บทที่ 1

คุณสมบัติทางกายภาพ เคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไวน์ผลไม้

ไวน์ผลไม้

ไวน์ผลไม้หมายถึงสุราแช่ชนิดหนึ่ง ซึ่งทำจากการนำวัตถุดิบจำพวกผลไม้หรือน้ำผลไม้มาผ่านกรรมวิธีการผลิตไวน์ผลไม้ มีแรงแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15 ดีกรี/ร้อยละโดยปริมาตร หากมีการผสมสุรากลั่นต้องมีแรงแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15 ดีกรี/ร้อยละโดยปริมาตร สุราแช่หมายถึง สุราที่ไม่ได้กลั่นและให้หมายรวมถึงสุราแช่ที่ได้ผสมกับสุรากลั่นแล้ว แต่ยังมีแรงแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15 ดีกรี/ร้อยละโดยปริมาตร กรรมวิธีการผลิตไวน์ผลไม้หมายถึง การหมักผลไม้และ/หรือน้ำผลไม้ด้วยยีสต์เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ซึ่งหมักไว้ระยะหนึ่งจะเป็นสุราแช่ หากมีการบ่มหมักต่อระยะหนึ่งจะได้รสชาติที่นุ่มละมุน ในการผลิตอาจมีการเติมน้ำตาลทรายขาวเพื่อเพิ่มความหวานให้เหมาะกับการหมักสุราแช่ เพื่อให้ได้แรงแอลกอฮอล์ตามต้องการ (มผช.๒/๒๕๔๖ ไวน์ผลไม้)

คุณลักษณะที่ต้องการของไวน์ผลไม้

1. คุณลักษณะทางกายภาพ

1. ความใส : เป็นไปตามลักษณะของไวน์ผลไม้
2. สี : มีสีเป็นไปตามธรรมชาติของวัตถุดิบที่ใช้ทำ และเป็นไปตามที่ระบุไว้ที่ฉลาก
3. กลิ่น : ต้องมีกลิ่นหอมของผลไม้หรือน้ำผลไม้ที่นำมาผลิตไวน์ผลไม้ที่ระบุไว้ที่ฉลาก และไม่มีกลิ่นน้ำส้มสายชู หรือกลิ่นอื่น ๆ ที่ไม่พึงประสงค์ปรากฏเด่นชัด
4. รสชาติ : มีความเป็นกรด หวาน ฝาด เฝื่อน และกลมกล่อม ตามธรรมชาติของวัตถุดิบที่ใช้ทำ
5. คุณภาพโดยรวมของไวน์ผลไม้ : มีความใส สี กลิ่น และรสชาติเป็นที่ยอมรับ
6. สิ่งแปลกปลอม : ต้องไม่ใช่สิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่วัตถุดิบที่ใช้ทำ
7. ความเสถียร : ต้องไม่ปรากฏฟองในภาชนะบรรจุเนื่องมากจากการหมักซ้ำ

2. คุณลักษณะทางเคมี

1. ความแรงแอลกอฮอล์ต้องไม่เกิน 15 ดีกรี/ร้อยละโดยปริมาตร

แอลกอฮอล์ในไวน์เกิดจากยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลที่อยู่ในผลไม้และน้ำตาลที่เติมลงไปให้เปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ปริมาณน้ำตาล ความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ของยีสต์ Harrison and Graham, (1970) พบว่าไวน์ยีสต์สามารถสร้างแอลกอฮอล์ได้ถึง 16 ดีกรี/ร้อยละโดยปริมาตร นอกจากนี้ยังขึ้นกับสภาวะที่ใช้และระยะเวลาในการหมัก เป็นต้น

2. เมทธิลแอลกอฮอล์ต้องไม่เกิน 420 มก./ลิตร

เมทธานอลไม่ใช่ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักไวน์โดยตรงแต่เกิดจากการ hydrolysis ของ methylated pectin ที่อยู่ในผลไม้โดยเอนไซม์ pectin methylesterase เพคตินเป็นพอลิเมอร์ของ galacturonic acid ต่อกันด้วย alpha-1,4-glycosidic ในธรรมชาติของเพคตินหมู่ carboxylic acid จะถูก esterify ด้วยเมทธานอล (Reed, 1966) ปริมาณของเมทธานอลในไวน์ขาวจากองุ่นอยู่ในช่วง 40-120 มก./ลิตร ส่วนไวน์แดงจากองุ่นสูงกว่าอยู่ในช่วง 120-250 มก./ลิตร และพบว่าไวน์องุ่นที่ติดเชื้อรา *Botrytis cineria* จะมีระดับของเมทธานอลสูงถึง 364 มก./ลิตร (Sponholz, 1988) อย่างไรก็ตามเมทธานอลไม่มีผลกระทบต่อกลิ่นรสของไวน์มากนักแต่การเกิด methyl esters จะมีผลกระทบมากกว่า

3. ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) ทั้งหมดต้องไม่เกิน 300 มก./ลิตร

ซัลเฟอร์ไดออกไซด์มีผลต่อกลิ่นของไวน์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่สูงจะทำให้เกิดกลิ่นที่รุนแรงขึ้นจมูก และมีผลต่อคุณภาพของไวน์เมื่อเก็บไว้เป็นเวลานานซัลเฟอร์ไดออกไซด์นิยมใช้มากในอุตสาหกรรมการผลิตไวน์และอุตสาหกรรมอาหารเพื่อใช้เป็นสารต้านออกซิเดชันและเป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ แต่ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่มากเกินไปจะเป็นอันตรายกับสุขภาพได้ พบว่าในน้ำผลไม้มีสารที่ถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย เช่น สารพวก polyphenols ดังนั้นจึงมีการใส่ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ลงไปเพื่อแข่งกับออกซิเจนในการเป็น reducing agent ซึ่งเป็นการช่วยลดการเกิด

ออกซิเดชันจากออกซิเจนได้ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ช่วยลดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลของน้ำผลไม้ (White and Ough, 1973)

4. **ทองแดงต้องไม่เกิน 5 มิลลิกรัม/ลิตร**

ทองแดงในปริมาณที่น้อยมาก ๆ มีความจำเป็นสำหรับเป็นสารคะตาลิสในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อจุลินทรีย์ ปริมาณทองแดงที่กำหนดในไวน์ของประเทศสหรัฐอเมริกาคือปริมาณตั้งแต่น้อยกว่า 0.1-0.3 มก./ลิตร แต่ถ้าปริมาณที่สูงขึ้น ทองแดงจะเป็นคะตาลีสการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารในกลุ่มฟีนอลในไวน์ ทองแดงและสารประกอบของทองแดงจะมีฤทธิ์มากกว่าเหล็กและสารประกอบของเหล็ก ทองแดงที่ความเข้มข้นสูงกว่า 1 มก./ลิตร อาจจะสัมผัสได้ด้วยความรู้สึก (Amerine *et al*, 1972) ทองแดงเป็นสารโลหะหนักที่จัดเป็นสารอันตรายเช่นเดียวกับ แคดเมี่ยมและปรอท ที่ความเข้มข้นเกินกว่า 9 มก./ลิตร ทองแดงจะมีพิษต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมซึ่งจะยับยั้งหรือทำให้การหมักแอลกอฮอล์เกิดขึ้นได้ช้า (Suomaloainen and Ura, 1971) ปริมาณของทองแดงอาจจะเกิดจากภาชนะบรรจุที่มีทองแดง เช่นทองเหลือง

ทองแดงทำให้เกิดความไม่คงตัวของไวน์

ในไวน์ที่บรรจุในขวดอาจจะเกิดความไม่คงตัว คือการเกิดสีขาวขุ่นในไวน์ขาวต่อมาจะเกิดตะกอนสีแดงน้ำตาล ซึ่งการเกิดการตกตะกอน (casse) จะเกิดในสภาวะที่มี strong reducing condition กับไวน์ที่อยู่ในขวด เมื่อทำให้เกิด reoxidation โดยการให้สัมผัสกับอากาศ หรือใส่ oxidizing agent ที่แรงลงไป เช่น hydrogen peroxide จะทำให้ตะกอนหายไป โปรตีนในไวน์จะมีส่วนสำคัญในการทำให้เกิดการขุ่น การกำจัดโปรตีนหรือการทำให้ปริมาณโปรตีนลดลงจะช่วยลด copper casse เป็นที่ทราบกันดีว่าความร้อนและแสงเป็นตัวเร่งการเกิด casse Peterson *et al*, (1958) พบว่าในสภาวะที่มีแสงจะเกิดสารประกอบของทองแดง เนื่องจาก sulfite reduction แล้วตกตะกอนเป็น copper (II) sulfide ในสภาวะที่มีดโปรตีนจะสลายตัวเนื่องจาก sulfite interaction สารประกอบระหว่างทองแดงกับโปรตีนทำให้เกิด sulfate จากการเกิด oxidation การเกิด copper casse เกิดได้ในสภาวะที่ไม่มีเหล็กหรือมีเหล็กปริมาณน้อยในไวน์ ตารางที่ 1-1 แสดงถึงสภาวะที่เหมาะและสภาวะที่ยับยั้งการเกิด casse ในไวน์

ตารางที่ 1-1 สภาวะที่เหมาะกับการเกิด casse และสภาวะที่ยับยั้งการเกิด casse ในไวน์

Condition necessary for copper casse formation	Preventive measures
Strong reducing conditions (as seen in bottled wine)	Maintain copper levels at less than 0.3 mg/L
Iron absent or present in very low concentrations, protein present	Cold-stabilizer and bentonite fine to reduce protein in white wines
Light and/or heat, which may hasten formation	Limit SO_2 additions

ที่มา : Zoecklein *et al.*, 1995, หน้า 202

มีกรรมวิธีหลายอย่างในการกำจัดหรือลดปริมาณของทองแดงและเหล็กในไวน์ เช่น การใช้ potassium ferrocyanide (blue finding) เนื่องจากยีสต์สามารถลดโลหะหนักได้อย่างมีประสิทธิภาพ อาจจะใช้วิธีนี้เดี่ยว ๆ หรือใช้วิธีนี้ร่วมกับ caseinate หลังจากกระบวนการหมัก

5. **เหล็กต้องไม่เกิน 15 มก./ลิตร**

เหล็กในประมาณที่น้อยและเหมาะสม จะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึม โดยทำหน้าที่เป็นตัวเร่งเอนไซม์ ช่วยทำให้เอนไซม์คงตัว และเป็นส่วนประกอบของโปรตีน แต่ถ้าปริมาณมากเกินไปเหล็กจะมีบทบาทที่ต่างไปคือ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ redox system ทำให้เกิดออกซิเดชันของกลิ่น มีผลกระทบต่อรสชาติของไวน์ และทำปฏิกิริยากับแทนนินและฟอสเฟต ทำให้เกิดความไม่คงตัวที่เรียกว่า casse โดยจะเกิดเป็นสีขาวขุ่นแล้วตกตะกอน casse ที่เกิดจากเหล็กมี 2 ชนิด คือ white casse (ferric phosphate) และ blue casse (ferric tannate) ซึ่งการเกิด blue casse จะพบได้บ่อย สำหรับ ferric tannate แต่อาจจะพบในไวน์ขาวหลังจากการเติมกรดแทนนินลงไป

Ferric phosphate casse

การเกิด white casse มีปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ ปริมาณเหล็ก pH redox potential ประมาณฟอสเฟต และลักษณะเฉพาะตัวและปริมาณของกรดในไวน์นั้น ๆ ตารางที่ 1-2 แสดงถึงปัจจัยที่สนับสนุนให้เกิด white casse และ สภาวะที่ขัดขวางการเกิด white casse

ตารางที่ 1-2 ปัจจัยที่สนับสนุนให้เกิด white casse และ สภาวะที่ขัดขวางการเกิด ferric phosphate casse ในไวน์

Condition necessary for casse formation	Conditions impeding or inhibiting casse formation
Redox potential that favors the presence of Fe III over Fe II	Iron levels of less than 5 mg/L
pH 2.9-3.6	Clarification with bentonite and cold stabilization
Iron concentration is excess of 7 mg/L	Citric acid additions 12-24 g/hL (1-2 lb/1,000 gal)

ที่มา : Zoecklein *et al.*, 1995, หน้า 203

ในกรณีขององุ่นจะพบปริมาณของเหล็กต่ำถึงแม้ว่าจะปลูกในที่ดินที่มีปริมาณเหล็กสูง ถ้าไม่มีการปนเปื้อนด้วยเหล็ก ปริมาณเหล็กจะอยู่ในช่วง 1-5 มก./ลิตร (Amerine and Ough, 1974) เหล็กที่ปนเปื้อนในไวน์ส่วนใหญ่มาจากภาชนะที่เป็นอัลลอยด์ที่มีเหล็กผสมอยู่ โรงงานผลิตไวน์สมัยใหม่หลีกเลี่ยงปัญญานี้โดยการใช้เครื่องมือที่ทำจากเหล็กกล้าไร้สนิม

6. ตะกั่ว ต้องไม่เกิน 0.2 มก./ลิตร

ร่างกายอาจจะได้รับตะกั่วที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารและน้ำ พิษจากตะกั่วมักจะเป็นเรื้อรังแทนที่จะเป็นพิษแบบเฉียบพลัน ในปี 1991 the U.S. Food and Drug Administration ได้กำหนดปริมาณของตะกั่วในไวน์ คือ 300 ppb ตามที่กำหนดไว้ (ในเวลานั้นแคนาดา เสนอ 200 ppb, OIV (International Organization of Vine and Wine) เสนอ 250 ppb ในการประชุมในปี 1993) ในปี 1994 California ได้กำหนดว่าไวน์ที่จะขายในรัฐนี้ได้ต้องมีตะกั่ว $\leq$ 150 ppb Henick-

Kling and Stoewsand (1993) และ Ough, (1993) รายงานเกี่ยวกับตะกั่วที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับไวน์ดังนี้

1. **แหล่งที่มาของตะกั่ว**

ตะกั่วมาจากดินที่ปลูกพืชที่มีสารตะกั่ว Henick-Kling and Stoewsand (1993) รายงานว่าตะกั่วในดินของสวนองุ่นของประเทศเยอรมัน อยู่ในช่วง 30-1000 ppb ดินในสวนองุ่นของประเทศฝรั่งเศสจะสูงกว่าคืออยู่ในช่วง 2.8-74 ppm (ค่าเฉลี่ย 14.1 ppm) โดยภาพรวมตะกั่วในดินในสวนองุ่นในประเทศฝรั่งเศสและเยอรมัน อยู่ในช่วง 10-570 ppb และพบตะกั่วสูง 450-650 ppb ในองุ่นที่ปลูกบริเวณริมถนน ทั้งนี้เนื่องจากผลกระทบจากการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงที่ผสมสารตะกั่วที่ใช้กันมากในยุโรปก่อนที่จะหันมาใช้น้ำมันเชื้อเพลิงที่ไร้สารตะกั่ว

2. Wine lees

ยีสต์และกระบวนการทำไวน์ให้ใส (fining) จะลดปริมาณตะกั่วในไวน์ได้ 50-90% ในระหว่างการหมัก ไฮโดรเจนซัลไฟด์จะทำปฏิกิริยากับตะกั่ว และจะถูกดูดซับด้วยยีสต์ เมื่อกำจัดยีสต์ออกไปจะกำจัดตะกั่วไปด้วย ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณตะกั่วที่พบในยีสต์ที่กำจัดทิ้งไป (Ziegler, 1990)

3. **ข้อต่อทองเหลือง**

ทองเหลืองเป็นแหล่งของตะกั่วที่สำคัญในไวน์ Kaufmann (1992) รายงานว่าเมื่อไวน์ไหลผ่านวาล์วทองเหลืองที่มีตะกั่วเป็นส่วนประกอบของสารที่ใช้เชื่อมข้อต่อด้วยอัตราเร็ว 4.8 ลิตร/นาที จะทำให้ตะกั่วเพิ่มขึ้น 25 ppb

4. **สารที่ทำไวน์ให้บริสุทธิ์**

ผงถ่านคาร์บอนด์ที่ใช้ในการทำไวน์ให้ไวน์มีสีและกลิ่นดีขึ้นพบว่ามีตะกั่วปนเปื้อนอยู่ด้วย (Enkelmann, 1989) พบว่าปริมาณของตะกั่วในผงถ่านอยู่ในช่วง 37-39 มก./กิโลกรัม อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ถ่านที่มีปริมาณตะกั่วสูงที่สุดไปใช้กับไวน์พบว่าไวน์มีตะกั่วเพิ่มขึ้นเพียง 18.3 ppb และยังพบว่า bentonite (ซึ่งได้มาจากดินซึ่งอาจจะมีการปนเปื้อนของตะกั่ว) และวัสดุที่ใช้ในการกรองมีผลต่อการเพิ่มของตะกั่วในไวน์น้อยมาก ไวน์ที่สัมผัสกับวัสดุเหล่านี้มีตะกั่วเพิ่มขึ้นน้อยกว่า 1.5 ppb

5. ขวดและแคปซูลที่มีตะกั่วเป็นส่วนผสม

ปกติในกระบวนการผลิตขวดใส่ไวน์ไม่มีตะกั่วมาเกี่ยวข้อง แต่อาจจะมีตะกั่วอยู่บ้างในวัตถุดิบที่ใช้ทำขวด แต่แหล่งของตะกั่วที่สำคัญคือแคปซูลที่ใช้หุ้มปากขวดไวน์ที่มีตะกั่วเป็นส่วนประกอบทำให้เกิดการปนเปื้อนของตะกั่วในไวน์ได้ จากการทดลองของ U.S. BATF (Higgins, 1991) พบว่าเมื่อนำไวน์ที่ปิดด้วยแคปซูลฟลอยด์ที่มีตะกั่วเป็นส่วนผสม เมื่อเอาแคปซูลออกแล้วดูดไวน์ออกมา เทียบกับการเทไวน์ออกจากขวดโดยไม่เช็ดปากขวดพบว่าไวน์ที่รินออกจากขวดมีปริมาณปนเปื้อนของตะกั่วสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ แต่ถ้าเช็ดปากขวดก่อนการรินไวน์พบว่าสามารถป้องกันการปนเปื้อนตะกั่วได้ (Edwards and Amerine, 1977) และตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม ค.ศ.1992 รัฐแคลิฟอร์เนียได้ห้ามการใช้แคปซูลที่มีส่วนผสมของตะกั่วมาปิดขวดไวน์

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไวน์

ได้มีการศึกษาประโยชน์ของไวน์ต่อสุขภาพในด้านต่าง ๆ และที่ได้รับความความสนใจอย่างมากคือฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของไวน์ ซึ่งมีผลยืนยันจากผลการทดลองในกายและนอกกาย (Vinson *et al.*, 2001, Minussi *et al.*, 2003) เป็นที่ทราบกันว่าการเกิดออกซิเดชันในร่างกายเป็นสาเหตุอย่างหนึ่งที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง และโรคหลอดเลือดหัวใจ ในระหว่างกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกายจะเกิด reactive oxygen species หรืออนุมูลอิสระ (free radical) ขึ้น อนุมูลอิสระคือโมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเลคตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอกและมีอายุสั้นมาก ประมาณ 10^{-3} ถึง 10^{-10} วินาที จึงจัดเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อปฏิกิริยาเคมี โดยสามารถตรวจวัดได้ด้วย Electron Spin Resonace (ESR) โมเลกุลหรือไอออนชนิดนี้เป็นตัวก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ หรือ Reactive Oxygen Species (ROS) มีดังนี้

Superoxide anion radical	$O^{\bullet}$
Hydroxyl radical	$HO^{\bullet}$
Hydrogen peroxide	H_2O_2
Ozone	O_3
Hydrogen radical	$H^{\bullet}$
Methyl radical	$CH^{\bullet}_3$

นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังเกิดจากปัจจัยอื่น เช่น การติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส เกิดจากการอักเสบ เช่น autoimmune disease รังสี สิ่งแวดล้อมเป็นพิษ การออกกำลังกายที่หักโหม อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนี้จะทำให้เกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น การเกิดออกซิเดชัน ของ DNA โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเกิดการทำลายของกลุ่มโมเลกุลที่มีพันธะ S-H และเยื่อหุ้มเซลล์ ก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์ และการทำลายเซลล์ซึ่งเป็นสาเหตุของการแก่ (aging) และโรคร้ายแรงต่าง ๆ เช่น เส้นเลือดตีบ autoimmune disease และโรคมะเร็งเป็นต้น ร่างกายมีกระบวนการป้องกันอันตรายจากสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นคือระบบแอนติออกซิเดน ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ หรือโมเลกุลของสารบางชนิด อย่างไรก็ตามร่างกายก็มีกลไกที่จะทำลายอนุมูลอิสระโดยอาศัยเอนไซม์หรือสารอื่นที่ไม่ใช่เอนไซม์ ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน สารต้านออกซิเดชันที่เป็นเอนไซม์ในร่างกายได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase สารต้านออกซิเดชันที่พบในร่างกายที่ไม่จัดเป็นเอนไซม์ได้แก่ glutathione, lipoic acid, ceruloplasmin, albumin, transferrin, haptoglobin, hemopexin, uric acid, billirubin, cysteine นอกจากนี้ยังมีสารต้านออกซิเดชันอื่น ๆ ซึ่งบางชนิดอาจจะพบในอาหาร เช่น tocopherols, carotenoids, ascorbic acids, steroids, ubiquinones, thiols, inosine, taurine, pyruvate, gallic acid, flavonoids และสารอื่นที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แก่ Trolox, butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), nitroblue tetrazolium (NBT), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เป็นต้น (Que *et al*., 2006) ซึ่งสารต้านออกซิเดชันเหล่านี้จะทำลายอนุมูลอิสระโดยการจับกับอนุมูลอิสระ ลดการเกิดปฏิกิริยา ณ จุดตั้งต้น หรือยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่