หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

น้ำผึ้ง

ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์มาตรฐาน เลขที่ มอก. 470-2526 ให้ความหมายไว้ว่า น้ำผึ้ง คือ ของเหลวรสหวานซึ่งผลิตขึ้นจากน้ำหวานของดอกไม้ หรือ จากส่วนใดส่วนหนึ่งของต้นไม้เลี้ยงสะสมไว้ในรังผึ้ง (มอก.,2526) องค์ประกอบพื้นฐานทางเคมีของน้ำผึ้ง แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 องค์ประกอบพื้นฐานของน้ำผึ้ง (สิริวัฒน์และเพ็ญศรี, 2529)

องค์ประกอบพื้นฐาน	ร้อยละ	จำนวนกรัม
น้ำ (ความชื้น)	17.20	78.00
ลีวูโลส(levulose หรือ D-fructose)*	38.19	173.20
เดกโทรส(dextrose หรือ D-glucose)*	31.28	141.90
ซูโครส (sucrose)*	1.31	5.90
มอลโตส (maltose)*	7.31	33.20
น้ำตาลอื่น ๆ*	1.50	6.80
กรดกลูโคนิค (gluconic) ซิตริค(citric) มาลิค (malic) ซัคซินิค (succinic) ฟอร์มิค (formic) อาซิติค (acetic) บิวทีริค (butyric) แลคติค (lactic) ไพโรกลูตามิค (pyroglutamic) และ กรดอะมิโน	0.57	2.60
โปรตีน	0.26	1.18
เถ้า (ash) หรือธาตุต่าง ๆ	0.17	0.80
อื่น ๆ	2.21	10.00
รวม	100.00	454.60
*หมายถึง รวมปริมาณน้ำตาล	79.59	361.00

จากตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่าคาร์โบไฮเดรทเป็นสารประกอบที่มีมากที่สุดในน้ำผึ้ง ส่วนใหญ่เป็นพวกโมโนแซคคาไรด์และไดแซคคาไรด์ โดยเฉพาะลีวูโลสและกลูโคสมีอยู่มากที่สุด ปริมาณร้อยละ 85-95 ของปริมาณคาร์โบไฮเดรทในน้ำผึ้ง ส่วนมอลโตสและซูโครสพบเป็นเพียงส่วนน้อย องค์ประกอบอื่น ๆที่พบในน้ำผึ้ง เช่น กรดอินทรีย์ แร่ธาตุ เถ้า กรดอะมิโน และโปรตีน

พบเป็นปริมาณน้อย ประมาณร้อยละ 0.28 แต่มีความสำคัญในแง่การบอกคุณภาพของน้ำผึ้งได้ โปรตีนที่พบในน้ำผึ้งแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับ ชนิดของน้ำผึ้ง ฤดูกาลของน้ำผึ้ง และแหล่งกำเนิดของน้ำผึ้ง ซึ่งแหล่งกำเนิดนั้นมาจากแหล่งของพืช ผึ้ง เกสรดอกไม้ และรวมถึงเอนไซม์บางชนิด เช่น α-amylase (Whtie,1975;White and Kushnir,1967:White,1978; White and Rudyi,1978;Lee et al.,1985,1990;Croft,Mistry,and Washington, 1986; Stadelmeier and Bergner,1986) หรือโปรตีนที่พบอาจแขวนลอยอยู่ในลักษณะคอลลอยด์(colloid) สมบัติของโปรตีนส่วนใหญ่จะมีน้ำหนักโมเลกุลสูงมาก และ มีความหนืดมาก (White,1975,1978)

ประโยชน์ของการศึกษาโปรตีนและกรดอะมิโนในน้ำผึ้ง

โปรตีนในน้ำผึ้งสามารถนำมาใช้ในการพิสูจน์สารเจือปนบางอย่างที่ปลอมปนในน้ำผึ้งได้ (Crane,1975,White,1978;White and Rudyi,1978;Crane,1979) ผลที่ได้จากการวิเคราะห์นี้สามารถบ่งบอกถึงความแตกต่างระหว่างน้ำผึ้งแท้และน้ำผึ้งปลอมได้ (White,1978; White and Rudyi,1978)

วิธีการที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของน้ำผึ้ง

สำหรับวิธีการที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของน้ำผึ้งมีทั้งวิธีการทางฟิสิกส์ และวิธีการทางเคมี ซึ่งวิธีการที่นิยมมาใช้ในการตรวจสอบ ได้แก่

-<u>วิธีการทางฟิสิกส์</u> (physical properties) สำหรับวิธีนี้ มักจะใช้ก่อนการใช้วิธีอื่นๆ เช่น การตรวจหาค่า optical rotation ซึ่งน้ำผึ้งแท้ ควรมีค่าระหว่าง $+5^{o}$ ถึง -20^{o} ส่วนมากน้ำผึ้งแท้มีค่า optical rotation เป็นลบ (negative rotation) ถ้าน้ำผึ้งนั้นมีค่าร้อยละของน้ำตาลซูโครสอยู่มาก ค่า optical rotation จะมีค่าเป็นบวก (positive rotation) (Mitra and Mathew,1988)

-<u>วิธีการทางเคมี</u> (chemical properties) สำหรับวิธีทางเคมีมีหลายวิธี เช่น

-<u>การหาอัตราส่วนระหว่างฟรุกโตสและเดกซ์โตรส</u> สำหรับน้ำผึ้งแท้ จะมีค่านี้ไม่

ควรต่ำกว่า 1 ถ้าค่านี้ มีค่าต่ำกว่า 1 แสดงว่า น้ำผึ้งนั้นอาจมีการปลอมปนได้ (สุหร่าย สายสร, 2520)

-การตรวจสอบเอนไซม์ไดแอสเทส (diastase) การตรวจหาเอนไซม์ชนิดนี้เป็นเครื่องประกอบในการตัดสินใจเกี่ยวกับความบริสุทธิ์ของน้ำผึ้ง ซึ่ง Codex Alimentarius (1969) กำหนดไว้ว่า น้ำผึ้งแท้มีค่านี้ไม่ควรน้อยกว่า 3 นอกจากนี้ค่านี้ยังบอกให้ทราบว่าน้ำผึ้งนั้นได้ผ่านการเตรียมอย่างถูกวิธี และน้ำผึ้งนั้นผ่านการให้ความร้อนมากหรือน้อย นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการเก็บด้วย เพราะ ค่าครึ่งชีวิต(half life) ของเอนไซม์ชนิดนี้ ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิด้วย (White and Subers,1964)

-การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซิ่ง (reducing sugar) เป็นสารปลอมปนที่พบในน้ำผึ้งซึ่งผลิตได้โดย acid hydrolysis สามารถตรวจสอบสารตัวนี้ได้ โดยการตรวจหา hydroxymethyl furfural (HMF) ของน้ำตาลฟรุคโตสและน้ำตาลกลูโคส จาก Codex Alimentarius (1969) กำหนดไว้ว่าค่านี้ไม่ควร เกิน 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ถ้าค่านี้สูงแสดงว่าน้ำผึ้งถูกปลอมปนด้วยน้ำตาลรีดิวซิ่ง นอกจากนี้ค่านี้ยังสามารถบอกถึงน้ำผึ้งนั้นผ่านการ เก็บอย่างถูกต้องหรือไม่ การเก็บน้ำผึ้งที่อุณหภูมิสูง เป็นเวลานาน ทำให้ปริมาณกรดในน้ำผึ้ง เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ทำให้ pH ลดลง และที่อุณหภูมิสูงนี้เอง มีผลทำให้ปริมาณ hydroxymethyl furfural เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ (สุหร่าย สายสร,2520)

-การตกตะกอนด้วยสารเคมีบางชนิด เช่น สารละลายแทนนิน (tannin) phosphotungstic acid,alcohol ทำปฏิกิริยากับโปรตีนในน้ำผึ้ง จะได้ตะกอนที่ประกอบด้วยโปรตีน ตะกอนที่เกิดขึ้นนี้สามารถบ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของน้ำผึ้งได้ (Lund,1909,1910; Voerman and Bakker,1911;Laxa,1923;Crane,1975,1979) ถ้าปริมาณตะกอนที่เกิดขึ้นมาก แสดงว่า น้ำผึ้งอาจมีสารชนิดอื่น ๆ เจือปนอยู่ (White,1978;White and Rudyi,1978)

-การวิเคราะห์กรดในน้ำผึ้ง Codex Alimentarius (1969) กำหนดไว้ว่า น้ำผึ้งแท้มีปริมาณกรดไม่ควร เกิน 40 มิลลิอิควาเลนซ์/1000 กรัมน้ำผึ้ง

-การใช้วิธีการทางอิมมูนวิทยา (Immunological) เทคนิคนี้ได้เริ่มมีการศึกษาในปี ค.ศ.1903 (White,1978)โดย Langer(1915) ได้ใช้วิธีนี้ในการตรวจหาความแตกต่างของโปรตีนในน้ำผึ้งและจากละอองเกสร เช่น การตรวจสอบ anti-bee serum, royal jelly (beebread) หรือ rabbit anti-serum (Langer,1909;Thoni,1911,1913)

-การใช้วิธีอื่น ๆ เช่น formal titrationในการวัดปริมาณตรดอะมิโนทั้งหมด (Tillmans and Kiesgen,1927)

วิธีการวัดปริมาณโปรตีนในน้ำผึ้ง

สำหรับวิธีการที่ใช้ในการวัดปริมาณโปรตีนที่พบในน้ำผึ้ง มีหลายวิธี ได้แก่

-Lowry วิธีนี้อาศัยหลักการเมื่อเติม folin -ciocalteu phenol reagent (phosphomolybdic phosphotungstic acid) ลงในสารละลายที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งจะทำปฏิกิริยาหมู่พีนอลของไทโรซีนได้สารประกอบเชิงซ้อนพวก reduced molybdenum Blue และหาค่าโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700-720 นม.(Lowry et al.,1951)

ข้อดี คือ ใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 40 นาที เป็นวิธีที่เชื่อถือได้ ความผันแประหว่างโปรตีนต่างชนิดกันมีน้อย มีความไว 5-100 ไมโครกรัม/มล. โดยวิธีนี้มีความไวสูงกว่าวิธี Biuret 100 เท่า และวิธี uv-absorption 10 ถึง 20 เท่า (Lowry et al.,1951; Lillevik,1970;Regenstein,1984;Bollag and Edelstein,1991)

ข้อเสีย คือ ปฏิกิริยาเคมีเกิดช้า ไม่ค่อยเสถียรต่อสารเคมีที่ใช้ จะแปรเปลี่ยนไปขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีน โปรตีนเสียสภาพอย่างถาวร (Lowry et al.,1951;Regenstein,1984; Bollag and Edelstein,1991)

White และ Rudyi (1978) ศึกษาวิธีการแยกโปรตีนในน้ำผึ้งจากตัวอย่างน้ำผึ้ง 740 ตัวอย่าง โดยวิธีการทำ dialysis และนำมาหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry พบว่าปริมาณไนโตรเจนส่วนใหญ่ยังเหลืออยู่ในช่วงร้อยละ 40-80 และโปรตีนที่ได้อยู่ในช่วง 58-786 มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำผึ้ง โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 169 ± 71 มก./100 กรัมน้ำผึ้ง

Lee และคณะ (1985) ศึกษาหาปริมาณโปรตีนจากน้ำผึ้งแหล่งต่าง ๆ 7 ชนิด เมื่อผ่านการทำ dialysis และนำมาหาโปรตีนโดยวิธี Lowry พบว่า ค่าปริมาณโปรตีนที่ได้แตกต่างกันมาก ตั้งแต่ช่วง 72-277 มก./100 กรัมน้ำผึ้ง ค่าเฉลี่ยของโปรตีนในน้ำผึ้ง 7 ตัวอย่าง คือ

165.43 มก./100 กรัม น้ำผึ้ง

Lee และคณะ (1990)ศึกษาองค์ประกอบและปริมาณโปรตีนในน้ำผึ้งจากผึ้งต่างชนิดกัน 3 ชนิดคือ A. mellifera ,A. cerana และ A. laboriosa โดยแยกโปรตีนจากน้ำผึ้งโดยวิธี dialysis และนำมาหาโปรตีนโดยวิธี Lowry พบว่า ปริมาณโปรตีนที่ได้มีค่า 192,206 และ 233 มก./100 กรัมน้ำผึ้ง ตามลำดับ

-uv-absorption เป็นวิธีการที่รวดเร็วสำหรับการวิเคราะห์หาโปรตีนในสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นม. วิธีนี้ส่วนใหญ่จะใช้วัดค่าการดูดกลืนแสงสำหรับโปรตีนที่แยกได้หลังจากผ่านคอลัมน์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี่ (column chromatography) (Layne,1957;Bollag and Edelstein,1991)

ข้อดี คือ สามารถวัดได้ทันทีไม่ต้องรอให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมี และ ไม่ทำลายโครงสร้างของโปรตีน และรวดเร็วและมีความถูกต้องพอสมควร ช่วงความไวคือ 0.05–2.0 มก./มล.(Regenstein,1984;Bollag and Edelstein,1991)

-ข้อเสีย คือ สารประกอบบางชนิด เช่น กรดอะมิโนบางชนิดจำพวก aromatic คือ ไทโรซีน ฟีนิลอลานิน และทริฟโตแฟน และกรดนิวคลีอิคบางชนิด สามารถดูดกลืนแสงได้ในช่วงความยาวคลื่นนี้ ทำให้ค่าโปรตีนที่วัดได้โดยวิธีนี้มีค่าสูง (Regenstein,1984 ; Bollag and Edelstein,1991)

-Kjeldahl วิธีนี้อาศัยหลักการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ และสารประกอบไนโตรเจน โดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4) และ ความร้อนไปเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลายอยู่ในช่วง $370^oซ.$–$410^oซ.$ โดยทั่วไปจะเติมตัวเร่ง เช่น การเติมสารประกอบโพแทสเซียมหรือโซเดียมซัลเฟตลงไป เพื่อเร่งให้สารตัวอย่างถูกย่อยได้เร็วขึ้น และถ้าสารตัวอย่างเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มี คาร์บอน และไฮโดรเจน เป็นองค์ประกอบ คาร์บอนและไฮโดรเจนจะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ดังสมการ (Regenstein,1984)

$$C_xH_yN_z \xrightarrow{H_2SO_4\ ,\ K_2SO_4} xCO_2 + 1/2yH_2O + z(NH_4)_2SO_4$$

สารตัวอย่าง

ข้อเสีย คือ ปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบจะเกิดได้ยาก การกัดกร่อนของกรด

ซัลฟูริก และการเกิดฟองในการย่อยสลายในช่วงแรก ๆ และ ใช้เวลาในการย่อยสลายนาน ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างทั้งหมดจะถูกนำมาคำนวณด้วย วิธีนี้มีความไวต่ำไม่สามารถใช้กับตัวอย่างที่มีโปรตีนน้อย (Regenstein,1984; ชุติมา และ ธวัชชัย,2532)

White และคณะ (1962)ศึกษาปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างน้ำผึ้งของอเมริกาจำนวน 490 ตัวอย่าง โดยวิธี Kjeldahl พบปริมาณไนโตรเจนในช่วงร้อยละ 0.000-0.133 ค่าเฉลี่ยคือ ร้อยละ 0.041 ± 0.028 สามารถคำนวณเป็นปริมาณโปรตีนเท่ากับร้อยละ 0.25

White และ Kushnir (1967) ศึกษาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในน้ำผึ้งเมื่อผ่านการทำ dialysis พบว่าค่าไนโตรเจนสูญเสียไปในระหว่างการทำ dialysis ในช่วงร้อยละ 35-65 และทำการวัดปริมาณโปรตีนในน้ำผึ้งโดยเปรียบเทียบ 3 วิธี คือ Lowry,uv-absorption และ Kjeldahl พบว่าวิธี uv-absorption เป็นวิธีที่ให้ค่าสูงที่สุด

White (1975) ศึกษาปริมาณโปรตีนจากน้ำผึ้งแหล่งต่าง ๆกัน พบว่ามีโปรตีนประมาณร้อยละ 0.2 และโปรตีนส่วนใหญ่ที่พบ จะมีน้ำหนักโมเลกุลสูง น้ำผึ้งบางชนิดพบโปรตีนในปริมาณมาก เช่น น้ำผึ้งที่ได้จากพืช Calluna vulgaris มีโปรตีนร้อยละ 1.5 (บางตัวอย่างมีโปรตีนสูงถึงร้อยละ 1.85) และน้ำผึ้งที่ได้จากพืช Leptospermum scoparium ในประเทศนิวซีแลนด์ มีโปรตีนสูงในช่วงร้อยละ 1.0-1.2

Yasui และคณะ(1978) ได้ปรับปรุงการหาปริมาณไนโตรเจน และโปรตีนในตัวอย่างน้ำผึ้งโดยวิธี Kjeldahl พบว่าปริมาณไนโตรเจนในน้ำผึ้ง Chinese มีค่าร้อยละ 0.0275 และน้ำผึ้ง Argentina มีค่าร้อยละ 0.0224 ซึ่งคำนวณเป็นปริมาณโปรตีนในน้ำผึ้ง Chinese มีค่าร้อยละ 0.1719 และน้ำผึ้ง Argentina มีค่าร้อยละ 0.1400

Bogdanov (1981) ศึกษาวิธีการหาปริมาณโปรตีนในน้ำผึ้งโดยวิธี Bradford โดยใช้ bio-rad coomassie brilliant blue G-250 เป็น Dye Binding พบว่า ค่าที่ได้โดยวิธี Bradford แตกต่างกับวิธี Kjeldahl และ Biuret ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ซึ่งค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนที่ได้จากน้ำผึ้ง Swiss 18 ชนิด และน้ำผึ้งชนิดอื่น 16 ชนิด อยู่ในช่วง 129± 59 มก./100 กรัม

วิธีศึกษารูปแบบและสมบัติของโปรตีน มีหลายวิธี คือ

-electrophoresis เป็นเทคนิคที่สำคัญในการแยกสารให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์สารทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ (วิรัช ว่องพัฒนกุล,2531;อาภัสสรา ชมิดท์,2537) หลักการของวิธีนี้ คือ การแยกสารเกิดจากการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีประจุภายใต้สนามไฟฟ้ากระแสตรง อนุภาคที่เคลื่อนที่นี้อาจจะอยู่ในรูปของไอออนโมเลกุลเชิงซ้อนขนาดใหญ่ คอลลอยด์หรือสารแขวนลอยก็ได้ (วิรัช ว่องพัฒนกุล,2531) เทคนิคนี้ จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของสารโมเลกุลใหญ่ (macromolecule)เช่น การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลในแง่ประจุสุทธิ รูปร่าง รวมทั้งการแยกน้ำหนักโมเลกุลที่มีขนาดต่างกัน (วิรัช ว่องพัฒนกุล,2531;พิณทิพ รื่นวงษา,2536;อาภัสสรา ชมิดท์,2537)

-ชนิดของ electrophoresis แบ่งออกได้หลายวิธี คือ (Plumer, 1971; วิรัช ว่องพัฒนกุล,2531;Hames and Rickwood,1990; Bollag and Edelstein,1991; พิณทิพ รื่นวงษา,2536;อาภัสสรา ชมิดท์,2537)

-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) วิธีนี้อาจจะเรียกว่า non denaturing gel electrophoresis หรือ native gel electrophoresis ตัวกลางที่ใช้ คือ อะคริลลาไมด์ (Acrylamide)การเตรียมเจลสามารถทำได้โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดโพลิเมอร์ของอะคริลาไมด์ (CH_2=CH.CO.NH_2) กับ สารเชื่อมโยง (Crosslinking) สายโซ่โพลีอะคริลลาไมด์ที่มีปริมาณเล็กน้อย คือ N,N´- methylenebisacrylamide (CH_2=CH.CO.NH_2).CH_2 มีลักษณะเป็นตาข่ายร่างแห โดยมี ammonium persulphate เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และมี N,N,N,N´-tetramethylethylenediamine (TEMED)เป็นตัวเริ่มต้นและควบคุมการเกิดปฏิกิริยา และป้องกันออกซิเจนซึ่งสามารถยับยั้ง(inhibit) การเกิดปฏิกิริยาได้ ขนาดของเจลที่เตรียมได้จะต่างกัน การเลือกใช้ขึ้นอยู่กับ น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ต้องการแยก (Plumer,1971;Heftmann,1975;วิรัช ว่องพัฒนกุล,2531;Hames and Rickwood, 1990 ;Bollag and Edelstein,1991;อาภัสสรา ชมิดท์,2537)

-sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาหน่วยย่อย (subunit) ของโปรตีน หลักการที่ใช้

อาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลเป็นสำคัญ (Bollag and Edelstein,1991;อาภัสสรา ชมิดท์,2537)สารเคมีที่ใช้คือ sodium dodecyl sulphate (SDS) หรือ sodium lauryl sulphate (SLS) เป็น anionic detergent ที่มีประจุลบ มีสมบัติในการคลายเกลียวและสลายพันธะ disulphide ในโปรตีน ที่ pH เท่ากับ 6.8 โดยสามารถจับกับสายโซ่โพลีเปปไทด์ด้วยอัตราส่วนคงที่ คือ sodium dodecyl sulphate 1.4 กรัมต่อสายโพลีเปปไทด์ 1.0 กรัม และสารประกอบจำพวก thiol เช่น 2-mercaptoethanol หรือ β-mercaptoethanolและ dithiothreitol (DDT) มีสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์โปรตีนจะไปทำการสลายพันธะ disulphideได้ และ sodium dodecyl sulphate สามารถจับกับตำแหน่งโปรตีนเป็นจำนวนมาก เกิดการรวมตัวของโปรตีน ทำให้ประจุสุทธิบนหน่วยย่อยของโปรตีนเป็นลบมาก ซึ่งแต่ละหน่วยย่อยจะมีประจุไม่แตกต่างกัน (Plumer,1971; Clark,1977; อาภัสสรา ชมิดท์,2537)

Helvey (1953) ศึกษาการแยกองค์ประกอบ non- dialysable ในน้ำผึ้งชนิด Buckwheat (Fagopyrum esculentum)โดยวิธีการเหวี่ยงแยก (ultracentrifugation) และ การตกตะกอน (sedimentation) พบว่ามีโปรตีนร้อยละ 0.28 ขององค์ประกอบทั้งหมด และศึกษารูปแบบโปรตีนที่ได้โดยวิธี moving-boundary electrophoresis พบองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด คือ ชนิดแรกมีปริมาณมากที่สุด คือ ร้อยละ 50 มีน้ำหนักโมเลกุล 146000, ชนิดที่สองมีปริมาณร้อยละ 35 มีน้ำหนักน้ำหนักโมเลกุล 73000 และ ชนิดที่สาม มีปริมาณน้อยที่สุด คือ ร้อยละ 15 และคาดว่าเป็นสารประกอบพวกโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 9000

White และ Kushnir (1967) ศึกษารูปแบบโปรตีนในน้ำผึ้ง 13 ชนิด โดยวิธี electrophoresis โดยใช้เจลแป้ง (starch) เป็นตัวกลางในการแยก โดยการแปรความต่างศักย์ 6 ระดับคือ 2.82,2.84,3.04,3.52,3.54 และ 3.68 v/cm. และเวลาที่ใช้ในการแยก 2 ระดับคือ 16 ชม.และ 17 ชม. พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ที่ความต่างศักย์ 3.58 v/cm. เวลาที่ใช้ 17 ชม. โดยได้แถบเป็นจำนวนมากและชัดเจน แตกต่างกันตามชนิด และตัวอย่างของน้ำผึ้ง โดยทุกตัวอย่างมีลักษณะที่เหมือนกันคือ พบแถบเดี่ยวและแถบคู่ที่มีลักษณะเข้มซับซ้อน

Bergner และ Sabir (1979) ศึกษาวิธีการแยกเอนไซม์ amylase จากน้ำผึ้ง

pine จากผึ้งสายพันธุ์ Abies sp. โดยวิธี disc electrophoresis พบว่าได้แถบโปรตีน 7 แถบ ซึ่งไม่สามารถตรวจสอบ จึงได้ทำการปรับปรุงวิธีการโดยใช้วิธี isoelectric focusing พบว่าได้แถบโปรตีน 11-13 ชนิด และจากแถบที่ได้นี้พบว่ามีเพียง 4 แถบ เป็นองค์ประกอบหลักที่ยังมีกิจกรรมของเอนไซม์ amylase และมีค่า isoelectric point (pI) ที่ต่ำ

Dolinsek (1981) ศึกษารูปแบบของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (water soluble protein) ที่ได้จากผลิตภัณฑ์จากเกสรผึ้ง 18 ชนิดที่มาจากแหล่งกำเนิดต่างกัน 6 แหล่ง โดยวิธี sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าแยกได้แถบโปรตีน 6 แถบ ซึ่งทุกตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ พบว่ามีเพียง 2 แถบ ให้รูปแบบการแยกที่เหมือนกัน

Marshall และ Williams (1987) ศึกษารูปแบบของโปรตีนในน้ำผึ้งออสเตรเลีย จำนวน 200 ตัวอย่าง ที่ไม่ได้ผ่านการทำให้เข้มข้น (unconcentrated) โดยวิธี sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis และ ตรวจสอบปริมาณโปรตีนที่ได้โดยวิธี non-ammonical silver staining พบว่าประกอบด้วยแถบ (band) อย่างน้อย 19 แถบ และช่วงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่พบกว้างมาก มีตั้งแต่โปรตีนที่มีขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 10500 จนถึง 500000 จากผลการทดลอง พบว่า แถบที่เป็นองค์ประกอบหลัก มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10500,23000,45000,58000,68000,79000, 102000 และ 121000 ตามลำดับ จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า รูปแบบการแยกที่ได้ไม่ดี เนื่องจาก แถบที่แยกได้ไม่ค่อยชัดเจน จึงทำการปรับปรุงรูปแบบการแยกให้ดีขึ้น โดยใช้วิธี two-dimensional electrophoresis พบว่าน้ำหนักโมเลกุลที่แยกได้มีค่า isoelectric point แตกต่างกันไปดังนี้ คือ น้ำหนักโมเลกุล 10500 มีค่า pI 5.1, น้ำหนักโมเลกุล 23000 มีค่า pI 4.8-6.1,น้ำหนักโมเลกุล 56000 มีค่า pI 4.8-7.7, น้ำหนักโมเลกุล 68000 มีค่า pI 5.2-6.0,น้ำหนักโมเลกุล 79000 มีค่า pI 7.2,น้ำหนักโมเลกุล 102000 มีค่า pI 5.2-5.8 และ น้ำหนักโมเลกุล 121000 มีค่า pI 5.2-5.8 จากผลที่ได้โดยวิธีนี้ พบว่ารูปแบบการแยกโปรตีนที่ได้ไม่ค่อยดี แต่วิธีนี้มีประโยชน์ในการพิสูจน์องค์ประกอบหลักของโปรตีนที่แยกได้

-<u>exclusion chromatography</u> (molecular sieving chromatography; molecular exclusion chromatography ; gel filtration) เป็นเทคนิคในการแยก

โปรตีนที่มีมวลโมเลกุลต่างกัน โดยตัวกลางที่ใช้แยก คือ เจลมีรูพรุนแน่นอน สารตัวอย่างที่มีโมเลกุลใหญ่จะมีมวลโมเลกุลสูงไม่สามารถเข้าไปในรูของเจลได้ ก็ถูกพาออกจากคอลัมน์ได้ง่าย ส่วนสารตัวอย่างที่มีโมเลกุลเล็กเพียงพอที่จะเข้าไปในรูของเจลก็จะถูกกักไว้ ทำให้ใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์นาน ดังนั้น การเลือกใช้ชนิดของเจลเพื่อบรรจุลงในคอลัมน์ต้องพิจารณาจากตัวอย่างที่ต้องการแยก คือ ต้องเลือกใช้เจลที่มีรูขนาดที่ให้สารชนิดหนึ่งผ่านเข้าไปได้ แต่อีกชนิดหนึ่งไม่สามารถเข้าไปได้จึงจะเกิดการแยกที่ดี (Jame and Morris,1964;Plumer,1971;ธวัชชัย ศรีวิบูลย์, 2533)

White และ Kushmir (1967) ศึกษารูปแบบโปรตีนในน้ำผึ้ง (crude protein) จากแหล่งของน้ำผึ้งต่างชนิดกัน และทำการตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนที่แยกได้โดยวิธี gel filtration พบว่า น้ำผึ้งที่มีจุดกำเนิดจากผึ้ง มีมวลโมเลกุลที่พบประมาณ 40000 ดาลตัน และ 240000 ดาลตัน ส่วนน้ำผึ้งที่มีจุดกำเนิดจากพืช มีมวลโมเลกุลที่พบประมาณ 98000 ดาลตัน และมากกว่า 400000 ดาลตัน ซึ่งแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำผึ้ง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาโปรตีนในน้ำผึ้ง รวบรวมได้ดังนี้

Moreau(1911) ศึกษาโปรตีนในน้ำผึ้งโดยการทดสอบทางเคมี เช่น Millons test xanthoproteic reaction ปฏิกิริยาการตกตะกอนโดยการใช้ความร้อน (heat coagulation) แสดงให้เห็นว่าพบโปรตีนบางชนิด เช่น albumins,globulins,proteoses และ peptones

Stitz และ Kominos (1930) ศึกษาโปรตีนในน้ำผึ้งพบว่าประกอบด้วย peptones, albumins, globulins บางชนิด, และ nucleoprotein แต่ไม่พบ protamines, alcohol-soluble albumins, histones และ albuminoids

Paine,Gertler และ Lothrop (1934) ศึกษาอนุภาคแขวนลอยที่พบในน้ำผึ้ง เขาได้ตั้งสมมติฐานว่าความขุ่นที่พบในน้ำผึ้งน่าจะเป็นโปรตีนจึงได้ศึกษา เพื่อแยกโปรตีนในน้ำผึ้ง โดยวิธีการกรองแบบ ultrafiltration พบว่า องค์ประกอบที่พบโดยส่วนใหญ่เป็นโปรตีน มากกว่าครึ่งหนึ่งของปริมาณองค์ประกอบทั้งหมด มีค่า isoelectric point (pI) เท่ากับ 4.3 และ

สามารถกำจัดโปรตีนที่เกิดขึ้นโดยการตกตะกอนกับเบนโตไนต์ (bentonite)

Mitchell,Irvine และ Scoular (1955) ศึกษาวิธีการตกตะกอนโปรตีนในน้ำผึ้งจากพืชชนิด Calluna vulgaris จำนวน 28 ตัวอย่างโดยใช้ trichloroacetic acid (TCA) พบอนุภาคคอลลอยด์พวกโปรตีนในช่วงร้อยละ 58-74 คิดจากองค์ประกอบของไนโตรเจน

Bergner และ Diemair (1975) ศึกษาวิธีการแยกโปรตีนในน้ำผึ้งพบว่าวิธีการที่ใช้แยก และทำให้เข้มข้นมีหลายวิธี เช่น ion - exchange chromatography, gel filtration, dialysis, pressurized filtration และ ultrafiltration พบว่าวิธี ultrafiltration จัดได้ว่าเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการเพิ่มประสิทธิภาพที่ดีในการแยก วิธีการนี้สามารถลดปริมาตรสารตัวอย่างลงได้ถึงร้อยละ 10 ความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้พบว่าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.12-0.92 และนำมาศึกษารูปแบบของโปรตีนที่ได้โดยวิธี gel filtration โดยใช้ตัวกลาง sephadex G-200 และศึกษาลำดับส่วนของโปรตีนที่แยกได้โดยวิธี starch-gel electrophoresis พบว่าประกอบด้วยแถบโปรตีนอย่างน้อย 5 แถบ และผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานของ White และ Kushnir (1897)

ศึกษาสมบัติของโปรตีนในน้ำผึ้งที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมีผลต่อน้ำผลไม้ใส

น้ำผึ้งประกอบด้วยโปรตีนในปริมาณเล็กน้อย คือ ร้อยละ 0.26 (สิริวัฒน์ และเพ็ญศรี, 2529) ประกอบด้วยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญหลายชนิด และมีผลต่อคุณภาพของน้ำผึ้งที่ได้ (Paine,Gertler,and Lothrop,1934 ; White and Kushnir,1967 ; Kime,1982, 1983;Lee and Kime,1984)โดยแหล่งของโปรตีนในน้ำผึ้งนี้อาจมาจากตัวผึ้งหรือชนิดของต้นพืช (White and Kushnir,1967; Kime,1982,1983) โดย Lee และ Kime(1984)ได้ทำการทดลองโดยการใส่น้ำผึ้งลงในน้ำแอปเปิ้ลสด ๆ พบว่า อนุภาคที่ก่อให้เกิดความขุ่นที่พบในน้ำแอปเปิ้ลสามารถรวมตัวกัน และเกิดการตกตะกอนได้ สามารถทำให้น้ำแอปเปิ้ลใสได้ ตะกอนที่เกิดขึ้นนี้ประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิคเป็นจำนวนมากกับโปรตีน (Kieser, Pollard, and Timberlake,1957; Calderon,Van Buren,and Robinson,1968;Heatherbell,1976; Wakayama and Lee,1987) หรือตะกอนที่เกิดขึ้น อาจจะเป็นสารที่เป็นอนุพันธ์ของแทนนินที่เกิดหลังได้รับความร้อนกับกรดเจือจาง (Neubert and Veldhuis,1944)

Lee (1984)ได้ทำการทดลองเพื่อพิสูจน์ว่าโปรตีนในน้ำผึ้งมีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสได้ โดยการนำสารละลายน้ำผึ้งมาทำ dialysis และนำโปรตีนที่ได้ใส่ลงในน้ำแอปเปิ้ล พบว่า น้ำแอปเปิ้ลใสได้ รวมทั้งทดสอบสมมติฐานที่ว่า โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสได้ โดยการนำสารละลายน้ำผึ้งมาเติมเอนไซม์โปรตีเอส (protease)ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 จากนั้นบ่มค้างคืนที่อุณหภูมิ 30°ซ. และนำสารละลายมาต้ม พบว่าเมื่อนำน้ำผึ้งที่ผ่านการบ่มและให้ความร้อนใส่ลงในน้ำแอปเปิ้ลที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ เกิดขึ้น

Lee และคณะ (1985) ศึกษารูปแบบ และสมบัติของโปรตีนในน้ำผึ้งชนิด White Dutch Clover โดยวิธีการทำ dialysis และนำโปรตีนที่ได้นำไปทำให้เข้มข้นโดยวิธี freeze dried ได้โปรตีนเข้มข้น 26 มก./1000 มล.น้ำผึ้ง ซึ่งนำมาศึกษาสมบัติของโปรตีนโดยวิธี gel filtration ในคอลัมน์ขนาด 2.5x50 ซม. ที่ประกอบด้วยตัวกลาง sephadex G-150 ในสารละลาย 0.01m.potassium phosphate buffer pH 6.5 และนำลำดับส่วน(fraction)ที่แยกได้แต่ละส่วนมาหาปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นม. พบว่าลำดับส่วนที่ให้ค่าปริมาณโปรตีนสูงที่สุด คือ ลำดับส่วน A รองลงมา คือ ลำดับส่วน B โดยเขาตั้งสมมติฐานไว้ว่า ลำดับส่วน A และลำดับส่วน B เป็นองค์ประกอบหลักที่มีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสได้ และทำการทดลองเพื่อทดสอบสมมติฐานดังกล่าว โดยการนำลำดับส่วน A และลำดับส่วน B ที่ได้ใส่ลงในน้ำแอปเปิ้ลที่ความเข้มข้น 7.2 มก./100 มล.น้ำแอปเปิ้ล ซึ่งเทียบเท่ากับการใส่น้ำผึ้งที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 สังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลง พบว่า ลำดับส่วน A เป็นองค์ประกอบหลักที่มีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสได้ ส่วนลำดับส่วน B ไม่มีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใส นำลำดับส่วน A และลำดับส่วน B มาศึกษารูปแบบโปรตีนที่ได้โดยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis เทียบกับโปรตีนของน้ำผึ้งเริ่มต้น พบว่า โปรตีนที่ได้จากลำดับส่วน A และลำดับส่วน B ให้รูปแบบการแยกที่เหมือนกัน

Lee และคณะ (1990) ศึกษาผลของโปรตีนที่มาจากผึ้งต่างชนิดกัน 3 ชนิด คือ A. mellifera ,A. cerana และ A. laboriosa ที่มีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใส โดยวิธี gel filtration โดยเดียวกันกับวิธีของ Lee และคณะ (1985) พบว่า ลำดับส่วน A เป็นองค์ประกอบหลักที่มีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสได้ และเมื่อนำมาศึกษารูปแบบของโปรตีนโดยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าโปรตีนในน้ำผึ้งจากผึ้งชนิด A. mellifera

สามารถแยกเป็น 10 แถบ โดยแถบหลักมีค่า R_f เท่ากับ 0.23 และ 0.28 ส่วนโปรตีนจากผึ้งชนิด A. cerana สามารถแยกเป็น 10 แถบ เหมือนกัน แต่ให้รูปแบบการแยกที่ต่างกับน้ำผึ้งชนิด A. mellifera โดยแถบหลักมีค่า R_f เท่ากับ 0.25 ส่วนโปรตีนจากผึ้งชนิด A. laboriosa สามารถแยกเป็น 9 แถบ แถบที่พบไม่พบองค์ประกอบหลัก

น้ำผลไม้

น้ำผลไม้ คือ ของเหลวที่ได้จากการสกัดจากผลไม้ส่วนที่สามารถบริโภคได้ โดยใช้แรงหรือวิธีการเชิงกลอื่น ๆ (Pollard and Timberlake,1971) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ น้ำผลไม้ชนิดใส เช่น น้ำองุ่น น้ำแอปเปิ้ล และ น้ำผลไม้ชนิดขุ่น เช่น น้ำมะม่วง และน้ำส้ม แม้ว่าองค์ประกอบที่ทำให้น้ำผลไม้ขุ่นที่พบตามธรรมชาติ ส่วนใหญ่ยังไม่เป็นที่ทราบอย่างแน่ชัด แต่จากการศึกษาของผู้วิจัยหลาย ๆ ท่านมีความเชื่อว่าความขุ่นของน้ำผลไม้เกิดจากสารประกอบในเซลพืชซึ่งเป็นสาร hydrocolloids เช่น แทนนิน เพคติน แป้ง เจลาติน กัม โปรตีนจากผลไม้ซึ่งมีอยู่หลายชนิด นิวเคลียส และองค์ประกอบอื่น ๆ ส่วนใหญ่เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำลักษณะเป็นโมเลกุลใหญ่เกิดการแขวนลอยในน้ำผลไม้ได้ สารประกอบฟีนอลที่พบในน้ำผลไม้ที่เป็นสาเหตุของความขุ่นมี 4 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ กลุ่ม cinnamic acid และอนุพันธุ์ กลุ่ม flavans และ flavanol กลุ่ม glycoside dihydrochalcones และ glycoside และกลุ่ม condensed tannin (Wakayama and Lee,1987) ซึ่งความขุ่นของน้ำผลไม้ทำให้เกิดการเปลี่ยนสี กลิ่นรสได้ นอกจากนี้อาจเกิดจากปฏิกิริยา hydrolysis ของเอนไซม์ ที่ย่อยสลายเพคติน เช่น เอนไซม์ pectinesterase ในสารแขวนลอยเหล่านั้น อาจจะมีสารที่เป็นน้ำมัน ไขมัน สารที่ให้สีจากผิวผลไม้ หรือเนื้อของผลไม้ (Kelhofer,1908; Davis,Fellers,and Esselen,1949 ; Tressler and Joslyn,1961; อรอนงค์ สินธุ์จาปาศักดิ์,2519 ; ทนง ภัครัชพันธุ์,2524; ประสิทธิ์ อติวีรกุล,2527) ซึ่งพบในปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของผลไม้ด้วย (Calderon,Van Buren,and Robinson,1968)

แทนนิน (tannin)

แทนนิน คือ สารประกอบฟีนอลที่ได้จากธรรมชาติ น้ำหนักโมเลกุลที่พบอยู่ระหว่าง 500 ถึง 3000 ประกอบด้วยหมู่ ฟีนอลิคไฮดรอกซิล (phenolic hydroxyl) อิสระอยู่จำนวนหนึ่ง (1-2 ต่อ 100 หน่วยโมเลกุล) สามารถเชื่อมโยงได้กับโปรตีนและสารไบโอโพลิเมอร์ (biopolymer)โดยได้สารใหม่ที่มีคุณสมบัติคงตัว (Gustavson,1954;White,1956)

ประเภทของแทนนิน แทนนินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนโพลีฟีนอลที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน มีรูปผลึกไม่แน่นอน ยากที่จะสกัดออกมาให้บริสุทธิ์ จึงไม่ค่อยเข้าใจเรื่องโครงสร้างอย่างเด่นชัด เป็นสาเหตุทำให้การแบ่งประเภทของแทนนินไม่ชัดเจนซึ่งในปัจจุบันการแบ่งชนิดของแทนนินขึ้นอยู่กับ ส่วนประกอบโครงสร้างของโมเลกุลของการแยกสลาย (hydrolysis)ด้วยความร้อน กรด เอนไซม์ และเชื้อราต่าง ๆสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ (Hervey,1921;Hillis,1960;Gustavson,1965)

-ไฮโดรไลซ์เซเบิลแทนนิน (hydrolysable tannin) คือแทนนินที่มีโครงสร้างที่ซับซ้อนประกอบด้วยกรดฟีนอลิคตั้งแต่ 2 โมเลกุลขึ้นไปเชื่อมต่อด้วยพันธะเอสเตอร์ (ester linkage) สามารถถูกย่อยสลายได้ง่ายเมื่อทำการแยกสลายด้วยน้ำจะได้ กรดและน้ำตาล เช่น กรดแกลลิค (gallic acid) และ กรดเอลลาจิค (ellagic acid) (Robinson,1967)

-คอนเดนซ์แทนนิน (condensed tannin) คือแทนนินที่เกิดจากการรวมตัวกันอย่างแน่นเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างโมเลกุลซับซ้อนมาก มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 1000 ขึ้นไป ประกอบด้วยโพลิไฮดริกฟีนอล (polyhydric phenol) เชื่อมต่อกันเป็นโมเลกุลใหญ่ด้วยพันธะคาร์บอนไม่สามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้ด้วยกรดหรือด่างได้ แต่ละลายได้ดีในน้ำร้อน แอลกอฮอล์ และอะซิโตน เช่น catechin (Robinson,1967)

สมมติฐานความหนืดและกลไกการเกิดปฏิกิริยาของน้ำผลไม้

จากการศึกษาความเป็นไปได้ของปฏิกิริยาการทำน้ำผลไม้ให้ใสโดยใช้น้ำผึ้งนั้น พบว่าปฏิกิริยาการทำน้ำผลไม้ให้ใสได้นั้น เกิดจากการรวมตัวระหว่างโปรตีนกับแทนนินในรูปที่ละลายน้ำได้และละลายน้ำไม่ได้(Paine,Gertler,and Lothrop,1934;Letzig and Nurnberger, 1963;Goldenstein and Swain,1965; Calderon,Van Buren,and Robinson,1968;

Hagerman and Butler,1978; Kime,1982,1983;Lee and Kime,1984;Lee et al., 1985) ตรงตำแหน่ง O-dihydroxy Phenolics ซึ่งเป็นหมู่หลักสำหรับการรวมตัวกับหมู่คาร์บอนิลกับโปรตีนที่พันธะเปปไตด์ (peptide bond) (Gustavson,1954; Zitko and Rosik,1962;Haslam,1974; Mc Manus et al.,1981) สำหรับพันธะที่คาดว่ามีผลต่อปฏิกิริยาดังกล่าวคือ พันธะไฮโดรเจน (Grassman,1937;Page,1942;Gustavson,1954; Cannon,1955) ส่วนพันธะชนิดอื่น เช่น พันธะโควาเลนต์ และ พันธะอิออนิก ก็สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ แต่เป็นน่าจะมีบทบาทรองลงมา (Gustavson,1954) Zitko และ Rosik(1962) ให้ข้อเสนอแนะว่าแทนนิน 1 โมเลกุลสามารถจับกับโปรตีนที่ตำแหน่งพันธะเปปไตด์ 2 กลุ่ม หรือมากกว่า 2 กลุ่ม การรวมตัวของตะกอนที่เกิดจากความขุ่น ขึ้นอยู่กับการเกิดการเชื่อมข้าม (crosslink) ซึ่งจะเพิ่มมากขึ้นตามความซับซ้อนของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน นอกจากนี้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับ จำนวนพันธะเปปไตด์ ความเข้มข้นของแทนนินและโปรตีน (Zitko and Rosik,1962) จำนวนหมู่ของ hydroxyl phenolic (Grassman,1937; Page,1942; Cannon,1955; Endres and Hoermann,1963; Bate and Smith,1973) pH เกลือ แอลกอฮอล์ และชนิดของแทนนิน (Calderon,Van Buren, and Robinson,1968) และ อัตราการเกิดปฏิกิริยาโพลิเมอร์ไรเซชั่น (polymerization) (Endres and Hoermann,1963)

วิธีการทำน้ำผลไม้ให้ใส (Tressler and Joslyn,1961;ทนง ภัครัชพันธุ์,2524;ประสิทธิ์ อติวีรกุล,2527)

เนื่องจากน้ำผลไม้ที่คั้นจากผลไม้สด ๆ โดยทั่วไปมักจะมีปัญหาในเรื่องของความขุ่นและตะกอนอยู่ที่ก้นภาชนะบรรจุ ทำให้ลักษณะปรากฏของน้ำผลไม้ด้อยลงไป น้ำผลไม้แต่ละชนิดจะมีความขุ่นมากน้อยแตกต่างกันไป และความใสของน้ำผลไม้เป็นปัจจัยที่สำคัญของคุณภาพ น้ำผลไม้บางชนิดนิยมบริโภคกันในลักษณะไม่มีตะกอนหรือความขุ่นหลงเหลืออยู่ เช่น น้ำองุ่น และ น้ำแอปเปิ้ล ดังนั้นจึงจำเป็นจะต้องผ่านกรรมวิธีที่จะกำจัดสารพวกฟีนอลิค โปรตีน และ เพคติน ที่ทำให้ขุ่น วิธีการทำน้ำผลไม้ให้ใสมีหลายวิธี ดังต่อไปนี้

-<u>การใช้ความร้อน</u> ปกติน้ำผลไม้มักจะใสได้หลังจากการให้ความร้อนแล้วเก็บรักษาไว้ ความร้อนทำให้สารแขวนลอยเกิดการตกตะกอน และกรองแยกได้ง่ายขึ้น

-<u>การใช้เอนไซม์</u> การเติมเอนไซม์ที่ย่อยสารประกอบเพคตินจะย่อยโมเลกุลใหญ่ให้เป็นโมเลกุลเล็กลงซึ่งละลายน้ำได้ ทำให้ความหนืดของน้ำผลไม้ลดลงตะกอนต่าง ๆ จะไม่เกิดการแขวนลอย สามารถกรองได้ง่ายขึ้นการใช้ เอนไซม์ทำให้ใสได้จะต้องมีสภาวะที่เหมาะสม เช่น pH อุณหภูมิ ปริมาณ ความเข้มข้นของ เอนไซม์ และเวลา

-<u>การเก็บน้ำผลไม้ไว้ในที่เย็น</u> การเก็บน้ำผลไม้ในที่เย็นเป็นเวลานาน ๆสารแขวนลอยจะค่อย ๆ ตกตะกอนนอนก้นอย่างช้า ๆในที่สุดน้ำผลไม้ส่วนบนจะใส จากนั้นแยก เอาส่วนใสออกมา

-<u>การกรอง</u> เป็นวิธีที่การทำให้น้ำผลไม้มีความใสได้มากการกรองอาจใช้สาร เคมีช่วยตกตะกอน และเครื่องกรอง เช่น filter press

-<u>การใช้สารช่วยตกตะกอน</u> น้ำผลไม้บางชนิดกรองให้ใสได้ยากและทิ้งไว้ก็ตกตะกอนได้ยาก จึงจำเป็น การใช้สารช่วยตกตะกอน ตัวอย่างสารช่วยตกตะกอนบางชนิด ได้แก่

-<u>เบนโทไนท์</u> เป็นผงดินที่มีพื้นที่ผิวสูงมีประจุลบสามารถจับกับโปรตีนซึ่งมีประจุบวกได้ทำให้เกิดการตกตะกอนรวมเอาสารพวกฟีนอลิคและแทนนินลงมาด้วย ปริมาณที่ใช้ระหว่าง 2-3 กรัม/ลิตร มักจะใช้ร่วมกับการพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิห้อง 60^{o}ซ. หรือ อุณหภูมิสูงกว่า ซึ่งจะช่วยให้ตกตะกอนเร็วขึ้น

-<u>ไข่ขาว</u> ไข่ขาวนิยมมาใช้ในรูปผง เมื่อจะใช้จะต้องนำมาละลายในน้ำอุ่น อุณหภูมิของน้ำต้องไม่สูง เกินไปจนทำให้ไข่ขาวตกตะกอน นำน้ำผลไม้ที่ต้องการจะทำให้ใสมาเติมไข่ขาวและ อุ่นน้ำผลไม้ให้มีอุณหภูมิ 70-80^{o}ซ. ซึ่งจะทำให้ไข่ขาวจะตกตะกอนรวมเอาสารแขวนลอยลงมาด้วย แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตะกอนนอนก้นก่อนทำการกรอง

-<u>เคซีน</u> ในทางการค้าอาจ เตรียมเคซีนจากน้ำนมแยก เอาไขมันออก หรือตกตะกอนด้วยกรดเจือจาง ทำการล้างอบแห้งบดเป็นผง นิยมใช้ในรูปสารละลายเข้มข้นร้อยละ 2

-<u>แทนนินกับเจลาติน</u> Kime (1982,1983) อธิบายว่าแทนนินที่พบในน้ำผลไม้ความหมายนี้รวมถึงอนุพันธ์สารพวกแทนนิน เช่น กรดแทนนิค พบในปริมาณต่ำ ไม่ใช่องค์ประกอบหลักทั้งหมดในการทำน้ำผลไม้ให้ใสได้ ในบางครั้งการใช้แทนนินอาจจะมีการใช้ควบคู่กับการ เติมสาร เคมีอื่น เช่น การ เติมเจลาตินลงไปในน้ำผลไม้ เจลาตินจะรวมตัวกับแทนนินในน้ำผลไม้ แล้วเกิดการตกตะกอนลงมาพร้อมทั้งตะกอนอื่น ๆ ลงมา ซึ่งการ เติมแทนนินลงในน้ำผลไม้อาจจะ เติม

ก่อนหรือภายหลังหรือเติมพร้อม ๆ กันก็ได้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำน้ำผลไม้ให้ใส

-น้ำผึ้ง Kime (1982,1983) อธิบายว่า น้ำผึ้งเป็นสารที่ช่วยทำให้น้ำผลไม้มีความใสได้ใช้ได้กับผลไม้สดหรือน้ำผลไม้ที่ผ่านการหมัก เช่น น้ำแอปเปิ้ล และ น้ำองุ่น น้ำผึ้งมีความสามารถในการก่อจัดอนุภาคแขวนลอยที่พบในน้ำผลไม้ได้ และทำให้อนุภาคชุ่นมีความคงตัวก่อนการบรรจุในภาชนะ สำหรับน้ำผึ้งที่จะใช้ได้ในการนี้ไม่มีข้อจำกัดเกี่ยวกับชนิดของน้ำผึ้งอาจจะใช้น้ำผึ้งชนิดเดี่ยวหรือน้ำผึ้งชนิดผสมก็ได้ การใช้น้ำผึ้งในการทำให้น้ำผลไม้ใสนั้นจะต้องใช้ความเข้มข้นของน้ำผึ้งอย่างน้อยร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักของน้ำผลไม้ จึงจะทำให้น้ำผลไม้ใสได้ การใช้ความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่มากกว่าร้อยละ 0.5 จะช่วยเพิ่มอัตราเร็วของการทำน้ำผลไม้ให้ใสได้ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่ใช้ ในทางปฏิบัติช่วงความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่นิยมใช้อยู่ในช่วงร้อยละ 1-10 ส่วนความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่นิยมใช้กันมากและไม่สิ้นเปลือง คือ ร้อยละ 2-4 ต่อน้ำหนักของน้ำผลไม้ ปัจจัยที่มีผลต่อการทำน้ำผลไม้ให้ใส นอกจากจะขึ้นอยู่กับ ชนิดของน้ำผึ้งและความเข้มข้นของน้ำผึ้งแล้ว ยังขึ้นอยู่กับอุณหภูมิด้วย เวลาที่ใช้ในการทำให้น้ำผลไม้ใสนี้ใช้เวลาตั้งแต่ 30 นาที ถึง 24 ชั่วโมง

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำน้ำผลไม้ให้ใสโดยใช้น้ำผึ้ง

-ความเข้มข้นของน้ำผึ้ง Lee และ Kime (1984) ศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำผึ้งต่างกันที่มีต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใส 9 ความเข้มข้น คือ ร้อยละ 0,1,2,3,4,5,7,10 และ 15 ของความเข้มข้นสุดท้าย โดยใช้น้ำผึ้งชนิด Clover และสังเกตการเกิดตะกอนและบันทึกช่วงเวลาต่าง ๆ ในการเปลี่ยนแปลงที่อุณหภูมิห้อง แบ่งได้เป็น 4 ช่วง คือ

ช่วงที่ I เริ่มตกตะกอน (initial coagulation)

ช่วงที่ II ตกตะกอนหนัก (heavy coagulation)

ช่วงที่ III มีการแยกเป็นส่วนใส (sparkling area)

ช่วงที่ IV ตกตะกอนทั้งหมด (total settling)

จากผลการทดลองพบว่า ช่วงความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่เหมาะสม คือ ร้อยละ 4-5 ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยามากที่สุด ส่วนความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่ต่ำกว่าร้อยละ 1 หรือ ความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่มากกว่าร้อยละ 10 อัตราการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสจะเกิดได้ช้าลง

-<u>ชนิดของน้ำผึ้ง</u> Lee และคณะ (1985) ศึกษาน้ำผึ้งชนิดต่าง ๆกันที่มีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใส 7 ชนิดคือ น้ำผึ้งที่เลี้ยงจากน้ำตาล Sucrose,น้ำผึ้งชนิด Citrus,Dandelion, Locust,Basswood,Clover และ Goldenrod โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 3 และสังเกตการเกิดตะกอนและบันทึกช่วงเวลาต่าง ๆ ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงด้วยวิธีเดียวกันกับวิธีของ Lee และ Kime (1984) จากผลการทดลองพบว่า น้ำผึ้งแต่ละชนิดมีความสามารถในการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสได้ต่างกันการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นดังกล่าวอยู่ในช่วงกว้าง ขึ้นอยู่กับ ปริมาณโปรตีนที่มีในน้ำผึ้ง กล่าวคือ น้ำผึ้งชนิด Goldenrod,Locust,Dandelion,Clover และ Basswood เป็นน้ำผึ้งที่มีปริมาณโปรตีนสูง อัตราการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสจะเกิดขึ้นได้เร็วและมากกว่า ในขณะที่น้ำผึ้งที่เลี้ยงจากน้ำตาล Sucrose และ น้ำผึ้งชนิด Citrus เป็นน้ำผึ้งที่มีปริมาณโปรตีนน้อย อัตราการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสเกิดได้ช้ามากกว่า

-<u>pH</u> Lee และ Kime(1984) ศึกษาผลของ pH ช่วงต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใส 8 ค่า คือ 2.0,2.5,3.0,3.5,4.0,4.5,5.0 และ 6.0 โดยใช้น้ำผึ้งชนิด Clover ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 4 ปรับ pHของสารละลายดังกล่าวโดยใช้ HCl หรือ NaOH ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงเวลา ด้วยวิธีเดียวกันกับวิธีที่ใช้ในการศึกษาความเข้มข้นของน้ำผึ้งของ Lee และ Kime (1984) จากผลการทดลองพบว่า ช่วง pH ที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงได้อย่างชัดเจนอยู่ในช่วง pH ที่แคบ คือในช่วง pH 3-4 จะเป็นช่วงที่อัตราการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสเกิดขึ้นได้เร็วโดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วง pH 3.5-4.0 อัตราการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสเกิดขึ้นได้มาก ส่วนช่วง pH ที่ต่ำกว่า 2.5 หรือช่วง pH ที่มากกว่า 4.0 อัตราการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นได้ช้าลง และเกิดได้น้อยมาก

Wakayama และ Lee (1987) ศึกษาผลของ pH ต่างกัน 4 ค่า คือ 3.0,3.5,4.0 และ 4.5 และชนิดของแอปเปิ้ล 6 ชนิด คือ Golden Delicious, Mc Intosh, Rhode Island Greening, Rome, Red Delicious และ Jonathan โดยใช้น้ำผึ้งชนิด Locust ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 4 ปรับ pH ของสารละลายโดยใช้ HCl หรือ NaOH ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงเวลา และบันทึกเวลาในการตกตะกอนแต่ละช่วงได้ 3 ช่วงคือ

<u>ช่วงที่ I</u> เริ่มตกตะกอน (initial coagulation)

ช่วงที่ II ตกตะกอนอย่างหนัก (heavy coagulation)

ช่วงที่ III มีการแยกเป็นส่วนใส (sparkling area)

จากผลการทดลองพบว่า แอปเปิ้ลต่างชนิดกันมีผลต่อเวลาในช่วงที่ I คือ แอปเปิ้ลชนิด Red Delicious, Jonathan และ Rome ใช้เวลาในช่วงที่ I สั้น ส่วนแอปเปิ้ลชนิด Rhode Island Greening และ Mc Intosh ใช้เวลาปานกลางในช่วงที่ I และแอปเปิ้ลชนิด Golden Delicious ใช้เวลานานที่สุดในช่วงที่ I และในช่วง pH ต่ำ แอปเปิ้ลทุกชนิดจะใช้เวลานานในช่วงที่ I ยกเว้นแอปเปิ้ลชนิด Red Delicious และ Jonathan ใช้เวลาเร็วในช่วงที่ I ส่วนที่ pH 4.5 แอปเปิ้ลชนิด Red Delicious และ Jonathan ก็ใช้เวลานานที่สุดในช่วงที่ I

-อุณหภูมิ Lee และ Kime (1984) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่างกันที่มีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใส 5 ช่วงคือ 10^{o}ซ.,30^{o}ซ.,50^{o}ซ.,70^{o}ซ.และ 80^{o}ซ.โดยใช้น้ำผึ้งชนิด Clover ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 4 สังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงเวลา ด้วยวิธีเดียวกันกับ วิธีการที่ใช้ในการศึกษาความเข้มข้นของน้ำผึ้ง Lee และ Kime (1984)จากผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 80^{o}ซ. อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเกิดได้เร็วที่สุด ส่วนในช่วงอุณหภูมิที่ต่ำ 10 ^{o}ซ. นี้ อัตราการเกิดปฏิกิริยาเกิดได้ช้าลง

Mc Lellan,Kime และ Lind(1985) ศึกษาความแตกต่างของอุณหภูมิ 4ระดับที่มีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสคือ 8^{o}ซ. 18^{o}ซ. 35^{o}ซ. และ 48^{o}ซ. โดยการนำน้ำผึ้ง 2 ชนิด คือ Clover และ Alfalfa มาผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60^{o}ซ. จากนั้นนำน้ำผึ้งมากรองแยกเอาตะกอนออก และนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำผึ้งร้อยละ 3 และเติมเอนไซม์เพคตินเนสความเข้มข้นร้อยละ 0.006 สังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงเวลา ด้วยวิธีเดียวกันกับวิธีการที่ใช้ในการศึกษาความเข้มข้นของน้ำผึ้ง Lee และ Kime (1984) จากผลการทดลอง พบว่าเวลาที่ใช้ในช่วงที่ I ขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ กล่าวคือ การใช้อุณหภูมิต่ำ 8^{o}ซ. ใช้เวลานาน 58 นาที อุณหภูมิ 18^{o}ซ. ใช้เวลานาน 45 นาที จะทำให้ใช้เวลาตกตะกอนนาน ส่วนการใช้อุณหภูมิ 35^{o}ซ. และ อุณหภูมิ 48^{o}ซ. ซึ่งเป็นช่วงที่มีอุณหภูมิสูงพบว่า เวลาที่ใช้ในช่วงที่ Iไม่แตกต่างกันคือประมาณ 10 นาที ซึ่งเป็นเวลาที่สั้น

-สายพันธุ์ของผลไม้ Wakayama และ Lee(1987) ศึกษาผลของแอบเบิ้ลต่างกัน 6 พันธุ์ คือ Red Delicious,Rhode Island Greening,Jonathan, Golden Delicious, Rome และ Mc Intosh โดยใช้น้ำผึ้งชนิด Locust ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 4 ด้วยวิธีเดียวกันกับวิธีการศึกษา pH ของWakayama และ Lee (1987)จากผลการทดลองพบว่าแอบเบิ้ลสายพันธุ์ Red Delicious,Rome และ Mc Intosh จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงได้อย่างรวดเร็วในขณะที่แอบเบิ้ลสายพันธุ์ Rhode Island Greening, Jonathan และ Golden Delicious จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ช้ามาก มีผลต่อการทำให้เสาได้น้อยมาก จากการเปลี่ยนแปลงที่ได้นี้สามารถจำแนกแอบเบิ้ลได้เป็น 2 กลุ่ม ตามความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา คือ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่มีสารประกอบแทนนินมีความสามารถสูงในการรวมตัวกับโปรตีนในน้ำแอบเบิ้ล ได้แก่ แอบเบิ้ลสายพันธุ์ Red Delicious, Rome และ Mc Intosh ส่วนกลุ่มที่สอง เป็นกลุ่มที่สารประกอบแทนนินมีความสามารถต่ำในการรวมตัวกับโปรตีนในน้ำผึ้ง ได้แก่ แอบเบิ้ลสายพันธุ์ Rhode Island Greening,Jonathan และ Golden Deliciousซึ่งจากการจำแนกแอบเบิ้ลออกเป็น 2 กลุ่มนี้จะเห็นได้ว่าแอบเบิ้ลแต่ละสายพันธุ์ประกอบด้วยชนิดของแทนนินและความเข้มข้นของแทนนินแตกต่างกัน

-ปริมาณแทนนิน Lee(1984) ศึกษาปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนในน้ำผึ้งกับกรดแทนนิค พบว่า โปรตีนและกรดแทนนิคสามารถรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อน อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนและกรดแทนนิคมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารเริ่มต้น และอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด ที่อัตราส่วนของกรดแทนนิค ต่อ โปรตีน เท่ากับ 1 ต่อ 2-3

-ความร้อน Lee และคณะ (1990) ศึกษาผลของความร้อนและโปรตีนที่มาจากผึ้งต่างกัน 3 ชนิดที่มีผลต่อการทำน้ำแอบเบิ้ลให้ใส คือ A. mellifera, A. cerana และ A. laboriosa ด้วยวิธีเดียวกันกับวิธีการศึกษาความเข้มข้นของน้ำผึ้งของ Lee และ Kime(1984); Lee และคณะ(1985)โดยนำน้ำผึ้งดังกล่าวมาต้มให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 100^{o}ซ. นาน 3 นาที และนำน้ำผึ้งที่ผ่านการต้ม นำไปใส่ในน้ำแอบเบิ้ล พบว่าโปรตีนที่มาจากผึ้งชนิด A. cerana ใช้เวลาเพียง 80 นาที เข้าสู่ช่วงที่ IV น้ำแอบเบิ้ลใสได้ ส่วนโปรตีนที่มาจากผึ้งชนิด A. mellifera และ A. laboriosa พบว่าไม่มีความสามารถในการทำน้ำแอบเบิ้ลใสได้

-<u>สารประกอบบางชนิดที่มีผลทำให้โปรตีนเสียสภาพ</u> Lee (1984) ศึกษาผลของสารเคมีบางชนิดที่มีผลต่อเวลาที่ใช้ในการทำน้ำแอบเบิ้ลให้ใสได้เร็วขึ้น สารเคมีที่ศึกษา คือ 5% trichloroacetic acid และ 0.2% 2-mercaptoethanol ด้วยวิธีเดียวกันกับวิธีการศึกษาความเข้มข้นของน้ำผึ้งของ Lee และ Kime(1984) โดยการนำสารเคมีดังกล่าวใส่ลงในน้ำผึ้งและไปต้มให้ความร้อนเพื่อทำลายโปรตีนในน้ำผึ้ง จากนั้น นำน้ำผึ้งที่ได้ไปใส่ในน้ำแอบเบิ้ลที่เตรียมได้โดยเปรียบเทียบกับน้ำผึ้งที่ไม่ได้เติมสารเคมีใด ๆ เลย และสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น พบว่า น้ำผึ้งที่ผ่านการเติม trichloroacetic acid ใช้เวลาเพียง 85 นาที น้ำแอบเบิ้ลก็ใสได้ ส่วนน้ำผึ้งที่ผ่านการเติม 2-mercaptoethanol ใช้เวลาเพียง 60 นาที น้ำแอบเบิ้ลก็ใสได้ ส่วนน้ำผึ้งที่ไม่ได้ผ่านการเติมสารเคมีใด ๆเลย ใช้เวลา 200 นาที น้ำแอบเบิ้ลใสได้ ซึ่งอธิบายได้ว่าน้ำผึ้งที่ผ่านการเติมสารเคมีที่ทำลายโปรตีน และ ความร้อนจะทำให้องค์ประกอบของโปรตีนถูกทำลายเป็นโมเลกุลเปิด (opened chain) อยู่ในรูปที่เสียสภาพ (denature) ซึ่งประกอบด้วย active site หลายตำแหน่ง ทำให้โปรตีนจับกับกรดแทนนิคได้มากขึ้นปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้รวดเร็วขึ้น

-<u>สายพันธุ์ของผึ้ง</u> Lee และคณะ (1990) ศึกษาความแตกต่างของผึ้ง 3 สายพันธุ์ คือ <u>A. mellifera</u>,<u>A. cerana</u> และ <u>A. laboriosa</u> ที่มีผลต่อการทำน้ำแอบเบิ้ลให้ใส ด้วยวิธีเดียวกันกับวิธีการศึกษาความเข้มข้นของน้ำผึ้งของ Lee และ Kime (1984) และ Lee และคณะ(1985) พบว่า เมื่อใช้น้ำผึ้งจากผึ้งสายพันธุ์ <u>A. mellifera</u> เข้าสู่เวลาในช่วงที่ I 20 นาที และเข้าสู่เวลาในช่วงที่ IV 110 นาที น้ำแอบเบิ้ลก็ใสได้ ส่วนน้ำผึ้งที่มาจากผึ้งสายพันธุ์ <u>A. cerana</u> และ <u>A. laboriosa</u> ไม่มีความสามารถในการทำน้ำแอบเบิ้ลให้ใสได้

-<u>ความเข้มข้นของเอนไซม์</u> Mc Lellan,Kime และ Lind (1985) ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์เพคตินเนส 3 ระดับคือ ร้อยละ 0,0.003 และ 0.006 และ ความเข้มข้นของน้ำผึ้ง 3 ระดับคือ ร้อยละ 0,1.5 และ 3.0 ที่มีผลต่อการทำน้ำแอบเบิ้ลให้ใส โดยศึกษาเปรียบเทียบกัน 2 แบบคือ การใช้เอนไซม์ร่วมกับการใช้น้ำผึ้งกับการใช้เอนไซม์หรือการใช้น้ำผึ้งเพียงอย่างเดียว สังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงเวลา ด้วยวิธีเดียวกันกับวิธีการที่ใช้ในการศึกษาความเข้มข้นของน้ำผึ้ง Lee และ Kime (1984)ผลการทดลองพบว่าการใช้เอนไซม์

ร่วมกับการใช้น้ำผึ้งมีประสิทธิภาพดีกว่า ทำให้สามารถลดระยะเวลาในช่วงที่ I ลงได้มาก และใช้เวลาน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์หรือการใช้น้ำผึ้งเพียงอย่างเดียว และจากผลการทดลองยังพบว่า การใช้น้ำผึ้งอย่างเดียวไม่สามารถลดความหนืดของน้ำแอปเปิ้ลลงได้

ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอล Wakayama และ Lee (1987) ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคต่างกันที่มีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสได้ โดยใช้แอปเปิ้ล 6 ชนิด คือ Golden Delicious, Mc Intosh, Rhode Island Greening, Rome, Red Delicious และ Jonathan โดยใช้น้ำผึ้งชนิด Locust ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 4 ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงเวลา ด้วยวิธีเดียวกันกับวิธีที่ใช้ในการศึกษา pH ของ Wakayama และ Lee (1987) ผลการทดลองพบว่าสารประกอบฟีนอลิคที่พบในแอปเปิ้ลมี 6 ชนิด คือ tannic phenolics, non-tannic phenolics, condensed phenolics,hydrolyzable tannins,non tannin flavans และ simple phenolics ในปริมาณที่แตกต่างกัน เวลาที่ใช้ในช่วงที่ I ไม่ขึ้นกับจำนวนหมู่ของสารประกอบฟีนอลิคที่แตกต่างกัน และนอกจากนี้ พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคที่แตกต่างกันนี้ไม่มีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใส