การประยุกต์ใช้น้ำผึ้งเพื่อทำน้ำผลไม้ให้ใส

วัฒนา วิริวุฒิกร

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

น้ำผลไม้

น้ำผลไม้คือ ของเหลวที่สกัดได้จากผลไม้ที่ใช้บริโภคโดยใช้แรงหรือวิธีการเชิงกลอื่นๆ ถ้าแบ่งน้ำผลไม้ตามลักษณะความขุ่น ความใสของน้ำผลไม้ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ น้ำผลไม้ชนิดใส เช่น น้ำองุ่น น้ำแอปเปิ้ล และน้ำผลไม้ชนิดขุ่น เช่น น้ำมะม่วง น้ำส้ม (Tressler and Joslyn, 1961)

สาเหตุความขุ่นของน้ำผลไม้

องค์ประกอบที่ทำให้น้ำผลไม้ขุ่นที่พบตามธรรมชาติ ส่วนใหญ่ไม่เป็นที่ทราบอย่างชัดเจน แต่จากการศึกษาของผู้วิจัยหลายๆ ท่านมีความเชื่อว่าความขุ่นของน้ำผลไม้เกิดจากสารประกอบในเซลล์พืช เป็นสารพวกไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid) เช่น แทนนิน เพคติน แป้ง เจลาติน กัม โปรตีนจากผลไม้ซึ่งมีอยู่ในพืชหลายชนิด นิวเคลียส และองค์ประกอบอื่นๆ ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำมีลักษณะเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่และเกิดการแขวนลอยในน้ำผลไม้ได้ สารประกอบฟีนอลิคที่พบในน้ำผลไม้ที่เป็นสาเหตุของความขุ่นมี 4 ประเภทใหญ่ๆ คือ กลุ่ม cinnamic acid และอนุพันธุ์ กลุ่ม flavan และ flavanol กลุ่ม glycoside dihydrochalcone และ glycoside กลุ่ม condensed tannin (Wakayama and Lee, 1987) ความขุ่นของน้ำผลไม้เป็นสาเหตุทำให้น้ำผลไม้เกิดการเปลี่ยนสี กลิ่นรสได้ นอกจากนี้อาจเกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรลิซีสของเอ็นไซม์ที่ย่อยสลายเพคติน เช่น pectinesterase ในสารประกอบที่แขวนลอยเหล่านั้นอาจจะเป็นสารที่เป็นน้ำมัน ไขมัน สารที่ให้สีจากผิวผลไม้หรือเนื้อผลไม้ (Tressler and Joslyn, 1961) ปริมาณที่พบจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของผลไม้ด้วย (Calderon et al., 1968)

สมมติฐานความขุ่นของน้ำผลไม้

จากการศึกษาความเป็นไปได้ของปฏิกิริยาการทำน้ำผลไม้ให้ใสโดยใช้สารเคมีบางชนิด เช่น ไข่ขาว เจลาติน พบว่าเกิดจากการรวมตัวระหว่างโปรตีนกับแทนนินตรงตำแหน่ง O-dihydroxy phenolic ซึ่งเป็นหมู่หลักสำหรับการรวมตัวกับหมู่คาร์บอนิลกับโปรตีนที่พันธะเปปไตด์ (peptide bond) สำหรับพันธะที่คาดว่ามีผลต่อปฏิกิริยาดังกล่าวคือ พันธะไฮโดรเจน ส่วนพันธะชนิดอื่นๆ เช่น พันธะโคเวเลนต์ และพันธะอิออนิก ก็สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้แต่น่าจะมีบทบาทรองลงมา (Gustavson, 1954) และนอกจากนี้บางสมมติฐานก็เสนอว่าแทนนิน 1 โมเลกุล สามารถจับกับโปรตีนที่พันธะตำแหน่ง

เปปไตด์ 2 กลุ่ม หรือมากกว่า 2 กลุ่ม การรวมตัวกันของตะกอนที่เกิดจากความขุ่นขึ้นอยู่กับการเกิดพันธะเชื่อมข้าม (crosslink) ซึ่งจะเพิ่มมากขึ้นตามความซับซ้อนของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน นอกจากนี้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับจำนวนพันธะเปปไตด์ ความเข้มข้นของแทนนินและโปรตีน จำนวนหมู่ของ phenolic hydroxyl pH เกลือ แอลกอฮอล์ ชนิดของแทนนินและอัตราการเกิดปฏิกิริยาโพลิเมอร์ไรเซชั่น (polymerization) (Endres and Hoermann, 1963 ; Calderon et al., 1968)

กลไกการเกิดความขุ่นของน้ำผลไม้

สำหรับกลไกการเกิดความขุ่นของน้ำผลไม้เกิดจากอนุภาคที่แขวนลอยซึ่งเป็นสารประกอบไฮโดรคอลลอยด์ที่ชอบน้ำปรากฏในน้ำผลไม้ประกอบด้วยอนุภาคแขวนลอยที่สำคัญอยู่รอบ ๆ เป็นชั้นของน้ำที่ถูกดูดซับและประจุที่อยู่รอบ ๆ โดยการเลือกอิออนที่ถูกดูดซับโดยการแตกตัวเป็นหมู่คาร์บอนิลอิสระ เช่น โปรตีน ชั้นของน้ำที่ถูกดูดซับและประจุไฟฟ้าป้องกันอนุภาคจากการรวมตัวในบริเวณใหญ่ที่มีการรวมตัวและการตกตะกอน การดูดซับ การแตกตัวเป็นอิออนและธรรมชาติของปฏิกิริยากับอนุภาคที่แขวนลอยอื่นที่มีผลต่อความคงตัว ส่วนการรวมตัวและการตกตะกอนอาจมีผลจากการทำให้ประจุทางไฟฟ้าเป็นกลาง โดยวิธีการทำแห้ง และเกิดการสูญเสียพื้นผิวหน้าโดยการให้ความร้อนในอนุภาคคอลลอยด์หนึ่ง ซึ่งอาจจะมีผลกับอนุภาคอีกอนุภาคหนึ่ง ทำได้โดยการกระตุ้นและการทำให้เกิดการตกตะกอนโดยใช้สารที่มีประจุไฟฟ้า (electrolyte) หรืออีกทางหนึ่งที่สามารถป้องกันหรือทำให้อนุภาคมีความเสถียร หรือถ้าอนุภาคแขวนลอยที่มีประจุตรงข้ามอยู่รวมกันในสัดส่วนที่เหมาะสม ประจุแต่ละประจุอาจจะตกตะกอนซึ่งกันและกัน และสามารถกำจัดตะกอนออกไปได้ (Tressler and Joslyn, 1961)

การใช้น้ำผึ้งสำหรับการทำน้ำผลไม้ให้ใส

เป็นที่ทราบกันดีว่า องค์ประกอบหลักที่พบในน้ำผึ้งมากที่สุด คือ คาร์โบไฮเดรต ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบโมโนแซคคาไรด์ โดยเฉพาะลีวูโลสและกลูโคสเป็นน้ำตาลที่พบเป็นปริมาณมากที่สุดถึงร้อยละ 85-95 ของปริมาณคาร์โบไฮเดรตในน้ำผึ้ง น้ำก็เป็นองค์-ประกอบที่พบรองลงมาร้อยละ 17.2 ส่วนองค์-ประกอบอื่น ๆ เช่น กรดอินทรีย์ แร่ธาตุ เถ้า พบในปริมาณน้อย ร้อยละ 0.05-0.79 ส่วนปริมาณพบในปริมาณน้อยปริมาณร้อยละ 0.26 แต่มีความสำคัญในแง่การบอกคุณภาพของน้ำผึ้งได้ ปริมาณโปรตีนที่พบนี้จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำผึ้ง ฤดูกาลของน้ำผึ้ง และแหล่งกำเนิดของน้ำผึ้ง โดยแหล่งกำเนิดของน้ำผึ้งนั้นมาจากพืช ตัวผึ้ง เกสรดอกไม้ รวมถึงเอ็นไซม์บางชนิด เช่น α-amylase (White and Rudyj, 1978) โปรตีนที่พบในน้ำผึ้งนั้นอาจจะพบในลักษณะคอลลอยด์ที่แขวนลอย และ

สมบัติของโปรตีนที่พบส่วนใหญ่จะมีน้ำหนักโมเลกุลสูงมากและมีความหนืดสูงมาก (White, 1975) ประโยชน์ของการศึกษาโปรตีนในน้ำผึ้งสามารถนำมาใช้ในการพิสูจน์สารเจือปนบางอย่างที่ปลอมปนในน้ำผึ้งได้และผลที่ได้จากการวิเคราะห์นี้สามารถบอกถึงความแตกต่างระหว่างน้ำผึ้งแท้และน้ำผึ้งปลอมได้ (White and Rudyj, 1978)

ในปี ค.ศ. 1982 Robert Kime แห่งภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยคอร์เนลล์ ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นนักวิทยาศาสตร์คนแรกที่ได้ค้นพบวิธีการนำน้ำผึ้งมาใช้ในการทำน้ำผลไม้ให้ใส เริ่มต้นได้ทำการทดลองโดยใช้โปรตีนจากน้ำผึ้งใส่ลงในน้ำผลไม้หลายๆ ชนิด เพื่อสังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ยังได้ศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้สารประกอบแทนนินร่วมกับการใช้โปรตีนจากน้ำผึ้ง เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการทำน้ำผลไม้ให้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลการใช้เอ็นไซม์ร่วมกับการใช้น้ำผึ้งและแทนนิน พบว่า ประสิทธิภาพการทำน้ำผลไม้ให้ใสดีขึ้นกว่าเดิม สามารถลดระยะเวลาในการทำน้ำผลไม้ให้ใสลงได้ และผลที่ได้ดีกว่าผลของการใช้น้ำผึ้งอย่างเดียว จากการค้นคว้านั้นได้ประสบความสำเร็จในการค้นพบ จึงได้ทำการจดสิทธิบัตร (patent) ไว้

และต่อมาในปี ค.ศ. 1983 Robert Kime ได้ศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมต่อจากผลงานที่รายงานไว้ในปี ค.ศ. 1982 ซึ่งได้เสนอแนะว่าปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างโปรตีนจากน้ำผึ้งและแทนนินนี้ในน้ำผลไม้เหมือนกับการใช้สารเคมี เช่น เจลาตินแทนการใช้โปรตีนจากน้ำผึ้งกับแทนนิน และนอกจากนี้ยังได้ศึกษารายละเอียดของเทคนิคและเวลาการผสมให้เข้ากัน (mixing) อย่างเพียงพอระหว่างน้ำผึ้งและน้ำผลไม้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผสมให้ดีขึ้น และตั้งทิ้งไว้อย่างเพียงพอ โดยเวลาที่ใช้ให้ตกตะกอนตกอย่างสมบูรณ์ตั้งแต่ 30 นาที จนถึง 24 ชั่วโมง เวลาที่ทำให้ตกตะกอนที่แตกต่างกันนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งของน้ำผึ้ง ความเข้มข้นของน้ำผึ้ง ชนิดของน้ำผลไม้ที่ใช้ และอุณหภูมิที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังได้ศึกษาเทคนิคในการแยกตะกอนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าวโดยวิธีการกรองและสามารถแยกตะกอนออกจากส่วนที่เป็นน้ำใส (supernatant) ได้ ทำให้น้ำผลไม้มีความใสมากขึ้นกว่าเดิม

นอกจากนี้ Robert Kime ยังได้กล่าวถึงข้อดีในการใช้น้ำผึ้งทำให้น้ำผลไม้ใสเมื่อเทียบกับการใช้เอ็นไซม์และสารเคมีบางชนิดที่ทำให้ใส เช่น เบนโทไนต์ เจลาติน ไข่ขาว คือ น้ำผึ้งนอกจากจะเป็นสารอาหารที่ให้ความหวานที่มีคุณค่าทางโภชนาการทำให้น้ำผลไม้มีเนื้อสัมผัสเพิ่มมากขึ้น คุณค่าทางอาหารไม่เปลี่ยนแปลง และเป็นการประหยัดพลังงานในขั้นตอนการให้ความร้อนและการทำให้เย็นลงได้ นอกจากนี้แล้วประโยชน์ของการใช้น้ำผึ้งที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ สามารถป้องกันไม่ให้เพคตินที่เป็นองค์ประกอบสำคัญที่พบในน้ำผลไม้ที่มีบทบาทสำคัญมากต่อร่างกายถูกกำจัดออกไปได้ เช่น การป้องกัน

การหดตัวของลำไส้ การกำจัดสารพิษในร่างกาย เช่น โลหะหนัก และลดระดับของโคเลสเตอรอลในเลือดได้ เป็นต้น

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำน้ำผลไม้ให้ใสโดยใช้น้ำผึ้ง

ดังได้กล่าวมาข้างต้นแล้วว่า นับตั้งแต่ Robert Kime เป็นนักวิทยาศาสตร์คนแรกที่ริเริ่มศึกษาเรื่องการนำน้ำผึ้งมาใช้ในการทำน้ำผลไม้ให้ใส นับว่าเป็นจุดเริ่มต้นที่ดี ทำให้มีนักวิทยาศาสตร์คนอื่น ๆ ได้พยายามริเริ่มศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมต่อมาอย่างลึกซึ้งขึ้นเพื่อให้เข้าใจในเรื่องของกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวมากขึ้น จึงได้มีการศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทำน้ำผลไม้ให้ใสมากขึ้น เช่น ชนิดและความเข้มข้นของน้ำผึ้ง pH อุณหภูมิ ความร้อน ปริมาณแทนนิน ความเข้มข้นของแทนนิน สายพันธุ์ของผึ้ง ชนิดของน้ำผลไม้ สารประกอบบางชนิดที่มีผลทำให้โปรตีนเสียสภาพ ชนิดและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ ชนิดและความเข้มข้นของสารประกอบโพลิฟีนอล และผลของการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล และในบางกรณีนั้นการศึกษาเพียงแค่ปัจจัยเดียวนั้นให้ผลไม่ค่อยชัดเจนนักจึงได้มีการศึกษาผลของปัจจัยต่าง ๆ ร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำน้ำผลไม้ให้ใสได้ดีขึ้น ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. ชนิดของน้ำผลไม้ ชนิดของน้ำผลไม้ที่จะนำมาศึกษาในการทำน้ำผลไม้ให้ใสโดยการใช้น้ำผึ้งมีหลายชนิด ไม่มีข้อจำกัด น้ำผลไม้ที่ศึกษาได้แก่ น้ำผลไม้สด เช่น น้ำแอปเปิ้ล น้ำองุ่น น้ำลูกแพร์ น้ำลูกพลัม น้ำแครนเบอรรี่ hard apple cider sweet apple cider น้ำผลไม้ที่ผ่านการหมัก เช่น ไวน์ขาวและไวน์แดง และน้ำผลไม้ที่ผ่านกรรมวิธีการให้ความร้อนแบบพาสเจอร์ไรซ์ (pasteurized) (Kime, 1982, 1983)

2. ความเข้มข้นของน้ำผึ้ง มีการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่มีประสิทธิภาพในการทำน้ำผลไม้ให้ใส พบว่า ความเข้มข้นของน้ำผึ้งอย่างน้อยที่สุดที่ใช้ในการทำน้ำผลไม้ให้ใสคือร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักของน้ำผลไม้ แต่ในทางปฏิบัตินิยมใช้น้ำผึ้งอยู่ในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 1-10 ของน้ำหนักของน้ำผลไม้ และช่วงความเข้มข้นที่นิยมใช้มากที่สุดในการทำน้ำผลไม้ให้ใสและไม่สิ้นเปลืองคือ ความเข้มข้นของน้ำผึ้งร้อยละ 2-5 ต่อน้ำหนักของน้ำผลไม้ (Kime, 1982, 1983) และมีรายงานจากการวิจัยบางฉบับที่ศึกษาช่วงของความเข้มข้นของน้ำผึ้งที่น้อยกว่าร้อยละ 1 พบว่าไม่สามารถทำให้น้ำผลไม้บางชนิด เช่น น้ำแอปเปิ้ลใสได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากน้ำแอปเปิ้ลมีความหนืดสูง การใช้โปรตีนจากน้ำผึ้งอย่างเดียวจึงไม่เพียงพอ อาจจะต้องศึกษาถึงปัจจัยอื่นร่วมด้วย เช่น การใช้เอ็นไซม์บางชนิดร่วมในการศึกษาด้วย และการใช้น้ำผึ้งที่มีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 7 ขึ้นไปจะทำให้ประสิทธิภาพในการทำน้ำผลไม้ให้ใสลดลง (Lee and Kime, 1984) เนื่องจากในน้ำผึ้งมีปริมาณน้ำตาลเป็นองค์ประกอบมากที่สุด ดังนั้นน้ำตาลนี้อาจจะไปขัดขวางปฏิกิริยาระหว่างแทนนิน

และโปรตีนจากน้ำผึ้ง ทำให้การรวมตัวเป็นไปได้ยากขึ้น หรือโปรตีนบางส่วนที่มีอยู่นี้อาจจะรวมตัวกันเองหรือโปรตีนอาจจะไปรวมตัวกับสารประกอบชนิดอื่นๆ ในน้ำแอปเปิ้ลมากกว่าแทนนิน หรือเหตุผลสุดท้ายที่อาจเป็นไปได้คือพันธะที่เชื่อมกันระหว่างโปรตีนและน้ำตาลในน้ำผึ้ง แข็งแรงทำให้ยากต่อการที่โปรตีนในน้ำผึ้งจะรวมตัวกับสารประกอบแทนนิน มีผลทำให้ปฏิกิริยาการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสเกิดได้ช้าลง

3. ชนิดของน้ำผึ้ง จากรายงานวิจัยในต่างประเทศพบว่าชนิดของน้ำผึ้งที่ทำให้น้ำผลไม้ใสมีหลายชนิด เช่น Sunflower Buckwheat Clover น้ำผึ้งที่เลี้ยงจากน้ำตาลซูโครส (sucrose) Citrus Dandelion Locust Basswood และ Goldenrod เป็นต้น (Kime, 1982, 1983; Lee and Kime, 1984; Lee et al., 1985) หรืออาจจะใช้น้ำผึ้งหลายๆ ชนิดรวมกันก็ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานเพิ่มเติมว่า น้ำผึ้งแต่ละชนิดมีความสามารถในการทำน้ำผลไม้เช่นน้ำแอปเปิ้ลให้ใสได้ต่างกัน การเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันอยู่ในช่วงกว้างขึ้นอยู่กับปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำผึ้ง เช่น น้ำผึ้งชนิด Goldenrod Locust Dandelion Clover และ Basswood เป็นชนิดของน้ำผึ้งที่มีปริมาณโปรตีนสูง (ร้อยละ 0.28 0.24 0.17 0.15 0.18 ตามลำดับ) ทำให้อัตราการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสจะเกิดขึ้นได้รวดเร็วกว่าน้ำผึ้ง Citrus และน้ำผึ้งที่เลี้ยงจากน้ำตาลซูโครส ซึ่งเป็นน้ำผึ้งที่มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่า (ร้อยละ 0.07 0.07 ตามลำดับ) ดังนั้นอัตราการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสจึงเกิดขึ้นได้ช้ามาก (Lee et al., 1985)

4. pH การศึกษาผลของ pH ช่วงต่างๆ ที่มีผลต่อการทำน้ำผลไม้บางชนิด เช่น น้ำแอปเปิ้ล โดยใช้ pH ช่วงที่กว้างต่างกันตั้งแต่ 2.0-6.0 จากผลการทดลองพบว่าช่วง pH ที่ต่างกันนี้มีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสได้แตกต่างกัน แต่จากการทดลองพบว่า pH ที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจนในช่วง pH แคบ คือ pH 3.0-4.0 จะเป็นช่วงที่อัตราการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสได้เร็ว และในช่วง pH 3.5-4.0 นี้ อัตราการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสเกิดขึ้นได้อย่างเร็วมาก ส่วน pH ที่ต่ำกว่า 2.5 หรือ pH ที่มากกว่า 4.0 อัตราการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดได้ช้าลงและเกิดได้น้อยมาก (Lee and Kime, 1984) สาเหตุที่ทำให้ pH ในช่วง 3.5-4.0 เป็นช่วง pH ที่เหมาะสมเนื่องจากในช่วง pH ดังกล่าวเหมาะสมกับการทำงานของแทนนิน ซึ่งแทนนินบางส่วนจะรวมตัวกับโปรตีนในน้ำผึ้งในรูปสารประกอบที่ละลายน้ำได้และในรูปที่ละลายน้ำไม่ได้ ทำให้เกิดตะกอนขึ้นมา ทำให้ลักษณะของตะกอนที่เกิดขึ้นมีขนาดไม่สม่ำเสมอและมีปริมาณมาก และปฏิกิริยาดังกล่าวจะเกิดขึ้นได้มากที่สุด เมื่อ pH อยู่ใกล้ช่วง isoelectric point (pI) ของโปรตีนในน้ำผึ้ง (Paine et al., 1934)

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาเพิ่มเติมมากขึ้นในช่วง pH ต่างกัน 4 ช่วงคือ 3.0 3.5 4.0 และ 4.5 ที่มีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสโดยใช้แอปเปิ้ลต่างกัน 6 ชนิด คือ Golden Delicious

McIntosh Rhode Island Greening Rome Red Delicious และ Jonathan จากผลการทดลองพบว่า แอปเปิ้ลต่างชนิดกันมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน กล่าวคือที่ pH ต่ำกว่า 3 แอปเปิ้ลทุกชนิด ยกเว้นชนิด Red Delicious และ Jonathan เริ่มตกตะกอนอย่างรวดเร็วกว่า pH ช่วงอื่นๆ และในทางตรงกันข้ามที่ pH 4.5 แอปเปิ้ลชนิด Red Delicious และ Jonathan จะเข้าสู่ช่วงการเปลี่ยนแปลงช่วงเริ่มตกตะกอนอย่างสมบูรณ์กว่าแอปเปิ้ลชนิดอื่นๆ(Wakayama and Lee, 1987)

5. สายพันธุ์ของผลไม้ ได้มีการศึกษาผลของแอปเปิ้ลต่างชนิดกัน 6 ชนิด คือ Red Delicious Rhode Island Greening Jonathan Golden Delicious Rome และ McIntosh ที่มีต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใส จากผลการทดลองพบว่า สายพันธุ์ของแอปเปิ้ลต่างชนิดกันมีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสได้แตกต่างกัน จากผลการทดลองที่ได้สามารถจำแนกแอปเปิ้ลออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่มีสารประกอบแทนนินที่มีความสามารถสูงในการรวมตัวกับโปรตีนในน้ำผึ้ง ได้แก่ แอปเปิ้ลสายพันธุ์ Red Delicious Rome และ McIntosh และสามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงได้อย่างรวดเร็วและชัดเจน ส่วนในกลุ่มที่สองเป็นกลุ่มที่สารประกอบแทนนินมีความสามารถต่ำในการรวมตัวกับโปรตีนในน้ำผึ้ง ได้แก่ แอปเปิ้ลสายพันธุ์ Rhode Island Greening Jonathan และ Golden Delicious และสามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ไม่ค่อยชัดเจน ซึ่งการจำแนกแอปเปิ้ลออกเป็น 2 กลุ่มนี้ จะเห็นได้ว่าแอปเปิ้ลแต่ละสายพันธุ์ประกอบด้วยชนิดและความเข้มข้นของแทนนินแตกต่างกัน (Wakayama and Lee, 1987)

6. สายพันธุ์ของผึ้ง จากผลการศึกษาความแตกต่างของการใช้ผึ้งต่างสายพันธุ์กัน 3 สายพันธุ์คือ *A. mellifera* *A. cerana* และ *A. laboriosa* ที่มีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใส จากผลการทดลองพบว่าน้ำผึ้งที่มาจากผึ้งสายพันธุ์ *A. mellifera* สามารถทำให้น้ำแอปเปิ้ลใสได้เท่านั้น ส่วนน้ำผึ้งที่มาจากผึ้งสายพันธุ์ *A. cerana* และ *A. laboriosa* ไม่มีความสามารถในการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสได้ (Lee et al., 1990)

7. ผลการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล ได้มีการศึกษาผลของการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลที่มีต่อการใช้ในการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใส โดยนำแอปเปิ้ลมาทดลองด้วยกัน 6 สายพันธุ์ คือ Jonathan Golden Delicious Rome Rhode Island Greening McIntosh และ Red Delicious จากผลการทดลองพบว่าแอปเปิ้ลทุกสายพันธุ์ยกเว้นสายพันธุ์ Golden Delicious ที่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ ส่วนแอปเปิ้ลสายพันธุ์อื่นสามารถเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลได้ จากผลการทดลองพบว่า มีค่า linear correlation ($r = -0.83$) ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า สารประกอบที่มีการเปลี่ยนแปลงในรูปที่ถูกออกซิไดซ์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยเริ่มตกตะกอนระหว่าง

โปรตีนในน้ำผึ้งและน้ำแอปเปิ้ลโดยเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลขึ้น สารประกอบในแอปเปิ้ลที่เกิดการเปลี่ยนแปลงคือ สารประกอบโพลีฟีนอลที่ถูกออกซิไดซ์อย่างรวดเร็วได้เป็นสารประกอบควิโนน (quinone) ที่มีความสามารถในการรวมตัวกับโปรตีนและเปปไตด์เป็นรงควัตถุที่มีสีน้ำตาลและเป็นปฏิกิริยาที่มีความสำคัญต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสได้อย่างรวดเร็ว (Wakayama and Lee, 1987) นอกจากนี้กรดคลอโรเจนนิค (chlorogenic acid) สามารถถูกออกซิไดซ์ให้เกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลได้เช่นกัน และมีความสามารถมากในการรวมตัวกับโปรตีนในน้ำผึ้ง ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้อาจกล่าวได้ว่า ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลนั้นสามารถเป็นดัชนีที่ดีสำหรับการหาเวลาที่เหมาะสมใช้ในการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสโดยใช้น้ำผึ้งได้ (Wakayama and Lee, 1987)

8. สารประกอบบางชนิดที่มีผลทำให้โปรตีนเสียสภาพ ได้มีการศึกษาผลของสารประกอบบางชนิดที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ 2 ชนิด คือ trichloroacetic acid (TCA) และ 2-mercaptoethanol เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสโดยการนำสารประกอบดังกล่าวข้างต้นทั้ง 2 ชนิดใส่ลงไปในน้ำผึ้งและนำไปต้มให้ความร้อนเพื่อทำลายโปรตีนในน้ำผึ้งและทำให้โปรตีนเสียสภาพ และนำมาใส่ลงในน้ำแอปเปิ้ลที่เตรียมไว้ จากผลการทดลองพบว่ามีผลทำให้โมเลกุลของโปรตีนเปลี่ยนแปลงจากโมเลกุลปิดไปเป็นโมเลกุลเปิดและทำให้มีตำแหน่ง active site เพิ่มขึ้นหลายตำแหน่ง สามารถจับกับแทนนินได้มากขึ้นและเร็วขึ้น และจากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่าง trichloroacetic acid และ 2-mercaptoethanol พบว่า 2-mercaptoethanol มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าการใช้ trichloroacetic acid (Lee, 1984)

9. ความร้อน มีการศึกษาผลของการให้ความร้อนที่มีต่อสมบัติของโปรตีนในน้ำผึ้ง โดยใช้น้ำผึ้งที่มาจากผึ้งต่างกัน 3 ชนิด ที่มีต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสคือ *A. mellifera* *A. cerana* และ *A. laboriosa* จากผลการทดลองพบว่าความร้อนมีผลต่อการทำงานของโปรตีนในน้ำผึ้งที่มาจากผึ้งชนิด *A. cerana* มีความสามารถในการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสได้เท่านั้น ส่วนโปรตีนที่มาจากผึ้งชนิด *A. mellifera* และ *A. laboriosa* พบว่าไม่มีความสามารถในการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสได้ (Lee et al., 1990)

10. อุณหภูมิ การทำน้ำผลไม้ให้ใสนั้นจำเป็นต้องเลือกช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมด้วย กล่าวคือ ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมคืออุณหภูมิเหนือจุดเยือกแข็งเล็กน้อย ดังนั้นในช่วงอุณหภูมินี้การเก็บรักษาน้ำผลไม้ไว้เป็นเวลานานๆ สารแขวนลอยต่างๆ จะค่อยๆ ตกตะกอนนอนก้นอย่างช้าๆ จนในที่สุดน้ำผลไม้ในส่วนบนจะใสได้ และสามารถทำการแยกเอาส่วนใสออกมาได้ (Tressler and Joslyn, 1961) และต่ำกว่าจุดเดือดของน้ำผลไม้ ซึ่งช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมของการทำน้ำผลไม้ให้ใสคือ ระหว่าง 4°ซ. ถึง 60°ซ. แต่ในทางปฏิบัติส่วนใหญ่นิยมใช้ช่วงอุณหภูมิ 21°ซ. ถึง 35°ซ. (Kime, 1982)

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาผลของอุณหภูมิที่ต่างกัน 5 ช่วง คือ 10 30 50 70 และ 80°ซ. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใส จากผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 80°ซ. นี้ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเกิดได้เร็วที่สุด ส่วนที่อุณหภูมิ 10°ซ. นี้ อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเกิดได้ช้าลง สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงขึ้นในช่วง 40°ซ. ถึง 70°ซ. อัตราความเร็วของการเกิดปฏิกิริยาในการรวมตัวของสารประกอบเชิงซ้อนจะเกิดขึ้นได้เร็วขึ้นตามไปด้วยและสามารถเร่งการเคลื่อนที่ของโมเลกุลและการรวมตัวกันระหว่างโปรตีนในน้ำผึ้งและแทนนินในน้ำแอปเปิ้ลให้ใสได้เร็วกว่า (Lee and Kime, 1984)

11. แทนนิน แทนนินที่ใช้หมายถึงแทนนินในรูปของกรดแทนนิคและอนุพันธุ์ของแทนนินที่มีผลต่อกระบวนการทำน้ำผลไม้ให้ใส ดังนั้นการหาปริมาณแทนนินหรืออนุพันธุ์ของแทนนินในรูปของกรดแทนนิคที่น้อยที่สุดที่มีผลต่อกระบวนการทำน้ำผลไม้ให้ใสเป็นเรื่องที่มีความสำคัญมาก โดยปกติตามธรรมชาติแทนนินที่พบในน้ำผลไม้มีปริมาณค่อนข้างต่ำและไม่ใช่องค์ประกอบหลักทั้งหมดที่สามารถทำน้ำผลไม้ให้ใสได้ ดังนั้นการใช้ปริมาณแทนนินมากเกินไปจะก่อให้เกิดความขุ่นในน้ำผลไม้ได้ ดังนั้นปริมาณของแทนนินหรืออนุพันธุ์ของแทนนินที่ใช้มีความเข้มข้นร้อยละ 0.01-0.50 ต่อน้ำหนักของน้ำผลไม้ แต่ในทางปฏิบัตินิยมใช้ความเข้มข้นของแทนนินร้อยละ 0.01-0.10 ต่อน้ำหนักของน้ำผลไม้ (Kime, 1982) หรือในบางครั้งการเติมแทนนินลงในน้ำผลไม้อย่างเดียวนั้นจะทำให้ประสิทธิภาพการทำน้ำผลไม้ต่ำ ดังนั้นอาจจะมีการเติมแทนนินร่วมกับเจลาตินด้วย โดยเจลาตินจะรวมกับแทนนินในน้ำผลไม้ในอัตราส่วนประมาณ 1:1 โดยน้ำหนัก จะทำให้ปริมาณแทนนินในน้ำผลไม้ลดลง มีผลทำให้น้ำผลไม้นั้นเสียรสชาติ จึงต้องมีการเติมแทนนินบางส่วนกลับคืนไป ในกรณีที่น้ำผลไม้นั้นมีปริมาณแทนนินต่ำจะต้องมีการเติมแทนนินรวมกับเจลาติน เพื่อให้เกิดการตกตะกอนได้ดี ปริมาณที่เหมาะสมของแทนนินและเจลาตินจะต้องมีการศึกษาในห้องปฏิบัติการ การใช้เจลาตินในปริมาณมากหรือน้อยไปจะทำให้น้ำผลไม้ไม่ใสได้ตามต้องการ ดังนั้นการทดสอบในห้องปฏิบัติการอาจจะทำได้โดยเติมเจลาตินและแทนนินในปริมาณต่างๆ ลงในน้ำผลไม้ปริมาตร 100 ลบ.ซม. แล้วดูการตกตะกอนที่เกิดขึ้นหลังจากตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อทราบปริมาณของแทนนินและเจลาตินที่เหมาะสมแล้ว จึงเติมลงในน้ำผลไม้ปริมาณมากๆ โดยเติมแทนนินในรูปของสารละลายลงไปก่อน คนให้เข้ากันแล้วจึงละลายเจลาตินในน้ำร้อนแล้วเติมลงไปทีหลัง ตั้งทิ้งไว้ค้างคืนก่อนที่จะกรองแยกตะกอนและน้ำผลไม้ (ประสิทธิ์, 2527)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแทนนินในรูปของไฮโดรไลซ์เซเบิลและคอนเดนซ์แทนนินสามารถรวมตัวกับโปรตีนในน้ำผึ้ง ทำให้ลดความขุ่นในน้ำผลไม้ลงได้ จากการทดลองพบว่า โปรตีนในน้ำผึ้งและแทนนินสามารถรวมตัวได้สารประกอบ

เชิงซ้อนในรูปละลายน้ำได้และไม่ละลายน้ำ (Lee, 1984) สำหรับสมมติฐานกลไกการเกิดปฏิกิริยาในน้ำผลไม้ เช่น น้ำแอปเปิ้ลนั้น มีรายงานว่าแทนนินในรูป active ที่มีปริมาณมากเกินพอสามารถรวมตัวกันที่บริเวณพื้นผิวหน้าของโปรตีนทำให้รวมตัวกับโปรตีนอื่นได้ แต่ถ้ามีแทนนินในรูป active น้อย และมีความเข้มข้นของสารประกอบ simple phenolic สูงจะพบว่าไม่มีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใส เนื่องจากความสามารถของแทนนินในการรวมตัวของโปรตีนชนิดอื่นเกิดขึ้นได้น้อยมาก ดังนั้นโมเลกุลของสารประกอบ simple phenolic สามารถรวมตัวกับบริเวณผิวหน้าโปรตีนได้มากขึ้นและได้โมเลกุลสารประกอบที่ชอบน้ำ (hydrophilicity) มากขึ้น จึงเป็นสาเหตุทำให้ความสามารถในการรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนในรูปแทนนินและโปรตีนเกิดขึ้นได้ช้าลง (Wakayama and Lee, 1987) นอกจากนี้มีรายงานบางฉบับได้กล่าวว่า อัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนและแทนนินจะมีความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารตั้งต้นและอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาสูงที่สุดคืออัตราส่วนของแทนนินต่อโปรตีนเท่ากับ 1 ต่อ 2-3 (Lee, 1984)

12. ความเข้มข้นและองค์ประกอบของสารประกอบโพลีฟีนอล นอกจากแทนนินที่มีผลโดยตรงต่อปฏิกิริยาการทำน้ำผลไม้ให้ใสแล้ว ยังได้มีการศึกษาถึงองค์ประกอบและความเข้มข้นของสารประกอบโพลีฟีนอลต่างกัน 6 ชนิดคือ tannic phenolic non-tannic phenolic condensed tannin hydrolyzable tannin non-tannin flavan และ simple phenolic ที่มีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสโดยใช้สายพันธุ์แอปเปิ้ลต่างกัน 6 ชนิด คือ Red Delicious Jonathan Golden Delicious Rhode Island Greening Rome และ McIntosh จากผลการทดลองที่ได้พบว่าการเปลี่ยนแปลงในช่วงเริ่มต้นของการตกตะกอนไม่ขึ้นกับจำนวนหมู่ของสารประกอบฟีนอลิคที่แตกต่างกันทั้ง 6 ชนิด และนอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิคทั้ง 6 ชนิดที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใส (Wakayama and Lee, 1987)

13. เอ็นไซม์ การนำเอ็นไซม์มาประยุกต์ใช้ในการทำน้ำผลไม้ให้ใสมีมานานแล้ว เอ็นไซม์ทำหน้าที่ย่อยเพคตินในน้ำผลไม้ เช่น การใช้เอ็นไซม์ที่มีชื่อทางการค้าว่า เพคตินอล (pectinol) ซึ่งได้จากเชื้อรา เป็นส่วนผสมของเอ็นไซม์เพคตินเมทธิลเอสเทอเรส (pectin methylesterase) กับโพลิกาแลคทิวโรเนส (polygalacturonase) หรือเอ็นไซม์ที่ใช้นี้เป็นส่วนผสมของสารเคมีระหว่างโพลีเมทธิลกาแลคทิวโรเนส (polymethylgalacturonase) เอ็นโด, เอ็กโซ-โพลีกาแลคทิวโรเนส (endo, exo-polygalacturonase) และเพคตินเมทธิลเอสเทอเรส (pectinmethylesterase) (Kime, 1983) ทำให้เพคตินถูกย่อยสลายจากโมเลกุลใหญ่เป็นโมเลกุลเล็กทำให้ละลายน้ำได้ไม่เห็นความขุ่น ความหนืดของน้ำผลไม้จึงลดลงและตะกอนต่างๆ ไม่เกิด

การแขวนลอยทำให้การกรองแยกได้ง่ายขึ้น การใช้เอ็นไซม์ในการทำน้ำผลไม้ให้ใสจำเป็นต้องมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม เช่น pH อุณหภูมิ ปริมาณและความเข้มข้นของเอ็นไซม์ และระยะเวลาที่ปล่อยให้เอ็นไซม์นั้นมีกิจกรรม (ประสิทธิ์, 2527) นอกจากนี้มีรายงานบางฉบับกล่าวว่าการใช้เอ็นไซม์อย่างเดียวในการทำน้ำผลไม้ให้ใสจำเป็นต้องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 49 °ซ. และตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ทำให้ตกตะกอนเกิดการแยกตัว (Kime, 1983) ปริมาณเอ็นไซม์ที่เหมาะสมขึ้นกับปริมาณเพคตินในน้ำผลไม้ อาจใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.02-0.15 ของเอ็นไซม์ขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของเอ็นไซม์นั้นๆ ด้วย ให้ความร้อนกับน้ำผลไม้ที่อุณหภูมิประมาณ 45-60 °ซ. แล้วเติมเอ็นไซม์ลงไป ระยะเวลาที่ทำให้เอ็นไซม์ดำเนินกิจกรรมตั้งแต่ 1-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำน้ำผลไม้ที่ได้ไปกรอง (Kime, 1983) โดยการเติมเอ็นไซม์อาจเติมก่อนการกรองหรือหลังการตีป่นก็ได้ แต่เนื่องจากการใช้เอ็นไซม์เพียงอย่างเดียวในการทำน้ำผลไม้ให้ใสเกิดขึ้นได้ช้า จึงได้มีการศึกษาวิจัยโดยใช้เอ็นไซม์ร่วมกับการใช้น้ำผึ้ง จากผลการทดลองพบว่า สามารถเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยาการทำน้ำผลไม้ให้ใสได้เร็วถึง 10-20 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เอ็นไซม์อย่างเดียว นอกจากนี้ยังมีข้อดีคือสามารถลดระยะเวลาในการทำน้ำผลไม้ใสลงได้จากเวลา 6-24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิต่ำคือระหว่าง 10° ซ. ถึง 16° ซ. ลงเหลือเพียง 30 นาที และลดความรุนแรงของปฏิกิริยาลงได้ โดยที่อุณหภูมินี้สามารถลดปริมาณการใช้เอ็นไซม์หรือน้ำผึ้งลงได้มากกว่าร้อยละ 70 (Kime, 1983)

รายงานวิจัยที่มีผู้ศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องผลของความเข้มข้นของเอ็นไซม์เพคตินเนส 3 ระดับคือ ร้อยละ 0 0.003 และ 0.006 และความเข้มข้นของน้ำผึ้ง 3 ระดับ คือ ร้อยละ 0 1.5 และ 3.0 ที่มีผลต่อการทำน้ำผลไม้ให้ใส โดยศึกษาเปรียบเทียบกัน 2 แบบ คือ การใช้เอ็นไซม์ร่วมกับการใช้น้ำผึ้ง การใช้เอ็นไซม์หรือการใช้น้ำผึ้งเพียงอย่างเดียว จากผลการทดลองพบว่าการใช้เอ็นไซม์ร่วมกับการใช้น้ำผึ้งมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้เอ็นไซม์หรือการใช้น้ำผึ้งเพียงอย่างเดียว และเวลาที่ใช้ในการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เอ็นไซม์หรือการใช้น้ำผึ้งเพียงอย่างเดียว และจากผลการทดลองยังพบอีกว่าในการใช้น้ำผึ้งอย่างเดียวไม่สามารถลดความหนืดของน้ำแอปเปิ้ลลงได้ (McLellan et al., 1985)

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษากลไลการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสลึกซึ้งมากขึ้น โดยศึกษาผลของอุณหภูมิที่ต่างกัน 4 ระดับ คือ 8 18 35 และ 48 °ซ. ที่มีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ โดยใช้น้ำผึ้งความเข้มข้นร้อยละ 3 และเติมเอ็นไซม์เพคตินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.006 จากผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 8° ซ. จะใช้เวลานาน 58 นาที อุณหภูมิ 18° ซ. ใช้เวลานาน 45 นาที ส่วนที่อุณหภูมิ 48° ซ. เป็นช่วงอุณหภูมิที่สูงใช้เวลาน้อยที่สุดประมาณ 10 นาที

(McLellan et al., 1985) จากผลการทดลองที่ได้พบว่าการใช้อุณหภูมิสูงมีความเหมาะสมต่อการทำงานของเอ็นไซม์ได้มากขึ้นและสามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาเคมีโดยอนุภาคที่มีอยู่จะรวมตัวกันได้อย่างดี ทำให้ปฏิกิริยาการทำน้ำแอปเปิ้ลให้ใสเกิดขึ้นได้เร็วขึ้นกว่าเดิม (Lee and Kime, 1984)

บรรณานุกรม

ประสิทธิ์ อติวีรกุล. 2527. เทคโนโลยีของผลไม้และผัก. สงขลา : ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร *คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์* วิทยาเขตหาดใหญ่.

Calderon, P., Van Buren, J.P. and Robinson, W.B. 1968. Factors influencing the formation of precipitates and hazes by gelatin and condensed and hydrolyzable tannins. *J. Agric Food Chem.* 16: 476-482.

Endres, H. and Hoermann, H. 1963. Preparative and analytical separation of organic compounds by polyamide chromatography. *Angrew Chem.* 75: 288.

Gustavson, K.H. 1954. Interaction of vegetable tannins with polyamides as proof the dominant function of the peptide bond of collagen for its binding of tannins. *J. Polymer Sci.* 12: 317-324.

Kime, R.W. 1982. Clarification of fruit juice with honey. *United States Patent* 4327115.

_____. 1983. The discovery of a new use for honey. *Am Bee J.* 123(8): 586.

Lee, C.Y. 1984. Interaction of honey protein and tannic acid. *J. Apic Res.* 23: 106-109.

Lee, C.Y. and Kime, R.W. 1984. The use of honey for clarifying apple juice. *J. Apic Res.* 23(1): 45-49.

Lee, C.Y., Smith, N.L., Kime, R.W. and Morse, R.A. 1985. Source of the honey protein responsible for apple juice clarification. *J. Apic Res.* 24(3): 190-194.

Lee, C.Y., Smith, N.L., Underwood, B.A. and Morse, R.A. 1990. Honey protein from different bee species in relation to apple juice clarification activity. *Am Bee J.* 130(7): 478-479.

McLellan, M.R., Kime, R.W. and Lind, L.R. 1985. Apple clarification with the use of honey and pectinase. *J. Food Sci.* 50: 206-208.

Paine, H.S., Gertler, S.I. and Lothrop, R.E. 1934. Colloidal constituents of honey influence on properties and commercial value. *Ind Eng Chem.* 26(1): 73-81.

Tressler, D.K. and Joslyn, M.A. 1961. Fruit and vergetable juice processing. Westport. C.T., USA: *AVI Publishing Co.*

Wakayama, T. and Lee, C.Y. 1987. Factors influencing honey clarification of apple juice. *Food Chem.* 25: 111-116.

_____. 1987. The influence of simple and condensed phenolics on the clarification of apple juice by honey. *J. Sci Food and Agric.* 40: 275-281.

White, J.W, Jr. 1975. Composition of honey in honey: a comprehensive survey. (E. Crane ed.) pp. 157-206. *London:* Heinemann.

White, J.W, Jr. and Rudyj, O.N. 1978. The protein content of honey. *J. Apic Res.* 17: 234-238.