บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีบางประการของน้ำผึ้งและน้ำองุ่นที่ใช้เป็นวัตถุดิบ

น้ำผึ้งที่ใช้เป็นวัตถุดิบในงานวิจัยนี้มี 4ชนิด คือ น้ำผึ้งจากดอกสาบเสือ(Snake Root, Eupatorium odoratum Linn.) น้ำผึ้งจากดอกนุ่น (Kapok,Bombax ceiba Linn.)น้ำผึ้งจากดอกลิ้นจี่ (Lychee, Litchi chinensis sonn.) และ น้ำผึ้งจากดอกลำไย (Longan, Dimocarpus longan Lour.) ซึ่งทุกตัวอย่างเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำน้ำผึ้งเหล่านั้นมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีบางประการ (ตารางที่ 5) พบว่า น้ำผึ้งทุกชนิดนี้มีค่าองค์ประกอบทางเคมีที่ทำการวิเคราะห์ใกล้เคียงกัน และผลจากการวิเคราะห์ของน้ำผึ้งทุกชนิดดังกล่าวข้างต้นสอดคล้องกับผลการทดลองของ สมบูรณ์ เตชัญญวรากุล (2536) และ มณัญญา สมบูรณ์ทรัพย์ (2537) และพบว่า องค์ประกอบทางเคมีของน้ำผึ้งแต่ละชนิดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของ Codex Alimentarius (1969) ซึ่งมาตรฐานของน้ำผึ้งในแต่ละประเทศนั้นอาจมีรายละเอียดแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับ สภาพดินฟ้าอากาศ ความนิยมในการบริโภค และพืชที่ใช้เป็นแหล่งน้ำหวาน (โดยทั่ว ๆ ไปแล้ว มาตรฐานของน้ำผึ้งนั้นจะระบุถึง ปริมาณน้ำในน้ำผึ้ง องค์ประกอบทางเคมี สี และกลิ่นรสของน้ำผึ้ง)

สำหรับตัวแทนของน้ำผลไม้ที่เลือกมาใช้ในการศึกษาใน เรื่องความใสในงานวิจัยนี้ คือ น้ำองุ่น ด้วยเหตุผลที่ว่า องุ่นเป็นผลไม้ที่มีการปลูกในประเทศไทย หาได้ไม่ยาก ราคาไม่แพงมาก กรรมวิธีการทำน้ำองุ่นก็ไม่ซับซ้อน และที่สำคัญคือ มีสารแทนนิน ซึ่งมีความสำคัญในงานวิจัยนี้ (สามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงในแต่ละขั้นตอนของการทำให้ใสได้อย่างชัดเจน) สำหรับผลการวิเคราะห์น้ำองุ่น แสดงดังตารางที่ 6

ศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการที่แตกต่างกันในการหาปริมาณโปรตีน

เนื่องจากโปรตีนที่พบในน้ำผึ้งมีปริมาณน้อย การพิจารณาเลือกวิธีการวัดโปรตีนที่เหมาะ

สมจึงมีความสำคัญมาก เป็นพิเศษ วิธีการวัดปริมาณโปรตีนมีหลายวิธีด้วยกัน ซึ่งแต่ละวิธีมีช่วงความไว (sensitivity) แตกต่างกันไป การวัดปริมาณโปรตีนในน้ำผึ้งสามารถวัดได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม สำหรับวิธีการวัดทางอ้อม เช่น วิธี Kjeldahl ซึ่งอาศัยหลักการหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง และเปลี่ยนค่าไนโตรเจนที่ได้เป็นค่าโปรตีน โดยใช้ค่าคงที่ตัวหนึ่งเป็นตัวคูณ แต่ค่าโปรตีนที่คำนวณได้หยาบ เนื่องจากมีสารประกอบชนิดอื่น เช่นกรดนิวคลีอิคเจือปนอยู่ (ชุติมา และธวัชชัย,2532;ชวนพิศ ดีเอกนามกูล,2536) ส่วนวิธีทางตรงนั้นมีหลายวิธี เช่น วิธี uv-absorption และวิธี Lowry ซึ่งวิธีแรกนั้นเป็นวิธีการวัดที่ค่อนข้างหยาบ แต่ก็มีประโยชน์ในแง่สามารถประมาณโปรตีนเริ่มต้นได้อย่างเร็ว ส่วนวิธีที่สองนั้นเป็นวิธีที่นิยมมาใช้มากที่สุด เนื่องจากค่าที่วัดได้โดยวิธีนี้มีความถูกต้องและเชื่อถือได้ สารประกอบที่เจือปนที่วัดได้ด้วยวิธีนี้มีน้อยกว่าวิธีแรก (ชวนพิศ ดีเอกนามกูล,2536)

ดังนั้นจุดประสงค์ของงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาวิธีการวัดปริมาณโปรตีนต่างกัน 3 วิธีคือ วิธี uv-absorption,Lowry และ Kjeldahl และเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่วัดได้ในแต่ละวิธี เพื่อเลือกวิธีที่เหมาะสมที่สุด

จากตารางที่ 7 เมื่อพิจารณาจากค่าปริมาณโปรตีนที่สูญเสียไปในการทำ dialysis ของน้ำผึ้งทั้ง 4 ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และ น้ำผึ้งนุ่น พบว่าน้ำผึ้งแต่ละชนิดมีค่าการสูญเสีย (loss) โปรตีนในช่วงร้อยละ 58-69 ซึ่งแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำผึ้ง และค่าโปรตีนที่สูญเสียไปมากกว่าครึ่งหนึ่งนี้ อาจเป็นสารประกอบชนิดอื่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น กรดอะมิโน โปรตีน และ เอนไซม์บางชนิด ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 12000 ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานของ White และ Kushnir (1967) และ White และ Rudyi(1978) และ Lee และคณะ (1985,1990)

จากตารางที่ 8 เมื่อเปรียบเทียบวิธีการวัดปริมาณโปรตีนหลังการทำ dialysis 2วิธี คือ uv-absorption และวิธี Lowry พบว่า วิธี uv-absorption เป็นวิธีที่ให้ค่าปริมาณโปรตีนสูงกว่าวิธี Lowry ซึ่งเหตุผลที่เป็นเช่นนี้ White และ Kushnir (1967) อธิบายไว้ว่า การหาค่าปริมาณโปรตีนโดยวิธี uv-absorption เป็นวิธีการวัดโปรตีนที่ความยาวคลื่น 260 นม. และ 280 นม. นี้สารประกอบบางชนิดรวมถึงส่วนที่ไม่ใช่โปรตีน เช่น กรดอะมิโนบางชนิด และกรดนิวคลีอิคบางชนิดสามารถดูดกลืนแสงได้ดีในช่วงนี้ด้วย (Lillevik,1970;Regenstein, 1984;Bollag and Edelstein,1991;ชวนพิศ ดีเอกนามกูล,2536) จึงทำให้ค่าที่ได้มีค่าสูง

เกินความจริง ซึ่งก็เป็นข้อเสียของวิธีการนี้ และเนื่องจากวิธีการ Lowry และ Kjeldahl ให้ค่าปริมาณโปรตีนที่ไม่แตกต่างกันมาก (ตารางที่ 7 และ ตารางที่ 8) ดังนั้นจึงเลือกวิธี Lowry เป็นวิธีที่เหมาะสมและเชื่อถือได้มากที่สุด เนื่องจาก วิธีดังกล่าวนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่าวิธีของ Kjeldahl และเป็นวิธีที่นิยมมาใช้กันมากในการหาปริมาณโปรตีน ความผันแปรระหว่างชนิดของโปรตีนมีน้อยกว่า ผลการทดลองที่ได้มีความถูกต้องเชื่อถือได้ (Lillevik,1970 ; Regenstein,1984; Bollag and Edelstein,1991;ชวนพิศ ดีเอกนามกูล,2536)

จากตารางที่ 9 จะเห็นได้ว่าผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณโปรตีนในน้ำผึ้งก่อนการทำ dialysis พบว่า วิธีการที่ใช้วัดปริมาณโปรตีนมีผลต่อน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลอง ($P\leq0.05$) แสดงว่า น้ำผึ้งแต่ละชนิดมีปริมาณโปรตีนต่างกัน และสามารถใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงความแตกต่างของแหล่งกำเนิดของน้ำผึ้งได้

จากตารางที่ 10-11 จะเห็นได้ว่าผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณโปรตีนในน้ำผึ้งหลังการทำ dialysis พบว่า วิธีการที่ใช้วัดปริมาณโปรตีนในน้ำผึ้งที่ผ่านการทำdialysis มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P\leq0.05$) ส่วนชนิดของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลองทั้ง 4 ชนิด พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

จากตารางที่ 12-13 จะเห็นได้ว่าผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณโปรตีนในน้ำผึ้งก่อนและหลังการทำ dialysis นั้นพบว่า วิธีการวัดปริมาณโปรตีนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$) ส่วนชนิดของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลองทั้ง 4 ชนิด พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนก่อนการทำ dialysis และหลังการทำ dialysis จะเห็นได้ว่าปริมาณโปรตีนหลังการทำ dialysis ของน้ำผึ้งทุกชนิดมีค่าน้อยกว่าปริมาณโปรตีนก่อนการทำ dialysis ประมาณ 3เท่า และผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับงานของ White และ Kushnir(1967) และ White และ Rudyi (1978)และ Lee และคณะ (1985,1990)

ศึกษารูปแบบและสมบัติของโปรตีนโดยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis และ วิธี sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoreis

เนื่องจากองค์ประกอบที่พบในน้ำผึ้งโดยส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลถึงประมาณร้อยละ 80 มี

โปรตีนในปริมาณน้อย คือประมาณร้อยละ 0.3-0.4 (สิริวัฒน์ และเพ็ญศรี,2529) ซึ่งยากต่อการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ได้ ดังนั้นวิธีการหนึ่งที่เป็นไปได้ คือ การกำจัดน้ำตาลออก ซึ่งวิธีการดังกล่าวมีหลายวิธี เช่น dialysis,ultrafiltration และ column chromatography (Bergner and Diemair,1975; White and Kushmir,1967; White and Kushmir,1978 ; Lee et al.,1985 ;Croft,Mistry,and Washington,1986 ;Stadelmeier and Bergner, 1986;Lee et al.,1990) และเนื่องจากวิธีการดังกล่าวข้างต้นค่อนข้างซับซ้อน และเสียเวลานาน ดังนั้น เราสามารถหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าวโดยใช้วิธี electrophoresis ซึ่งวิธีนี้จัดได้ว่าเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมมาใช้กันมาก เนื่องจากวิธีนี้ มีความสะดวก รวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่าย และที่สำคัญ คือ ให้ผลแน่นอนเชื่อถือได้ (Regenstein,1984;Bollag and Edelstein,1991) และ สำหรับวิธีนี้สามารถพิสูจน์ความบริสุทธิ์ของโปรตีนได้ สามารถแยกองค์ประกอบของโปรตีนที่ซับซ้อนได้ (Regenstein,1984) โดยการเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้งที่ผ่านการทำให้เข้มข้น (unconcentrated) โดยการตรวจสอบปริมาณโปรตีนในน้ำผึ้งที่มีปริมาณเล็กน้อย (trace)โดยเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบปริมาณโปรตีน 2 วิธี คือ วิธี ammonical silver staining และวิธี non-ammonical silver staining (Kerenyi and Gallyas,1972;Switzer, Merril,and Shifrin,1979;Marshall and Williams,1987;Hames and Rickwood, 1990) เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแยกที่ได้ว่า มีความชัดเจนแตกต่างกันมากน้อยเพียงใด และเนื่องจากวิธีการดังกล่าวนี้จัดได้ว่าเป็นวิธีที่มีความไวสูงกว่าวิธีการของcoomassie Brilliant blue R-250 ถึงประมาณ 100 เท่า (Switzer,Merril,and Shifrin,1979; Bollag and Edelstein,1991)สามารถ ตรวจสอบปริมาณโปรตีนได้ในปริมาณเล็กน้อยได้ในช่วง 2-10 นก./แถบ (Giulian et al.,1983)ในขณะที่วิธีการ coomassie brilliant blue R-250 สามารถตรวจสอบโปรตีนได้ในช่วง 0.1-1.0ไมโครกรัม/แถบ (Smith,1984) สำหรับวิธีการดังกล่าวที่ใช้ในการศึกษาในงานวิจัยนี้มี 2 วิธีคือ

-polyacrylamide gel electrophoresis

วิธีนี้ใช้ในการศึกษารูปแบบโปรตีนในรูปธรรมชาติ (native protein) ที่พบในน้ำผึ้ง สำหรับตัวกลางที่เหมาะสมที่ใช้ในการศึกษามีหลายชนิด เช่น เซลลูโลสอะซิเตท แป้ง อะคริลาไมด์

(Heftmann,1975;วิรัช ว่องพัฒนกุล,2531;อาภัสสรา ชมิดท์,2537) สำหรับงานวิจัยนี้ได้เลือกเจลชนิดอะคริลาไมด์เจลมาเป็นตัวกลางในการแยก ซึ่งข้อดีของการเลือกใช้เจลชนิดนี้เมื่อเปรียบเทียบกับเจลชนิดอื่น เช่น เจลแป้ง คือ สามารถเตรียมเจลได้ในช่วงความเข้มข้นกว้าง(ร้อยละ 3-30) โครงสร้างของเจลที่เตรียมได้ให้รูปแบบการแยกที่ดี เจลที่เตรียมได้มีลักษณะโปร่งแสงและเจลมีความคงตัว เก็บรักษาเจลได้ง่าย (Heftmann,1975;วิรัช ว่องพัฒนกุล,2531; อาภัสสรา ชมิดท์,2537) ซึ่งอ้างอิงจากงานวิจัยของ Lee และคณะ (1985,1990)

ในการตรวจสอบปริมาณโปรตีนในน้ำผึ้งภายหลังการทำโดย electrophoresisเทียบกับโปรตีนมาตรฐานโดยใช้วิธี coomassie blue staining พบว่า ไม่สามารถใช้วิธีนี้ในการตรวจสอบปริมาณโปรตีนได้ เนื่องจาก มีช่วงความไวต่ำกว่า (Hames and Rickwood,1990; Bollag and Edelstein,1991) ดังนั้นจึงได้เลือกใช้วิธี silver staining โดยเปรียบเทียบวิธีการย้อม 2 วิธี คือ วิธี ammonical silver staining และวิธี non- ammonical silver staining (Kerenyi and Gallyas,1972; Switzer,Merril,and Shifrin, 1979;Marshall and Williams,1987;Hames and Rickwood,1990) พบว่า วิธี non-ammonical silver staining ให้รูปแบบการแยกที่ชัดเจนกว่าวิธีของ ammonical silver staining โดยการเจือจางตัวอย่างด้วย sample buffer ประมาณ 10-20 เท่า เพื่อใช้ในการทำ polyacrylamide gel electrophoresis

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาโดยการแปรช่วงความเข้มข้นของเจล 3 ค่า คือร้อยละ 5,7.5 และ 10 และผลการทดลอง พบว่าที่ความเข้มข้นของเจลร้อยละ10 นี้เป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษา เนื่องจากในช่วงความเข้มข้นของเจลที่ต่ำกว่าร้อยละ 10 คือ ร้อยละ 5 และร้อยละ 7.5 นี้ ลักษณะของแถบโปรตีนที่ได้พบว่าแถบของโปรตีนแยกออกจากกันไม่ค่อยชัดเจน (Davis,1964;Bryan,1977;Hames and Rickwood,1990 ; Bollag and Edelstein, 1991)

จากรูปที่ 1 แสดงรูปแบบของโปรตีนที่แยกได้โดยใช้ตัวอย่างน้ำผึ้ง 4 ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งนุ่น พบว่า ลักษณะของแถบที่ได้มีจำนวนมาก และพบอยู่ในช่วงใกล้กันมาก ชนิดของโปรตีนในน้ำผึ้งที่ได้นี้อาจจะเป็นโปรตีนหรือเอนไซม์ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเล็กหรือขนาดใหญ่อยู่รวมกันได้ ซึ่งลักษณะของโปรตีนน่าจะเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนขนาดใหญ่ (complex molecule) ที่ประกอบด้วยเปปไทด์หลาย ๆ สายที่เรียงตัวกันอย่างหลวม ๆ หรือ

อาจเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนขนาดเล็กก็ได้ เมื่อพิจารณาจากน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลอง (ตารางที่ 14) พบว่า น้ำผึ้งสาบเสือและน้ำผึ้งบุ่น พบแถบที่มีลักษณะเข้ม 2 แถบคือ ที่ตำแหน่งค่า R_f เท่ากับ 0.28 และ R_f เท่ากับ 0.54 น้ำผึ้งลิ้นจี่ และน้ำผึ้งลำไย พบแถบที่มีลักษณะเข้ม 1 แถบ คือ ที่ตำแหน่งค่า R_f เท่ากับ 0.28 และมีข้อสังเกตว่า น้ำผึ้งทั้ง 4ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งบุ่นให้ลักษณะของแถบที่เข้มชัดเจนเหมือนกัน และมีปริมาณมาก คือที่ตำแหน่งค่า R_f เท่ากับ 0.28 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 58000 (จากรูปที่ 3) ซึ่งที่ตำแหน่งค่า R_fนี้ น่าจะเป็นแถบที่มีความสำคัญ ซึ่ง Lee และคณะ(1985,1990)ซึ่งได้ตั้งสมมติฐานไว้ว่า แถบของโปรตีนที่พบในช่วงค่า R_fเท่ากับ 0.20-0.30 ในช่วงนี้ มีลักษณะของแถบที่เข้ม และชัดเจนและมีปริมาณมาก ซึ่งน่าจะเป็นแถบที่มีความสำคัญต่อการทำน้ำนมเอบเบิ้ลให้เสถียร แถบที่พบที่ต่างกันนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งกำเนิดและชนิดของน้ำผึ้งที่ใช้ในการศึกษาด้วย อย่างไรก็ตามการศึกษาโดยวิธีนี้พบว่า โปรตีนที่พบในน้ำผึ้งนี้อยู่ในลักษณะธรรมชาติ ซึ่งวิธีนี้พบว่า ลักษณะการจัดเรียงตัวของโปรตีนจะมีการจัดเรียงตัวอย่างซับซ้อนภายในโมเลกุล ซึ่งทำให้การเปรียบเทียบความแตกต่างของลักษณะของแถบโปรตีนที่ได้เป็นไปได้ยาก โดยเฉพาะอย่าง จากผลการทดลองที่ได้จะเห็นได้ว่า โปรตีนที่พบอยู่ในช่วงโมเลกุลที่ใกล้เคียงกันมาก ซึ่งจะไม่สามารถแยกความแตกต่างทางรูปร่างหรือประจุของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ได้ คือ โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันอาจเคลื่อนที่ได้เท่ากันได้ วิธีนี้จึงไม่เหมาะสมสำหรับการหาความบริสุทธิ์ของโปรตีนหรือการหาน้ำหนักโมเลกุลได้ เพราะวิธีนี้ ไม่สามารถแยกได้ถึงผลของประจุโครงร่าง(Conformation) ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของโปรตีนได้ (พิณทิพ รื่นวงษา,2536; อาภัสสรา ชมิดท์,2537) ซึ่งเป็นข้อเสียของวิธีการนี้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิธีอื่นที่เหมาะสมเพื่อทำการเปรียบเทียบผลที่ได้ชัดเจนกว่านี้ เช่น sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis,gel filtration ซึ่งจะได้กล่าวในหัวข้อต่อไป

-sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis

สำหรับวิธีนี้ เป็นวิธีการที่ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่แยกได้ระหว่างขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน และค่า relative mobility แถบโปรตีนเพียงแถบเดียวที่ปรากฏสามารถบ่งบอกถึง ความบริสุทธิ์ของโปรตีนได้ นอกจากนี้วิธีนี้ยังเป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาและหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนหรือหน่วยย่อย

เมื่อใช้เทคนิคนี้ควบคู่กับวิธี gel filtration ก็จะทราบจำนวนหน่วยย่อยของโปรตีนนั้น ๆ (พิณทิพ รื่นวงษา, 2536)

วิธีการศึกษาทำนองเดียวกันกับวิธี polyacrylamide gel electrophoresis จากรูปที่ 2 แสดงรูปแบบของโปรตีนที่แยกได้ทำการศึกษาโดยใช้ตัวอย่างน้ำผึ้ง 4 ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งปุ่นโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ลักษณะของแถบที่ได้ของน้ำผึ้งทั้ง 4 ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งปุ่น จะเห็นได้ว่า น้ำผึ้งสาบเสือ พบแถบเข้ม 4 แถบ คือ ที่ R_f เท่ากับ 0.22 R_f เท่ากับ 0.58 R_f เท่ากับ 0.73 และ R_f เท่ากับ 0.80 น้ำผึ้งลิ้นจี่ พบแถบเข้ม 5 แถบ คือที่ R_f เท่ากับ 0.22 R_f เท่ากับ 0.38 R_f เท่ากับ 0.58 R_f เท่ากับ 0.73 และ R_f เท่ากับ 0.80 น้ำผึ้งลำไย พบแถบเข้ม 4 แถบ คือ R_f เท่ากับ 0.22 R_f เท่ากับ 0.38 R_f เท่ากับ 0.73 และ R_f เท่ากับ 0.80 และน้ำผึ้งปุ่น พบแถบเข้ม 5 แถบคือ ที่ R_f เท่ากับ 0.22 R_f เท่ากับ 0.41 R_f เท่ากับ 0.58 R_f เท่ากับ 0.73 และ R_f เท่ากับ 0.80 จากผลที่ได้สังเกตได้ว่า น้ำผึ้งทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองให้แถบเข้มที่ตำแหน่ง R_f เท่ากับ 0.22 ซึ่งแถบที่พบนี้ น่าจะมีความสำคัญที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใสได้ ซึ่งเมื่อนำค่า R_f ที่ได้นำไปหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ได้จากกราฟมาตรฐาน (ดังรูปที่ 4) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในน้ำผึ้งแต่ละชนิดเป็นดังนี้ คือ (ตารางที่ 16)

-น้ำผึ้งสาบเสือ ที่ R_f เท่ากับ 0.22 น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 57000 R_f เท่ากับ 0.58 น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35000 R_f เท่ากับ 0.73 น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27000 และ R_f เท่ากับ 0.80 น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 23000

-น้ำผึ้งลิ้นจี่ ที่ R_f เท่ากับ 0.22 น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 57000 R_f เท่ากับ 0.38 น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45000 R_f เท่ากับ 0.58 น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35000 R_f เท่ากับ 0.73 น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27000 และ R_f เท่ากับ 0.80 น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 23000

-น้ำผึ้งลำไย ที่ R_f เท่ากับ 0.22 น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 57000 และ R_f เท่ากับ 0.38 น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45000 R_f เท่ากับ 0.73 น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27000 และ R_f เท่ากับ 0.80 น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 23000

-น้ำผึ้งปุ่น ที่ R_f เท่ากับ 0.22 น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 57000 R_f เท่ากับ 0.41 น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 43000 และ R_f เท่ากับ 0.58 น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35000 R_f เท่ากับ 0.73 น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27000 และ R_f เท่ากับ 0.80 น้ำหนักโมเลกุลประมาณ

23000

และเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ในตอนนี้กับ วิธี polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าผลการทดลองสอดคล้องกัน ดังนี้ คือ

-น้ำผึ้งสาบเสือ พบแถบเข้ม 2 แถบ คือ R_fเท่ากับ 0.22 และ R_f เท่ากับ 0.58 ที่ตำแหน่งเดียวกัน

-น้ำผึ้งลิ้นจี่ พบแถบเข้ม 1 แถบ คือ R_f เท่ากับ 0.22 ที่ตำแหน่งเดียวกัน

-น้ำผึ้งลำไย พบแถบเข้ม 1 แถบ คือ R_fเท่ากับ 0.22 ที่ตำแหน่งเดียวกัน

-น้ำผึ้งนุ่น พบแถบเข้ม 2 แถบ คือ R_fเท่ากับ 0.22 และ R_fเท่ากับ 0.58 ที่ตำแหน่งเดียวกัน

จากผลการทดลองที่ได้ สามารถสรุปได้ว่า การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีนี้ค่าที่คำนวณได้ไม่แตกต่างกับวิธี polyacrylamide gel electrophoresis แถบที่เข้มน้อยที่มีปริมาณน้อย นอกจากนี้ การที่โมเลกุลของโปรตีนในน้ำผึ้งแต่ละชนิดให้แถบโปรตีนดิคสีเข้มที่ตำแหน่งเดียวกันนั้นเป็นการสนับสนุนผลการทดลองที่ได้ว่าลักษณะของโปรตีนที่พบนี้ควรเป็นโปรตีนชนิดเดียวกันที่มีคุณสมบัติเดียวกัน

เนื่องจากการเลือกความเข้มข้นของเจลให้เหมาะสม จะมีผลต่อรูปแบบการแยกของโปรตีนที่ได้ด้วย ซึ่งในช่วงความเข้มข้นของเจลที่สูงขึ้น จะเหมาะสำหรับการแยกโปรตีนที่มีช่วงน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับเจลที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า นั่นคือเจลที่มีความเข้มข้นต่ำจะเหมาะสมสำหรับการแยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง(Davis,1964;Bryan,1977;Hames and Rickwood,1990;Bollag and Edelstein,1991;อาภัสสรา ชมิดท์,2537) ทำให้การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนในช่วงดังกล่าวเป็นไปได้ยากขึ้น ดังนั้นในการทดลองนี้ได้เลือกความเข้มข้นของเจลร้อยละ 10เพื่อใช้ในการศึกษา ซึ่งในช่วงนี้เหมาะสำหรับแยกโปรตีนที่มีช่วงน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 15000-70000 (Hame,1981;อาภัสสรา ชมิดท์,2537) ซึ่ง เป็นช่วงน้ำหนักโมเลกุลที่พบในช่วงกว้างมาก และในช่วงนี้ให้รูปแบบการแยกที่ดี ดังนั้นค่า R_fและน้ำหนักโมเลกุลที่หาได้ในช่วงนี้มีความสำคัญ และผลการทดลองที่ได้ดังกล่าวสอดคล้องกับงานของ Marshall และ Williams (1987) เนื่องจากLee และคณะ (1985,1990)ได้ตั้งสมมติฐานว่าแถบโปรตีนในช่วงนี้มีลักษณะ เข้ม และมีปริมาณมากและมีน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งคาดว่า มีความสำคัญในการทำน้ำนอบเบิ้ลให้เสถียร แต่ยังไม่สามารถระบุได้อย่างแน่นอนว่าเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่าไร

ซึ่งการศึกษาโดยวิธีนี้บอกได้อย่างคร่าว ๆ ถึงลักษณะและรูปแบบการแยกที่ได้ แต่ยังไม่สามารถยืนยันได้อย่างแน่นอนว่าแถบที่ได้จากการศึกษามีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใสได้ จึงต้องทำการศึกษาวิธีการหามวลรวมเลกุลโดยวิธีอื่นเพื่อทำการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ เช่น วิธี gel filtration ดังหัวข้อต่อไป

ศึกษาวิธีการหามวลรวมเลกุลของโปรตีนโดยวิธี gel filtration

สำหรับวิธีนี้เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ในการศึกษาหามวลรวมเลกุลของโปรตีน และสามารถตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (พิมพ์ รื่นวงษา, 2536) สำหรับวิธีการหามวลรวมเลกุลในน้ำผึ้งนั้น White และ Kushnir(1967) ได้ศึกษาผลของขนาดตัวกลางที่ใช้คือ sephadex ที่มีขนาดต่างกัน 4ขนาด คือ sephadex G-25,G-50,G-100 และ G-200 ในสารละลาย0.01m.potassium phosphate buffer pH 6.5ซึ่งจากผลการทดลองสรุปได้ว่า sephadex G-200ให้ผลการแยกที่ดีที่สุด และเนื่องจาก sephadex G-200 นี้มีขนาดของ เจลมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่จึงทำให้โครงสร้างของ เม็ดเจลไม่แข็งแรง เปราะ และแตกหักได้ง่าย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึง เลือกใช้ sephadex G-150 เป็นตัวแทนในการศึกษา ซึ่งอ้างอิงจากงานวิจัยของ Lee และคณะ (1985,1990)

จากรูปที่ 5-8 จะเห็นได้ว่าน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลองทั้ง 4ชนิดคือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งนุ่น ให้รูปแบบการแยกที่เหมือนกัน พบว่า รูปแบบการแยกโปรตีนในน้ำผึ้งแต่ละชนิดสามารถแยกลำดับส่วน (fraction)ออกได้เป็น 3 ชนิด ให้ชื่อว่า ลำดับส่วน A, ลำดับส่วน B และ ลำดับส่วน C ตามลำดับ โดยที่ค่า A $_{280}$ ที่วัดได้จากลำดับส่วน A มีค่ามากที่สุด รองลงมาคือ ลำดับส่วน B และ ลำดับส่วน C ค่าที่ได้ไม่แตกต่างกัน สามารถวัดค่า elution volume (V_e) ของน้ำผึ้งแต่ละชนิดได้โดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน สามารถนำไปคำนวณหาค่า K_{av} และนำค่า K_{av}ที่คำนวณได้นี้เทียบหามวลรวมเลกุลของโปรตีนได้ดังกราฟรูปที่ 9 ดังนั้น จึงสามารถสรุปค่า K_{av} และมวลรวมเลกุลที่ได้จากลำดับส่วนทั้ง 3 ชนิด คือ ลำดับส่วน A, ลำดับส่วน B และ ลำดับส่วน C ดังตารางที่ 17

จากตารางที่ 17 จะเห็นได้ว่าค่า K_{av} และค่ามวลรวมเลกุลที่คำนวณได้จากลำดับส่วนทั้ง 3 ชนิด คือ ลำดับส่วน A,ลำดับส่วน B ลำดับส่วน C ในน้ำผึ้งแต่ละชนิดมีค่าที่แตกต่างกันไป

ค่า K_{av} ในน้ำผึ้งแต่ละชนิดอยู่ในช่วงประมาณ 0.40-0.90 โดยคิดเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล (ตารางที่ 18) ซึ่งค่า K_{av} ที่แตกต่างกันนี้ ทำให้มวลโมเลกุลที่คำนวณได้แตกต่างกันไป ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลอง มวลโมเลกุลที่คำนวณได้ในลำดับส่วน A, ลำดับส่วน B และลำดับส่วน C อยู่ในช่วงประมาณ 19000-43000 ดาลตัน ซึ่งค่ามวลโมเลกุลที่คำนวณได้ในแต่ละลำดับส่วนนี้มีความสำคัญ ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องงานของ White และ Kushnir(1967);Lee และคณะ (1985,1990) เนื่องจาก Lee(1984)ได้ทำการตั้งสมมติฐานไว้ว่าโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลสูงมีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสได้ ดังนั้นมวลโมเลกุลที่หาได้จากลำดับส่วนทั้ง 3 ชนิด คือ ลำดับส่วน A, ลำดับส่วน B และลำดับส่วน C ในน้ำผึ้งแต่ละชนิดซึ่งยังไม่สามารถสรุปได้ว่า เป็นโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลในช่วงไหน จึงต้องทำการทดสอบสมมติฐานดังกล่าวต่อไป

จากตารางที่ 19-20 เป็นผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ที่วัดได้โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นม. จากตารางพบว่าวิธีการที่ใช้วัดปริมาณโปรตีนมีผลต่อชนิดของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลองทั้ง 4 ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งนุ่น อย่างชัดเจน ($P \leq 0.05$)ซึ่งจากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า น้ำผึ้งต่างชนิดกันให้ค่าปริมาณโปรตีนแตกต่างกันกันไป ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงความแตกต่างของแหล่งกำเนิดของน้ำผึ้งได้

ศึกษาปฏิกิริยาระหว่างแทนนิน(ในรูปกรดแทนนิค) และโปรตีนในน้ำผึ้งที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส

จุดประสงค์ของการศึกษาในขั้นตอนนี้ เพื่อหาเวลา (นาที)ในแต่ละช่วงของการเปลี่ยนแปลงที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส และหาสภาวะที่เหมาะสมของการทดลอง โดยแปรความเข้มข้นของน้ำผึ้งต่างกัน 3ระดับ คือ ร้อยละ 0,3,6 และ 9 และ ชนิดของน้ำผึ้งต่างกัน 4 ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และ น้ำผึ้งนุ่น

<u>-ศึกษาเวลาในแต่ละช่วงของการทำน้ำองุ่นให้ใส</u>

จากรูปที่ 10-13 จะเห็นได้ว่าเมื่อแปรชนิดของน้ำผึ้ง 4 ชนิดคือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้ง

ลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งนุ่น และความเข้มข้นของน้ำผึ้ง 4 ระดับคือ ร้อยละ 0,3,6 และ 9 มีผลทำให้เวลาในแต่ละช่วงของการทำน้ำองุ่นให้ใสแตกต่างกัน ($P \leq 0.05$) พบว่า เวลาที่ใช้ในการทำน้ำองุ่นให้ใสในช่วง I ช่วงII และช่วง III มีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกัน แต่เวลาในช่วงที่ IV ของการทำน้ำองุ่นให้ใส แตกต่างกัน เวลาที่ใช้ในการทำน้ำองุ่นให้ใสของน้ำผึ้งแต่ละชนิดนี้จะอยู่ในช่วงประมาณ 140-300 นาที แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับ ความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่ใช้ นอกจากนี้ยังขึ้นกับชนิดของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลอง (Lee and Kime, 1984) ซึ่งการใช้น้ำผึ้งที่มีความเข้มข้นมากจะทำให้เวลาในการทำน้ำองุ่นให้ใส (ช่วงที่ IV) เพิ่มมากขึ้นด้วย (Lee and Kime, 1984) น้ำผึ้งสาบเสือ และน้ำผึ้งลิ้นจี่ จะใช้เวลาในการทำให้ใสนานกว่าน้ำผึ้งลำไย ส่วนน้ำผึ้งนุ่นใช้เวลาในการทำให้ใสน้อยที่สุด ซึ่ง Lee และคณะ (1985) สรุปไว้ว่า น้ำผึ้งที่มีโปรตีนสูงจะใช้เวลาในการทำให้ใสนานกว่าน้ำผึ้งที่มีโปรตีนต่ำกว่า แต่เมื่อพิจารณาจาก องค์ประกอบของโปรตีนที่พบในน้ำผึ้ง (ตารางที่ 5) จะเห็นได้ว่า น้ำผึ้งนุ่นเป็นน้ำผึ้งที่มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด รองลงมา คือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งสาบเสือ และ น้ำผึ้งลำไย ซึ่งน้ำผึ้งนุ่น น่าที่จะใช้เวลามากขึ้นด้วยกว่าน้ำผึ้งชนิดอื่น ๆ แต่จากผลการทดลองที่ได้ไม่เป็นเช่นนั้น น้ำผึ้งนุ่น กลับใช้เวลาในการทำให้น้ำองุ่นใสน้อยที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณโปรตีนในน้ำผึ้งทั้ง 4 ชนิด มีค่าใกล้เคียงกัน หรืออาจเนื่องมาจาก ความแตกต่างของชนิดน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลอง ทำให้น้ำผึ้งนุ่นมีประสิทธิภาพในการทำให้น้ำองุ่นใสต่ำกว่าน้ำผึ้งชนิดอื่น ๆ

จากตารางที่ 21-22 เป็นผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเวลาใน ช่วงที่ I ช่วงที่ II ช่วงที่ III และช่วงที่ IV และความเข้มข้นของน้ำผึ้งต่างกัน 4 ระดับ คือ ร้อยละ 0,3,6 และ 9 ที่มีต่อเวลาในการทำน้ำองุ่นให้ใส 4 ช่วง คือ ช่วงที่ I จนถึงช่วงที่ IV พบว่า เวลาที่ใช้ในการทำน้ำองุ่นให้ใสนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลอง ($P \leq 0.05$) ส่วนความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลองนั้นพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเวลาในแต่ละช่วงของการทดลองทั้ง 4ช่วง คือช่วงที่ I ช่วงที่ II ช่วงที่ III และช่วงที่ IV พบว่า ค่านี้จะมีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับจาก ช่วงเวลาตั้งแต่ ช่วงที่ I จนถึงช่วงที่ IV โดยเฉพาะอย่างยิ่งเวลาในช่วงที่ IV มีค่า MS_E สูงที่สุด ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสิ่งทดลองที่ได้ พบว่าไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของน้ำผึ้ง ($P > 0.05$) แต่ขึ้นกับชนิดของน้ำผึ้งทั้ง 4 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และ น้ำผึ้งนุ่น ทั้งนี้น่าจะเนื่องจาก ในน้ำผึ้งต่างชนิดกัน ปริมาณโปรตีนต่างกัน

ศึกษาปริมาณแทนนิน (ในรูปกรดแทนนิค) ที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส

จุดประสงค์ในขั้นตอนนี้ เพื่อวัดปริมาณแทนนิน (ในรูปกรดแทนนิค) ที่ละลายน้ำได้ การวัดค่านี้วัดหลังจากปฏิกิริยาการทำน้ำองุ่นให้ใสสิ้นสุดลงแล้ว

ความสำคัญของการศึกษาปริมาณแทนนินในน้ำผลไม้ คือ ความสามารถของแทนนินในการรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับโปรตีนที่พบในอาหาร ซึ่งมีประโยชน์ในแง่ผลิตภัณฑ์อาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่ประกอบด้วยแอลกอฮอล์และไม่มีแอลกอฮอล์ (Howes, 1953;Haslam,1966;Swain,1966;Mitjivila,Carrera,and Derache,1971; Axtell and Oswalt,1972;Ronk,1972) เช่น ก่อให้เกิดการตกตะกอนในไวน์ น้ำผลไม้ เครื่องดื่ม และ ผลิตภัณฑ์อื่น ๆ อาศัยหลักการนี้ทำให้เครื่องดื่ม เช่น ไวน์ น้ำผลไม้ ใสขึ้นมีสีดีขึ้นกว่าเดิม กระบวนการใช้โดยทั่วไป คือ การเติมสารพวกโปรตีน เช่น เจลาติน เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับแทนนินที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์อาหารแล้วเกิดเป็นตะกอน ทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีเปลี่ยนแปลง เนื่องจากปริมาณแทนนินในผลิตภัณฑ์ลดลง (Wilson,1928;Rosin,1961; Ronald,1966; Van Buren and Robinson,1969; ศรีอนงค์ กิจสัมมากูร, 2522) นอกจากความสำคัญดังกล่าวข้างต้นแล้ว แทนนินสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผลไม้ที่สุก และการงอกของเมล็ด (Joslyn and Goldenstein,1964 ; Robinson,1967 ; Singleton and Kratzer, 1969) โดยกลไกการเกิดที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่ชัด (Brown,1964;Haslam,1966) สำหรับวิธีการวัดปริมาณแทนนินนั้นมีหลายวิธี เช่น uv-absorption, folin-ciocalteu phenol, Mitchell's ferrous tartrate ,vanillin reactive phenolic,iodometric และ ferric chloride สำหรับงานวิจัยนี้เลือกวิธี folin-ciocalteu Phenol สำหรับช่วงของความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรวจสอบด้วยวิธีนี้อยู่ในช่วง 0.1-1.0 มก./100 มล.(Joslyn, 1970)

จากตารางที่ 23 แสดงค่าปริมาณแทนนิน (ในรูปกรดแทนนิค)ที่วัดได้ในน้ำองุ่นจะเห็นได้ว่า ปริมาณแทนนินที่พบในน้ำองุ่นเมื่อแปรชนิดของน้ำผึ้งที่ใช้แตกต่างกันทั้ง 4 ชนิดคือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งนุ่น และความเข้มข้นของน้ำผึ้ง 4 ระดับ คือ ร้อยละ 0,3,6 และ 9 พบว่าค่าปริมาณแทนนิน(ในรูปกรดแทนนิค)ที่วัดได้มีค่าใกล้เคียงกัน จากตารางที่ 24-25 เป็นผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณแทนนิน (ในรูปกรดแทนนิค) สรุปได้ว่า

ปริมาณแทนนินที่วัดได้ ไม่ขึ้นกับชนิดของน้ำผึ้ง ($P>0.05$) และความเข้มข้นของน้ำผึ้ง ($P>0.05$) ซึ่งเหตุผลที่เป็นเช่นนี้ อาจเป็นเพราะ pHของน้ำองุ่นที่ใช้ในการทดลองมีค่า ประมาณ 3.83 ซึ่ง Lee (1984) อธิบายไว้ว่า เป็นช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของแทนนินอยู่ในช่วง pH 3.50-4.00 แทนนินบางส่วนจะรวมตัวกับโปรตีนในรูปสารประกอบเชิงซ้อนที่ละลายน้ำได้ และแทนนินบางส่วนจะรวมตัวกับโปรตีนในรูปสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำได้ ทำให้เกิดตะกอนขึ้นมา ซึ่งทำให้ลักษณะของตะกอนที่เกิดขึ้นมีขนาดไม่สม่ำเสมอ และมีปริมาณมาก และ ปฏิกิริยาการเกิดตะกอนนี้เกิดขึ้นได้มากที่สุดเมื่ออยู่ใกล้ช่วง isoelectric point ของโปรตีนในน้ำผึ้ง(Paine, Gertler,and Lothrop,1934;Kieser,Pollard and Timberlake,1957; Van Buren and Robinson,1969; Hagerman and Butler,1978;Lee,1984) ดังนั้นปริมาณแทนนิน (ในรูปเทรดแทนนิค) ที่วิเคราะห์ได้ จึงไม่ขึ้นกับ อัตราการเกิดปฏิกิริยาในแต่ละช่วงของการทำน้ำองุ่นให้ใส (Lee,1984;Wakayama and Lee,1987) ซึ่งผลการทดลองที่ได้ดังกล่าวสอดคล้องกับงานของ Lee และ Kime (1984) และ Wakayama และ Lee (1987)ซึ่งได้ทำการทดลองในน้ำแอปเปิ้ล พบว่า ค่าปริมาณแทนนินที่ได้ไม่มีความแตกต่างกัน pH ของน้ำแอปเปิ้ลประมาณ 3.9 (Van Buren,1970) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับช่วง pH ของน้ำองุ่น ทำให้แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงจึงไปในทางเดียวกัน

นอกจากแทนนิน จะสามารถในการรวมตัวแล้ว สารประกอบ gallic acid และสารประกอบ catechol ก็คาดว่า มีความสามารถในการรวมตัวกับโปรตีนในรูปที่ละลายน้ำได้เช่นกัน (Mc Manus et al.,1981)

สำหรับสารประกอบฟีนอลิคตัวอื่น เช่น สารประกอบ chlorogenic acid,catechin คาดว่าไม่มีผลสำคัญต่อการตกตะกอนของโปรตีน (Eastmond and Gardner,1974; Haslam, 1974;Hoff and Singleton,1977)

สำหรับสมมติฐานกลไกการ เกิดปฏิกิริยาระหว่างแทนนินในน้ำแอปเปิ้ลกับโปรตีนในน้ำผึ้งนั้น Wakayama และ Lee(1987) อธิบายไว้ว่า แทนนินในรูป active ที่มากพอสามารถจับกับบริเวณพื้นผิวหน้าโปรตีน และเป็นเหตุที่ทำให้เกิดการรวมตัวกับโปรตีนอื่นได้ แต่ถ้ามีปริมาณแทนนินในรูป active น้อย แต่ความเข้มข้นของสารประกอบ simple phenolic acid สูงนั้น พบว่าไม่มีผลต่ออัตราการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใส เนื่องจากความสามารถของแทนนินในการรวมตัวกับโปรตีนชนิดอื่นเกิดขึ้นได้น้อยมาก ดังนั้นโมเลกุลของสารประกอบ simple phenolic acid สามารถ

รวมตัวกับบริเวณผิวหน้าโปรตีนได้มากขึ้น และได้มีเลคุลของสารประกอบที่ชอบน้ำ (hydrophilicity) มากขึ้น จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ความสามารถในการเกิดการรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนในรูปแทนนินและโปรตีนเกิดขึ้นได้ช้าลง

-ประเมินประสิทธิภาพของการทำน้ำองุ่นให้ใสโดยการวัด %transmittance

จุดประสงค์ในขั้นตอนนี้ เพื่อทำการวัด %transmittance ของน้ำองุ่นที่ได้ ซึ่งค่านี้จะสามารถประเมินผลได้ว่าในแต่ละ treatment นี้มีประสิทธิภาพในการทำน้ำองุ่นให้ใสได้ต่างกัน ซึ่งการวัดค่านี้วัดหลังจากปฏิกิริยาการทำน้ำองุ่นให้ใสสิ้นสุดลงแล้ว

ค่า %transmittance นี้มีค่ามากหรือน้อย ขึ้นกับ องค์ประกอบที่พบในน้ำผลไม้ ที่ทำให้เกิดความขุ่นในน้ำผลไม้ ได้แก่สารประกอบพวก protopectinซึ่งมีลักษณะเป็นอนุภาคเล็กๆ ที่แขวนลอยอยู่ในน้ำผลไม้ และสามารถเกิดปฏิกิริยา hydrolysis โดยการทำงานของกรดเอนไซม์ และความร้อน ทำให้เพคตินเปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ทำให้ค่านี้มีค่าเพิ่มขึ้นได้ ถ้าค่า %transmittance มีค่ามากย่อม แสดงว่า น้ำผลไม้มีความขุ่นน้อย (อรอนงค์ สินธุ์จาปาศักดิ์,2519)

จากตารางที่ 26 แสดงค่า %transmittance ที่วัดได้ของน้ำองุ่น เมื่อแปรความเข้มข้นของน้ำผึ้งต่างกัน 4 ระดับ คือ ร้อยละ 0,3,6 และ 9 และชนิดของน้ำผึ้ง 4 ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งนุ่น พบว่าค่า %transmittance ที่วัดได้นี้มีค่าแตกต่างกันและจากตารางสังเกตได้ว่า เมื่อความเข้มข้นของน้ำผึ้งเพิ่มมากขึ้นค่า%transmittance มีแนวโน้มลดลง แสดงว่า การใช้น้ำผึ้งที่มีความเข้มข้นมากมีได้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำน้ำองุ่นให้ใสได้ แต่ในทางตรงกันข้ามประสิทธิภาพในการทำให้ใสกลับลดลง เมื่อพิจารณาจากตารางที่ 27-28 ซึ่งเป็นผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า%transmittance นั้นจะเห็นว่า ค่า %transmittance นั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลอง ($P\leq0.05$) และความเข้มข้นของน้ำผึ้ง($P\leq0.05$) และจากผลการทดลองที่ได้สามารถสรุปได้ว่า ชนิดของน้ำผึ้งที่แตกต่างกัน 4 ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งนุ่น และ ความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ ร้อยละ 0,3,6 และ 9 นั้นมีผลต่อความใสของน้ำองุ่นที่ได้ ($P\leq0.05$) จากผลการทดลองที่ได้ช่วงนี้ พบว่าประสิทธิภาพในการทำน้ำองุ่นให้ใสต่ำ ซึ่งเหตุผลที่เป็นไปได้ คือ

เนื่องจากในน้ำผึ้งมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบที่มากที่สุดถึงร้อยละ 80 (สิริวัฒน์ และเพ็ญศรี, 2529) ดังนั้น น้ำตาลนี้อาจจะไปขัดขวางการทำงานระหว่างโปรตีนในน้ำผึ้งกับปริมาณแทนนิน (ในรูปเกรดแทนนิค)ในน้ำองุ่นได้ ทำให้การรวมตัวเป็นไปได้ยากขึ้น หรือโปรตีนบางส่วนที่มีอยู่นี้อาจจะรวมตัวกันเอง หรือโปรตีนอาจจะไปรวมตัวกับสารประกอบชนิดอื่น ๆ ในน้ำองุ่นมากกว่าแทนนิน หรือเหตุผลสุดท้ายที่อาจเป็นไปได้ คือ พันธะที่เชื่อมกันระหว่างโปรตีนและน้ำตาลในน้ำผึ้งแข็งแรง ทำให้ยากต่อการที่โปรตีนในน้ำผึ้งจะเข้ารวมตัวกับสารประกอบแทนนิน (ในรูปเกรดแทนนิค) มีผลทำให้ปฏิกิริยาการทำน้ำองุ่นให้ใสเกิดขึ้นได้ช้า จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาถึงปัจจัยอื่น ๆ ที่ช่วยในการปรับปรุงการทำน้ำองุ่นให้ใสให้ดีขึ้น เช่น การศึกษาผลของการเติมสารประกอบบางชนิดที่มีผลต่อโครงสร้างของโปรตีนเพื่อช่วยลดระยะเวลาในการทำให้น้ำองุ่นให้ใสได้เร็วขึ้น ดังหัวข้อต่อไป

ศึกษาผลของสารประกอบบางชนิดที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส

สารประกอบบางชนิดที่มีผลต่อโปรตีนทำให้โปรตีนเสียสภาพได้ เช่น trichloroacetic acid เป็นสารเคมีประเภทกรด และ 2-mercaptoethanol เป็นสารเคมีที่มีหมู่ thiol (R-SH) เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้โปรตีนอาจเสียสภาพ จากความร้อนที่มีผลทำให้โครงสร้างของโปรตีนเสียสภาพไปจากรูมเลกุลปิด (closed chain)ไปเป็นรูมเลกุลเปิด(opened chain) โปรตีนมีการคลายเกลียวออก ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ง่ายขึ้น (Lee, 1984) สำหรับงานวิจัยนี้เลือกสารประกอบที่มีผลต่อสมบัติของโปรตีนทั้ง 2 ประเภท เพื่อศึกษากลไกที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส

-<u>ศึกษาผลของ เวลาในแต่ละช่วงที่มีต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส</u>

สำหรับเวลาที่ใช้ในแต่ละช่วงของการ เปลี่ยนแปลงนี้ ทำนอง เดียวกันกับหัวข้อศึกษาปฏิกิริยาระหว่างแทนนิน (ในรูปเกรดแทนนิค) กับโปรตีนในน้ำผึ้ง

เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 14-25 จะเห็นได้ว่าวิธีการที่แตกต่างกัน 3 วิธี คือ น้ำผึ้งที่ผ่านการต้ม น้ำผึ้งที่ผ่านการเติม trichloroacetic acid และต้ม และ น้ำผึ้งที่ผ่านการเติม 2-mercaptoethanol และต้ม ชนิดของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลองทั้ง 4ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งนุ่น และ ความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลองมี 4 ระดับ

คือ ร้อยละ 0,3,6 และ 9 ที่มีผลต่อปฏิกิริยาการทำน้ำองุ่นให้ใสแตกต่างอย่างชัดเจน ซึ่งสังเกตได้ว่า น้ำผึ้งที่เติม 2-mercaptoethanol และต้ม สามารถทำน้ำองุ่นให้ใสเร็วที่สุด (ช่วงที่ IV) คือในช่วงเวลาประมาณ 30-80 นาที รองลงมา คือ น้ำผึ้งที่ผ่านการเติม trichloroacetic acid และต้ม ใช้เวลาประมาณ 50-90 นาที ส่วนน้ำผึ้งที่ผ่านการต้มอย่างเดียวใช้เวลาประมาณ 40-90 นาที ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำผึ้ง และความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลองด้วย และจากรูปที่แสดงผลการทดลอง จะพบว่าการเปลี่ยนแปลงของเวลาใน ช่วงที่ I ช่วงที่ II และช่วงที่ III ของการทำน้ำองุ่นให้ใสเกิดขึ้นได้เร็วมาก ซึ่งทำให้สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ยาก ส่วนเวลาในช่วงที่ IV ของการทำน้ำองุ่นให้ใสจะเกิดขึ้นได้ช้ากว่าช่วงอื่น ๆ (ช่วงที่ I-ช่วงที่ III) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานของ Lee(1984) และ Lee และ Kime (1984) ซึ่งอธิบายไว้ว่า เมื่อน้ำผึ้งผ่านการให้ความร้อนจะทำให้โมเลกุลของโปรตีนเสียสภาพเกิดการเปลี่ยนแปลงจากโมเลกุลปิดไปเป็นโมเลกุลเปิด และง่ายต่อการรวมตัวกับเทนนิน(ในรูปสารคแทนนิค) การให้ความร้อนกับน้ำผึ้งเพียงอย่างเดียวนั้นจะให้ผลไม่ดีเท่ากับการเติมสารประกอบบางชนิดที่คาดว่ามีผลต่อสมบัติของโปรตีนในน้ำผึ้ง เช่น การเติม trichloroacetic acid และ 2-mercaptoethanol จากผลการทดลองที่ได้เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารประกอบที่ใช้ 2 ชนิด คือ 2-mercaptoethanolและtrichloroacetic acid พบว่า2-mercaptoethanol จะมีประสิทธิภาพการทำน้ำองุ่นให้ใสได้ดีกว่าการใช้ trichloroacetic acid และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำผึ้งที่ผ่านการให้ความร้อนกับน้ำผึ้งที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน พบว่า น้ำผึ้งที่ผ่านการให้ความร้อนสามารถลดระยะเวลาในการทำน้ำองุ่นให้ใสได้ดีกว่า และให้ผลที่ดีกว่าน้ำผึ้งที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับงานของ Mc Lellan,Kime และ Lind (1985)

จากตารางที่ 29-30 เป็นผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเวลาในช่วงที่ I ถึงช่วงที่ IV พบว่า เวลาที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใสนั้นจะขึ้นอยู่กับวิธีการ 3 วิธีที่แตกต่างกัน คือ น้ำผึ้งที่ผ่านการต้ม น้ำผึ้งที่ผ่านการเติม trichloroacetic acid และต้ม และน้ำผึ้งที่ผ่านการเติม 2-mercaptoethanol และต้ม ($P\leq0.05$) และชนิดของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลองทั้ง 4 ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งปุน ($P\leq0.05$)แต่ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลอง 4ระดับ คือ ร้อยละ 0,3,6 และ 9 ($P>0.05$)

-ศึกษาปริมาณแทนนิน (ในรูปกรดแทนนิค) ที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส

การศึกษาปริมาณแทนนิน (ในรูปกรดแทนนิค) ที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใสมีวิธีทำนองเดียวกันกับการศึกษาในหัวข้อปฏิกิริยาระหว่างแทนนิน (ในรูปกรดแทนนิค) กับโปรตีนในน้ำผึ้งที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส จากตารางที่ 31 ซึ่งเปรียบเทียบค่าแทนนิน(ในรูปกรดแทนนิค) ที่วัดได้เมื่อเปรียบเทียบวิธีการ 3 วิธีที่ต่างกัน คือ น้ำผึ้งที่ผ่านการต้ม น้ำผึ้งที่ผ่านการเติม 2-mercaptoethanol และต้ม และ น้ำผึ้งที่ผ่านการเติม trichloroacetic acid และต้ม ชนิดของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลอง 4ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งนุ่น และความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลอง 4 ระดับ คือ ร้อยละ 0,3,6 และ 9 จะเห็นได้ว่าปริมาณแทนนินที่วิเคราะห์ได้มีค่าใกล้เคียงกัน และเมื่อพิจารณาจากตารางที่ 32-33 เป็นผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณแทนนิน (ในรูปกรดแทนนิค) ที่วัดได้ พบว่า ปริมาณแทนนินขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำผึ้งทั้ง 4 ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งนุ่น ($P \leq 0.05$) ส่วนความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลอง 4 ระดับ คือ ร้อยละ 0,3,6 และ 9 และ วิธีการ 3 วิธีที่แตกต่างกัน คือ น้ำผึ้งที่ผ่านการต้ม น้ำผึ้งที่ผ่านการเติม trichloroacetic acid และต้ม และน้ำผึ้งที่ผ่านการเติม 2-mercaptoethanol และต้มไม่มีผลต่อค่าปริมาณแทนนิน (ในรูปกรดแทนนิค) ที่วัดได้ ($P > 0.05$)

-ประเมินประสิทธิภาพของการทำน้ำองุ่นให้ใสโดยการวัด %transmittance

การศึกษาวัดค่า %transmittance นี้ทำนองเดียวกันกับหัวข้อปฏิกิริยาระหว่างแทนนิน (ในรูปกรดแทนนิค) กับ โปรตีนในน้ำผึ้งที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส จากตารางที่ 34 เมื่อเปรียบเทียบค่า %transmittance ที่วิเคราะห์ได้ พบว่า ค่าที่ได้อยู่ในช่วงที่กว้างมากประมาณร้อยละ 59-78 ซึ่งจะแตกต่างกันไป และ เมื่อพิจารณาการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า %transmittance (ตารางที่ 35-36) พบว่า ค่านี้ขึ้นอยู่กับวิธีการ 3 วิธีที่แตกต่างกัน คือ น้ำผึ้งที่ผ่านการต้ม น้ำผึ้งที่ผ่านการเติม 2-mercaptoethanol และต้ม น้ำผึ้งที่ผ่านการเติม trichloroacetic acid และต้ม ($P \leq 0.05$) ชนิดของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลองทั้ง 4 ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งนุ่น ($P \leq 0.05$) และความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่

ใช้ในการทดลองทั้ง 4 ระดับ คือ ร้อยละ 0,3,6 และ 9 ($P \leq 0.05$) นอกจากนี้ยังมี interactionระหว่างวิธีการ 3 วิธีที่แตกต่างกัน คือ ชนิดของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลอง ($P \leq 0.05$) และความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลอง ($P \leq 0.05$)

จากผลการทดลองทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่า เมื่อพิจารณาความแตกต่างของวิธีการที่ใช้กับน้ำผึ้งทั้ง 4 วิธี คือ น้ำผึ้งที่ไม่ผ่านการต้ม น้ำผึ้งที่ผ่านการต้ม น้ำผึ้งที่ผ่านการ เติม trichloroacetic acid และต้ม และ น้ำผึ้งที่ผ่านการ เติม 2-mercaptoethanol และต้ม พบว่า ให้ผลที่แตกต่างกันไป คือ เวลาที่ใช้ในการทำให้ใส ปริมาณแทนนิน(ในรูปกรดแทนนิค) และค่า %transmittance จากผลการทดลองที่ได้สรุปได้ว่า น้ำผึ้งที่ผ่านการ เติม 2-mercaptoethanol และต้มมีประสิทธิภาพในการทำน้ำองุ่นให้ใสได้มากที่สุด รองลงมา คือ น้ำผึ้งที่ผ่านการ เติม trichloroacetic acid และต้ม และน้ำผึ้งที่ผ่านการต้มให้ประสิทธิภาพในการทำน้ำองุ่นให้ใสได้ไม่แตกต่างกัน ส่วนน้ำผึ้งที่ไม่ผ่านการต้มให้ประสิทธิภาพในการทำน้ำองุ่นให้ใสได้ต่ำที่สุด เมื่อ เปรียบเทียบกับวิธีการอื่น ๆ ในการทำน้ำองุ่นให้ใส ส่วนชนิดของน้ำผึ้งที่ทำการทดลองทั้ง 4ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งนุ่น พบว่า น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย มีประสิทธิภาพในการทำน้ำองุ่นให้ใสได้ใกล้เคียงกันไม่แตกต่างกันมาก ส่วนน้ำผึ้งสาบเสือ,น้ำผึ้งนุ่น พบว่าประสิทธิภาพในการทำน้ำองุ่นให้ใสได้ต่ำ และ จากผลการทดลองพบว่า น้ำผึ้งลำไย จะสังเกตเห็นการ เปลี่ยนแปลงได้รวดเร็วกว่าน้ำผึ้งลิ้นจี่ ดังนั้นในการทดลองในขั้นต่อไป จึงได้คัดเลือกน้ำผึ้งลำไยไว้เป็นตัวแทนในการศึกษา หัวข้อปัจจัยที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใสต่อไป ส่วนความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลองทั้ง 4 ระดับ คือ ร้อยละ 0,3,6 และ 9 จากผลการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้นของน้ำผึ้ง ร้อยละ 3 และ 6 ค่าที่ได้ใกล้เคียงกัน ส่วนความเข้มข้นของน้ำผึ้งร้อยละ 9 พบว่า ประสิทธิภาพในการทำน้ำองุ่นให้ใสลดต่ำลง ดังนั้นจากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่เหมาะสม และไม่สิ้นเปลือง คือ ความเข้มข้นของน้ำผึ้งร้อยละ 3 แต่เนื่องจากในทางปฏิบัติสารประกอบ นี้เป็นอันตราย (toxic) ไม่มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้งานทางด้านอาหาร ดังนั้นจึง เลือกวิธีการที่เหมาะสม คือน้ำผึ้งที่ผ่านการต้มมาเป็นตัวแทนใช้ในการศึกษาต่อไป

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส

สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใสนี้จะทำการศึกษาผลของ pH ต่างกัน 3 ระดับ คือ pH 2.0,3.5 และ 5.0 เพื่อทดสอบสมมติฐานที่ว่าที่ pH ต่างกัน มีผลต่อการทำงานของแทนนิน และอุณหภูมิต่างกัน 3 ระดับคือ 40°ซ.,60°ซ. และ 80°ซ. เพื่อศึกษาผลของความแตกต่างของอุณหภูมิต่างกัน ทำให้สามารถลดระยะเวลาในการทำน้ำผลไม้ให้ใสได้

-<u>ศึกษาผลของเวลาที่มีต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส</u>

เวลาแต่ละช่วงที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นไปทำนองเดียวกันกับ หัวข้อปฏิกิริยาระหว่างแทนนิน(ในรูปเรดแทนนิค)กับโปรตีนในน้ำผึ้งที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส และผลของสารประกอบบางชนิดที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส จากรูปที่ 26-28 จะเห็นได้ว่า ที่อุณหภูมิ และ pH ที่ต่างกันปฏิกิริยาการทำน้ำองุ่นให้ใสจะแตกต่างกันไป เมื่อพิจารณาที่อุณหภูมิที่ต่างกัน 3 ระดับคือ 40°ซ., 60°ซ.และ 80°ซ. พบว่า เวลาที่ใช้ในการทำให้น้ำองุ่นให้ใสแตกต่างกัน ($P \leq 0.05$) ที่อุณหภูมิ 80°ซ.ใช้เวลาสั้นที่สุด คือ ใช้เวลาประมาณ 2-14 นาที น้ำองุ่นก็ใสได้ รองลงมาคือ ที่อุณหภูมิ 60°ซ. คือ ใช้เวลาประมาณ 5-32 นาที น้ำองุ่นก็ใสได้ และที่อุณหภูมิ 40°ซ. คือ ใช้เวลาประมาณ 50-80 นาที ซึ่งที่อุณหภูมิ 40°ซ.ใช้เวลานานที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 80°ซ. และ 60°ซ.ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับงานของ Lee และ Kime (1984);Mc Lellan, Kime และ Lind(1985) ซึ่งเหตุผลที่เป็นเช่นนี้ Lee และ Kime (1984) อธิบายไว้ว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นในช่วง40°ซ.-70°ซ. อัตราการเกิดปฏิกิริยาในการรวมตัวของสารประกอบเชิงซ้อนก็จะสูงขึ้นตามไปด้วย สามารถเร่งการเคลื่อนที่ของโมเลกุลและการจับกันระหว่างโปรตีนในน้ำผึ้งและแทนนินในน้ำองุ่นได้มากกว่า เมื่อทดลองที่อุณหภูมิห้อง ที่อุณหภูมิ 80°ซ. นี้ การเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วมากโดยเฉพาะเวลาในช่วงที่ II จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงในช่วงนี้ได้ทัน และเมื่อพิจารณาจาก pH ต่างกัน 3 ระดับ คือ 2.0,3.5 และ 5.0 พบว่าpH 3.5 เป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยามากที่สุด รองลงมาคือ pH 2.0 และน้อยที่สุด คือ pH 5.0 และ เป็นที่น่าสังเกตว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิกับ pH มีความสัมพันธ์กัน และที่อุณหภูมิ 80°ซ. จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนกว่าที่อุณหภูมิ 60°ซ.และที่อุณหภูมิ 40°ซ. ซึ่งเหตุผลที่

เป็นเช่นนี้ Lee และ Kime(1984);Wakayama และLee(1987) อธิบายไว้ว่า ช่วงpH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของแทนนินอยู่ในช่วง pH 3-4 ซึ่งเป็นช่วงที่เคบ ส่วนช่วง pH ที่ต่ำกว่า 2.5 หรือ pH ที่มากกว่า 4.5 อัตราการเกิดปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ช้าลงไม่เหมาะสมต่อการทำงานของแทนนิน

จากตารางที่ 37-38 เป็นผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเวลาในการทำน้ำองุ่นให้ใส ช่วงที่ I-ช่วงที่ IV เมื่อแปรอุณหภูมิต่างกัน 3 ระดับคือ 40°ซ.,60°ซ.และ 80°ซ. และ pH ต่างกัน 3 ระดับคือ 2.0,3.5 และ 5.0 จะเห็นว่าเวลาในช่วงที่ I ของการทำน้ำองุ่นให้ใสจะขึ้นอยู่กับ pH อย่างเดียว ($P \leq 0.05$) ส่วนเวลาในช่วงที่ II-ช่วงที่ IV ของการทำน้ำองุ่นให้ใส จะขึ้นอยู่กับ pH อุณหภูมิ และมี Interaction กันระหว่าง pH และอุณหภูมิ ($P \leq 0.05$) แสดงว่า การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง 3ระดับ คือ 40°ซ., 60°ซ. และ 80°ซ.และการเปลี่ยนแปลง pH 3 ระดับคือ 2.0,3.5 และ 5.0 มีความสัมพันธ์กัน

<u>ศึกษาผลของปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส</u>

การวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids)สามารถบ่งบอกถึงปริมาณของแข็งที่พบในรูปละลายน้ำได้ ซึ่งค่านี้ รวมถึงน้ำตาล กรด และเพคตินในรูปที่ละลายน้ำได้ และองค์ประกอบอื่นๆ ในรูปที่ละลายน้ำได้ (อรอนงค์ สินธุ์จาบาศักดิ์,2519)

จากตารางที่ 39 แสดงค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำในน้ำองุ่นที่วัดได้ เมื่อแปร pH ต่างกัน 3 ระดับคือ 2.0,3.5 และ 5.0 และอุณหภูมิต่างกัน 3 ระดับคือ 40°ซ.,60°ซ. และ 80°ซ.จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิต่างกัน และการเปลี่ยนแปลงของ pH ทำให้ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้มีค่าแตกต่างกัน และจากตารางสังเกตได้ว่า ที่อุณหภูมิ 80°ซ. ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้มีแนวโน้มสูงกว่าที่อุณหภูมิ 60°ซ.และอุณหภูมิ 40°ซ.และค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ที่อุณหภูมิ 60°ซ.และอุณหภูมิ 40°ซ.มีค่าใกล้เคียงกัน และที่อุณหภูมิเดียวกันแต่ pH ต่างกัน ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ไม่แตกต่างกันมาก สาเหตุที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงสามารถเร่งปฏิกิริยาเคมีทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นเร็วได้มากขึ้น เป็นผลทำให้เกิดการย่อยสลายของสารประกอบในรูปที่ละลายน้ำได้มากขึ้น ซึ่งค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้นี้มีความสัมพันธ์กับช่วง pH ที่ทำการทดลองกล่าว คือ ถ้าช่วง pH มีค่าสูง ค่านี้มีค่าสูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตามค่านี้ ขึ้นอยู่กับ

ความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่ใช้ด้วย กล่าวคือ การใช้น้ำผึ้งที่มีความเข้มข้นมากทำให้ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้มากขึ้นตามไปด้วย จากตารางที่ 40-41 เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ พบว่า ค่านี้ขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ($P\leq0.05$) แต่ไม่ขึ้นอยู่กับ pH ($P>0.05$)

-<u>ศึกษาผลของการทำน้ำองุ่นให้ใสต่อสีของน้ำองุ่น</u>

การวัดสีนี้เป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งในการประเมินคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ มีความสัมพันธ์กับปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลด้วย (อรอนงค์ สินธุ์จำบาศักดิ์, 2519) การวัดสีในการทดลองนี้จึงเลือกใช้เครื่องมือ Lovibond ประเมินผลของการทำน้ำองุ่นให้ใสที่สภาวะต่าง ๆ ต่อสีของผลิตภัณฑ์ หลักการของวิธีนี้คือ อาศัยตัวกลาง คือ แสงเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางซึ่งตัวกลางที่ใช้อาจจะเป็นแก้วที่มีสีเช่น สีทอง สีโครเมียม และสีโคบอลต์ ซึ่งแต่ละชนิดจะมีค่าจำเพาะของสเกลนั้น ซึ่งแหล่งกำเนิดแสงที่ออกมาสามารถแปรเปลี่ยนได้ตามกลุ่มของสีและความเข้ม สีที่สามารถแยกได้มี 3 สีคือ สีน้ำเงิน สีเหลือง และสีแดง สเกลที่ใช้มีตั้งแต่ 0.1-30 หรือมากกว่าซึ่งข้อดีของการใช้ Lovibond คือ ความสัมพันธ์ระหว่างสเกลและการมองเห็นสังเกตดูจากสีเข้าใจได้ง่าย แปลผลง่าย เป็นเครื่องมือที่เก่าแก่และใช้กันอย่างกว้างขวาง เทคนิคการดูแลและวัดผลง่าย ข้อเสียของการใช้ Lovibond คือ ค่าสีที่วัดได้โดยวิธีนี้ไม่สามารถเปลี่ยนเป็นหน่วยอื่น ๆ ได้ (Mac Kinnery and Little, 1962)

จากตารางที่ 42 แสดงค่าสีที่วัดได้ในน้ำองุ่นมี 3 สีคือ สีน้ำเงิน สีเหลือง และสีแดง เมื่อแปร pH ต่างกัน 3 ระดับคือ 2.0, 3.5 และ 5.0 และอุณหภูมิต่างกัน 3 ระดับคือ 40^{o}ซ., 60^{o}ซ.และ 80^{o}ซ. จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิแตกต่างกัน และ pH แตกต่างกัน พบว่า ค่าสีที่อ่านได้ 3 สี คือ สีน้ำเงิน สีเหลือง และสีแดง ที่วัดได้ในน้ำองุ่นมีค่าแตกต่างกันไป

จากตารางที่ 43-44 เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าสีทั้ง 3 ชนิด คือ สีน้ำเงิน สีเหลือง และสีแดง พบว่า เมื่อแปรอุณหภูมิต่างกัน 3 ระดับคือ 40^{o}ซ., 60^{o}ซ. และ 80^{o}ซ. และ pH ต่างกัน 3 ระดับคือ 2.0, 3.5 และ 5.0 ค่าสีน้ำเงินและสีเหลืองที่วัดได้ในน้ำองุ่นไม่มีความแตกต่าง ($P>0.05$) ส่วนค่าสีแดงที่วัดได้ในน้ำองุ่นนี้ พบว่า มีความแตกต่าง ($P\leq0.05$) ซึ่งค่าสีที่วัดได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ pH และมี interactionระหว่างอุณหภูมิ

และ pH ($P \leq 0.05$)

-ศึกษาผลของแทนนิน (ในรูปเกรดแทนนิค) ที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส

ทำนองเดียวกันกับหัวข้อปฏิกิริยาระหว่างแทนนิน (ในรูปเกรดแทนนิค)กับโปรตีนในน้ำผึ้งที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส และผลของสารประกอบบางชนิดที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส จากตารางที่ 45 แสดงค่าแทนนิน (ในรูปเกรดแทนนิค)ที่วัดในน้ำองุ่น เมื่อแปร pH ต่างกัน 3 ระดับ คือ 2.0,3.5 และ 5.0 และ อุณหภูมิต่างกัน 3 ระดับ คือ 40°ซ.,60°ซ. และ 80°ซ. จะเห็นได้ว่า ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน และ pH แตกต่างกัน ค่าปริมาณแทนนิน (ในรูปเกรดแทนนิค) ในน้ำองุ่นที่วัดได้มีค่าแตกต่างกันไป และจากตารางที่ 46-47 เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่าค่าปริมาณแทนนิน(ในรูปเกรดแทนนิค) ที่วัดได้ขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ pH และมี interaction ระหว่างอุณหภูมิและ pH ($P \leq 0.05$) ซึ่งผลการทดลองที่ได้ในหัวข้อนี้สนับสนุนผลของ pH ที่แตกต่างกันที่มีผลต่อการทำงานของแทนนิน และเหตุผลนี้เป็นไปทำนองเดียวกันคำอธิบายในหัวข้อปฏิกิริยาระหว่างแทนนิน (ในรูปเกรดแทนนิค) กับโปรตีนในน้ำผึ้งที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใสและผลของสารประกอบบางชนิดที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใสได้

-ประเมินประสิทธิภาพของการทำน้ำองุ่นให้ใส โดยการวัด %transmittance

ทำนองเดียวกันกับหัวข้อปฏิกิริยาระหว่างแทนนิน (ในรูปเกรดแทนนิค)กับโปรตีนในน้ำผึ้งที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส และผลของสารประกอบบางชนิดที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส จากตารางที่ 48 แสดงค่า % transmittance ที่วัดได้ในน้ำองุ่น เมื่อแปร pH ต่างกัน 3ระดับ คือ 2.0,3.5 และ 5.0 และอุณหภูมิต่างกัน 3 ระดับคือ 40°ซ.,60°ซ. และ80°ซ. จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิแตกต่างกัน และที่ pH ต่างกันมีผลทำให้ค่า %transmittance ที่ได้แตกต่างกันอย่างชัดเจนอยู่ในช่วงกว้างมาก ซึ่งขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่แตกต่างกัน และ pH ที่แตกต่างกัน จากตารางจะเห็นได้ว่า ที่ pH 2.0 นี้จะมีค่า %transmittance สูงกว่าที่ pH 3.5 และ pH 5.0 เหตุผลที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นไปได้ว่าในช่วง pH 2.0 นี้ เป็นช่วงที่อยู่ในสภาพความเป็นกรดสูง (pH ต่ำ)ซึ่งในช่วง pH นี้ส่วนใหญ่โปรตีนในน้ำผึ้งมีประจุบวกเป็นจำนวนมาก ซึ่งปฏิกิริยา

เคมีที่เกิดขึ้นในช่วงนี้ น่าจะเกิดเนื่องจากการทำงานของโปรตีนในน้ำผึ้งมากกว่าแทนนินในน้ำองุ่น และโปรตีนที่อยู่ในช่วงนี้จะมีการเสียสภาพไปจากเดิมไม่สามารถรวมตัวกับแทนนิน (ในรูปกรดแทนนิค)ได้ จึงทำให้โปรตีนสามารถตกตะกอนลงมาได้ และสารประกอบที่พบบางชนิดอาจจะถูกทำลายไป หรือเสียสภาพไปจากเดิม และอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ทำให้ไม่พบอนุภาคที่แขวนลอยบนอยู่ ดังนั้น ค่า %transmittance ที่วัดได้จึงมีค่าสูงกว่าในช่วง pH 3.5 และ pH 5.0 และในช่วง pH 5.0 นี้มีค่า %transmittance ต่ำที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในช่วง pH นี้ การเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับกรดแทนนิคเกิดได้ไม่ค่อยดี เนื่องจากในช่วงนี้เป็นช่วง pH ที่ไม่เหมาะสมกับการทำงานของแทนนิน ซึ่งโอกาสในการรวมตัวระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างกรดแทนนิคและโปรตีนในรูปที่ละลายน้ำได้ จึงเป็นไปได้น้อยมากจึงพบอนุภาคแขวนลอยขุ่นอยู่มาก ทำให้ %transmittance ที่วัดได้มีค่าต่ำกว่าในช่วงpH 2.0 และ pH 3.5จากตารางที่ 49-50 เป็นผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า %transmittance ที่วัดในน้ำองุ่น ซึ่งจะเห็นได้ว่า ค่า %transmittance นี้ขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ pH และ interaction ระหว่างอุณหภูมิกับ pH ($P \leq 0.05$) และเมื่อพิจารณาจากค่าสรุปค่า %transmittance ที่วัดได้พบว่า ที่อุณหภูมิต่างกัน 3 ระดับ คือ 40^{o}ซ.,60^{o}ซ. และ 80^{o}ซ. ค่า %transmittance ที่วัดได้แตกต่างกันอย่างชัดเจน ($P \leq 0.05$) และที่ pH ต่างกัน 3 ระดับ คือ 2.0,3.5 และ 5.0 พบว่า ค่า %transmittance ที่วัดได้แตกต่างกันอย่างชัดเจน ($P \leq 0.05$)

-<u>ศึกษาผลของการทำน้ำองุ่นให้ใสต่อวิตามินซี</u>

ลักษณะของผลไม้และผลิตภัณฑ์จากผลไม้ในแง่คุณค่าทางอาหาร ได้แก่ เป็นแหล่งของวิตามินซี หรือกรดแอสคอร์บิค ปริมาณของวิตามินซีในผลไม้แต่ละชนิดย่อมแตกต่างกัน ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณวิตามินซีในผักและผลไม้ ได้แก่ ชนิดและสายพันธุ์ ฤดูกาลเพาะปลูก ฤดูกาลเก็บเกี่ยว สภาพดินฟ้าอากาศ ความแก่อ่อนของผลไม้ ตลอดจนระยะเวลาการเก็บเกี่ยว (Bauernfeind, 1953) ซึ่งวิตามินซีในผักและผลไม้นี้ถูกทำลายได้ง่ายในระหว่างการแปรรูปผักและผลไม้ โดยเฉพาะสามารถถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายในสภาพที่มีออกซิเจน เอนไซม์บางชนิดตลอดจนเกลือของทองแดง เหล็ก ก็สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้เร็วขึ้นได้ (Mapson,1970) นอกจากนี้ความร้อน และอุณหภูมิที่ใช้ก็มีผลต่อปริมาณวิตามินซีด้วย (Clifcorn,1948; Clegg and

Hootan,1965)

จากตารางที่ 51 แสดงค่าวิตามินซีที่วัดได้ในน้ำองุ่น เมื่อแปร pH ต่างกัน 3 ระดับคือ 2.0,3.5 และ 5.0 และอุณหภูมิต่างกัน 3 ระดับคือ 40°ซ.,60°ซ. และ 80°ซ.จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิแตกต่างกัน และ pH ต่างกัน นี้มีผลทำให้ค่าปริมาณวิตามินซีที่วัดได้มีค่าแตกต่างกันไป และจากตารางที่ 52-53 ซึ่งเป็นผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของวิตามินซี พบว่าค่าวิตามินซีที่วัดได้นี้ขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ pH และมี interaction ระหว่างอุณหภูมิ และpH ($P \leq 0.05$) และเนื่องจากวิตามินซี เป็นสารประกอบที่ไม่ค่อยเสถียรสามารถสลายตัวได้ง่าย เมื่อถูกความร้อนที่อุณหภูมิสูง (Clegg and Hootan,1965) และเมื่อพิจารณาจากตารางจะเห็นได้ว่าที่ อุณหภูมิสูง ปริมาณวิตามินซีมีแนวโน้มลดลง เรื่อย ๆ ทั้งนี้เนื่องจาก วิตามินซีจัดเป็นน้ำตาลชนิดเพนโตส (pentose) ซึ่งจะมีกลุ่มของคาร์บอซิลอยู่ภายในโมเลกุล ดังนั้น ความร้อนที่ใช้ทำให้เกิดการสลายตัวของกรดแอสคอร์บิคได้สารประกอบพวก dehydroascorbic acid และ 2,3-diketoascorbic acid และ α-ketogulonic acid มีค่าสูงขึ้น (Clegg and Hootan,1965) นอกจากนี้ความร้อนยังมีผลทำให้กรดแอสคอร์บิคสามารถเกิดปฏิกิริยากับสารประกอบไนโตรเจน ทำให้ได้สารประกอบประเภท furfural ซึ่งสารประกอบตัวนี้ เป็นสาร Intermediate ในปฏิกิริยา maillard ได้อีกด้วย และสารประกอบชนิดนี้สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้สารประกอบที่มีสีน้ำตาลจำพวก melanoidins อีกด้วย (Fennema,1985) ดังนั้นในสภาวะที่เกิดปฏิกิริยา maillard ได้ดี คือ สภาวะที่มีน้ำตาลอยู่มาก การสลายตัวของกรดแอสคอร์บิคก็จะเกิดได้มากขึ้น (Clifcorn,1948) และเมื่อพิจารณาจากค่า pH จะเห็นได้ว่าในช่วง pH ต่ำวิตามินซีมีแนวโน้มสูงกว่าในช่วง pH สูง เนื่องจาก วิตามินซีมีความคงตัวในสภาพที่มีความเป็นกรด (pH ต่ำกว่า 4)มากกว่าในช่วงที่มี pH สูง (Clifcorn,1948) และจากตาราง พบว่าในช่วง pH 2.0 และ pH 5.0 วิตามินซีที่ได้ แตกต่างกันมาก ($P \leq 0.05$) ทั้งนี้เป็นผลเนื่องจากในช่วง pH ดังกล่าวเกิดการสลายตัวได้มากขึ้น แต่เมื่อพิจารณาที่ pH 3.5 พบว่าค่าที่ได้ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$)

-<u>ศึกษาผลของการทำน้ำองุ่นให้ใสต่อการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล</u>

การวัดค่าปฏิกิริยาสีน้ำตาลในผักและผลไม้นี้ ทำได้โดยอาศัยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่

ความยาวคลื่น 420 นม. (Ranganna,1977) การเกิดสีน้ำตาลหรือสีคล้ำในน้ำผลไม้ที่เกิดจากการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาสีน้ำตาลชนิด Maillard ซึ่งจะทำให้ได้สารประกอบชนิด melanoidins (Fennema,1985)

จากตารางที่ 54 แสดงค่าปฏิกิริยาสีน้ำตาลที่วัดได้ในน้ำองุ่น เมื่อแปร pH ต่างกัน 3 ระดับ คือ 2.0,3.5 และ 5.0 และอุณหภูมิต่างกัน 3 ระดับ คือ 40°ซ.,60°ซ. และ 80°ซ. จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิเดือดต่างกัน และpH ต่างกัน พบว่าปฏิกิริยาการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลในน้ำองุ่นมีค่าต่างกันไปขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ,pH ที่ใช้ในการทดลอง ($P \leq 0.05$) และจากตารางสังเกตได้ว่าที่อุณหภูมิ 80°ซ. จะเห็นได้ว่าแนวโน้มการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลสูงกว่าที่อุณหภูมิ 60°ซ.และอุณหภูมิ 40°ซ. ทั้งนี้เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงนี้ทำให้น้ำตาลซูโครสในน้ำตาลจะไปทำปฏิกิริยากับสารประกอบไนโตรเจน เช่น กรดอะมิโนที่มีอยู่ตามธรรมชาติในน้ำผลไม้เกิดเป็นสารประกอบสีน้ำตาลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีค่าสูงขึ้น เนื่องจากปฏิกิริยา Maillard นี้สามารถเกิดขึ้นได้ดีที่อุณหภูมิสูง (Fennema,1985) นอกจากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลเกิดขึ้นได้ดีที่อุณหภูมิสูงแล้ว Loomis และ Battaile (1966)ได้รายงานว่าสารประกอบโพลีฟีนอลที่ถูกออกซิไดซ์โดยเฉพาะคิวโนน มีความสามารถในการรวมตัวกับโปรตีนกับแทนนินได้เป็นรงควัตถุสีน้ำตาลได้ และทำให้ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลเกิดได้เร็วขึ้น (Negoro,1972) และอัตราการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณกรดแอสคอร์บิค ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลชนิด non-enzymatic และปริมาณออกซิเจนในอากาศ(Clegg,1964) นอกจากปฏิกิริยาสีน้ำตาลชนิด non-enzymatic ที่เกิดได้แล้ว ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลชนิด enzymatic ก็สามารถเกิดขึ้นได้เหมือนกัน ที่อุณหภูมิ 40°ซ. เอนไซม์ยังมี activity อยู่ ส่วนที่อุณหภูมิ 60°ซ. และ 80°ซ. เอนไซม์ส่วนใหญ่ถูกยับยั้งการทำงาน ซึ่งที่อุณหภูมิสูงขึ้นนี้น่าจะเกิดขึ้นได้เล็กน้อย

จากตารางที่ 55-56 ซึ่งเป็นผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลในน้ำองุ่น พบว่าค่าปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลนี้ขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ อย่างเดียว ($P \leq 0.05$) และไม่ขึ้นกับ pH ($P > 0.05$)

-ศึกษาผลของ pH ที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส

ค่า pH เป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถบ่งบอกความเหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา (AOAC,

1990) จากตารางที่ 57 แสดงค่า pH ของน้ำองุ่นที่วัดได้เมื่อแปร pH ต่างกัน 3ระดับคือ 2.0, 3.5 และ 5.0 และอุณหภูมิต่างกัน 3 ระดับคือ 40°ซ.,60°ซ. และ 80°ซ. จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิแตกต่างกัน และ pH แตกต่างกันมีผลทำให้ค่า pH ในน้ำองุ่นที่วัดได้ มีค่าแตกต่างกันไป และจากตารางที่ 58-59 เป็นผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า pH ที่วัดได้ พบว่าค่า pH ที่วัดได้ในน้ำองุ่นมีค่าแตกต่างกัน ($P \leq 0.05$) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ pH และ interaction ระหว่างอุณหภูมิและpH ($P \leq 0.05$) ซึ่งค่าที่แตกต่างกันไปนี้มีผลทำให้อัตราการทำน้ำองุ่นให้ใสในช่วง pH และอุณหภูมิแตกต่างกันไป ซึ่งในช่วง pH 2.0 นั้นเป็นช่วง pH ที่ต่ำมากมีความเป็นกรดสูงมาก โปรตีนส่วนใหญ่ที่มีจะถูกทำลายไป และมีโปรตีนบางส่วนที่สามารถเกิดปฏิกิริยาเชิงซ้อนระหว่างแทนนินได้จะอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ดี (Hoff and Singleton,1977) ซึ่งผลของการวัดค่า pH นี้ สามารถบ่งบอกถึงความเหมาะสมต่อการทำงานของแทนนินได้

ศึกษาสมมติฐานที่ว่าโปรตีนที่มีมวลรวมโมเลกุลสูงที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส

ในขั้นตอนนี้จะทำการทดสอบสมมติฐานที่ว่า โปรตีนที่มีมวลรวมโมเลกุลสูงมีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส โดยการนำสารสกัดส่วนที่แยกได้โดยวิธี gel filtration มาทำการศึกษาโดยนำสารสกัดส่วนทั้ง 3 ชนิดคือ สารสกัดส่วน A,สารสกัดส่วน B และสารสกัดส่วน C ที่แยกได้จากน้ำผึ้ง 4 ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งนุ่น ใส่ในน้ำองุ่นสดที่เตรียมได้โดยแปรความเข้มข้นของโปรตีน 2 ระดับคือ ร้อยละ 0 และ 3 จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดส่วน A เท่านั้นที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใสได้ ส่วนสารสกัดส่วน B และสารสกัดส่วน C นั้น พบว่า ไม่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใสได้

-<u>ศึกษาปริมาณโปรตีนที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส</u>

ดังนั้น ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน จึงทำเฉพาะสารสกัดส่วน A เท่านั้น โดยเปรียบเทียบวิธีการวัดปริมาณโปรตีน 2 วิธี คือ uv-absorption และ Lowryเพื่อเปรียบเทียบค่าปริมาณโปรตีนที่ได้ทั้ง 2 วิธี

จากตารางที่ 60 จะเห็นได้ว่าวิธีการวัดปริมาณโปรตีนจากสารสกัดส่วน A ทั้ง 2 วิธี คือ

uv-absorption และวิธี Lowry ให้ค่าปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกัน ($P \leq 0.05$) จากตารางที่ 61-62 เป็นผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณโปรตีน พบว่า วิธีการวัดโปรตีนที่ต่างกัน 2 วิธี คือ uv-absorption และวิธี Lowry และชนิดของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลองทั้ง 4 ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และ น้ำผึ้งนุ่น มีผลต่อค่าปริมาณโปรตีนที่วัดได้ ($P \leq 0.05$) จากตาราง พบว่าค่าปริมาณโปรตีนที่วัดได้ในน้ำผึ้งแต่ละชนิดมีค่าที่ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบวิธีการวัดโปรตีนทั้ง 2 วิธี คือ uv-absorption และ Lowry พบว่า วิธี uv-absorptionให้ค่าที่สูงกว่าวิธีของ Lowry ซึ่งเหตุผลที่เป็นเช่นนี้อธิบายได้ทำนองเดียวกันกับการหาปริมาณโปรตีนในน้ำผึ้งภายหลังการทำ dialysis และ จากผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานของ White และ Kushnir (1967) ซึ่งเขาสรุปได้ว่าวิธี Lowry เป็นวิธีที่ดีที่สุดและเชื่อถือได้มากกว่าวิธีของ uv-absorption เนื่องจากวิธี Lowry นี้ค่าปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้นั้นคิดเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน 1 ตัว ซึ่งแตกต่างกับวิธีของ uv-absorption ที่ไม่มีกราฟมาตรฐานเปรียบเทียบ และเหตุผลที่ว่าวิธี uv-absorption ให้ค่าโปรตีนสูงเกินความจริง เนื่องจากวิธีนี้ค่าที่วัดได้ด้วยวิธีนี้จะรวมถึงสารประกอบไนโตรเจนบางชนิดที่ไม่ใช่โปรตีน ไม่ใช่นิวคลีโอไทด์บางชนิดในปริมาณสูง เช่น กรดอะมิโนบางชนิดที่สามารถดูดกลืนแสงได้ดีในช่วงนี้ด้วย ทำให้ค่าที่วัดได้สูงเกินความจริง (Lillevik,1970;Regenstein,1984 ; Bollag and Edelstein,1991;ชวนพิศ ดีเอกนามกูล,2536)

-<u>ศึกษาผลของเวลาที่มีต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส</u>

ทำนองเดียวกันกับหัวข้อปฏิกิริยาระหว่างแทนนิน (ในรูปเกรดแทนนิค)กับโปรตีนในน้ำผึ้งที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส และผลของสารประกอบบางชนิดที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส จากรูปที่ 29 เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างน้ำผึ้งที่ใส่โปรตีน ร้อยละ0 และ 3 พบว่า เวลาในการทำให้น้ำองุ่นใสในช่วงที่ I ช่วงที่ II ไม่ค่อยแตกต่างกันเท่าไร แต่ เมื่อพิจารณาจากช่วงที่ III ช่วงที่ IV ของการทำน้ำองุ่นให้ใส พบว่า เริ่มแตกต่างโดยเฉพาะเวลาในช่วงที่ IV จะแตกต่างอย่างชัดเจน ($P \leq 0.05$) และ จากผลการทดลองสังเกตได้ว่า น้ำองุ่นที่ใส่โปรตีนความเข้มข้นร้อยละ 3จะใช้เวลาในการทำให้ใสมากกว่าน้ำองุ่นที่ไม่ใส่โปรตีน(ความเข้มข้นร้อยละ 0) จะเห็นได้ว่าการใส่โปรตีนลงในน้ำองุ่นนี้มีผลทำให้เวลาที่ใช้ในการทำน้ำองุ่นให้ใสนานขึ้น (Lee

and Kime,1984;Lee et al.,1985)

จากตารางที่ 63-64 เป็นผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของ เวลาในช่วงที่ I ถึง ช่วงที่ IV ของการทำน้ำองุ่นให้ใส เมื่อแปรชนิดของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลองต่างกัน 4 ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งนุ่น และความเข้มข้นของน้ำผึ้งต่างกัน 4 ระดับ คือ ร้อยละ 0 และ 3 พบว่า เวลาในช่วงที่ I ช่วงที่ IIของการทำน้ำองุ่นให้ใสไม่มีแตกต่างกัน ($P>0.05$) ส่วนเวลาในช่วงที่ III ช่วงที่ IVของการทำน้ำองุ่นให้ใส พบว่าแตกต่าง($P\leq0.05$) จากตาราง พบว่าเวลาที่ใช้ในการทำน้ำองุ่นให้ใสนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลองทั้ง 4 ชนิดคือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งนุ่นอย่างเดียว ($P\leq0.05$) ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลอง 2 ระดับคือ ร้อยละ 0 และ ร้อยละ 3 ($P>0.05$) และผลการทดลองที่ได้ สอดคล้องกับหัวข้อปฏิกิริยาระหว่างแทนนิน (ในรูปกรดแทนนิค) กับโปรตีนในน้ำผึ้งที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส ซึ่งเวลาที่ใช้ในการทำน้ำองุ่นให้ใส (ช่วงที่ IV) นี้ใช้เวลาน้อยกว่า ซึ่งเหตุผลที่เป็นไปได้ คือ ในช่วงนี้ได้มีการใช้โปรตีนที่แยกได้จากวิธี gel filtration ซึ่งโปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง ดังนั้นโอกาสที่โปรตีนจะรวมตัวกับสารประกอบจำพวกแทนนิน (ในรูปกรดแทนนิค) นี้มีได้มากขึ้น ทำให้ในช่วงนี้ใช้ เวลาในการทำน้ำองุ่นให้ใส (ช่วงที่ IV) ได้น้อยกว่า ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานของ Lee และคณะ (1985) ซึ่งเขาสรุปได้ว่า น้ำผึ้งแต่ละชนิดที่ได้ทำการทดลองจะสังเกตเห็นการ เปลี่ยนแปลง เหมือนกัน คือ เวลาที่ใช้ในการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใส (ช่วงที่ IV) นี้ใช้เวลา 110 นาที ซึ่งผลที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงนี้เขาได้อธิบายว่า เกิดจากอัตราส่วนในการรวมตัวของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโปรตีนและแทนนิน (Lee,1984)

-<u>ศึกษาปริมาณแทนนิน (ในรูปกรดแทนนิค)ที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส</u>

ทำนองเดียวกันกับหัวข้อปฏิกิริยาระหว่างแทนนิน (ในรูปกรดแทนนิค)กับโปรตีนในน้ำผึ้งที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส และผลของสารประกอบบางชนิดที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส จากตารางที่ 65 แสดงค่า ปริมาณแทนนิน(ในรูปกรดแทนนิค)ที่วัดในน้ำองุ่น เมื่อแปรชนิดของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลอง 4ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งนุ่น และความเข้มข้นของโปรตีน 2 ระดับคือ ร้อยละ 0 และ 3 จะเห็นได้ว่า ที่ความเข้มข้นของโปรตีนร้อยละ 3 มี

ผลทำให้ค่าปริมาณแทนนิน(ในรูปทรดแทนนิค)น้อยกว่าที่ความเข้มข้นของโปรตีนร้อยละ 0 จากตารางที่ 66-67 เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแทนนิน (ในรูปทรดแทนนิค) พบว่า ค่าปริมาณแทนนิน (ในรูปทรดแทนนิค)ที่ได้ขึ้นอยู่กับ ความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ 2 ระดับ คือ ร้อยละ 0 และ ร้อยละ 3 ($P \leq 0.05$) ส่วนชนิดของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลอง คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งนุ่น พบว่า ไม่มีผล ($P > 0.05$) แสดงว่า น้ำผึ้งที่ผ่านการใส่โปรตีนความเข้มข้นร้อยละ 3 มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยากับแทนนิน (ในรูปทรดแทนนิค)ได้ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนที่ละลายน้ำด้วย

-ประเมินประสิทธิภาพของการทำน้ำองุ่นให้ใส โดยการวัด%transmittance

ทำนองเดียวกันกับหัวข้อปฏิกิริยาระหว่างแทนนิน (ในรูปทรดแทนนิค)กับโปรตีนในน้ำผึ้งที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส และผลของสารประกอบบางชนิดที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส จากตารางที่ 68 แสดงค่า %transmittance ที่วัดได้ในน้ำองุ่น เมื่อแปรชนิดของน้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลอง 4ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งนุ่น และความเข้มข้นของโปรตีน 2 ระดับ คือ ร้อยละ 0 และ ร้อยละ 3 จะเห็นได้ว่า ที่ความเข้มข้นของโปรตีนร้อยละ3 นี้ให้ค่า % transmittance มากกว่าที่ความเข้มข้นของโปรตีนร้อยละ 0 จากตารางที่ 69-70 เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า %transmittance ที่วัดในน้ำองุ่น พบว่า ค่านี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ 2ระดับ คือ ร้อยละ 0 และร้อยละ 3 ($P \leq 0.05$) ส่วนชนิดของน้ำผึ้งทั้ง 4ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งนุ่น พบว่า ไม่มีผล ($P > 0.05$)

จากผลการทดลองที่ได้จึงสามารถสรุปได้ว่า น้ำผึ้งที่ใส่โปรตีนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงไปจะทำให้ค่า %transmittance สูงกว่าน้ำผึ้งที่ไม่ใส่โปรตีน (ร้อยละ 0) แสดงว่า การใช้โปรตีนที่แยกได้จากวิธี gel filtration นี้โปรตีนที่ได้ค่อนข้างบริสุทธิ์ สารประกอบอื่น ๆ ปนเปื้อนอยู่น้อย ดังนั้น โอกาสที่โปรตีนจะรวมตัวกับสารประกอบจำพวกแทนนิน (ในรูปทรดแทนนิค) และสารประกอบฟีนอลิคอื่น ๆ นี้มีได้มากขึ้น จึงทำให้ค่า %transmittance ที่วัดได้นี้มีค่ามากกว่าการใช้โปรตีนที่ไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นเท่ากัน และในขั้นตอนนี้ประสิทธิภาพในการทำน้ำองุ่นให้ใสได้ดีกว่า (ค่า %transmittance จะมีค่าสูงกว่า)