลคติกได้ใช้สารอาหารต่าง ๆ ในน้ำหมักไปในการเจริญแล้ว ดังนั้นจึงทำให้น้ำหมักขาดสารอาหารบางอย่างที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ นอกจากนี้ยังอาจมีการสร้างสารพิษ เช่น แบคทีรีโอซิน (Bacteriocins) ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้เช่นกัน จึงนับว่าเป็นเหตุผลสำคัญประการหนึ่งที่ผู้ผลิตเลือกทำการหมักแบบมาโลแลคติกในการผลิตไวน์ เพราะหากไม่ทำการหมักแบบมาโลแลคติกแล้ว อาจเป็นไปได้ว่าไวน์ที่บรรจุโดยที่ไม่ผ่านการกรองจะเกิดการหมักขึ้นอีกครั้ง (Refermentation) แบคทีเรียบางสายพันธุ์จะย่อยสลายน้ำตาลรีดิวซ์ให้กลายเป็นกรดแลคติก กรดอะซิติก และสารอื่น ๆ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดความขุ่น มีฟองก๊าซเล็กน้อย และไวน์อาจมีกลิ่นรสที่ผิดปกติไป

การเปลี่ยนแปลงของกลิ่นรส (Flavor changes) การหมักแบบมาโลแลคติกจะมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารให้กลิ่นรส โดยจะขึ้นกับสายพันธุ์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้ ตลอดจนปริมาณสัดส่วนองค์ประกอบของน้ำผลไม้ Must หรือไวน์ และปริมาณอากาศ (Aeration) ที่มีอยู่ในขณะที่มาโลแลคติกกำลังดำเนินอยู่นั้น นอกจากนี้แลคติกแอซิดแบคทีเรียยังสามารถสร้างสารให้กลิ่นรสอื่น ๆ อีกมากมาย โดยเฉพาะสารให้กลิ่นรสที่เกิดจากการย่อยสลายกรดอะมิโน เช่น กลิ่นเนยแข็ง (Cheese) กลิ่นอุจจาระของสุกร (Pig feces) และกลิ่นปัสสาวะหนู (Mousy taint) เป็นต้น สารประกอบสำคัญที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักแบบมาโลแลคติก (ตารางที่ 2.2) ได้แก่ กรดอะซิติก (Acetic acid) ไดอะเซทิล (Diacethyl) อะซิโทอิน (Acetoin) 2,3-บิวทานิไดออล (2,3-Butantediol) เอทิลแลคเทต (Ethyllactate) ไดเอทิลซัคซินิค (Diacethyl succinate) และอะโครลิน (Acrolene) เป็นต้น

กรดอะซิติก (Acetic acid) การหมักแบบมาโลแลคติก นอกจากจะช่วยทำให้ความเป็นกรดของไวน์ลดลงแล้วยังทำให้มีการสร้างกลิ่นรสต่าง ๆ เกิดขึ้น ซึ่งหากจุลินทรีย์เข้าสู่วิถีการหมักแบบ Heterofermentative แล้วจะทำให้มีการสร้างกรดอะซิติกซึ่งมีกลิ่นที่แหลมฉุน แม้ว่าจะไม่ได้น่ารังเกียจ

เสมอไปแต่อาจนำไปสู่การสร้างสารอื่น ๆ ที่เป็นที่พึงประสงค์และไม่พึงประสงค์ต่อไปได้ กรดอะซิติกจะถูกสร้างขึ้นจากการขบวนการสลายโมเลกุลของน้ำตาล (Sugar catabolism) ซึ่งสามารถเกิดขึ้นจากกิจกรรมของจุลินทรีย์สร้างกรดอะซิติกและเอทานอล ในขณะที่เอทานอลจะถูกสร้างขึ้นเมื่อไม่มีตัวรับอิเลคตรอน แต่ถ้าหากมีโมเลกุลของออกซิเจนอยู่ก็จะสามารถสร้างกรดอะซิติกได้ จึงเป็นเหตุผลที่ในระหว่างการหมักแบบมาโลแลคติกไม่ต้องการอากาศ อย่างไรก็ตามออกซิเจนจะกระตุ้นการเจริญของมาโลแลคติกแบคทีเรียมากกว่ายีสต์ การจำกัดปริมาณออกซิเจนสามารถกระตุ้นการสร้างแลคเตทแต่ต้องมีการควบคุมอย่างระมัดระวัง ในสภาพที่มีการจำกัดปริมาณออกซิเจน *O. oeni* มีแนวโน้มที่จะสร้างแลคเตทและเอทานอล และต้องการปริมาณออกซิเจนสูงกว่าการสร้างอะซิเตท อย่างไรก็ตามแลคติกแบคทีเรียอื่น ๆ อาจสร้างอะซิเตทภายใต้สภาวะที่แตกต่างไปจาก *O. oeni* ปริมาณกรดอะซิติกที่ถูกสร้างขึ้นจะมีความแตกต่างกันไปและสูงกว่าระดับที่สามารถตรวจได้ทางประสาทสัมผัส (Sensory threshold) นอกจากนี้อะซิเตทยังถูกสร้างขึ้นผ่านขบวนการเมตาบอลิซึมของกรดซิตริก (Citrate metabolism) โดยแลคติกแบคทีเรีย ในขณะที่ยีสต์ *Saccharomyces* สามารถสร้างสารนี้ได้ในปริมาณต่ำ

ตารางที่ 2.2 สารประกอบสำคัญที่เกิดขึ้นในการหมักแบบมาโลแลคติก

สารประกอบ	ลักษณะคุณภาพ
กรดอะซิติก	ให้กลิ่นรสของน้ำส้มสายชู
ไดอะเซทิล	ถ้ามีปริมาณต่ำ (1-4 มิลลิกรัม/ลิตร) ให้กลิ่นเนย
	ถ้ามีปริมาณสูง (มากกว่า 4 มิลลิกรัม/ลิตร) ให้กลิ่นเนยและกลิ่นเหม็นหืน
อะซิโทอิน	พบในปริมาณต่ำมากกว่าที่จะสามารถตรวจพบได้ในไวน์ส่วนใหญ่
2, 3-บิวทานิไดออล	ส่วนใหญ่จะพบในปริมาณต่ำมากให้กลิ่นจาง ๆ ของแอลกอฮอล์และมีรสขม
เอทิลแลคเทต	พบในผลไม้ทั่วไป เป็นเอสเทอร์ของกรดแลตเทต (Acid lactate) และเอทานอล ซึ่งถูกสร้างขึ้นระหว่างการหมักด้วย Lactic acid bacteria
ไดเอทิลซัคซินิค	พบในผลไม้ทั่วไป เกิดจากการรวมตัวของกรดไดคาร์บอกซิลิกซัคซิเนต (Dicarboxylic acid succinate) กับเอทานอลสองโมเลกุล
อะโครลิน	เมื่อรวมตัวกับสารประกอบฟีนอลจะให้รสขม

ที่มา : Bisson (2012)

ไดอะเซทิล (Diacetyl) เป็นสารประกอบสำคัญตัวหนึ่งที่ถูกสร้างขึ้นโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ถ้าหากมีปริมาณต่ำคือ 1-4 มิลลิกรัม/ลิตร จะให้กลิ่นเนย (Buttery note) และหากมีปริมาณสูงจะให้กลิ่นข้าวโพดอบเนย (Popcorn butter) แต่ถ้าหากมีปริมาณสูงมากกว่า 4 มิลลิกรัม/ลิตร จะให้กลิ่นเหม็นหืน (Rancid taint) ไดอะเซทิลเกิดจากการเมตาบอไลท์ของไพรูเวท ปกติแล้วไพรูเวทสามารถเกิดขึ้นได้หลายทาง ได้แก่ การย่อยสลายของกรด (Acid catabolism) และการย่อยสลายของน้ำตาล (Sugar catabolism) ทั้งนี้ขึ้นกับความเข้มข้นของสารเริ่มต้น (Precursors) ในปฏิกิริยาเหล่านี้ ในขณะที่ยีสต์จะสร้างสารนี้ได้ในปริมาณต่ำ

ไดอะเซทิลเกิดจากการรวมตัวของคาร์บอน 2 ตัว อะเซทาดีไฮด์แอคทีฟ (Active acetaldehyde) และอะเซทิลโคเอ (Acetyl Co-A) หรือเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างไพรูเวทและอะเซทาดีไฮด์แอคทีฟ เกิดเป็นอะซิโทแลคเตท (Acetolactate) ซึ่งมีคาร์บอน 5 ตัว และจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไดอะเซทิล ซึ่งมีคาร์บอน 4 ตัว และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมเลกุล (อะเซทาดีไฮด์แอคทีฟ หมายถึง อะเซทาดีไฮด์ที่อยู่ในรูปเชื่อมต่อหรือรวมเข้ากับโคเอนไซม์ไทอามีนไพโรฟอสเฟต (อะเซทาดีไฮด์แอคทีฟ) ที่มีความพร้อมต่อการเกิดปฏิกิริยา) ไดอะเซทิลและสารประกอบคาร์บอนิลอื่น ๆ จะสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ (Sulfur-containing amino acids) เกิดเป็นสารที่ให้กลิ่นรสของเมล็ดถั่วเปลือกแข็ง (Hazel nut) ช็อคโกแลต (Choccolate) ชีส (Cheese) มันฝรั่ง (Potato) กระหล่ำปลี (Cabbage) ข้าวโพดอบเนย (Popcorn) และถั่วคั่ว (Nuts) สารเหล่านี้จะถูกสร้างขึ้นหรือไม่นั้น ขึ้นกับองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่มีอยู่ในน้ำผลไม้หรือไวน์

อะซีโทอิน (Acetoin) เกิดจากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย และอาจเกิดจากไพรูเวทหรือไดอะเซทิล ปกติแล้วจะพบอะซีโทอินในระดับต่ำกว่าที่มนุษย์สามารถตรวจพบได้ในไวน์ส่วนใหญ่ (Threshold of detection)

2, 3-บิวทานิไดออล (2, 3 Butantediol) เกิดจากอะซิโทอิน ปกติจะมีในปริมาณที่ต่ำกว่าระดับที่คนเราสามารถตรวจพบได้ มีกลิ่นรสคล้ายแอลกอฮอล์อ่อน ๆ ซึ่งเป็นเส้นแบ่งของความขมหรือถูกสร้างจากยีสต์ในปริมาณเล็กน้อย มีการสร้างขึ้นในรูปของรีดักทีฟ (Reductive) คือมีอิเลคตรอนที่ถูกตรึงไว้สำหรับการสร้างทั้งอะซีโทอินและ 2, 3-บิวทานิไดออล และจุลินทรีย์จะเปลี่ยนสารดังกล่าวไปให้ไปอยู่ในรูปของสารที่สามารถสลายในสภาวะที่มีออกซิเจน (Catabolize substrates oxidatively) และสร้างเป็นกรดอะซิติคได้

เอทิลแลคเตท (Ethyl lactate) เป็นสารที่พบทั่วไปในผลไม้ เกิดจากปฏิกิริยาการรวมตัวกันของกรดของแลคเตทและเอทานอล ในขณะที่สารทั้งสองดังกล่าวจะถูกสร้างขึ้นในระหว่างเมตาบอลิซึมของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย และเกิดปฏิกิริยารวมตัวกันเป็นเอสเทอร์ได้ด้วยเช่นกัน กลิ่นรสของผลไม้เป็นส่วนที่ทำให้แนวโน้มการยอมรับต่อไวน์ในภาพรวมเพิ่มขึ้น เอทิลแลคเตทอาจจะไม่สามารถระบุตัวตนของไวน์นั้น ๆ ไวน์อาจจะมีกลิ่นรสของผลไม้สูงขึ้นและบางทีอาจจะมีลักษณะเฉพาะของพันธุ์นั้น

(Varietal character) อย่างไรก็ตามสามารถค้นคว้าเพิ่มเติมได้จากหัวข้อการที่เอสเทอร์ถูกไฮโดรไลซ์ภายใต้สภาวะต่าง ๆ ของไวน์ซึ่งจะไม่คงที่ตลอดเวลา

ไดเอทิล ซัคซิเนท (Diethyl succinate) ให้กลิ่นรสของผลไม้เช่นเดียวกับเอทิลแลคเตท เกิดจากปฏิกิริยาของกรดไดคาร์บอกซิลิกของซัคซิเนท (Dicarboxylic acid succinate) กับเอทานอลจำนวน 2 โมเลกุล

อะโครลิน (Acrolein) เกิดจากกิจกรรมของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย แต่แทบจะไม่พบในการผลิตไวน์ เกิดขึ้นได้จากกลีเซอรอลและทำให้เกิดความขมเมื่อรวมตัวเข้ากับสารประกอบฟีนอล ไม่ใช่แลคติกแอซิดแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารอะโครลินได้ ประกอบกับโดยทั่วไปแล้วจะพบกลีเซอรอล (Glyceral) ในไวน์ในปริมาณที่ต่ำ ซึ่งเกิดผลดีในการป้องกันการเกิดอะโครลิน อย่างไรก็ตามการเลือกใช้สายพันธุ์ยีสต์ที่สร้างกลีเซอรอลสูงเพื่อช่วยปรับปรุง Mouth feel ก็ควรมีการใช้อย่างระมัดระวัง ถ้าหากไวน์นั้นต้องเข้าสู่การหมักแบบมาโลแลคติกและโดยเฉพาะในสภาวะที่มี *Pediococcus* และ *Lactobacillus* อยู่ด้วย

2.8 บทบาทสารให้กลิ่นรสในไวน์

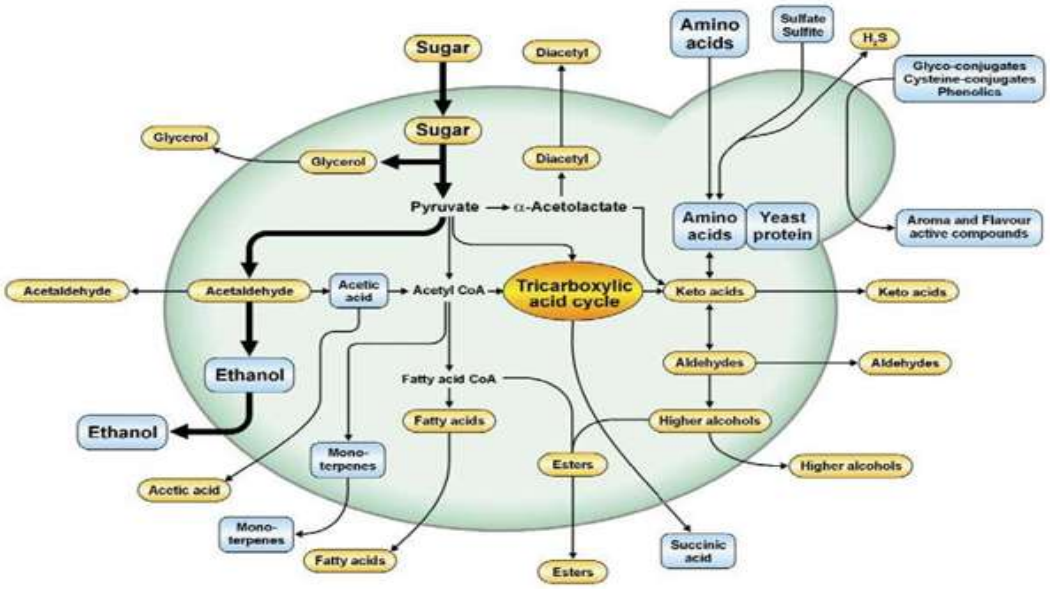
สารให้กลิ่นรสในไวน์ (Wine aroma and flavor) เป็นความผสมผสานซับซ้อนอย่างสมดุลของสารประกอบที่ระเหยได้จำนวนมากกว่า 800 ชนิด (Bayonove, 1998; Ferreira *et al*., 1998; Noble, 1994) ภายหลังการหมักแล้วจะมีสารประกอบต่าง ๆ รวมถึงสารที่ให้กลิ่นรสของไวน์ที่ค่อนข้างซับซ้อนเกิดขึ้นจำนวนมาก ซึ่งอาจเกิดจากการสกัดสารที่อยู่ในรูปของแข็งหรืออนุพันธ์ของมันที่มีอยู่ในน้ำหมัก (Must) และจากกระบวนการเมตาบอลิซึ่มของยีสต์ สารให้กลิ่นรสที่ถูกสร้างขึ้นจากยีสต์ แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ สารให้กลิ่นที่ระเหยได้หลัก ๆ ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก สารให้กลิ่นดอกไม้นานาพรรณที่ได้จากการหมัก และสารให้กลิ่นที่ไม่เป็นที่พึงประสงค์

สภาวะต่าง ๆ ระหว่างกระบวนการผลิตไวน์ มีผลส่งเสริมประสิทธิภาพการหมักของยีสต์ในวงการอุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ไวน์ยีสต์สายพันธุ์ *Sacharomyces cerevisiae* ได้รับความเชื่อถืออย่างแพร่หลายทั่วโลก เนื่องจากมีความสามารถหลักคือการย่อยน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้อย่างสมบูรณ์และรวดเร็ว และความสามารถรองคือสร้างสารสำคัญที่มีผลต่อประสาทสัมผัสและไม่สร้างสารให้กลิ่นรสไม่พึงประสงค์ (Off-flavours) (รูปที่ 2.4) (Pretorius, 2000) ด้านบทบาทรองนั้นจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ต่าง ๆ ของสารประกอบที่มีอยู่ในผลองุ่น เช่น ไกลโค (Glyco) และคอนจูเกตของซีสเตอีน (Cysteins conjugate) ซึ่งเป็นสารประกอบที่กระตุ้นสารประกอบต่าง ๆ ที่เป็นเอกลักษณ์ประจำสายพันธุ์องุ่น การสร้างภาวะการหมักอย่างเหมาะสมจะทำให้เกิดสารอนุพันธ์สารให้กลิ่นรสต่าง ๆ จากกระบวนการหมักของยีสต์ ที่อยู่ในรูปกรด

แอลกอฮอล์ (Alcohol acid) คาร์บอนิล (Carbonyl) เอสเทอร์ (Ether) สารประกอบซัลเฟอร์ (Sulphur compounds) และโมโนเทอร์พีน (Monoterpenoids) ดังตารางที่ 2.3 และ 2.4

S. cerevisiae เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยกรดมาลิกได้ถึงร้อยละ 3-45 ในระหว่างการหมักยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม ได้แก่ Enoferm M2 จะสามารถเพิ่มปริมาณกรดมาลิกในการผลิตไวน์องุ่นพันธุ์ Cabernet Sauvignon ได้ถึง 1.5 กรัม/ลิตร ICV และ D254 สร้างได้ถึง 0.5 กรัม/ลิตร ส่วนกรดซัคซินิค เป็นกรดคาร์บอกซิลิคหลักที่ถูกผลิตขึ้นระหว่างการหมักและอาจเพิ่มได้สูงถึง 2 กรัม/ลิตร (Thoukis *et al*., 1965; Radler 1993; Coulter *et al.,* 2004) เป็นกรดที่ให้รสเค็มและขม ในไวน์ การพบกรดซัคซินิคปริมาณสูงในไวน์อาจเกิดได้หลายสาเหตุ ได้แก่ สายพันธุ์ยีสต์ อุณหภูมิการหมัก ปริมาณออกซิเจน ความขุ่นและองค์ประกอบต่าง ๆ ในน้ำหมัก ได้แก่ น้ำตาล ปริมาณสารอาหาร พีเอช ปริมาณกรด และความเข้มข้นของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (Coulter *et al*., 2004)

กรดคีโทนิค (Ketonic acids) ส่วนใหญ่ที่พบ ได้แก่ Pyruvic acid และ α-Ketoglutaric acid เป็นตัวชี้ถึงความเสถียรภาพและคุณภาพของไวน์ เนื่องจากเป็นสารที่สามารถสร้างพันธะกับซัลเฟอร์ไดออกไซด์และยังทำปฏิกิริยาได้กับสารกลุ่มฟีนอลด้วย (Rankine, 1967; Rankine, 1968a, b; Rankine and Pocock, 1969) กรดคีโทนิคจะถูกผลิตในช่วงแรกของการหมักผ่านขบวนเมตาบอลิซึ่มของน้ำตาลหรือกรดอมิโนอลานิน (Alanine) และกลูตาเมท (Glutamate) ผ่าน Erhlich pathway ปัจจัยสำคัญมากที่สุดอันหนึ่งต่อการสร้างสารกลุ่มนี้คือสายพันธุ์ยีสต์ ตลอดจนชนิดและปริมาณไนโตรเจนที่มีอยู่ในน้ำหมัก (Rankine, 1968) ยีสต์จะสร้างกรดแอลฟา-คีโทกลูทาเรทต่ำกว่า 50-100 มิลลิกรัม/ลิตร ในสภาวะที่มีปริมาณไนโตรเจนเพียงพอ และจะสูงหลายร้อยมิลลิกรัม/ลิตร เมื่อมีไนโตรเจนในปริมาณจำกัดมาก



รูปที่ 2.4 แผนผังกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบให้กลิ่นรสจากเมตาบอลิซึมของไวน์ยีสต์จากน้ำตาล กรดอะมิโน และซัลเฟอร์

ที่มา : Swieger *et al*. (2005)

กรดแลคติค เป็นผลิตภัณฑ์หลักที่สร้างจากแบคทีเรียกลุ่มแลคติค (Lactic acid bacteria) เป็นกรดที่มีความเสถียรในไวน์ สำหรับการหมักแบบมาโลแลคติค (Malolactic acid fermentation) อาจพบสูงถึง 6 กรัม/ลิตร ในขณะที่ยีสต์ *S. cereviseae* จะสร้างเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Dequin and Barre, 1994)

กรดอะซิติคเป็นกรดที่ระเหยได้จะมีความยาวของโซ่คาร์บอนสั้น พบว่า ในไวน์จะมีอยู่ประมาณ 500-1000 มิลลิกรัม/ลิตร (ร้อยละ 10-15 ของปริมาณกรดทั้งหมด) ประกอบด้วยกรดอะซิติคประมาณร้อยละ 90 (Fowles, 1992; Henschke and Jiranek, 1993; Radler, 1993) ส่วนที่เหลือจะเป็นกรดโพรพิโอนิค (Propionic acid) เฮกซาโนอิค (Hexanoic acid) ซึ่งเป็นผลจากขบวนการเมตาบอลิซึ่มของกรดไขมันของยีสต์และแบคทีเรีย กรดอะซิติคนับว่าเป็นกรดที่มีความสำคัญมาก ถ้าหากมีความเข้มข้นสูงขึ้นจะให้กลิ่นรสของน้ำส้มสายชู ถ้ามีมากเกิน 0.7-1.1 กรัม/ลิตร จะให้กลิ่นที่ไม่เป็นที่ต้องการ แต่ทั้งนี้ยังขึ้นกับชนิดของไวน์ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 0.2-0.7 กรัม/ลิตร (Corison *et al*., 1979; Dubois, 1994) โดย *S. Cereviseae* จะสร้างปริมาณน้อยมากในระหว่างการหมัก จาก 100 มิลลิกรัม/ลิตร ถึง 2 กรัม/ลิตร (Radler, 1993) สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตไวน์จะผลิตกรดอะซิติคที่ระดับต่ำสุดของมาตรฐาน Dry wine แต่จะสูงขึ้นในไวน์หวาน (Sweet wine) (Monk and Cowley, 1984; Henschke and Dixon, 1990; Millan *et al*., 1991; Bely *et al*., 2003; Erasmus *et al*., 2004)

สารให้กลิ่นรสกลุ่ม Higher alcohols เป็นสารให้กลิ่นรสกลุ่มให้ผลทางด้านดีและไม่ดีต่อกลิ่นรสของไวน์ เมื่อมีปริมาณเหมาะสมจะให้กลิ่นหอมของผลไม้ ถ้าหากสูงเกินไปจะให้กลิ่นฉุน (Nykanen *et al*., 1977; Lambrechts and Pretorius, 2000; Swiegers and Pretorius, 2005) สายพันธุ์ยีสต์มีความสำคัญต่อปริมาณการเกิดสารกลุ่มนี้ พบว่า ความเข้มข้นของกรดอะมิโน (เป็นสารตั้งต้นของ Higher alcohols) ในน้ำหมักก็มีผลต่อการสร้าง Higher alcohols ด้วยเช่นกัน (Schulthess and Ettlinger, 1978) นอกจากนี้ ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ อุณหภูมิการหมัก พีเอช และองค์ประกอบของผลองุ่น ปริมาณออกซิเจน ปริมาณของแข็ง พันธุ์องุ่น ระดับความสุก และระยะเวลาของการหมักร่วมกับกาก ก็มีผลต่อความเข้มข้นของ Higher alcohols เช่นกัน (Fleet and Heard, 1993)

Acetaldehyde เป็นสารประกอบคาร์บอนิลหลักที่พบในไวน์ประมาณ 10-75 มิลลิกรัม/ลิตร และค่าที่ประสาทสัมผัสสามารถรับรู้ได้คือ 100 มิลลิกรัม/ลิตร (Schreier, 1979; Berg *et al*., 1955) ให้กลิ่นคล้ายแอปเปิ้ลที่มีผิวถลอกและกลิ่นถั่ว และยังชี้ให้เห็นว่าไวน์เกิดการออกซิเดชัน โดยระหว่างการหมักจะมีการสะสม Acetaldehyde เร็วที่สุดเมื่อมีอัตราการใช้คาร์บอนอยู่ที่ระดับสูงสุด และจะลดลงเรื่อย ๆ จนถึงระดับต่ำสุดในช่วงสุดท้ายของการหมัก และหลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งอย่างช้า ๆ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการหมัก ได้แก่ องค์ประกอบของน้ำหมัก สมบัติของสารที่ใช้ให้เกิดความใสในน้ำหมัก และการเจริญของยีสต์ในระยะที่ต้องการออกซิเจนเป็นต้น ซึ่งล้วนแล้วแต่มีผลต่อปริมาณ Acetaldehyde ทั้งสิ้น (Bennetzen and Hall, 1982; Denis *et al*., 1983; Delfini and Costa, 1993)

สารเอสเทอร์เป็นสารให้กลิ่นกลุ่มหลักที่ยีสต์สามารถผลิตได้และให้กลิ่นผลไม้ในไวน์ ได้แก่ เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate), ไอโซเอมิลอะซิเตท (Isoamyl acetate หรือ Isopentyl acetate), ไอโซบิวทิลอะซิเตท (Isobutyl acetate), เอทิลคาโพเอท (Ethyl caproate หรือ Ethyl hexanoate) และ 2-ฟีนิลเอทธิลอะซิเตท (2-Phenylethyl acetate) (Thurston *et al*., 1981) สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไวน์จะมีผลต่อการสร้างเอสเทอร์ในปริมาณที่แตกต่างกันไป ได้แก่ ไอโซเอมิลอะซิเตท (Isoamyl acetate), เฮกซิลอะซิเตท (Hexyl acetate) และเอทธิลเฮกซาโนเอท (Ethyl hexanoate) ซึ่งจะมีผลต่อคุณภาพกลิ่นรสของไวน์ (Rankine, 1977; Soles *et al*., 1982; Lambrechts and Pretorius, 2000; Marais, 2001)

สารประกอบซัลเฟอร์ เป็นสารให้กลิ่นที่พบในไวน์จะมีความเข้มข้นต่ำมาก แต่ก็มีผลต่อระดับของ Detection thresholds โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบซัลเฟอร์ที่พบในไวน์ ได้แก่ ซัลไฟด์ (Sulfides), โพลีซัลไฟด์ (Polysulfides), เฮเทอโรไซคลิก (Heterocyclic compounds), ไทโอเอสเทอร์ (Thioesters) และไทออล (Thiols) โดยสารประกอบเหล่านี้จะให้สมบัติทางด้านประสาทสัมผัสที่มีความแตกต่างกันอย่างมาก ส่วนใหญ่จะให้ผลทางด้านกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์ ได้แก่ กลิ่นกะหล่ำปลี กลิ่นไข่เน่า กลิ่นซัลเฟอร์ กลิ่นกระเทียม กลิ่นหัวหอม และกลิ่นยาง เป็นต้น (ตารางที่ 2.4) (Rauhut, 1993; Mestres *et al*., 2000; Vermeulen *et al*., 2005) แต่ก็มีสารประกอบซัลเฟอร์บางตัวที่ให้กลิ่นรสที่น่าพึงพอใจในไวน์ เช่น กลิ่นสตรอเบอรี่ (Strawberry) กลิ่นเสาวรส (Passion fruit) กลิ่นผลไม้ตระกูลส้ม (Grapefruit) (Tominaga *et al*., 1996, 1998a, b) อย่างไรก็ตาม กลไกการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับรูปแบบของสารประกอบซัลเฟอร์ในไวน์ยังไม่เป็นที่แน่ชัด (Rauhut, 1993; Mestres *et al*., 2000; Vermeulen *et al*., 2005) ยีสต์จะสร้างสารประกอบซัลเฟอร์โดยจะรวมถึงการย่อยสลายของสารซัลเฟอร์ที่เป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโนบางชนิด การย่อยสลายของสารประกอบซัลเฟอร์ที่อยู่ในยาฆ่าแมลง และการหลั่งออกมาจากขบวนการเมตาบอลิซึมของสารตั้งต้นหรืออนุพันธ์ที่มีอยู่ในผลองุ่น (Mestres *et al*., 2000)

ตารางที่ 2.3 สารให้กลิ่นรสที่พบในไวน์

Compounds	Concentration in wine (µg/L)	Aroma threshold (µg/L)	Aroma descriptors
Ethyl acetate	22.5,63.5	7.5’	VA, nail polish, fruity
Isoamyl acetate	0.1-3.4	0.03’	Banana, pear
2-Phenylethyl acetate	0-18.5	0.25’	Flowery, rose, fruity
Isobutyl acetate	0.01-1.6	1.6””	Banana, fruity
Hexyl acetate	0-4.8	0.7”	Sweet, perfume
Ethyl butanoate	0.01-1.8	0.02’	Floral, fruity
Ethyl hexanoate	0.03-3.4	0.05’	Green apple
Ethyl ocranoate	0.05-3.8	0.02’	Sweet soap
Ehtyl decanoate	0-2.1	0.2’””	Floral, soap
Propanol	9.0-68	500”	Pungent, harsh
Butanol	0.5-8.5	150’	Fusel, spirituous
Isobutanol	9.0-174	40’	Fusel, spirituous
Isoamyl alcohol	6.0-490	30’	Hansh, nail polish
Hexanol	0.3-12.0	4”	Green, grass
2-Phenylethyl alcohol	4.0-197	10’	Floral, rose
Acetic acid	100-1150	280’	VA, vinegar
Acetaldehyde	10-75	100”	Sherry, nutty, bruised apple
Diacetyl	‹5	0.2”/2.8’”	Buttery
Glycerol	5-14 g/L	5.2 g/L”	Odourless (slightly sweet taste)
Linalool	0.0017-0.010	0.0015””””/0.025””””	Rose
Geraniol	0.001-0.044	5””””/30’	Rose-like
Citronellol	0.015-0.042	8””””/100’	Citronella
2-Acetyl-l-pyrroline (ACPY)	Trace	0.0001””””	Mousy
2-Acetyltetrahydropyridine (ACPTY)	0.0048-0.1	0.0016””””	Mousy
4-Ethylphenol	0.012-6.5	0.14’/0.6’”	Medicinal, barnyard
4-Ethyl quaiacol	0.001-0.44	0.033’/0.11’”	Phenolic, sweet
4-Vinyl phenol	0.04-0.45	0.02””””	Medicinal, barnyard
4-Vinyl guaiacol	0.0011,0.71	10””””	Phenolic, pharmaceutical Sweet, Clove like, phenolic

‘ 10% ethanol, “wine, ”’red wine, ””beer, ””””synthetic wine, ””””water

ที่มา : Swieger *et al*. (2005)

สารประกอบโมโนเทอร์ปีน (Monoterpenoids) เป็นสารให้กลิ่นรสที่มีศักยภาพสูง ถูกผลิตในพืชชั้นสูง สาหร่าย ฟังไจ และรวมถึงยีสต์บางชนิด ได้จากสารตั้งต้นทั่วไปคือ Geranyl pyrophosphate โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืช 2 สปีชี่ส์ ที่สามารถผลิตโมโนเทอร์ปีนได้คือ *V.vinifera* (ผลองุ่น) และ *Humulus lupulus* (hops) (King and Dickinson, 2000) มีฟังไจบางชนิด โดยสภาวะการหมักสามารถที่จะกระตุ้นการสร้างโมโนเทอร์ปีน เมื่อเปรียบเทียบการใช้ไนโตรเจนที่ระดับ 400 มิลลิกรัม/ลิตร และ 180 มิลลิกรัม/ลิตร ทั้งสองสภาวะจะสามารถกระตุ้นอัตราการหมักได้ แต่ไม่เพิ่มปริมาณ Biomass และการสร้างโมโนเทอร์ปีนไม่สามารถกระตุ้นการสร้าง Sesquiterpenes, Nerolidol และ Farnesol นอกจากนี้ *Saccharomyces* บางสายพันธุ์สามารถสร้างกลิ่นดอกไม้ให้แก่ไวน์ จากการศึกษาการสังเคราะห์โมโนเทอร์ปีนเมื่อสภาวะการหมักที่เหมาะสม เช่น การเติม Assimilable nitrogen และแอมโมเนียมอิออนร่วมกับการให้ก๊าซออกซิเจนปริมาณเล็กน้อย (Microaerobic condition) (Carrau *et al*., 2005) จากการศึกษาสารให้กลิ่นรสที่มีศักยภาพของผลไม้บางชนิด เช่น ผลองุ่น เสาวรส มะละกอ ราสเบอร์รี่ ผลิตภัณฑ์หมักจากน้ำผลไม้และเครื่องดื่มไวน์ พบว่า นอกจากจะมีสารประกอบกลุ่มเทอร์ปีนอิสระที่ระเหยได้ (Free volatile terpenoids) แล้ว ยังพบสารประกอบประเภทที่ไม่มีกลิ่น (Non-odourous) และสารประกอบที่ไม่ระเหย (Non-volatile precursor) ซึ่งเป็นสารที่สำคัญกลุ่มหนึ่งที่จะสร้างสารประกอบที่ให้กลิ่นหอมต่อไป วิธีการหนึ่งที่จะทำให้ Bound terpenoids สามารถแตกตัวออกมาได้ในระหว่างการทำไวน์คือการใช้ Glucosidase enzyme ซึ่งปกติจะพบในผลองุ่น ยีสต์ และแบคทีเรีย ดังนั้นการเพิ่มกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ จึงส่งผลต่อการกระตุ้นการเกิดสารประกอบให้กลิ่นกลุ่ม Terpenoids ในไวน์

ตารางที่ 2.4 สารประกอบซัลเฟอร์ที่พบในไวน์

Compounds	Concentration in wine (µg/L)	Aroma threshold (µg/L)	Aroma descriptors
4-Mercaptc-4-methylpentan-2-one-(4MMP)	0-30 ng/L	3 ng/L	cat urine, box tree/blackcurrant broom
3-Mercaptchexan-l-d(3MH)	50-5000 ng/L	60 ng/L	Passionfruit, grapefruit
3-Mercaptchexyl acetate (3MHA)	1-100 ng/L	4 ng/L	Riesling-type note, passionfruit, box tree
4-Mercaptc-4-methylpentan-2-one-(4MMP)	0-30 ng/L	3 ng/L	Cat urine, box tree/blackcurrant, broom
3-Mercaptchexan-l-d(3MH)	50-5000 ng/L	60 ng/L	Passionfruit, grapefruit
3-Mercaptchexyl acetate (3MHA)	1-100 ng/L	4 ng/L	Riesling-type note, passionfruit, box tree

ที่มา : Swieger *et al.* (2005)

สายพันธุ์องุ่นที่มีสาร Terpenoids เป็นส่วนประกอบ เช่น Muscat, Riesling และ Gewürztraminer พบว่า มีโมโนเทอร์ปีนปริมาณมาก ได้แก่ เจรานีออล (Geraniol) และ นีรอล (Nerol) โดย Geraniol และ Linalool ให้กลิ่นกุหลาบ, Linalool oxides ให้กลิ่นการบูร, Nerol oxides ให้กลิ่นเหม็นเขียวของผัก (Ritter *et al*., 1979) โดยทั่วไปแล้วจะพบ Bound glycosides มากกว่า Free terpenoids (William *et al*., 1982)

ลัดดาวัลย์ และคณะ (2554) ได้ศึกษาชนิดของสารให้กลิ่นระเหยที่เป็นเอกลักษณ์ในผลเม่าต่างสายพันธุ์ พบว่า ผลเม่าสายพันธุ์ฟ้าประทาน ประกอบด้วยสารให้กลิ่น 11 ชนิด แบ่งเป็นที่พบในน้ำเม่าจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ 1-Hexanol, Limonene, β-Ocimene, α-Terpinene, (+-)-3-Carene, β-Pinene และ 2-Pentanone และกากเม่าจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ 1-Hexanol, 1-Hexanal, 2-Hexenal, Octanal, (+-)-3-Carene, 2-Pentanone และ Hexyl acetate ผลเม่าสายพันธุ์คำตา ประกอบด้วยสารให้กลิ่นจำนวน 9 ชนิด แบ่งเป็นที่พบในน้ำเม่าจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ 1-Hexanol, 2-Hexenal, Limonene, α-Terpinene และ (+-)-3-Carene และกากเม่าจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ 1-Hexanol, 2-Hexenal, Octanal, Nonanal, 1-Hexanal, 2-Hexenal, Octanal, Nonanal, (+-)-3-Carene และ 2-Pentanone ผลเม่าสายพันธุ์ห้วยบาง ประกอบด้วยสารให้กลิ่นจำนวน 9 ชนิด แบ่งเป็นที่พบในน้ำเม่าจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Limonene, α-Terpinene, α-Calacorene, Ethyl hexanoate และ Phenol และกากเม่าจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ 1-Hexanal, 2-Hexenal, Octanal, (+-)-3-Carene และ Ethyl hexanoate และผลเม่าสายพันธุ์แสนโฮม ประกอบด้วยสารให้กลิ่นจำนวน 10 ชนิด แบ่งเป็นที่พบในน้ำเม่าจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ 1-Hexanol, 1-Hexenal, 2-Hexenal, Limonene, α-Terpinene, (+-)-3-Carene, α-Terpinolene และ α-Calacorene และกากเม่าจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ 1-Hexanal, 2-Hexenal, Octanal, (+-)-3-Carene และ 2-Pentanone โดย α-Limonene, β-Ocimene, α-Terpinene, (+-)-3-Carene, α-Calacorene และ 1-Hexanol เป็นกลุ่มสารที่มีแนวโน้มให้กลิ่นผลไม้ตระกูลส้ม กลิ่นไม้แห้งและกลิ่นเขียว เป็นต้น และ 1-Hexanal, 2-Hexenal เป็นกลุ่มสารที่มีแนวโน้มให้กลิ่นเขียว และ 2-Pentanone เป็นกลุ่มสารที่มีแนวโน้มให้กลิ่นผลไม้และกลิ่นอีเทอร์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังศึกษา พบว่า คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นของน้ำเม่าทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ฟ้าประทาน คำตา ห้วยบาง และแสนโฮม มีความคล้ายคลึงกันมาก มีเฉพาะคุณลักษณะกลิ่นดอกกระเจี๊ยบแห้งเท่านั้นที่มีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ โดยน้ำเม่าสายพันธ์ห้วยบางมีกลิ่นดอกกระเจี๊ยบแห้งเข้มมากกว่าสายพันธุ์อื่น และเมื่อพิจารณาชนิดของสารให้กลิ่นระเหยที่วิเคราะห์ด้วย GC-MS ที่พบในน้ำเม่าสายพันธุ์ห้วยบางคือ Ethyl hexanoate ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นผลไม้ตระกูลส้มและกลิ่นผลไม้สดที่พบเฉพาะในน้ำเม่าสายพันธุ์ห้วยบางเท่านั้น

Jitjaroen (2007) ได้ทำการศึกษาสารให้กลิ่นรสที่ถูกสร้างขึ้นในกระบวนการหมักไวน์เม่า ตารางที่ 2.5 พบว่า การเพิ่มปริมาณไนโตรเจนถึง 2000 มิลลิกรัม/ลิตร มีผลทำให้เอสเทอร์ และกรดส่วนใหญ่เพิ่มขึ้นในขณะที่ Higher alcohols ลดลง สอดคล้องกับ Houtman *et al*. (1980a; 1980b) รายงานว่า Isoamyl acetate และ Hexyl acetate มีความสัมพันธ์กัน ในขณะที่ Phenylethyl acetate ไม่

สัมพันธ์กับปริมาณไนโตรเจนในน้ำหมัก Rapp and Versini (1991) รายงานว่า ไนโตรเจนในน้ำหมักสัมพันธ์กับการสร้างสารให้กลิ่นประเภท Ethyl acetate ester และ 1-Propanol แต่มีผลในเชิงลบกับ Higher alcohols นอกจากนี้ De la Calle Garcia *et al*. (1998) พบว่า สารพวกเทอร์พีนอยด์จะไม่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมัก โดยโมโนเทอร์พีนจะแสดงถึงเอกลักษณ์ของไวน์ที่ผลิตจากองุ่นตามสายพันธุ์

ตารางที่ 2.5 ค่า Relative factor ของสารให้กลิ่นรสในไวน์เม่าที่หมักด้วยยีสต์ SIHA3 ร่วมกับการใช้สารเสริมต่างชนิด

RT* min	**Aroma compound**	**AS/AIS****			
		DAP 1000 mgL^{-1} Thiamine 0.6 mgL^{-1}	**DAP 2000 mgL^{-1} Thiamine 0.6 mgL^{-1}**	**FerE 160 g hL^{-1}**	**FerK 160 g hL^{-1}**
	Esters				
3.67	Acetic acid, ethylester	1.820	2.355	1.057	1.285
5.86	Acetic acid, 2-methylpropylester	0.025	0.049	0.040	0.036
6.45	Butanoic acid, ethylester	0.127	0.077	0.093	0.067
8.48	Acetic acid, 3-methylbutylester	2.574	2.225	2.039	2.248
11.49	Propanoic acid, pentylester	0.003	0.002	0.058	0.002
12.51	Hexanoic acid, ethylester	1.459	1.455	1.112	1.472
14.49	4-Hydroxybutanoic acid, ethylester	0.017	0.004	0.020	0.031
16.03	Heptanoic, ethylester	0.004	0.093	0.004	0.004
18.62	Benzoic acid, ethylester	0.009	0.006	0.008	0.007
18.95	Butanedioic acid, ethylester	0.433	0.400	0.372	0.281
19.61	Octanoic acid, ethylester	2.892	4.215	2.781	3.519
21.19	Benzeneacetic acid, ethylester	0.056	0.039	0.082	0.049
21.68	Acetic acid, 2-phenylethylester	2.340	1.914	3.682	2.634
22.96	Nonanoic acid, ethylester	0.004	0.009	0.004	0.010
25.95	9-Decanoic acid, ethylester	4.093	9.018	6.066	4.857
26.27	Decanoic acid, ethylester	4.370	5.914	2.365	4.963
27.25	Butanedioic acid, 3-methylbutylester	0.045	0.023	0.059	0.023
27.83	Octanoic acid, 3 methylbutylester	0.009	0.007	0.010	0.009
28.03	Hexanedioic acid, bis (1-methylethyl)	0.069	0.124	0.063	0.074
30.49	3-Hydroxy-dodecanoic acid, ethylester	0.119	0.186	0.248	0.142
32.24	Dodecanoic acid, ethylester	0.196	0.452	0.119	0.213
32.41	Propanoic acid, 2-methyl-1-(1, 1-	0.121	0.367	0.051	0.115
33.63	Hexanoic acid, 2-phenylethylester	0.022	0.012	0.038	0.118
36.20	3-Hydroxy-tridecanoic acid, ethylester	0.038	0.060	0.031	0.057
36.69	2-Propanoic, 2, 3-(4-methoxyphenyl),	0.009	0.006	0.007	0.014
40.73	ethylester				
51.45	Pentadecanoic acid, ethylester	0.058	0.105	0.028	0.068
	Hexanedioic acid, bis (2-ethylhexyl)	0.019	0.024	ND***	0.005

RT* min	Aroma compound	AS/AIS**			
		DAP 1000 mgL^{-1} Thiamine 0.6 mgL^{-1}	DAP 2000 mgL^{-1} Thiamine 0.6 mgL^{-1}	FerE 160 g hL^{-1}	FerK 160 g hL^{-1}
	Alcohols				
5.30	2-Methyl-1-propanol	0.535	ND	0.534	0.599
5.35	3-Methyl-1-butanol	5.738	2.669	5.659	5.043
6.25	2-Methyl-1-butanol	1.475	1.339	1.790	1.657
15.07	2, 3-Butanediol	0.030	0.050	0.022	0.010
	1-Octanol	0.018	0.020	0.016	0.001
16.67	Phenethyl alcohol	2.885	0.982	5.977	5.622
22.17	1-Decanol	0.217	0.207	0.039	0.064
	Acids				
12.02	Hexanoic acid	0.020	0.122	0.077	0.112
19.41	Octanoic acid	1.342	1.981	0.719	1.979
26.35	Decanoic acid	0.530	0.009	0.835	ND
	Terpenoids				
21.84	α-Terpinene	0.007	0.008	0.007	0.006
22.54	Vitispirane	0.022	0.019	0.017	0.067
24.93	1, 1, 6-Trimethyl-1-2-dihydronapthalene	0.003	0.005	0.004	0.003
16.11	Linalool	0.088	0.093	0.097	0.109
18.07	Neroloxide	0.022	0.011	0.010	0.011
20.71	ß-Citronellol	0.034	0.033	0.021	0.011
31.40	d-Nerolidol	0.365	0.474	0.468	0.816
34.86	α-Bisabolol	0.015	0.020	0.022	0.026
34.99	2, 3-Dihydro-6-trans-farnesol	0.078	0.064	0.013	0.105
35.84	Farnesol	0.124	0.048	0.053	0.280
	Miscellaneous				
19.86	Decanal	0.071	0.034	0.715	0.021
10.53	3-Octanone, 6-methyl	0.017	0.023	0.019	0.013
15.80	2-Nonanone	0.011	0.005	0.014	0.007
28.47	2 (3H)-Furanone, 5-heptyldihydro	0.014	0.011	0.030	0.010
28.66	2, 6-Di (t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2, cyclohexadien-1-one	0.034	0.089	0.040	0.046
34.61	γ-Dodecalactone	0.159	0.225	0.122	0.219
17.41	Benzeneacetonitrile	0.012	0.009	0.009	0.007
20.51	Benzothiazole	0.011	0.021	0.011	0.031
28.70	1-Decene	0.073	0.088	0.016	0.029
29.48	Pentadecane	0.008	0.007	0.002	0.004

* Retention time **AS/AIS = (peak area sample)/(peak area IS) *** Not detected

IS = internal standard: benzenamine 2, 6 dichloroanilin with RT = 20.94 min

ที่มา : Jitjaroen (2007)

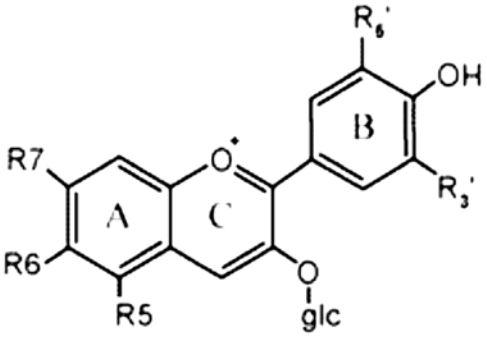
3. บทบาทของสารต่อต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดกระบวนการออกซิเดชันซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระหยุดยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระทำให้คงตัวและหยุดการก่อตัวใหม่ นอกจากนั้นยังซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดจากตัวอนุมูลอิสระทำลายเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกาย กำจัดและแทนที่โมเลกุลที่ถูกทำลาย เพราะสารเหล่านี้อาจเป็นพิษต่อร่างกาย มักพบสารต้านอนุมูลอิสระในอาหารจำพวกผักและผลไม้ ได้แก่ วิตามินอีได้จากเมล็ดทานตะวัน วิตามินซีได้จากผักใบเขียวทั่วไป แคโรทีนอยด์ (Carotenoids) พบในมะเขือเทศ สารประกอบฟีนอล (Phenolic compound) พบในองุ่น และในผักพื้นบ้าน ได้แก่ กระถิน และผักชีล้อม เป็นต้น (นวลศรีและอัญชนา, 2545) การใช้ประโยชน์ของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ตามธรรมชาติที่ได้จากผักและผลไม้ส่วนใหญ่มักจะนำไปเป็นส่วนประกอบร่วมกับส่วนผสมอาหารได้หลากหลายในผลิตภัณฑ์อาหาร และเป็นสารป้องกันการหืนในน้ำมันและไขมัน ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ โทโคฟีรอล (Tocopherol), กรดทาร์ทาริค (Tartaric acid), เลซิติน (Lecithin) เคอร์คูมิน (Curcumin), สารประกอบฟีนอล (Phenolic compounds), แอนโธไซยานิน (Anthocyanin) และวิตามินซี (Ascorbic acid) เป็นต้น (Madhavi *et al*., 1995)

Kalt *et al*. (1999) ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระในรูปของวิตามินซี และแอนโธไซยานินในสตรอเบอรี่ ราสเบอรี่ และบลูเบอรี่ หลังเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0, 10, 20 และ 30 °ซ เป็นเวลา 8 วัน พบว่า สารต้านอนุมูลอิสระในบลูเบอรี่มีมากกว่าในราสเบอรี่และสตรอเบอรี่ ส่วนในสตรอเบอรี่นั้นมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 0 °ซ ซึ่งให้ผลในลักษณะเดียวกันนี้กับปริมาณแอนโธไซยานินและสารประกอบฟีนอลในราสเบอรี่ สำหรับปริมาณวิตามินซีนั้นในสตรอเบอรี่และราสเบอรี่ไม่มีการสูญเสียวิตามินซีตลอดการเก็บรักษาทั้ง 8 วัน Janina *et al*. (2005) ศึกษากิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระของแอนโธไซยานินกลุ่ม Glycoside ในรูปของ Liposome oxidation พบว่า สารแอนโธไซยานินกลุ่ม Cyanidin-3-glycosides และ Delphinidin-3-rutinoside มีกิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิตามินอีและ Trolox

แอนโธไซยานิน เป็นสารสีที่พบในมะเม่าทั้งผล เมื่อมะเม่าเริ่มสุกก็จะมีการเปลี่ยนแปลงของเปลือกจากสีแดงเป็นสีม่วงดำถึงเกือบดำ สีของแอนโธซัยยานินจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะความเป็นกรด-ด่าง คือ ในสภาวะที่เป็นกรดจะมีสีแดงในสภาวะที่เป็นกลางจะมีสีม่วง และสภาวะที่เป็นด่างจะมีสีน้ำเงิน สารสีแอนโธไซยานินสามารถละลายน้ำได้แต่ไม่ละลายใน Non-hydroxy solvent เช่น อะซิโตน (Acetone) เบนซิน (Benzene) คลอโรฟอร์ม (Chloroform) และอีเทอร์ (Ether) แอนโธไซยานินจัดเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids หรือ Flavonol glycosides) ประเภทหนึ่ง มีสูตรโครงสร้างพื้นฐานทางเคมีเป็นฟลาวิลเลียมแคตไอออน (Flavylium cation) หรือไซยานิดิน (Cyanidin) อนุพันธุ์อื่น ๆ ของแอนโธไซยานินเกิดจากการเปลี่ยนแปลงจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl groups) หรือโดยการเกิดเมทธิลเลชัน (Methylation) หรือไกลโคซิลเลชัน

(Glycosylation) การแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซีและหมู่เมทิลในตำแหน่ง R- จะทำให้เกิดแอนโธไซยานินชนิดต่าง ๆ ชนิด ดังตารางที่ 2.6



รูปที่ 2.5 สูตรโครงสร้างของแอนโธไซยานิน
ที่มา : Harborne, (1986)

ตารางที่ 2.6 ชนิดแอนโธไซยานินที่เกิดจากการแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซีและเมทิลในตำแหน่ง R

Anthocyanidin	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
Cyanidin	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Delphinidin	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
Pelargonidin	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Malvidin	$-OCH_3$	-OH	$-OCH_3$	-OH	-OH	-H	-OH
Peonidin	$-OCH_3$	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Petunidin	-OH	-OH	$-OCH_3$	-OH	-OH	-H	-OH

ที่มา : ดัดแปลงจาก Harborne, 1986

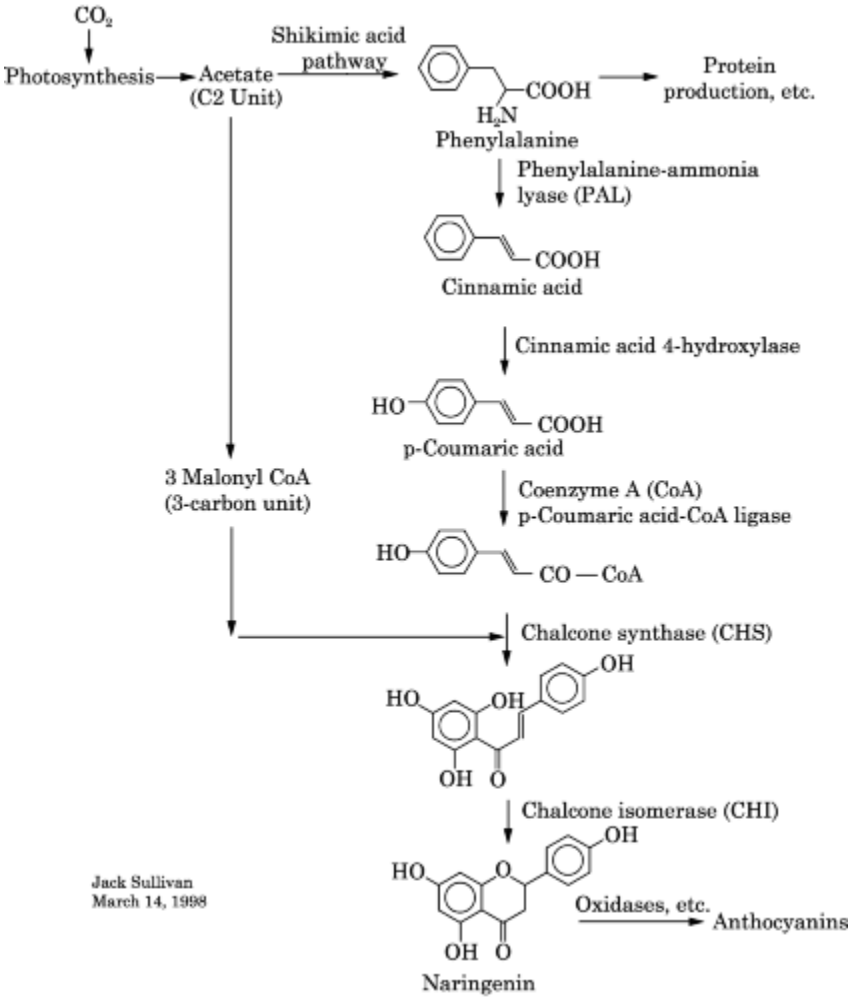
แอนโธไซยานินในธรรมชาติส่วนใหญ่พบในรูปไกลโคไซด์ (Glycoside) ซึ่งจับน้ำตาลด้วยพันธะไกลโคซิดิกหรือเรียกว่า แอนโธไซยานิดิน (Anthocyanidin) มี 6 กลุ่ม คือ ไซยานิดีน (Cyanidin), เดลฟินิดีน (Delphinidin), มัลวิดีน (Malvidin), พีลาโกนิดีน (Pelargonidin), พีโอนิดีน (Peonidin) และพีทูนิดีน (Petunidin) (Mazza and Maniati, 1993) แอนโธไซยานินมีค่าการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 510-540 นาโนเมตร ในเซลล์ของพืชหรือในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพืชนั้นจะไม่ค่อยเสถียร เมื่อโครงสร้างเปลี่ยนแปลงไปจะทำให้สีเปลี่ยนไปด้วย การเปลี่ยนแปลงของแอนโธไซยานินขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น แสง ออกซิเจน ความร้อน สภาพความเป็นกรด-ด่าง เอนไซม์เพอร์ออกไซด์ วิตามินซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ไอออนของโลหะ โมเลกุลของน้ำตาล ฟีนอล และสารสีอื่น ๆ เป็นต้น (จริงแท้, 2538) ซัลเฟอร์ไดออกไซด์เป็นสาเหตุทำให้สีของผลไม้ที่มีแอนโธไซยานินเป็นรงควัตถุซีดจางลงได้

เนื่องจากไบซัลไฟด์อิออนจะเข้าไปจับกับแอนโธไซยานิน (นุกุล, 2545) การใช้ประโยชน์ของแอนโธไซยานิน เช่น อุตสาหกรรมผลไม้กระป๋อง นมเปรี้ยว และไวน์แดง ซึ่งสีของแอนโธไซยานินจะคงสภาพได้ดีที่ความชื้นไม่เกินร้อยละ 3 และการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ที่มีความเป็นกรดจะให้สีคงทน ตลอดจนใช้เป็นสีผสมอาหารได้ (สันติและวรวรรณ, 2534)

แอนโธไซยานินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีโครงสร้างที่สามารถจับอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวของอนุมูลอิสระ ทำให้สามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและหยุดการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ และลดอัตราการเกิดโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระเป็นต้นเหตุ ในสมัยก่อนชาวกรีกได้นำผลไม้ที่มีสีม่วงมาพอกหน้าและร่างกายเพราะเชื่อว่าจะทำให้ผิวพรรณดูอ่อนกว่าวัย (Sullivan, 1998) การรับประทานบิลเบอรี่ (Bilberries) *(Vaccinium myrtillus)* ทำให้มองเห็นในที่มืดได้ดีขึ้น (Lila, 2004) การดื่มไวน์แดงที่มี Polyphenolic compounds ต่าง ๆ รวมทั้งแอนโธไซยานินสามารถลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ (Blando *et al*., 2004) การรับประทานผักและผลไม้ที่มีแอนโธไซยานินสามารถยับยั้งการลุกลามของเนื้องอก ป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง และลดระดับไขมันในเลือดได้ (Wrolstad, 2001) แอนโธไซยานินสามารถป้องกันโรคเบาหวานได้ Nair (2004) รายงานว่า การนำแอนโธไซยานินที่สกัดได้จากผลเชอร์รี่ไปทดลองกับเซลล์ตับอ่อนของหนูหลอดทดลอง พบว่าแอนโธไซยานินสามารถกระตุ้นให้เซลล์ตับอ่อนสร้างอินซูลิน (Insulin) เพิ่มขึ้น ซึ่งอินซูลินทำหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลในกระแสเลือด Duan *et al*. (2007) รายงานว่าแอนโธไซยานินที่สกัดได้จากเปลือกของลิ้นจี่ (*Lichi chinenesis* Sonn.) สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ Linoleic acid ในหลอดทดลองได้ และ Rottmann *et al*. (2002) รายงานว่าแอนโธไซยานินที่มีในน้ำสกัดของผลอาคช์ (Ach; *Aristotelia chilensis*) ผลแบล็คเบอรี่ (Blackberry; *Rubus* spp.) ผลครานเบอรี่ (Cranberry; *Vaccinium macrocapon*) ผลบลูเบอรี่ (Blueberry; *Vaccinium corymbosum*) และผลราสพ์เบอรี่ (Raspberry; *Rubus idaeus*) สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (Low density lipoprotein oxidation; LDL oxidation) ในหลอดทดลองได้ด้วย (จุฬาลักษณ์, 2551)

ในการสังเคราะห์แอนโธไซยานินนั้น มีวิถีการสังเคราะห์เริ่มจาก Acetate (C2 unit) ที่ได้จากการสังเคราะห์แสงเข้าสู่ Shikimic acid pathway แล้วเปลี่ยนเป็นสารตั้งต้นคือกรดอะมิโน Phenylalanine จากนั้น Phenylalanine จะถูกเปลี่ยนเป็น Cinnamic acid โดยมีเอนไซม์ Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) เร่งปฏิกิริยา Cinnamic acid จะถูกเปลี่ยนเป็น p-Coumaric acid จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น p-Coumaryl Co-A แล้วเปลี่ยนเป็น Chalcone (C15 unit) โดยมีเอนไซม์ Chalcone synthase (CHS) เร่งปฏิกิริยา จากนั้น Chalcone จะถูกเปลี่ยนเป็น Nariginine โดยมีเอนไซม์ Chalcone isomerase (CHI) เร่งปฏิกิริยา แล้ว Nariginine จะถูกเปลี่ยนเป็นแอนโธไซยานินต่อไป การสังเคราะห์แอนโธไซยานินอีกวิถีหนึ่งมาจาก การเปลี่ยน Acetate (C2 unit) ที่ได้จากการสังเคราะห์แสงไปเป็น Malonyl Co-A (C3 unit) 3 โมเลกุลแล้วเข้าร่วมกับ p-Coumaryl Co-A เพื่อเปลี่ยนเป็น Chalcone โดยมีเอนไซม์ CHS เร่งปฏิกิริยา

จากนั้น Chalcone จะถูกเปลี่ยนเป็น Nariginine โดยมีเอนไซม์ CHI เร่งปฏิกิริยา จากนั้น Nariginine จะถูกเปลี่ยนเป็นแอนโธไซยานินต่อไป (รูปที่ 2.6)



รูปที่ 2.6 วิถีการสังเคราะห์แอนโธไซยานิน
ที่มา : ดัดแปลงจาก Sullivan, (1998)

เสกสรร (2546) พบว่า มะเม่ามีสารให้สีแดงกลุ่มแอนโธไซยานิน 17.6 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร Arusa (2004) ศึกษาสารรงควัตถุแอนโธไซยานิน สารฟีนอล และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในผลไม้บลูฮันนี่ซักเกิล (Bluehoneysuckle) 10 พันธุ์ พบว่า มีปริมาณแอนโธไซยานิน 116-593 มิลลิกรัม/100 กรัม (น้ำหนักสด) Haruyo *et al*. (2001) ศึกษากิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระของแอนโธไซยานินที่สกัดได้จากข้าวกล่ำ (Purple black rice) พบว่า แอนโธไซยานินชนิด Cyanidin-3-glucoside เป็นตัวหลักที่มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นผลการทดสอบที่คล้ายคลึงกับในผลบลูเบอรี่

สารประกอบฟีนอล โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอลจะเกิดการรวมตัวของโมเลกุลน้ำตาลตั้งแต่ 1 โมเลกุลขึ้นไปกับหมู่ไฮดรอกซิล (OH-group) โดยน้ำตาลดังกล่าวอาจจะเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharides) น้ำตาลโมเลกุลคู่ (Disaccharides) หรือโอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharides) ก็ได้ แต่น้ำตาลชนิดที่พบมากที่สุดในโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลคือ กลูโคส (Glucose) ส่วนน้ำตาลชนิดอื่นที่พบ ได้แก่ กาแลคโทส (Galactose) แรมโนส (Rhamnose) ไซโรส (Xylose) อะราบิโนส (Arabinose) และอนุพันธ์ของน้ำตาลเหล่านี้ เช่น กรดกลูโคโรนิก (Glucoronic acid) กรดกาแลกทูโรนิก (Galacturonic acid) และสารอื่น ๆ เป็นต้น คุณสมบัติที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันของสารประกอบฟีนอลคือการเป็นสารต้านออกซิเดชัน และสารต้านการกลายพันธุ์ (Antimutagents) ซึ่งเกิดจากอนุมูลอิสระ (Free radicals) และการใช้สารประกอบฟีนอลในการป้องกันโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะโรคหัวใจขาดเลือด และมะเร็ง โดยสารประกอบฟีนอลจะทำหน้าที่จับกับอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่น ๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระจะได้อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลค่อนข้างมีเสถียรภาพ ดังนั้นจึงไม่ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไป ยิ่งไปกว่านั้นอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลบางชนิดยังคงสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้อีกด้วย ทำให้สามารถลดจำนวนอนุมูลอิสระลงถึง 2 เท่า การเปรียบเทียบคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลบริสุทธิ์ พบว่า คาเทชิน (Catechin) มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันมากที่สุด รองลงมาคือ ไมริเซอติน (Myricetin), อิพิคาเทชิน (Epicatechin) และรูทิน (Rutin) แต่ทั้ง 3 ตัวมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันใกล้เคียงกับ Gallic acid, Quercetin และ Cyanidin ตามลำดับ (Fennema, 1976) เสกสรร (2546) พบว่า มะเม่ามีสารประกอบกลุ่มฟีนอล 311 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร Arusa (2004) ศึกษาปริมาณสารฟีนอล และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในผลไม้บลูฮันนี่ซักเกิล (Bluehoneysuckle) 10 พันธุ์ พบว่า มีสารประกอบฟีนอลทั้งหมด 440-1142 มิลลิกรัม/100 กรัม (น้ำหนักสด)

กรดแกลลิค (Gallic acid) เป็นสารประกอบฟีนอลชนิดหนึ่งที่สำคัญ มีชื่อตามระบบ IUPAC คือ 3, 4, 5-Trihydroxybenzoic acid สูตรโมเลกุลมักมีน้ำรวมอยู่ด้วยเช่น $C_7H_6O_5H_2O$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 188.14 จุดหลอมเหลว 251 °ซ แหล่งข้อมูลบางแห่งระบุไว้ที่ 256-260 °ซ สามารถละลายได้ในอีเทอร์ มีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน เมื่อละลายน้ำจนถึงจุดอิ่มตัว (ที่อุณหภูมิ 20 °ซ) มีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 2-3 และมีความหนาแน่นประมาณ 500 กิโลกรัม/ลูกบาศก์เมตร เมื่อได้รับความร้อนเกิน 220 °ซ กรดแกลลิคจะสูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์จากโมเลกุล แล้วเปลี่ยนเป็นสารที่เรียกว่า Pyrogallol หรือ 1, 2, 3-Trihydroxybenzene ซึ่งเป็นสารที่ใช้ผลิตสีย้อมผ้าและใช้ในกระบวนการถ่ายรูป รวมถึงใช้ในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากมีคุณสมบัติดูดซับออกซิเจนได้ มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ของกรดแกลลิคมากมาย เช่น Acetylcholine esterase inhibitor บรรเทาอาการปวดคลายกล้ามเนื้อ กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ต่อต้านเชื้อ HIV, Adenovirus และอาการแพ้ นอกจากนี้ยังต่อต้านอาการ

หอบหืดโดยการไปขยายหลอดลม ต่อต้านหลอดลมอักเสบ และต่อต้านแบคทีเรีย โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถใช้ยับยั้งแบคทีเรียคือ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (MIC=1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และพบว่ากรดแกลลิคเป็นพิษกับเซลล์เนื้องอก แต่ไม่เป็นพิษกับเซลล์ปกติ สำหรับเซลล์เนื้องอกที่ไวต่อกรดแกลลิคสามารถสร้างสารต่อต้านกลไกการออกฤทธิ์ของกรดแกลลิคได้ กรดแกลลิคยังมีฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือด ลดความเป็นพิษของสารพิษต่อตับได้ ต่อต้านเชื้อเริม ต่อต้านฤทธิ์ของสารพวกไนโตรซามีนและต่อต้านอนุมูลอิสระ (แรงกว่า Quercitin 7 เท่า) มีคุณสมบัติทำลายหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางอย่างได้ โดยเฉพาะพวก *Staphylococci* ฆ่าศัตรูพืชบางชนิดได้ ต่อต้านฤทธิ์ของสารกระตุ้นให้เกิดเนื้องอก และมีฤทธิ์สมานแผลได้ (Kanai and Okano, 1998)

3.1 บทบาทสารต่อต้านอนุมูลอิสระในไวน์

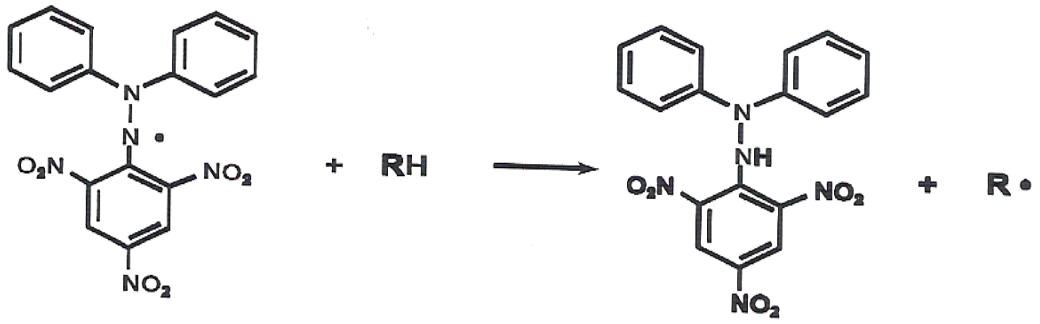
สารกลุ่มสารฟลาโวนอยด์ที่มีบทบาทในการเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ Hertog *et al*., (1993) พบว่าชาวฮอลแลนด์บริโภคสารฟลาโวนอยด์ (Dietary flavonoids) เฉลี่ย 23 มิลลิกรัม/วัน และชาวอเมริกันบริโภคเฉลี่ย 180-215 มิลลิกรัม/วัน (Kühnau, 1976) ค่าเหล่านี้จัดว่ามีปริมาณสูงกว่าการบริโภคสารฟลาโวนอยด์ชนิดอื่น ๆ เช่น ฟลาโวน (Flavone), ฟลาโวนอล (Flavonol) โดยการบริโภคผลเบอร์รี่ 100 กรัม จะให้สารแอนโธไซยานิน 500 มิลลิกรัม (Domenico *et al*., 2007) แหล่งที่พบสารแอนโธไซยานินสูง ได้แก่ บลูเบอรี่ 83-420 มิลลิกรัม/100 กรัม เชอร์รี่หวาน (Sweet cherry) 2-450 มิลลิกรัม/100 กรัม ราสพ์เบอรี่ 10-60 มิลลิกรัม/100 กรัม สตรอเบอรี่ แบล็คเบอรี่ 115 มิลลิกรัม/100 กรัม องุ่นสำหรับทำไวน์ 30-750 มิลลิกรัม/100 กรัม พอร์ทไวน์แดง (Port red wine) 14-110 มิลลิกรัม/100 กรัม และไวน์แดง 24-35 มิลลิกรัม/100 กรัมของน้ำหนักสด (Bernhard Watzi *et al*., 2002) และพบในรูปของสารประกอบโพลีฟีนอล 1800-3000 มิลลิกรัม/ลิตร (Lugasi *et al*., 1997) การดื่มไวน์ในระดับปานกลางจะสามารถลดความเสี่ยงจากการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน โดยป้องกันการเกิดออกซิเดชันของ LDL ทำให้ไม่เกิดสภาวะผนังเส้นเลือดแดงจับตัวแคบลง และแข็งขึ้นจากการที่มีหินปูนหรือไขมันจับเกาะ (Kähkönen *et al*., 2003; Kühnau, 1976; Lugasi *et.al*., 1997)

3.2 การตรวจหาฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระ

ปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก ได้มีการนำสารต้านอนุมูลอิสระมาใช้ในการส่งเสริมสุขภาพ ป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ เพราะเชื่อว่าสามารถลดปฏิกิริยาออกซิเดชันและต้านการเกิดอนุมูลอิสระได้ (Molyneux, 2004) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสำคัญ เพื่อใช้บอกประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ หากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่าสูงแสดงว่ามีประสิทธิภาพในการต้านการเกิดอนุมูลอิสระสูงด้วยเช่นกัน วิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

มีหลายวิธี เช่น 2, 2-Diphennyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity และ 2, 2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) (ABTS) Free radical declorization assay เป็นต้น

การวัดความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging activity นั้นอาศัยหลักการคือสารที่มีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันจะทำปฏิกิริยากับ 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical ทำให้สีม่วงของ DPPH จางลง ดังนั้นในการวิเคราะห์จึงเตรียมสารละลายสกัดที่ต้องการวิเคราะห์ให้มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ แล้วทำปฏิกิริยากับสาร DPPH radical (รูปที่ 2.7) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 520 nm หรือความยาวคลื่นที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้สูงสุด นำค่าไปคำนวณหาร้อยละของสารต้านอนุมูลอิสระ (% Radical scavenger) เพื่อสร้างกราฟ แล้วนำไปหาสมการจากเส้นแนวโน้ม จึงคำนวณค่าร้อยละ Radical scavenger ที่ 50 หรือค่า IC50 (50 % Inhibit concentration) เพื่อทราบความเข้มข้นของสารที่มีอยู่ โดยสารละลายที่มีปริมาณสารต้านออกซิเดชันสูงแสดงว่ามีค่า IC50 ต่ำ

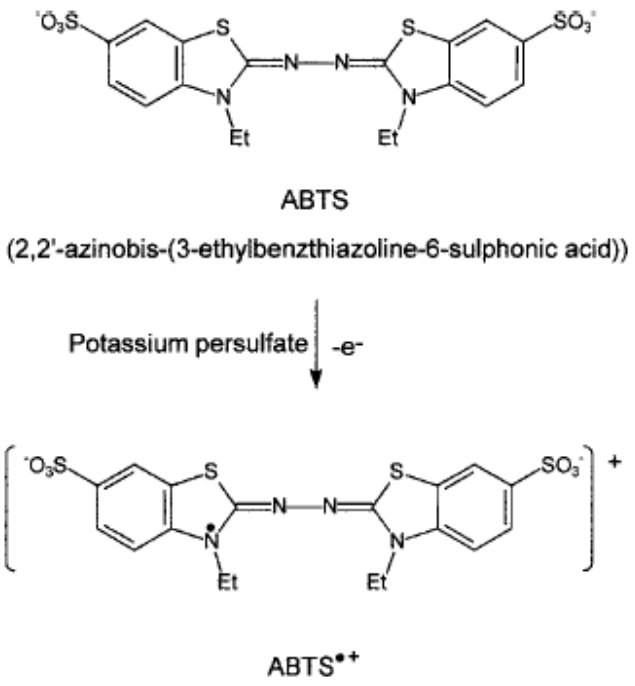


DPPH (สีม่วง) DPPH:H (ไม่มีสี)

Diphenylpicrylhydrazyl (free radical) Diphenylpicrylhydrazine (non-radical)

รูปที่ 2.7 สูตรโครงสร้างของ 2, 2 - Diphenyl -1 - picrylhydrazyl (DPPH)
ที่มา : Prakash, 2001

ส่วนวิธี ABTS เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีหลักการคล้ายกับวิธี DPPH คือ สร้างอนุมูลอิสระที่มีสีขึ้น โดยสร้างอนุมูลอิสระจากการทำปฏิกิริยาของสารละลาย ABTS กับ Oxidizing agent คือ สารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate) เมื่อ ABTS ถูกออกซิไดซ์ ด้วย Oxidizing agent จะเกิด ABTS free radical (ABTS•+) สารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการนำมาทดสอบจะขจัด ABTS•+ ที่เกิดขึ้น (รูปที่ 2.8) แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm (เฉลิมพงษ์และไชยวัฒน์, 2547) โดยหากค่าการดูดกลืนแสงลดลงมากหรือสีของสารละลายจางลงมากจะแสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี (อนุพงษ์และคณะ, 2549)



รูปที่ 2.8 สูตรโครงสร้างของ ABTS ที่อยู่ในรูปไม่เป็นอนุมูลอิสระ (A.) และเป็นอนุมูลอิสระ (B.)
ที่มา : Haruyo *et at*. (2001)

ราสพ์เบอร์รี่ มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (ใช้ IC50 เป็นดัชนีวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) จากการวัดด้วยวิธี DPPH เท่ากับ 5.10 มิลลิโมล/100 กรัมของน้ำหนักสด (Miller *et al.*, 2000) วิธี ABTS เท่ากับ 1.85 มิลลิโมล/100 กรัมของน้ำหนักสด (Proteggente *et al.*, 2002) แอนโธไซยานินที่สกัดได้จากเชอร์รี่มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากการวัดด้วยวิธี ABTS เท่ากับ 2.7 มิลลิโมลของ Trolox /100 กรัมของน้ำหนักสด (Blando *et al.*, 2004) Sampantachit and Supasiri (2004) ได้ศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของผักและผลไม้ไทย 4 ชนิด โดยใช้สารสกัดหยาบที่ใช้เมทานอลเป็นตัวสกัดของมะเขือม่วง ดอกแคแดง ใบแคแดง และแก้วมังกรขาว จากการวิจัยพบว่า สารสกัดหยาบจากใบแคแดงมีสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด เมื่อใช้ DPPH เป็นสารอนุมูลอิสระ โดยมีค่า IC50 ของการยับยั้ง DPPH เท่ากับ 750 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม และจากการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลในพืชทั้ง 4 ชนิด พบว่า ใบแคแดงมีสารประกอบฟีนอลมากที่สุด คือ 125.2 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม

xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx