นิพนธ์ต้นฉบับ

ลักษณะของน้ำหมักชีวภาพจากพืชในภาคใต้ของประเทศไทย

ดวงพร คันธโชติ [1] วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล[2] และ ณรงค์ฤทธิ์ อัศวเรืองพิภพ[3]

Abstract

Kantachote, D.[1], Charernjiratrakul, W.[1] and Asavaroungpipop, N.[2]

Characteristics of fermented plant beverages in southern Thailand

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(3) : 601-615

The characteristics of fermented plant beverages based on a sensory test, physico-chemical properties, enumeration of microorganisms present and their microbiological quality were investigated. A total of 19 samples of beverages collected from various sources in southern Thailand were examined. It was found that odor, color and clarity and the presence of Cu, Zn, K and Na were mainly dependent on the types of plant used and the additive of sugar or honey. Therefore, the appearance of the beverages was light brown and dark brown. An ester smell was occasionally detected. The fermented plant beverages had sour flavor that developed during fermentation and a little sweetness from residual sugar. The taste was related to the amounts of organic acid and sugar as measured in the ranges of 0.98-7.13% (pH 2.63-3.72) and 0.21-4.20%, respectively. The levels of alcohols measured as ethanol were between 0.03-3.32% and methanol in a range

---

[1]Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand. [2]Department of Statistics, Faculty of Commerce and Accountancy, Chulalongkorn University, 10330 Bangkok, Thailand.

---

[1]Ph.D.(Microbiology), รองศาสตราจารย์ [2]วท.ม.(จุลชีววิทยา), รองศาสตราจารย์, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110 [3]พบ.ม., ภาควิชาสถิติ คณะพาณิชยศาสตร์และการบัญชี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พญาไท กรุงเทพฯ 10330

Corresponding e-mail: duangporn.k@.psu.ac.th

รับต้นฉบับ 20 กรกฎาคม 2547 รับลงพิมพ์ 28 กันยายน 2547

of 0.019-0.084%. Methanol production was dependent on both the fermentation process and the plant used. Total coliforms and *Escherichia coli* were not detected in any sample, whereas other microbes were detected in some samples as were total bacterial count, lactic acid bacteria, yeast and mold in amounts that differed depending on the fermentation time and also the level of sanitation of the production process.

Key words : fermented plant beverages, fermentation, microbes, organic acids, methanol

บทคัดย่อ

ดวงพร คันธโชติ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และ ณรงค์ฤทธิ์ อัศวเรืองพิภพ

ลักษณะของน้ำหมักชีวภาพจากพืชในภาคใต้ของประเทศไทย

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(3) : 601-615

การกำหนดลักษณะน้ำหมักชีวภาพจากพืชโดยอาศัยการตรวจสอบทางประสาทสัมผัสคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพ จุลินทรีย์ที่อาจยังคงหลงเหลืออยู่ และคุณภาพทางจุลชีววิทยา โดยได้เก็บตัวอย่างน้ำหมักจากพืชชนิดต่าง ๆ มา 19 ชนิด จากแหล่งผลิตในภาคใต้ของประเทศมาตรวจสอบพบว่าคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสในแง่ของกลิ่น สี และความใส รวมทั้งแร่ธาตุ (ทองแดง สังกะสี โพแทสเซียม และโซเดียม) ขึ้นกับประเภทของพืชที่ใช้รวมถึงน้ำตาลหรือน้ำผึ้งเป็นหลัก ส่งผลให้น้ำหมักชีวภาพมีสีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม รวมถึงกลิ่นของสารระเหย เช่น เอสเตอร์ที่เกิดจากการหมัก สำหรับรสชาติของน้ำหมักมาจากการหมักเป็นหลักคือมีรสเปรี้ยวนำ หวานเล็กน้อยจากน้ำตาลที่เหลือ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดและน้ำตาล ซึ่งอยู่ในช่วง 0.98-7.13% (pH 2.63-3.72) และ 0.21-4.20% ตามลำดับ และปริมาณแอลกอฮอล์ในรูปเอทานอลอยู่ระหว่าง 0.03-3.32% ขณะที่เมทานอลอยู่ในช่วง 0.019-0.084% โดยเมทานอลที่เกิดขึ้นเป็นผลร่วมระหว่างกระบวนการหมัก และประเภทของพืชที่ใช้ ทุกตัวอย่างตรวจไม่พบแบคทีเรียโคลิฟอร์ม และ *Escherichia coli* แต่สำหรับแบคทีเรียทั้งหมด แลกติกแอสิดแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ยังตรวจพบในบางตัวอย่างซึ่งมีปริมาณแตกต่างกันไปโดยขึ้นกับอายุการหมัก และสุขาภิบาลของการผลิต

น้ำหมักชีวภาพจากพืช (เรียกสั้นๆ ว่า น้ำหมักชีวภาพ) อาจมีชื่อเรียกได้ต่างๆ กันไป เช่น น้ำจุลินทรีย์ หรือน้ำเอนไซม์จากผลไม้ (enzyme ionic plasma) และจุลินทรีย์อีเอ็ม (EM: Effective Microorganisms) ซึ่งเป็นที่รู้จักกันมากขึ้นผ่านสื่อต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นวิทยุ ทีวี และสิ่งตีพิมพ์ โดยที่การผลิตน้ำหมักชีวภาพมักใช้จุลินทรีย์อีเอ็มเป็นหัวเชื้อในกรณีที่ใช้เพื่อการเกษตร ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้มีการผลิตและจำหน่ายเป็นการค้า บ้างก็ใช้จุลินทรีย์ท้องถิ่น (ที่ได้จากน้ำหมักเก่า) ขณะที่ผลิตภัณฑ์น้ำหมักชีวภาพมีทั้งที่ผลิตเป็นการค้าโดยชุมชน และผลิตใช้เองตามครัวเรือน ประโยชน์ของน้ำหมักชีวภาพมี 3 ด้านหลักๆ ได้แก่ ทางการเกษตรเพื่อทดแทนปุ๋ยเคมี หรือทดแทนยาฆ่าแมลง ทางด้านสิ่งแวดล้อมเป็นการบำบัดน้ำเสียกำจัดกลิ่นเหม็นของมูลสัตว์ และที่สำคัญยังใช้เป็นเครื่องดื่มเสริมสุขภาพ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ใช้เป็นเครื่องดื่มนั้นมีกรรมวิธีการผลิตที่ต้องพิถีพิถัน ป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นที่ถือว่าอาจก่อให้เกิดโทษ โดยให้เฉพาะจุลินทรีย์หัวเชื้อเท่านั้นมีบทบาท แต่อย่างไรก็ตามการผลิตน้ำหมักชีวภาพมักมีปัญหาอยู่เสมอกับการปนเปื้อนของยีสต์ และบางครั้งด้วยเชื้อรา และยังมีสารพวกเมทานอลปนเปื้อนอยู่ด้วย ซึ่งส่งผลให้ชุมชนผู้ผลิตไม่สามารถขอใบทะเบียนอาหารและยาสำหรับน้ำหมักชีวภาพในรูปของเครื่องดื่มได้ แม้ว่าพอมีข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาโดยเทียบกับมาตรฐานของเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทว่าต้องมีโคลิฟอร์มทั้งหมด (Total coliforms) น้อยกว่า 2.2 ต่อ 100 มล โดยวิธี MPN และแบคทีเรียอี โคไล (*Escherichia coli*) ต้องไม่พบ ไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค และไม่มียีสต์และรา ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 214 (2543) และ 234 (2544) และถ้าพิจารณาเป็นเครื่องดื่มทั่วไปซึ่งกำหนดให้มียีสต์ได้ไม่เกิน 100 และเชื้อราไม่เกิน

10 ต่อเครื่องดื่ม 1 มล ตามเกณฑ์ของกองวิเคราะห์อาหาร มีความเป็นไปได้มากขึ้นสำหรับกรณีหลัง ประกอบกับการขาดข้อมูลทางวิทยาศาสตร์รองรับไม่ว่าจะเป็นสารอาหารที่มีประโยชน์ หรือสารอื่นๆ ที่อาจมีประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยอาจได้มาจากการที่สารเหล่านั้นที่มีในพืชถูกสกัดออกมาด้วยกรรมวิธีการหมัก หรือเกิดโดยจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก

น้ำลูกยอซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์น้ำหมักชีวภาพชนิดหนึ่งที่รู้จักกันแพร่หลาย โดยเชื่อกันว่าเป็นเครื่องดื่มที่บำรุงสุขภาพ เพราะประกอบด้วยสารมากมายประมาณ 140 ชนิด โดยเฉพาะโพรเซโรนีน (Proxeronine) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเซโรนีน (Xeronine) และถูกเปลี่ยนเป็นสารชนิดนี้ในร่างกาย ซึ่งช่วยปกป้องเซลล์จากสารพิษต่างๆ และฟื้นฟูเซลล์ที่เสื่อมให้กลับเป็นปกติได้ (www.sarinoni.com) และน้ำหมักลูกยอเป็นที่นิยมดื่มในหมู่เกาะฮาวายประเทศสหรัฐอเมริกา (www.collagen.weightloss.com) สำหรับในประเทศไทยการบริโภคผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีวัตถุประสงค์ที่หลากหลายบนพื้นฐานที่เชื่อว่าเป็นเครื่องดื่มที่ใช้บำรุงสุขภาพ แต่อย่างไรก็ตามการผลิตเป็นการค้ามักมีการกล่าวอ้างสรรพคุณเกินความเป็นจริง ดังนั้นสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาจึงเตือนผู้บริโภคอย่าหลงเชื่อโฆษณาผลิตภัณฑ์น้ำลูกยอที่อ้างสรรพคุณในการรักษาโรคต่างๆ ได้ เพราะแท้จริงแล้วน้ำลูกยอเป็นเพียงผลิตภัณฑ์ที่เสริมอาหารเท่านั้นไม่สามารถรักษาโรคได้ (www.fda.moph.go.th/information2545.nsf/e) ประกอบกับข้อมูลทางวิชาการ ดังเช่น บทความเรื่อง “ดื่มน้ำลูกยอ... ดีจริงหรือ” (จันทิมา, 2546) ที่แสดงความเห็นต่อการไม่มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ของน้ำลูกยอรวมทั้งน้ำหมักลูกยอ ซึ่งกล่าวได้ว่าข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ของน้ำหมักชีวภาพรวมทั้งน้ำหมักลูกยอในปัจจุบันยังมีน้อยมาก ไม่เพียงพอที่จะใช้เป็นข้อมูลสำหรับการสร้างเกณฑ์มาตรฐานของน้ำหมักชีวภาพในการบริโภค ซึ่งตรงกับข้อสรุปของการประชุมวิสามัญฯ ของศูนย์ฝึกอบรมและพัฒนาการสาธารณสุขมูลฐาน (ศูนย์ สสม., 2545) เพื่อที่จะช่วยชุมชนผู้ผลิตให้มีข้อมูลเพียงพอเพื่อประกอบการขอขึ้นทะเบียนอาหาร และเป็นการช่วยผู้บริโภคให้ใช้วิจารณญาณในการตัดสินใจซื้อได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาน้ำหมักเพื่อเป็นเครื่องดื่มบำรุงสุขภาพ โดยมีวัตถุประสงค์คือ การสำรวจลักษณะน้ำหมักชีวภาพในภาคใต้ของประเทศ เพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่เข้าใจน้ำหมักชีวภาพมากขึ้นไม่ว่าจะเป็นคุณสมบัติทางด้านเคมี-กายภาพ และจุลชีววิทยา และเมื่อรวบรวมกับข้อมูลน้ำหมักชีวภาพของภาคอื่นๆ ในประเทศ จะทำให้สามารถกำหนดมาตรฐานน้ำหมักชีวภาพในเบื้องต้นเป็นมาตรฐานชุมชน และจากนั้นเป็นการพัฒนาเพื่อให้สามารถขอขึ้นทะเบียนอาหารได้

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ

ได้เก็บผลิตภัณฑ์น้ำหมักชีวภาพจำนวน 19 ตัวอย่าง จากแหล่งผลิตต่างๆ ในภาคใต้ ปริมาตรที่เก็บอยู่ระหว่าง 400-1000 มล. บรรจุในขวดปราศจากเชื้อแล้วนำมาศึกษาเพื่อหาลักษณะของน้ำหมักชีวภาพ รายละเอียดของข้อมูลตัวอย่างดัง Table 1 และในการเก็บตัวอย่างได้หาข้อมูลการผลิตของแต่ละแหล่งที่ผลิต พบว่าทุกแหล่งที่ผลิตเรียนรู้มาจากแหล่งเดียวกัน คือการถ่ายทอดความรู้โดย ดร.รสสุคนธ์ พุ่มพันธ์วงศ์ คือใช้ผลไม้หรือผัก 3 กก. น้ำตาลทรายแดง 1 กก. น้ำสะอาด 10 ลิตร อาจมีการเติมหัวเชื้อหรือไม่เติม คือใช้เชื้อที่ติดมากับวัตถุดิบ (แต่ทั้งหมดที่สอบถามมีการเติมหัวเชื้อ) หมักในถังหรือขวดทำด้วยพลาสติกโดยให้เหลือพื้นที่ว่างน้อยที่สุด เพื่อให้เกิดสภาพมีอากาศน้อย ปล่อยไว้เป็นเวลา 3 เดือน ก็สามารถนำมาดื่มได้เพื่อบำรุงสุขภาพ หรือบรรจุขวดขาย และในกรณีที่ผลิตเพื่อดื่มเอง อาจใช้น้ำผึ้งรวงแทนน้ำตาลทราย หรือใช้ผสมระหว่างน้ำผึ้งรวงและน้ำตาลทรายก็ได้ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์จากส่วนผสมที่ใช้ซึ่งมีน้ำตาลสูงถึง 10% (W/V) หรือ 7.14% (W/W) ซึ่งเป็นปริมาณน้ำตาลที่สูงพอสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ ประกอบกับอยู่ภายในภาชนะที่มีการจำกัดปริมาณอากาศ อีกทั้งมีการเติมหัวเชื้อ หรือน้ำหมักเก่า 10% จึงทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียเฉพาะกลุ่มคือแลกติกแอสิดแบคทีเรียเป็นกลุ่มหลักเนื่องจากน้ำหมักมีรสเปรี้ยว (Battcock and Azam-Ali, 2003) และอาจมียีสต์ได้เช่นกัน (ดวงพร และนาตยา, 2538; ดวงพร และไกรสร, 2538) ดังนั้นวิถีการหมักน่าจะเป็น Embden-Meyerhof pathway หรือ Phosphoketolase pathway ดังนั้นผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากการหมักด้วยวิถีดังกล่าวคือกรดแลกติก

Table 1. Information of fermented plant beverages collected from various sources in southern Thailand

Sample (Code)	Source	Composition[1]	Container	Fermentation time
1. บัวบก: *Centella asiatica* Urban	Thaksinasolk Muang district Trang province (samples 1-5)	Plant 2.5/5, honey1/5 and starter 1/5 (v/v of bottle)	PET drinking water bottle (2 L)	2 years from start of fermentation. Every 3 months remove sample and replace with a fresh sample of raw materials
2. เชอร์รี่: *Malpighia glabra* L.				
3. สะระแหน่: *Mentha cordifolia* Opiz				
4. เสาวรส: *Passiflora* sp.				
5. ว่านหางจระเข้: *Aloe vera* (L.) Burm.f				
6. กล้วยน้ำว้า: *Musa sapientum* L.	Muang district Trang province	Sliced banana 2.5/5, honey 1/5 and starter 1/5 (v/v of container)	Plastic cylinder (1L)	3 years with the same condition as above
7. ลูกยอ: *Morinda citrifolia* L.	Muang district Phangnga province	Fruit 3 kg, brown sugar 1 kg and clean water 10 L and 10% starter (V/V)	Sale in glass bottle (750 ml)	12 months
8. ลูกยอป่า: *Morinda coreia* Ham.	Hat-Yai district Songkhla (samples 8-9)	Same as the sample 7	Big plastic bucket (50 L)	6 months
9. ผลไม้รวม: Mixed fruit[2]				
10. ยูคาลิปตัส: *Eucalyptus citriodora* Hook.	Huay-yoi district, Trang (samples 10-19)[3]	Fruit 3 kg, honey and brown sugar 1kg and clean water 10 L and 10% starter (V/V)	Big size (20 L) of drinking water bottle	3-6 months except a few sample (14 and 17) < 3 months
11. ถั่วเหลือง: *Glycine max* L.				
12. ตะไคร้: *Cymbopogon citratus* Stapf				
13. สาหร่ายเขียวสกัด: Green algae				
14. ชะมวง: *Garcinia cova* Roxb.				
15. บอระเพ็ด: *Tinospora crispa* (L.) Mers ex Hook.f.				
16. ข้าวกล้อง: *Oryza sativa* L.				
17. ลูกจันทน์: *Diospyros decandra* Lour.				
18. ใบทำมัง: *Litsea elliptica* Boerl				
19. เปลือกมังคุด: *Garcinia mangostana* L.				

[1] **Previous fermented plant beverage was used as a starter for each sample**

[2] **Mixed fruit: Pineapple, noni, pumpkin, star apple and fig (*Ficus racemosa* Linn.)**

[3] **Samples 10-19 were collected from the same place, thereby their composition, container used and fermentation time were similar**

กรดอะซีติก เอทานอล และสารตัวกลางของวิถีดังกล่าวคือ อะเซทอลดีไฮด์ (Moat and Foster, 1995) สารเหล่านี้ควรตรวจพบในน้ำหมักชีวภาพ จากเหตุผลที่กล่าวมาจึงเป็นข้อมูลที่กำหนดพารามิเตอร์ของการตรวจสอบในข้อ 2

2. การศึกษาลักษณะน้ำหมักชีวภาพ

เพื่อการกำหนดลักษณะน้ำหมักชีวภาพจึงตรวจสอบพารามิเตอร์ต่างๆ ทั้งทางด้านประสาทสัมผัส ทางด้านเคมี-กายภาพ และจุลชีววิทยา ตามรายละเอียดในแผนภูมิการวิเคราะห์ด้านล่าง

2.1 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

โดยคณะผู้วิจัยได้สังเกตสี ความใสหรือขุ่น ดมกลิ่น ชิมรส และดูการเกิดฟองแก๊ส ซึ่งเป็นลักษณะที่บ่งบอกถึงความน่าจะดื่มของน้ำหมักชีวภาพ และการทดสอบในลักษณะดังกล่าว จัดได้ว่าเป็น multisample difference test และได้ทดสอบการยอมรับรวมโดยวิธีการให้คะแนน (5-point hedonic scale) (Meilgaard *et al.*, 1998)

2.2 คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพ

พารามิเตอร์ที่ตรวจสอบ ได้แก่ ปริมาณแร่ธาตุบางชนิด (ทองแดง สังกะสี โซเดียม และโพแทสเซียม) ที่มีแหล่งจากวัตถุดิบที่ใช้หมัก และมีผลต่อสุขภาพของผู้บริโภคด้วย ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (total soluble solid: TSS) ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity: EC) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar: TS) ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity: TA) พีเอช และปริมาณสารอินทรีย์เป้าหมาย ได้แก่ กรดแลคติก กรดอะซิติก เอทานอล เพราะเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรท (หัวข้อ 1) รวมทั้งสารตัวกลางในวิธีการหมักคือ อะเซทอลดีไฮด์ และรวมถึงเมทานอลซึ่งยังไม่สามารถสันนิษฐานแหล่งที่มาได้ แต่เป็นที่ทราบกันว่าเมทานอลคือ wood alcohol (Merck, 1978) การวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์เหล่านี้โดยใช้เครื่องแก๊สโคมาโตกราฟฟี (gas chromatography) ได้คัดเลือกมาเพียง 10 ตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์โดยพิจารณาจากฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรค (ซึ่งจะไม่กล่าวในที่นี้) และปริมาณธาตุที่พบ และ 10 ตัวอย่างที่

Sample in sterile bottle

Sensory test	Physico-chemical property	Microbial investigations: 150 ml in sterile bottle	
10 ml in wine glass	150 ml	Microbes	Microbial indicators
- Color	- Total soluble solid: hand refractometer	- Total bacterial count (TBC)	- Total coliforms
- Flavor	- EC: electrical conductivity meter	- Lactic acid bacteria (LAB)	- *Escherichia coli*
- Odor	- pH: pH meter	- Yeast and mold	Membrane filter technique[5]
- Clarity	- Total acidity: titration method (AOAC, 1990)	Standard plate count method[4]	
- Gas bubble (bottle)	- Total sugar: Phenol-sulfuric total sugar (Dubois *et al.*, 1956)		
Acceptability (5-point Hedonic scale)	- Elements (Cu, Zn, Na and K): ICP-AES[1]		
Tested by researchers	- Lactic and acetic acids: GC (Yang and Choong, 2001)[2]		
	- Alcohols and acetaldehyde: GC (Yang and Choong, 2001)[3]		

[1] Inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES)

[4] PCA for TBC, MRS for LAB and PDA for mold and yeast (FDA, 1992)

[5] Endo medium for total coliforms and MFC agar for *E. coli* (APHA, 1998)

[2] Details: inlet temperature 240ºC
Oven temperature 75ºC 1 min
Ramp to 180ºC at 5ºC/min
Ramp to 230ºC at 15ºC/min

[3] Details: inlet temperature 240ºC
Oven temperature 35ºC 5 min
Ramp to 100ºC at 5ºC/min
Ramp to 230ºC (5 min) at 15ºC/min

Column: Rtx-5MS, length 30m, film thickness 0.25µm, ID 0.25 mm

Flow chart of methods used to characterize fermented plant beverages

คัดเลือกมาคือ บัวบก เสาวรส กล้วยน้ำว้า ลูกยอ ลูกยอป่า ถั่วเหลือง สาหร่ายเขียวสกัด (ไม่สามารถระบุชื่อวิทยาศาสตร์ได้เพราะสภาพการหมัก) ใบชะมวง ข้าวกล้อง และเปลือกมังคุด

2.3 การตรวจทางจุลชีววิทยา

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมัก ได้แก่ แบคทีเรียทั้งหมด (total bacterial count) แลคติก แอสิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria) ซึ่งเป็นเชื้อที่สร้างกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแลกติก และกรดอะซิติก และเอทานอล ขณะที่ยีสต์ผลิตเอทานอล และเชื้อราที่ใช้กรดเพื่อการเจริญ ซึ่งอาจปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายภายหลังการหมัก หรือขั้นตอนการบรรจุผลิตภัณฑ์

จุลินทรีย์บ่งชี้สุขลักษณะของน้ำหมักชีวภาพ โดยตรวจสอบ total coliforms และ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์บ่งชี้ว่ามีการปนเปื้อนของอุจจาระจากคนหรือสัตว์เลือดอุ่นหรือไม่ในกระบวนการผลิตจนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย และเนื่องจากโอกาสที่จะพบจุลินทรีย์บ่งชี้มีน้อยมากจึงเลือกใช้วิธี membrane filter technique โดยใช้ปริมาตรน้ำหมักชีวภาพ 100 ml (APHA, 1998)

3. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเมทานอลกับพารามิเตอร์ที่ตรวจสอบตามที่ระบุในข้อ 2.2 และ 2.3 โดยใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียรสัน

ผลการทดลอง

1. คุณสมบัติทางประสาทสัมผัส

ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสดัง Table 2 พบว่าสีของน้ำหมักชีวภาพมาจากสีของวัตถุดิบที่ใช้คือ พวกพืชผัก ผลไม้ กับน้ำตาลทรายแดง หรือน้ำผึ้ง อย่างไรก็ตาม

Table 2. Characteristics of fermented plant beverages based on the sensory test[1]

Sample[2]	Color	Odor[3]	Flavor	Clearness
1: Gotu kola	Brown	O	Sour and astringent	Nearly clear
2: Cherry	Red brown	Honey	Sour and sweet[4]	Nearly clear
3: Saranae	Dark brown	O	Sour and sweet[4]	Nearly clear
4: Passion fruit	Brown	O	Very sour and sweet	Clear with seed
5: Aloe	Light brown	Alcohol	Very sour no sweet	Clear
6: Banana	Light brown	O	Very sour no sweet	Turbidity
7: Noni	Brown	O	Only sour	Clear
8: Wild forest noni	Nearly black	O	Very sour no sweet	Nearly clear
9[5]: Mixed fruit	Light brown	Ester	Very sour and bitter	Nearly clear
10: Eucalyptus	Dark yellow	O	Only sour	Clear
11: Soybean	Dark brown	Sour smell	Very sour no sweet	Turbidity
12: Lemon grass	Brown	Mud smell	Not done	Turbidity
13: Green algae	Yellow green	O	Only sour	Turbidity
14: Chamuang	Red brown	No smell	No taste	Clear
15: Cordifolia	Orange brown	O	Very bitter	Nearly clear
16: Half milled rice	White	O	Little sour and sweet	Turbidity
17: Nutmeg	Yellow brown	O	Only sour	Turbidity
18: Thammang	Dark brown	O	No sour with astringent	Clear
19: Mangosteen fruit shell	Dark brown	O	Very sour with astringent	Turbidity

[1] All samples no gas bubble
[2] Common name
[3] O: smell originated from plant with little smell of ester from fermentation
[4] Good flavor as overall acceptability had 4 points
[5] Mixed fruit: Pineapple, noni, pumpkin, star apple and fig (*Ficus racemosa* Linn.)

พบว่ากระบวนการหมักก็น่ามีส่วนต่อการเกิดสีของน้ำหมักชีวภาพด้วย ดังเช่น สะระแหน่ซึ่งมีสีน้ำตาลเข้ม ขณะที่กลิ่นก็เช่นเดียวกับสีคือมีกลิ่นของพืช ผัก ผลไม้ เป็นหลัก และกรณีที่ใช้น้ำผึ้งมากก็มีกลิ่นของน้ำผึ้งด้วย และส่วนหนึ่งของกลิ่นที่เกิดขึ้นเป็นกลิ่นของสารระเหยพวกแอลกอฮอล์หรือเอสเตอร์ที่เกิดจากการหมัก และมีอยู่ 1 ตัวอย่างคือตะไคร้ซึ่งมีกลิ่นเหม็นคล้ายโคลน จึงไม่มีการชิมรสชาติ สำหรับรสชาติของน้ำหมักชีวภาพมีรสเปรี้ยวนำซึ่งเป็นเพราะความเป็นกรดที่เกิดจากการหมักโดยจุลินทรีย์ทำให้เกิดกรดแลกติก และกรดอะซิติก ส่วนรสหวานที่พบในบางตัวอย่างเป็นเพราะยังมีน้ำตาลเหลืออยู่เพราะจุลินทรีย์ใช้ไม่หมด ขณะที่รสขมหรือฝาดเป็นเพราะธรรมชาติของพืช ผัก ผลไม้ นั้น เช่น บอระเพ็ดซึ่งมีรสขมมากจนกลบรสเปรี้ยวได้ ส่วนชะมวง (เอาใบมาหมัก พบว่าไม่มีรสชาติคือจืดๆ) แม้ว่าใบชะมวงเองมีรสเปรี้ยว แต่เป็นเพราะเกิดกรดในปริมาณต่ำมาก (คุณสมบัติเคมี-กายภาพของน้ำหมักชีวภาพจะกล่าวในหัวข้อต่อไป) สำหรับความใสพบว่า พืช ผัก ผลไม้ ที่นำมาหมักส่งผลมากต่อความใส-ขุ่นของน้ำหมักชีวภาพ เช่น การใช้ใบไม้ มักจะได้ผลิตภัณฑ์ที่ใส เช่น ใบยูคาลิปตัส ขณะที่ใช้ผลไม้ก็ขึ้นกับประเภทของผลไม้ เช่น ลูกยอได้น้ำหมักที่ใส ขณะที่กล้วย ข้าวกล้องได้น้ำหมักที่ขุ่น เป็นต้น

2. คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของน้ำหมักพืช

ตาม Table 3 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (TSS) ขึ้นกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (TS) เป็นหลัก เช่น น้ำหมักชีวภาพจากใบบัวบก (1) เชอร์รี่ (2) สะระแหน่ (3) เสาวรส (4) มีค่า TSS อยู่ระหว่าง 33-48 ºBrix โดยที่มีค่า TS อยู่ระหว่าง 3.6-4.3% และค่า TSS ยังขึ้นกับปริมาณเกลือแร่ที่ละลายน้ำและนำไฟฟ้า (EC) ดังเช่น น้ำหมักชีวภาพ

Table 3. Physico-chemical properties of fermented plant beverages collected in southern Thailand

Sample code/ Common name	TSS[1] (ºBrix)	EC[2] (µs)	Total sugar (g/100 ml)	Total acidity (g/100 ml)	pH
1: Gotu kola	38	1339	3.6	2.44	3.17
2: Cherry	33	896	4.2	1.92	3.37
3: Saranae	38	989	4.0	1.92	3.38
4: Passion fruit	48	1183	4.3	3.20	3.21
5: Aloe	11	2105	2.0	2.41	3.5
6: Banana	25	3305	2.0	7.13	2.83
7: Noni	17	1238	2.0	2.85	3.06
8: Wild forest noni	15	4640	1.0	5.76	3.27
9[3]: Mixed fruit	4	2195	1.0	3.39	3.28
10: Eucalyptus	6	195	1.0	2.85	3.28
11: Soybean	14	3520	3.5	5.39	3.39
12: Lemon grass	6	5145	0.44	3.17	3.72
13: Green algae	7	5060	0.75	2.10	3.06
14: Chamuang	3	1987	0.21	0.98	3.48
15: Cordifolia	9	1591	1.00	3.65	3.17
16: Half milled rice	13	2235	4.00	4.55	3.24
17: Nutmeg	18	1705	1.23	4.01	2.63
18: Thammang	4	3405	1.60	1.07	3.60
19: Mangosteen fruit shell	12	3570	0.50	4.01	3.28

[1] **TSS: Total soluble solid**

[2] **EC: Electrical conductivity**

[3] **Mixed fruit: Pineapple, noni, pumpkin, star apple and fig (*Ficus racemosa* Linn.)**

Table 4. Amounts of organic acids, alcohols and acetaldehyde in fermented plant beverages in southern Thailand

Sample Common name	Concentration (g/100 ml) ± standard deviation				
	Lactic acid	Acetic acid	Ethanol	Acetaldehyde	Methanol
Gotu kola	4.30±0.13	1.21±0.02	1.85±0.03	0.048±0	0.038±0.001
Passion fruit	0.34±0.06	0.04±0.003	3.32±0.14	0.088±0.01	0.084±0.006
Banana	2.72±0.05	1.95±0.01	0.57±0.09	0.027±0.004	0.04 ±0.005
Noni	2.78±0.15	1.42±0.03	0.03±0	0.022±0	0.033±0.001
Wild forest noni	1.94±0.13	1.91±0.01	0.05±0	0.007±0.001	0.019±0
Soybean	0.76±0.07	0.68±0.02	2.87±0.13	0.024±0.001	0.049±0.004
Green algae	0.32±0.003	0.55±0.02	2.27±0.09	0.023±0.001	0.035±0.001
Chamuang	0.09±0.007	0.09±0.004	1.35±0.05	0.02 ±0.001	0.039±0.002
Half-milled rice	0.62±0.03	1.61±0.02	3.00±0.02	0.025±0	0.041±0.001
Mangosteen fruit shell	1.95±0.02	1.66±0.08	0.49±0.02	0.025±0.001	0.048±0.001

จากกล้วยมีค่า TSS 25 ºBrix โดยมีค่า EC 3305 µs และมีค่า TS 2.0% เป็นต้น ขณะที่น้ำหมักชีวภาพจากว่านหางจระเข้มีค่า TS 2% เช่นกัน แต่มีค่า EC เพียง 2105 µs ส่งผลต่อค่า TSS คือมีค่าเพียง 11 ºBrix เท่านั้น

น้ำหมักชีวภาพที่มีค่า EC สูง (4,640-5,145 µs) ได้แก่ ลูกยอป่า ตะไคร้ และสาหร่ายเขียวสกัด สำหรับธาตุทองแดงพบปริมาณสูงสุดในเสาวรสคือ 0.142 มก/ลิตร และมีระดับปานกลาง (0.071-0.104 มก/ลิตร) ได้แก่ กล้วย เชอร์รี่ สะระแหน่ ลูกยอป่า และถั่วเหลือง รายละเอียดดัง Figure 1A ส่วนธาตุสังกะสีมีปริมาณสูงสุดในถั่วเหลืองและข้าวกล้อง (6.58-6.86 มก/ลิตร) ดูรายละเอียดน้ำหมักชนิดอื่นตาม Figure 1B และน้ำหมักที่มีโพแทสเซียมในระดับสูง (1,290-1,680 มก/ลิตร) ได้แก่ กล้วย ลูกยอป่า ถั่วเหลือง ตะไคร้ และเปลือกมังคุด ดูรายละเอียด Figure 1C ขณะที่ปริมาณโซเดียมสูงสุด (971 มก/ลิตร) ในสาหร่ายเขียวสกัด รองลงมา ได้แก่ ใบทำมังมี 503 มก/ลิตร ส่วนน้ำหมักชีวภาพอื่นๆ มีปริมาณต่ำมากแสดงใน Figure 1D

ค่า pH ในน้ำหมักอยู่ระหว่าง 2.63-3.72 สอดคล้องกับปริมาณกรดที่มีอยู่ในน้ำหมักชีวภาพคือ ระหว่าง 0.98-7.13% (Table 3) เมื่อพิจารณาจาก Table 4 ปริมาณกรดอินทรีย์คือ แลคติก และอะซิติกส่วนใหญ่ของน้ำหมักมีกรดแลกติกมากกว่ากรดอะซิติกโดยเฉพาะน้ำหมักชีวภาพจากเสาวรสและใบบัวบกมีสัดส่วนของกรดแลกติกต่อกรดอะซิติกเป็น 7.66 และ 3.54 แต่ก็ยังมีบางตัวอย่างคือสาหร่ายเขียวสกัดและข้าวกล้องที่มีปริมาณกรดอะซิติกมากกว่ากรดแลกติก (สัดส่วน 0.59 และ 0.38) และผลรวมของกรดอินทรีย์ทั้งสองที่วิเคราะห์ได้โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี มีปริมาณต่ำกว่าการวิเคราะห์โดยวิธีการไตเตรทในรูปของกรดทั้งหมดซึ่งคำนวณเป็นกรดแลกติก (Table 3 and 4) สำหรับปริมาณของเอทานอลมีค่าอยู่ระหว่าง 0.03-3.32% โดยปริมาณสูงสุดพบในเสาวรสตามด้วยข้าวกล้อง ขณะที่ปริมาณต่ำสุดพบในลูกยอและลูกยอป่า ซึ่งน้ำหมักทั้งสองชนิดก็มีปริมาณเมทานอลต่ำสุดเช่นกัน (0.02-0.03%) และพบปริมาณเมทานอลสูงสุด 0.084% ในน้ำหมักชีวภาพจากเสาวรส ซึ่งมีปริมาณเอทานอลสูงสุดด้วยเช่นกัน ส่วนปริมาณอะเซทอลดีไฮด์พบในปริมาณต่ำมากทุกตัวอย่างคืออยู่ระหว่าง 0.01-0.09%

ผลตาม Table 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเมทานอลกับปริมาณของพารามิเตอร์อื่นๆ ที่ตรวจสอบโดยวิเคราะห์ผลด้วยการใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียรสัน (Pearson correlation coefficient: r) และทำการทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (H_0 : p=0) เพื่อพิจารณาว่าพารามิเตอร์กับเมทานอลมีความสัมพันธ์กันหรือไม่ เช่น ปริมาณการมีกรดอะซีติกกับปริมาณการมีเมทานอลมีความสัมพันธ์กันหรือไม่ โดยพิจารณาจากค่า P-value ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (P-value < 0.05) และที่มีระดับนัยสำคัญ 0.1 (P-value < 0.1) พบ

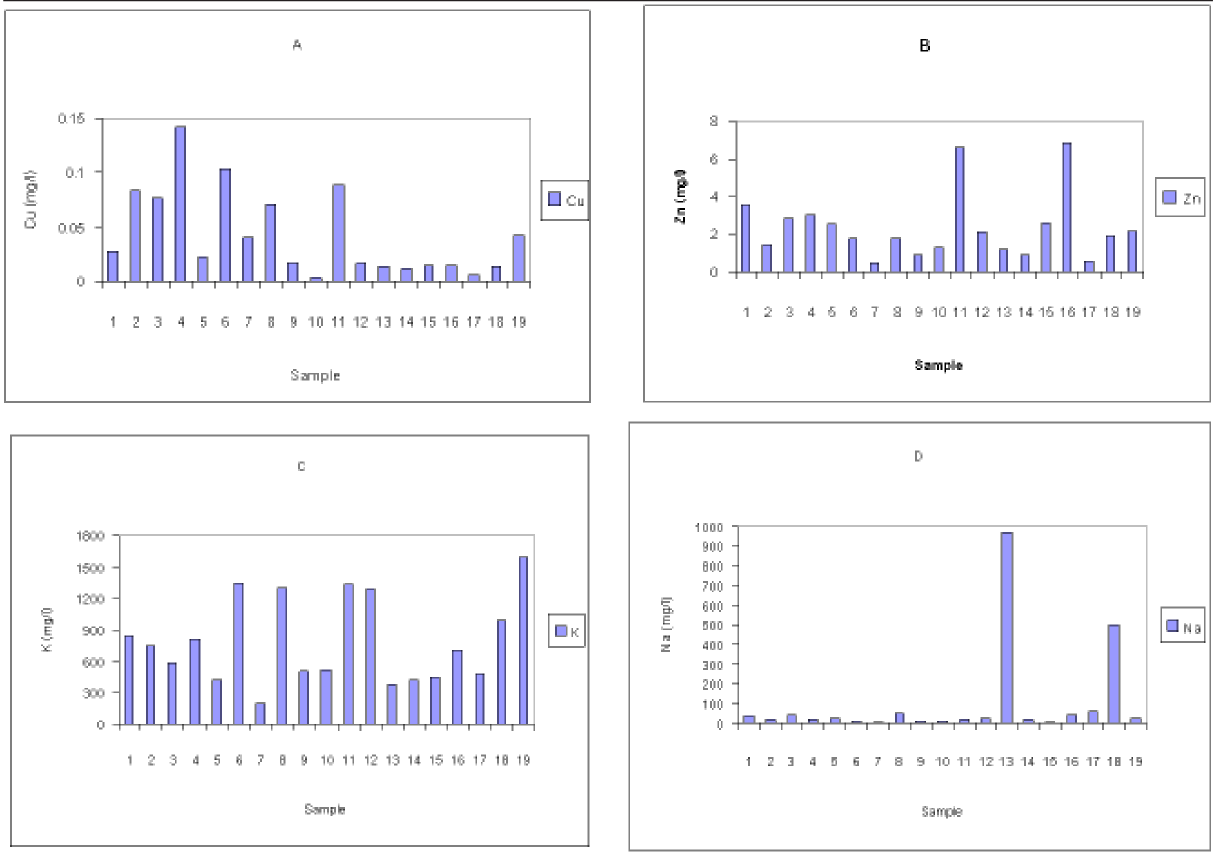

Figure 1. Concentration of selected elements in fermented plant beverages collected in southern Thailand

ว่าพารามิเตอร์ที่มีความสัมพันธ์ทางบวกสูงมากกับการมีเมทานอลในน้ำหมักชีวภาพที่ $p<0.05$ คืออะเซทอลดีไฮด์ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และเอทานอล โดยมีค่า r เท่ากับ 0.881 0.857 และ 0.636 ตามลำดับ และที่ $p<0.1$ คือ TSS Cu และแลกติกแอสิดแบคทีเรีย (r: 0.605 0.604 และ 0.561) ขณะที่พารามิเตอร์ที่มีความสัมพันธ์ทางลบกับปริมาณเมทานอลที่ $p<0.10$ ได้แก่ กรดอะซิติก ($r = -0.564$) ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ที่ได้แสดงให้ทราบว่าการปนเปื้อนของเมทานอลในน้ำหมักชีวภาพอาจมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณของอะเซทอลดีไฮด์ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และเอทานอล รวมถึงกรดอะซิติก ซึ่งพารามิเตอร์ดังกล่าวเกิดจากการหมัก ส่วนพารามิเตอร์ที่มาจากวัตถุดิบที่ใช้คือทองแดงซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสูงสุดของเมทานอลที่พบในน้ำหมักชีวภาพเสาวรส รวมถึงกรณีของเอทานอลด้วยเช่นกันที่มีปริมาณสูงสุด ดัง Table 3 และ 4

3. ผลการตรวจทางจุลชีววิทยา

การตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำหมักชีวภาพโดยตรวจหาเชื้อ total coliforms และ *E. coli* พบว่าทุกตัวอย่าง (19 ตัวอย่าง) ตรวจไม่พบจุลินทรีย์ที่เป็นตัวบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของอุจจาระ (Table 6) ส่วนการตรวจหาจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก อย่างเช่น แลกติกแอสิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria : LAB) ยีสต์ และยังตรวจหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (TBC) และเชื้อรา พบว่ามีอยู่ 9 ตัวอย่างที่ตรวจไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ น้ำหมักชีวภาพจากเชอร์รี่ สะระแหน่ ว่านหางจระเข้ กล้วยน้ำว้า ลูกยอ ลูกยอป่า ผลไม้รวม ยูคาลิปตัส และใบทำมัง แสดงถึงสภาพปลอดเชื้อของน้ำหมักชีวภาพที่เป็นผลจากการหมัก ขณะที่อีก 10 ตัวอย่าง ตรวจพบประเภทและปริมาณจุลินทรีย์แตกต่างกันไป โดยมีเพียง 2 ตัวอย่าง คือ น้ำหมักจากใบบัวบกและเสาวรสที่ตรวจพบทั้ง TBC,

Table 5. Relationship between correlation and P-value of the measured parameters compared to methanol concentration in fermented plant beverages

Parameter	Correlation (r)	P-value
Total bacterial count (TBC)	0.857	0.002*
Lactic acid bacteria (LAB)	0.561	0.091**
Yeast	0.077	0.833
Mold	-0.142	0.695
Electrical conductivity (EC)	-0.445	0.198
Cu	0.604	0.064**
Zn	0.260	0.468
Na	-0.176	0.626
K	0.064	0.860
Total soluble solid (TSS)	0.605	0.064**
pH	0.102	0.779
Acidity	-0.112	0.757
Lactic acid	-0.351	0.320
Acetic acid	-0.564	0.090**
Ethanol	0.636	0.048*
Acetaldehyde	0.881	0.001*

*** Significant at P-value < 0.05**
**** Significant at P-value < 0.1**

LAB และยีสต์ ประเภทของจุลินทรีย์ที่พบว่าหลงเหลืออยู่ในน้ำหมักมากที่สุดคือ ยีสต์ โดยพบถึง 9 ตัวอย่าง (6-1.7x10^{4} CFU/ml) ขณะที่ LAB พบ 5 ตัวอย่างปริมาณระหว่าง 34-1.4x10^{4} CFU/ml และเชื้อราพบ 6 ตัวอย่าง โดยในน้ำหมักชีวภาพจากตะไคร้ พบสูงสุดถึง 4.0x10^{2} CFU/ml

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. คุณลักษณะของน้ำหมักชีวภาพจากพืชที่มาจากวัตถุดิบ

ความใสของน้ำหมักชีวภาพขึ้นกับประเภทของพืชที่ใช้เป็นหลัก ขณะที่สีก็ขึ้นกับพืชที่ใช้และแหล่งน้ำตาลซึ่งอาจเป็นน้ำตาลทรายแดงหรือผสมด้วยน้ำผึ้ง ส่งผลให้ส่วนใหญ่ของน้ำหมักมีสีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม ซึ่งสีนี้น่าเกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีที่เรียกว่า Millard reaction ระหว่างสารประกอบคาร์บอนิล ซึ่งได้แก่ น้ำตาลกับกรดอะมิโน เช่น น้ำตาลกูลโคสกับกรดอะมิโนไลซิน (www.aagsci.ubc.ca/courses/fnh/410/coloue/3-81.htm) ซึ่งผลก็สอดคล้องกับค่า TSS (น้ำตาล โปรตีน และอื่นๆ ที่ละลายน้ำ แล้วเกิดการรวมตัวกันเป็นสารที่ซับซ้อนขึ้น) และค่า TS ดังตัวอย่างที่มีค่า TSS สูง (33-48 ^{o}Brix) และค่า TS ระหว่าง 3.6-4.3 (Table 3) ก็มีสีของน้ำหมักเป็นสีน้ำตาลถึงเข้ม (Table 2) รวมทั้งระยะเวลาการหมักก็มีผลต่อสีด้วยเช่นกันโดยสีเกิดจากการที่น้ำสกัดเอาสารต่างๆ ที่ละลายน้ำได้ออกมา และจากนั้นผลของการหมักที่เกิดเอทานอลส่งผลให้สารมากชนิดขึ้นจากพืชถูกสกัดออกมา และเป็นที่ทราบกันว่ากรดอินทรีย์ทำปฏิกิริยากับคลอโรฟิลล์ทำให้สีเขียวสดกลายเป็นสีเขียวขี้ม้า (Battcock and Azam-Ali, 1998) ก็น่าจะมีผลต่อสีของน้ำหมักด้วยเช่นกัน เพราะสีของน้ำหมักนอกจากสีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม ก็ยังมีสีน้ำตาลแดง น้ำตาลเหลือง และเกือบเป็นสีแดง กลิ่นของน้ำหมักแทบทุกชนิดยังคงกลิ่นของพืชที่นำมาหมักอยู่ และรวมกับกลิ่นที่มาจากกระบวนการหมักเพราะกรดอินทรีย์และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์รวมตัวกับเอทานอลที่เกิดจากการหมักทำให้เกิดสารพวก Aromatic esters ส่งผลต่อกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์หมัก (Battcock and Azam-Ali, 1998)

Table 6. Enumeration of microorganisms present and bacterial indicators of contamination in fermented plant beverages in southern Thailand

Sample code[1]	TBC[2] CFU/ml	LAB[3] CFU/ml	Yeast CFU/ml	Mold CFU/ml	TC[4] CFU/ml	*E. coli* CFU/ml
1: Gotu kola	1.8 x 10^2	34	5.3 x 10^2	0	ND	ND
2: Cherry	0	0	0	0	ND	ND
3: Saranae	0	0	0	0	ND	ND
4: Passion fruit	1.4 x 10^3	2.4 x 10^3	4.7 x 10^2	0	ND	ND
5: Aloe	0	0	0	0	ND	ND
6: Banana	0	0	0	0	ND	ND
7: Noni	0	0	0	0	ND	ND
8: Wild forest noni	0	0	0	0	ND	ND
9[5]: Mixed fruit	0	0	0	0	ND	ND
10: Eucalyptus	0	0	0	0	ND	ND
11: Soybean	0	0	1.7 x 10^4	0	ND	ND
12: Lemon grass	0	0	0	4.0 x 10^2	ND	ND
13: Green algae	0	0	1.0 x 10^3	15	ND	ND
14: Chamuang	0	2.7 x 10^3	1.3 x 10^5	0	ND	ND
15: Cordifolia	0	0	6	2	ND	ND
16: Half milled rice	0	0	3.4 x 10^2	3	ND	ND
17: Nutmeg	0	1.4 x 10^4	1.5 x 10^4	7	ND	ND
18: Thammang	0	0	0	0	ND	ND
19: Mangosteen bark	0	3.6 x 10^2	2.1 x 10^2	3	ND	ND

[1] Sample 1-5 : 2 yr
6 : 3 yr
7 : 12 months
8-9 : 6 months
10-19 : ~ 3-6 months except 14 and 17 < 3 months
[2] TBC = Total bacterial count, [3] LAB = Lactic acid bacteria, [4] TC = Total coliforms
[5] Mixed fruit: Pineapple, noni, pumpkin, star apple and fig (*Ficus racemosa* Linn.)
ND = Not detected

ค่า EC เป็นค่าที่บ่งบอกถึงการละลายได้ของเกลือแร่หรือธาตุในสารละลาย ซึ่งพบว่าน้ำหมักชีวภาพมีค่า EC แตกต่างกันไประหว่าง 896-5145 µs ซึ่งขึ้นกับประเภทของพืชที่ใช้เป็นหลักเพราะส่วนประกอบอื่นๆ เหมือนกัน คือน้ำตาลและน้ำ และสำหรับธาตุที่ตรวจสอบคือทองแดง พบว่ามีปริมาณสูงสุด 0.142 มก/ลิตร ในน้ำหมักชีวภาพจากเสาวรส ขณะที่มาตรฐานน้ำดื่มกำหนดให้มีสูงสุดได้ 1.0 มก/ลิตร ซึ่งร่างกายต้องการ 2-5 มก/วัน ทองแดงในปริมาณที่ไม่เป็นพิษมีผลช่วยในการกำจัดอนุมูลอิสระ (เสาวนีย์, 2532) ส่วนธาตุสังกะสีซึ่งก็ช่วยกำจัดอนุมูลอิสระได้เช่นกัน พบปริมาณสูงสุด 6.58-6.86 มก/ลิตร ในน้ำหมักชีวภาพจากถั่วเหลืองและข้าวกล้อง ซึ่งน่าจะกล่าวได้ว่าพวกธัญพืชอุดมด้วยธาตุสังกะสีเมื่อเปรียบเทียบกับพืชอื่นๆ ที่ตรวจสอบด้วยกัน โดยร่างกายต้องการสังกะสี 15 มก/วัน และปริมาณสูงสุดที่ยอมให้มีได้ในน้ำดื่มหรือเครื่องดื่มคือ 5 มก/ลิตร (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 214 และ 234) ขณะที่โพแทสเซียมพบในปริมาณสูงในน้ำหมักชีวภาพจากพืชหลายชนิด เช่น กล้วยน้ำว้า ลูกยอป่า ถั่วเหลือง ตะไคร้ เปลือกมังคุด โดยมีปริมาณ 1290-1680 มก/ลิตร ซึ่งร่างกายต้องการ 2-4 กรัม/วัน (ปาหนัน, 2530) และสำหรับธาตุโซเดียมซึ่งถ้ามีมากเกินไปย่อมส่งผลเสียต่อสุขภาพ โดยร่างกายต้องการ 1-3 กรัม/วัน ซึ่งพบปริมาณสูงสุด 971 มก/ลิตร ในสาหร่ายเขียวสกัดซึ่งเป็นพืชน้ำเค็ม และรองลงมาในใบทำมัง 503 มก/

ลิตร ซึ่งถือว่ามีค่าโซเดียมสูงสำหรับพืชบกเมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่นๆ ที่นำมาตรวจสอบ จากผลดังกล่าวจึงจำเป็นที่จะต้องกำหนดปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการบริโภคน้ำหมักชีวภาพแต่ละชนิดต่อวัน และเป็นเหตุผลที่ภาครัฐควรหาข้อมูลเพื่อช่วยแนะนำชุนชนผู้ผลิต

2. ผลของการหมักต่อคุณลักษณะของน้ำหมักชีวภาพจากพืช

ส่วนใหญ่ของน้ำหมักชีวภาพจากพืชที่นำมาตรวจสอบ พบว่าได้น้ำหมักที่มีคุณลักษณะที่น่าพึงพอใจคือตรวจไม่พบ total colicorms และ *E. coli* ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ตรวจไม่มีการปนเปื้อนด้วยสิ่งสกปรก เช่น ดิน รวมถึงอุจจาระของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น และผลิตภัณฑ์มีลักษณะของน้ำหมักแสดงถึงการควบคุมสภาพการหมักได้ดี คือมีการจำกัดปริมาณอากาศให้น้อย และผลจากการเจริญของจุลินทรีย์ในที่จำกัดปริมาณอากาศแล้วเกิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ทำให้เกิดสภาพไร้อากาศ และเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่มีการเติมเกลือ แต่มีการเติมน้ำตาลสูงประมาณ 10% โดยปริมาตร ซึ่งเป็นสภาวะที่ส่งเสริมการเจริญของแลกติกแอสิดแบคทีเรีย แล้วเกิดกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลกติก และกรดอะซิติก รวมทั้งเอทานอล ผลของการเกิดสารประกอบเหล่านี้เป็นการถนอมอาหารทำให้ได้น้ำหมักชีวภาพ และความเป็นกรดที่เกิดขึ้นทำให้น้ำหมักชีวภาพมีรสเปรี้ยวนำ เช่น กล้วย ลูกยอป่า และถั่วเหลือง ซึ่งมีปริมาณกรดทั้งหมดระหว่าง 5.39-7.13% (Table 2 and 3) และปริมาณกรดก็ขึ้นอยู่กับอายุการหมัก เช่น ของกล้วยน้ำว้ามีอายุการหมัก 3 ปี (TA 7.13) ตามมาด้วยลูกยอป่าที่มีอายุการหมัก 6 เดือน (TA 5.76) และถั่วเหลือง 3 เดือน (TA 5.39) ขณะที่น้ำหมักชีวภาพจากชะมวงมีความเป็นกรดต่ำสุดเพียง 0.98% เพราะอายุการหมักไม่ถึง 3 เดือน และอีกเหตุผลหนึ่งสำหรับความเป็นกรดต่ำ อาจเป็นเพราะมีปริมาณน้ำตาลต่ำก็เป็นได้ (เหลือเพียง 0.21% Table 3) ทั้งนี้เนื่องจากใบชะมวงไม่ได้เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีเมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่นๆ เช่น กล้วย หรือถั่วเหลือง (เพราะมีการเติมน้ำตาลเท่ากัน) หรืออาจเป็นเพราะใบชะมวงมีสารที่ยับยั้งการเจริญของแลกติกแอสิดแบคทีเรีย ความเป็นกรดที่เกิดขึ้นในน้ำหมักชีวภาพที่ตรวจสอบสอดคล้องกับสภาพ pH ของน้ำหมักชีวภาพ ซึ่งพบว่าน้ำหมักมีค่า pH อยู่ในช่วง 2.63-3.72 (Table 3) ซึ่งสภาพความเป็นกรดสูง และมี pH ต่ำกว่า 4.00 สามารถป้องกันการเจริญของ *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* (Banwart, 1989) ที่อาจปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Finished product) ได้

การนำพืชผักผลไม้มาหมักโดยที่ไม่ใช้เกลือภายใต้สภาพไร้อากาศแล้วเกิดการหมักโดยแลกติกแอสิดแบคทีเรียพบแพร่หลายพอสมควร เช่น ในประเทศเกาหลี เวียดนาม เนปาล ประเทศแถบแปซิฟิกตอนใต้ และในอัฟริกา เช่น เอธิโอเปีย โดยการหมักในภาชนะปิด เช่น การหมักหัวผักกาด หรือกล้วย ทำให้ pH ลดลงจาก 6.7 เป็น 3.2-3.7 และสามารถเก็บผลิตภัณฑ์สุดท้ายไว้ได้นานจากกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้น โดยเฉพาะกรดแลกติก ซึ่งผลก็สอดคล้องกับน้ำหมักชีวภาพที่ศึกษา และการทำผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำหมักจากพืชผักผลไม้ต้องเติมน้ำตาล 1 ใน 3 ถึงครึ่งหนึ่งของน้ำหนักพืชที่ใช้ แต่การทำน้ำหมักนี้ในประเทศเกาหลีและเวียดนามนิยมใช้เพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืช

ด้วยการจำกัดปริมาณอากาศและมีน้ำตาลปริมาณสูงรวมทั้งมีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ควรมีบทบาทหลักในการเกิดน้ำหมักชีวภาพจากพืชคือ แลกติกแอสิดแบคทีเรียซึ่งอาจเป็นกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งหรือทั้งสองคือ กลุ่ม homofermentors ที่ผลิตเฉพาะกรดแลกติกจากน้ำตาล (2 โมลของกรดแลกติกจาก 1 โมล กลูโคส) โดย Embden-Meyerhof pathway: EMP หรือ Heterofermentors ซึ่งผลิตกรดแลกติก 50% และ 25% เป็นกรดอะซิติกและเอทานอล และอีก 25% เป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ โดย 6-phosphogluconate (Phosphoketolase pathway) (Moat and Foster, 1995) อย่างไรก็ตามด้วยสภาพการหมักดังกล่าวยีสต์ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบก็สามารถเจริญได้เช่นกัน โดยเฉพาะช่วงต้นที่มีปริมาณอากาศอยู่ส่งเสริมให้ยีสต์เจริญ และต่อมาเป็นสภาพที่ไม่มีอากาศทำให้ยีสต์ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบผลิตเอทานอลได้เป็นอย่างดี เพราะยีสต์ใช้น้ำตาลซูโครสผลิตเอทานอลโดยวิถี EMP ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สุดท้ายจาก Table 4 จึงสันนิษฐานว่าน้ำหมักชีวภาพจากบัวบกจุลินทรีย์ที่มีบทบาทหลักน่าจะเป็นแลกติกแอสิดแบคทีเรียซึ่งอาจมียีสต์ปนเปื้อนบ้าง ขณะที่น้ำหมักชีวภาพจากกล้วย เปลือกมังคุด ไม่น่าจะมีการปนเปื้อนด้วยยีสต์เพราะมีปริมาณเอทานอลต่ำ (0.49-

0.57%) และน้ำหมักชีวภาพจากลูกยอและลูกยอป่าไม่มีการปนเปื้อนด้วยยีสต์เพราะปริมาณเอทานอลต่ำมากเพียง 0.03-0.05% แต่สำหรับน้ำหมักชีวภาพที่เหลือคือ เสาวรส ถั่วเหลือง สาหร่ายเขียวสกัด ชะมวง และข้าวกล้อง มีการปนเปื้อนด้วยยีสต์ปริมาณสูงในระหว่างการหมักเพราะมีปริมาณเอทานอลสูงมาก (1.35-3.32%) เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณกรดแลกติก และอะซิติก (0.18-2.23%) นอกจากนี้ยังพบยีสต์เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายของน้ำหมักเหล่านี้ในปริมาณที่สูงเช่นกัน (Table 6)

กรณีที่กรดแลกติกและอะซิติกเมื่อรวมกันแล้วมีปริมาณต่ำกว่าค่ากรดทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ สาเหตุหนึ่งน่ามาจากการเกิดกรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ด้วย เช่น กรดโพรพิโอนิก และกรดฟอร์มิก ดังเช่นการศึกษาการทำกะหล่ำปลีดอง (Sauerkraut) ซึ่งเป็นบทบาทของแลกติกแอสิดแบคทีเรีย ก็พบว่านอกจากจะมีกรดแลกติกเป็นหลักแล้ว ก็มีส่วนรองที่เป็นกรดอะซิติก และโพรพิโอนิก นอกจากนี้กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นก็มีการรวมกับแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นทำให้ได้เอสเตอร์ ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นรสที่เฉพาะกับกะหล่ำปลีดอง (Battcock and Azam-Ali, 1998) ซึ่งปรากฏการณ์เหล่านี้ก็อาจเกิดขึ้นได้กับน้ำหมักชีวภาพที่ศึกษาดัง Table 2 ก็พบลักษณะกลิ่นรสที่เฉพาะเช่นกัน ส่วนในกรณีที่น้ำหมักชีวภาพจากข้าวกล้องมีปริมาณกรดอะซิติกมากกว่าแลกติกถึง 1% อาจเป็นเพราะมียีสต์ที่สร้างกรดเจริญร่วม ซึ่งยีสต์นี้ก็สามารถสร้างกรดอะซีติก (Geros *et al*., 2000; Freer, 2002) และก็พบยีสต์ในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวสูงถึง $3.4\ x10^2$ CFU/ml (Table 6)

สำหรับตัวอย่างที่พบเชื้อราในปริมาณสูงสุด $4.0x\ 10^2$ CFU/ml คือ ตะไคร้ส่งผลให้มีกลิ่นเหม็น (Table 2 and 6) การที่พบเชื้อราในผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เหลือน้ำตาลเพียง 0.44% และมีปริมาณกรดอยู่ 3.17% โดยที่ pH 3.72 สูงกว่าน้ำหมักชีวภาพอื่นๆ ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 2.63-3.60 เพราะเชื้อราใช้กรดเพื่อการเจริญแสดงถึงการปนเปื้อนด้วยเชื้อราภายหลัง ซึ่งมักพบได้เสมอสำหรับผลิตภัณฑ์หมักที่มีความเป็นกรดสูงและมีการบรรจุหรือเก็บรักษาไม่ดีพอส่งผลให้ผลิตภัณฑ์เน่าเสีย (Frazier and Westhoff, 1988; Jay, 2000)

การพบเมทานอลในน้ำหมักชีวภาพเป็นสาเหตุที่ทำให้ต้องใส่ใจกับปริมาณที่พบซึ่งขณะนี้ยังไม่มีการกำหนดค่ากับผลิตภัณฑ์น้ำหมักชีวภาพ มีแต่การกำหนดมาตรฐานในสุราแช่ไม่เกิน 0.42% (มอก.2089 2544) และข้อสังเกตที่ได้จากการวิจัยนี้พบว่าการเกิดเมทานอลเป็นปัจจัยร่วมระหว่างการหมักและพืชที่ใช้ ซึ่งสามารถอธิบายได้เนื่องจากพืชมีเพคติน (pectin) ที่เป็นสารประกอบพวก Poly-β-1, 4-D-galacturonic acid ที่มีเมทิลเป็นส่วนประกอบอยู่สูง สารประกอบนี้เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของผนังเซลล์พืช (Moat and Foster, 1995) มีแบคทีเรียหลายชนิดที่ย่อยสลายเพคตินได้ เช่น *Erwinia carotovara E. chrysanthemi* รวมทั้งยีสต์เช่น *Rhodotorula glutinis* และ *R. rubra* โดยใช้เอนไซม์ pectin methylesterase เพื่อตัด methoxyl group ออกมาอยู่ในรูปเมทานอล และได้ poly-galacturonate และ H^+ (Moat and Foster, 1995; Whittaker, 1990) น้ำหมักชีวภาพจากเสาวรสมีปริมาณเมทานอลสูงสุด 0.084% และเอทานอลก็สูงสุดเช่นกัน 3.32% ซึ่งถือได้ว่าปลอดภัยจากเมทานอลเพราะปริมาณเอทานอลต้องมีอย่างน้อยเป็น 5 เท่าของเมทานอลเพื่อแข่งขันกันในการจับกับเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) ที่สลายเมทานอลให้เป็นกรดฟอร์มิก (formic acid) และฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ตาบอดและตายได้ (ไมตรี, 2545; www.objectssearch.com)

สรุปผล

การกำหนดลักษณะน้ำหมักชีวภาพจากพืชโดยอาศัยการตรวจสอบทางประสาทสัมผัสคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพ จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง และคุณภาพทางจุลชีววิทยา พบว่าแทบทุกตัวอย่างมีลักษณะที่ปรากฏจัดได้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์หมัก มีความน่าบริโภคมากน้อยต่างกันไป สภาวะที่เป็นกรดมี pH ที่ต่ำ และน้ำตาลน้อยเป็นปัจจัยรักษาผลิตภัณฑ์ไว้ได้ และจากตัวอย่างน้ำหมักที่เก็บมาวิเคราะห์พบว่าทุกตัวอย่างผ่านเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาในส่วนของ total coliforms และ *E. coli* และตัวอย่างส่วนหนึ่งพบว่าอยู่ในสภาพที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์ แต่ก็มีหลายตัวอย่างที่ยังตรวจพบยีสต์ และราในปริมาณที่มากน้อยต่างกันไป ซึ่งขณะนี้ยังไม่มีการกำหนดมาตรฐานกับน้ำหมักชีวภาพ แต่ถ้าเทียบกับเกณฑ์ของกองวิเคราะห์

อาหารพบว่าในตัวอย่างดังกล่าวส่วนใหญ่ยังมียีสต์เกินมาตรฐานที่กำหนด และมีอยู่ 1 ตัวอย่างที่น่าวิตกคือปริมาณเชื้อราสูงมาก ส่วนแร่ธาตุ (ทองแดง สังกะสี โพแทสเซียม และโซเดียม) ขึ้นกับประเภทของพืชที่ใช้ และจากข้อมูลที่ได้การศึกษาปริมาณที่ควรบริโภคในแต่ละวันเป็นสิ่งที่ควรกำหนด และชุมชนผู้ผลิตต้องเลือกชนิดของพืชที่มีการใช้บริโภคมาผลิตในแง่ความปลอดภัย สำหรับปริมาณแอลกอฮอล์มีความผันแปรของทั้งเอทานอล และปริมาณเมทานอล โดยปริมาณที่ตรวจพบยังจัดอยู่ในเกณฑ์ที่ปลอดภัย โดยที่การเกิดเมทานอลพบว่าเป็นปัจจัยร่วมระหว่างการหมักกับพืชที่ใช้ จากที่กล่าวมาการเลือกชนิดของพืชที่นำมาหมักและการควบคุมกระบวนการหมักเป็นสิ่งจำเป็น ตลอดจนสุขาภิบาลของการผลิต ดังนั้นต้องมีการกำหนดมาตรฐานชุมชนของน้ำหมักชีวภาพ และการศึกษาวิจัยในประเด็นที่กล่าวมาเพื่อให้ได้องค์ความรู้ในการถ่ายทอดให้ชุมชนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่สนับสนุนทุนการวิจัย และขอขอบคุณ รศ.พิมพรรณ ตันสกุล และ ผศ.ช่อทิพย์ ปุรินทรวรกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับความช่วยเหลือในชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชที่ใช้ทำน้ำหมัก และท้ายสุดขอขอบคุณชุมชนผู้ผลิตน้ำหมักชีวภาพจากแหล่งต่างๆ ของประเทศ โดยเฉพาะในภาคใต้

เอกสารอ้างอิง

กองวิเคราะห์อาหาร. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. กระทรวงสาธารณสุข. เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. กรุงเทพมหานคร.

จันทิมา จาปะเกษตร์. 2546. ดื่มน้ำลูกยอ...ดีจริงหรือ? ว.อาหาร. 33(1): 28-29.

ดวงพร คันธโชติ และ ไกรสร พุ่มพวง. 2538. ศึกษาส่วนประกอบและสภาวะที่เหมาะสมของการทำกิมจิ: บทบาทของแลกติกแอสิด แบคทีเรีย ว. วิจัยและพัฒนา สจ.ธ. 18(2): 59-74.

ดวงพร คันธโชติ และ นาตยา ทับกะแดะ. 2538. การศึกษาส่วนผสมที่เหมาะสมและบทบาทของแลคติคแอสิดแบคทีเรียในแตงกวาดองหวาน. ว. วิจัย และพัฒนา สจธ. 18(2): 77-92.

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 214) พ.ศ. 2543. เรื่องเครื่องดื่มในภาชนะที่ปิดสนิท.

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 230) พ.ศ. 2544. เรื่องเครื่องดื่มในภาชนะที่ปิดสนิท (ฉบับที่ 2).

ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม. 2544. กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมสุราแช่. มอก. 2089-2544. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. กระทรวงอุตสาหกรรม.

ปาหนัน บุญ-หลง. 2530. โภชนาการ. พิมพ์ครั้งที่ 4 เชียงใหม่: สำนักพิมพ์ปอง.

ไมตรี สุทธจิตต์. 2545. ระดับของเมทานอลในอาหารและเครื่องดื่ม. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

เสาวนีย์ จักรพิทักษ์. 2532. หลักโภชนาการปัจจุบัน. พิมพ์ครั้งที่ 4 กรุงเทพ. ไทยวัฒนาพานิชจำกัด.

ศูนย์ฝึกอบรมและพัฒนาการสาธารณสุขมูลฐาน (ศูนย์ สสม). ขอนแก่น. 2545. รายงานผลการตรวจน้ำหมักชีวภาพและการใช้เป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ. เอกสารแจกในการประชุมเชิงปฏิบัติการจัดทำโครงร่างการวิจัยน้ำหมักชีวภาพหัวน้ำผลไม้เข้มข้นที่สกัดด้วยวิธีธรรมชาติ และผลต่อการบริโภค. 22-23 เมษายน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists 15th ed. Vol II. The Association of Official Analytical Chemists, Inc. USA.

AOAC. 1992. Food and Drug Administration: Bacteriological Analytical Manual 7th ed. AOAC International, Arlington.

APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 19th ed. American Public Health Association. Washington DC.

Banwart, G.J. 1989. Basic Food Microbiology 2nd ed. Chapman & Hall, New York.

Battcock, M. and Azam-Ali, S. 1998. Fermented fruits and vegetables: A global perspective. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome. FAO Agricultural Services Bulletin. No. 14. 134.

Dubois, M., Gilles, K.A. Hamilton, J.K. Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Phenol-sulfuric total sugar. Anal. Chem. 28: 350.

Frazier, W.C. and Westhoff, D.C. 1988. Food Microbiology. 4th ed. McGraw-Hill Co. New York.

Freer, S.N. 2002. Acetic acid production by Dekkera/brettanomyces yeasts. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 18: 271-275.

Geros, H. Azevedo, M.M. and Cassio, F. 2000. Biochemical studies on the production of acetic acid by the yeast *Dekkera anomala*. Food. Technol. Biotechnol. 38(1): 59-62.

Jay, J.M. 2000. Modern Food Microbiology 6th ed. Chapman & Hall. Melbourne.

Meilgaard, M., Civille, G.V. and Carr, B.T. 1998. Sensory Evaluation Techniques. 2nd. Ed. CRC Press, Inc. Boca Raton.

Moat, A.G. and Foster, J. W. 1995. Microbial Physiology 3rd. ed. A John Wiley & Sons, INC., Publication, New York.

Whittaker, J.R. 1990. Microbial pectolytic enzymes. **In**: Microbial Enzymes and Biotechnology 2nd ed. Eds. W.M. Fogarty and C.T. Kelly. Elsevier Applied Science. London.

Windholz, M. 1976. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals and Drugs. 9th ed. MERCK & CO., INC. Rahway.

Yang, M. and Y. Choong. 2001. A rapid gas chromatographic method for direct determination of short-chain (C1-C12) volatile organic acids in foods. Food Chemistry. 75: 327-331.