บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. น้ำผึ้ง

น้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้มี 4 ชนิด ได้แก่ น้ำผึ้งดอกลิ้นจี่ น้ำผึ้งดอกลำไย น้ำผึ้งดอกทานตะวัน และน้ำผึ้งดอกไม้ป่า ซึ่งน้ำผึ้งแต่ละชนิดได้รับจากแหล่งที่ 1 จังหวัด เชียงใหม่ และแหล่งที่ 2 จังหวัด ลพบุรี

2. เอนไซม์

เอนไซม์ α-glucosidase ทางการค้าจาก *Aspergillus* sp. บริษัท Fluka (USA)

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส ฟรุกโทส ซูโครส และมอลโทส ในน้ำผึ้งโดยวิธี HPLC ตามวิธีของ Da Costa Leite และคณะ (2000)

3.2 สารเคมีที่ใช้ทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ α-glucosidase ตามวิธีของ Duan และคณะ (1995)

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมด ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (2000)

3.4 สารเคมีที่ในการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน Kjeldahl method ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (2000)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้เป็นภาชนะใส่น้ำผึ้ง

1.1 ถังแกลลอน (gallon) ขนาด 20 ลิตร

1.2 หลอดแก้วทดลองขนาด 150x16 มิลลิเมตร

1.3 ขวดแก้วมีฝาปิด (schott bottle) ขนาด 500 มิลลิลิตร

2. อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ทางเคมี

2.1 ชุดอุปกรณ์หาความชื้นของ Gallenkamp โถอบแห้ง และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.2 ชุดอุปกรณ์หาปริมาณเถ้า ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) เตาเผา (muffle furnace)

2.3 ชุดอุปกรณ์หาปริมาณกลูโคส ฟรุกโทส ซูโครส และมอลโทส ได้แก่เครื่อง HPLC Shimadzu รุ่น CR 6A Chromatipac ใช้คอลัมน์ Lichrosorp-NH2 และใช้ reflective index เป็น detector

2.4 ชุดอุปกรณ์หาปริมาณกรดทั้งหมดประกอบด้วย ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บิวเรต ขาตั้ง และชุดจับบิวเรต

2.5 ชุดอุปกรณ์หาปริมาณไนโตรเจน Kjeldahl method ประกอบด้วย เครื่องย่อย (digestion apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Kjeldatherm เครื่องกลั่น (distillation apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Vapodest I หลอดย่อยโปรตีน (digestion tube) กระบอกตวง บีกเกอร์ บิวเรต ขาตั้ง ชุดจับขาบิวเรต ปิเปต หลอดหยด และขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.6 ชุดอุปกรณ์วัดความเป็นกรด ด่าง (pH) คือเครื่อง pH meter ของ Mettler รุ่น Toledo 320

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในวิธีการทางเอนไซม์

ชุดอุปกรณ์ในการเตรียมเอนไซม์ได้แก่ บีกเกอร์ ขวดแก้วมีฝาปิด (schott bottle) ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิเปต หลอดหยด ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) และ เครื่องฆ่าเชื้อ (autoclave)

4. อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ผลึก

4.1 ชุดอุปกรณ์หาขนาดของผลึกได้แก่ เครื่อง Mastersizer E แท่งแก้วคน บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ magnetic bar และ magnetic stirrer

4.2 ชุดอุปกรณ์ตรวจสอบลักษณะรูปร่างของผลึกได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ Nikon รุ่น YS2-H สไลด์ และที่ปิดสไลด์

5. อุปกรณ์ในการวัดสี

ชุดอุปกรณ์การวัดสี ยี่ห้อ HunterLab รุ่น ColorFlex

6. อุปกรณ์ในการวัดค่า water activity (Aw)

ชุดอุปกรณ์ในการวัดค่า water activity ยี่ห้อ Novasina รุ่น Thermoconstanter

วิธีการทดลอง

1. วิธีการเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างน้ำผึ้งทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ น้ำผึ้งดอกลิ้นจี่ น้ำผึ้งดอกลำไย น้ำผึ้งดอกทานตะวัน และน้ำผึ้งดอกไม้ป่า ซึ่งน้ำผึ้งแต่ละชนิดได้รับจากแหล่งที่ 1 จังหวัดเชียงใหม่ และแหล่งที่ 2 จังหวัดลพบุรี นำมาให้ความร้อนที่ 65 องศาเซลเซียส ใน waterbath เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเป็นการฆ่าเชื้อยีสต์ป้องกันการหมักของน้ำผึ้ง และกำจัดเอนไซม์ รวมทั้งผลึกเล็กๆ ที่มีอยู่ในน้ำผึ้งให้หมดไป (Dyce, 1975) และ(Cano *et al.,* 2001)

2. ศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีของน้ำผึ้งที่ได้รับจากทั้ง 2 แหล่ง

นำตัวอย่างน้ำผึ้งที่เตรียมแล้ว มาวัดค่าสี และวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางชีวเคมีได้แก่ พีเอช ความชื้น ค่าwater activity ปริมาณเถ้า กรดทั้งหมด ปริมาณไนโตรเจน ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (2000) และปริมาณกลูโคส ฟรุกโทส ซูโครส และมอลโทสในน้ำผึ้งด้วยวิธี HPLC ตามวิธีของ Mendes และคณะ (1998) และ Da Costa Leite และคณะ (2000) โดยใช้คอลัมน์ Liphosorb-NH_2 ขนาดความยาว 25 เซนติเมตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้อะซิโตไนไตรล์ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นวัฏภาคไหล ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อดูความแตกต่างขององค์ประกอบทางชีวเคมีของน้ำผึ้งแต่ละตัวอย่าง เปรียบเทียบกันในเรื่องของอัตราส่วนของกลูโคสต่อน้ำ และอัตราส่วนของฟรุกโทสต่อกลูโคส ในน้ำผึ้ง โดยผลการทดลองที่ได้จะนำไปเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกตัวแทนของน้ำผึ้งที่ตกผลึก และไม่ตกผลึกโดยธรรมชาติ แล้วนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

วิธี HPLC ตามวิธีของ Mendes และคณะ (1998) และ Da Costa Leite และคณะ (2000) เป็นแบบแอดซอร์บชันโครมาโตกราฟี หรือ ลิควิด-ซอลิดโครมาโตกราฟี (liquid-solid chromatography) เป็นการแยกโดยอาศัยความแตกต่างระหว่างวัฏภาคนิ่ง และวัฏภาคไหล วัฏภาคนิ่งที่ใช้เป็นสารดูดซับที่เป็นของแข็ง (solid absorbent) ซึ่งเป็นสารมีขั้ว เช่น ซิลิกาเจล (silica gel) หรืออลูมินา (alumina) ในขณะที่วัฏภาคไหลที่ใช้เป็นสารไม่มีขั้วซึ่งได้แก่ เฮกเซน (hexane) เฮปเทน (heptane) หรือเตตราไฮโดรฟูแรน (tetrahydrofuran) เป็นต้น การแยกโดยวิธีนี้อาศัยหลักการในการดูดซับหรือแอดซอร์บชัน (adsorption) ที่แตกต่างกันของโมเลกุลต่างๆ ของสารละลายตัวอย่างผสมบนวัฏภาคนิ่ง เนื่องจากน้ำมีอิทธิพลอย่างมากต่อการแยกสารละลายตัวอย่างผสมโดยวิธีแอดซอร์บชันโครมาโตกราฟี ดังนั้นจึงต้องควบคุมปริมาณของน้ำที่มีอยู่ในวัฏภาคไหลให้มีความ

เหมาะสม (Matissek และWittkowski, 1993) ซิลิกาเป็นวัฏภาคนิ่งที่นิยมใช้ในโครมาโตกราฟีแบบแอดซอร์บชัน เนื่องจากซิลิกามีขนาดอนุภาคเล็กสามารถรับปริมาณสารละลายตัวอย่างผสมได้น้อยกว่า อย่างไรก็ตามในการเลือกวัฏภาคนิ่งที่เป็นซิลิกาเจลนั้น ต้องพิจารณาถึงช่วงของพีเอชในการใช้งาน สำหรับวัฏภาคไหลที่เป็นสารไม่มีขั้วที่นิยมใช้ในแอดซอร์บชันโครมาโตกราฟี ซึ่งนอกเหนือจากเฮกเซน เฮปเทน และเตตราไฮโดรฟูแรน ยังมี 1-คลอโรบิวเทน คลอโรฟอร์ม เมทิลลีนคลอไรด์ ไอโซโพรพิวอีเทอร์ เอทิลอะซีเตท โพรพิวเอมีน อะซิโตไนไตรล์ และเมทานอล (พัฒนา เหล่าไพบูลย์, 2547)

3. ศึกษาการใช้เอนไซม์เพื่อเพิ่มองค์ประกอบของปริมาณกลูโคส ในน้ำผึ้ง

นำตัวอย่างน้ำผึ้งที่ได้จากการคัดเลือก ซึ่งเป็นตัวแทนของน้ำผึ้งที่ไม่ตกผลึก 100 กรัม มาให้ความร้อนที่ 65 องศาเซลเซียส ใน waterbath เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเป็นการฆ่าเชื้อยีสต์ป้องกันการหมักของน้ำผึ้ง และกำจัดเอนไซม์ รวมทั้งผลึกเล็กๆ ที่มีอยู่ในน้ำผึ้งให้หมดไป

3.1 ศึกษาปฏิกิริยาในการย่อยสลายมอลโทสในน้ำผึ้งโดยวิธีการทางเอนไซม์

นำตัวอย่างน้ำผึ้งที่ได้จากการคัดเลือก ซึ่งเป็นตัวแทนของน้ำผึ้งที่ไม่ตกผลึก 100 กรัม และใช้เอนไซม์ α-glucosidase (0, 1, 2, 3 และ 4 unit) ใช้ระยะเวลาในปฏิกิริยาย่อยสลาย 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง เมื่อครบกำหนดเวลานำน้ำผึ้งดังกล่าวมาทำการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยต้มในน้ำเดือดนาน 3 นาที (Matsui *et al.*, 2001a; Matsui *et al.*, 2001b) นำน้ำผึ้งที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณของกลูโคส และมอลโทส ในน้ำผึ้งหลังการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ α-glucosidase ด้วยวิธี HPLC ตามวิธีของ Mendes และคณะ (1998) และ Da Costa Leite และคณะ (2000)

3.2 ศึกษาการใช้เอนไซม์เพื่อเพิ่มปริมาณกลูโคสในน้ำผึ้งเพื่อชักนำการเกิดผลึก

นำตัวอย่างน้ำผึ้งที่ได้จากการคัดเลือก ซึ่งเป็นตัวแทนของน้ำผึ้งที่ไม่ตกผลึก 100 กรัม จากนั้นใช้เอนไซม์ α-glucosidase ตามปริมาณที่ได้รับจากการทดลองที่ 3.1 ซึ่งเป็นปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมคือสามารถเพิ่มปริมาณกลูโคสได้มากที่สุด เพื่อนำมาทำการดัดแปรองค์ประกอบของมอลโทสในน้ำผึ้ง และทำให้ปริมาณของกลูโคสที่เป็นองค์ประกอบในน้ำผึ้งมีปริมาณสูงพอที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการตกผลึกในน้ำผึ้งได้ โดยให้เป็นไปตามอัตราส่วนของกลูโคสต่อน้ำ และอัตราส่วนของฟรุกโทสต่อกลูโคส โดยการเติมเอนไซม์ และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องกลิ้งขวดน้ำผึ้ง ใช้เวลาในการย่อยสลาย 7 วัน เพื่อต้องการให้เอนไซม์ย่อยมอลโทส และเปลี่ยนเป็นกลูโคสให้ได้มากที่สุด เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยต้มในน้ำเดือดนาน 3 นาที นำน้ำผึ้งที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณของกลูโคส และมอลโทส ใน

น้ำผึ้งหลังการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ α-glucosidase ด้วยวิธี HPLC ตามวิธีของ Mendes และคณะ (1998) และ Da Costa Leite และคณะ (2000)

ภาพที่ 6 ภาพถ่ายของเครื่องกลิ้งขวดน้ำผึ้ง

Figure 6 Picture of bottle rotor

4. ศึกษาการตกผลึกของน้ำผึ้งด้วยวิธีทางกายภาพ

นำตัวอย่างน้ำผึ้งทั้ง 2 ชนิดที่เป็นตัวแทนของน้ำผึ้งที่ตกผลึกได้ตามธรรมชาติ และน้ำผึ้งที่ไม่ตกผลึกหรือตกผลึกได้ยาก แบ่งเป็นชุดการทดลองที่ 1 น้ำผึ้งดอกลิ้นจี่ให้เป็นชุดควบคุม โดยไม่มีการเติมผลึกขนาดเล็ก (seed) ชุดการทดลองที่ 2 เป็นน้ำผึ้งดอกลิ้นจี่ที่เติมผลึกขนาดเล็ก 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยผลึกขนาดเล็กที่ใช้ในการทดลองคือ กลูโคสโมโนไฮเดรต ชุดการทดลองที่ 3 เป็นน้ำผึ้งดอกลำไย ให้เป็นชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ 4 เป็นน้ำผึ้งดอกลำไยที่เติมผลึกขนาดเล็ก 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ชุดการทดลองที่ 5 เป็นน้ำผึ้งดอกลำไยที่ผ่านวิธีการทางเอนไซม์ และไม่มีการเติมผลึกขนาดเล็ก ชุดการทดลองที่ 6 เป็นน้ำผึ้งดอกลำไยที่ผ่านวิธีการทางเอนไซม์ และเติมผลึกขนาดเล็ก 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จากนั้นนำน้ำผึ้งทุกชุดการทดลองวางลงบนเครื่องกลิ้งขวดน้ำผึ้งและกลิ้งวันละ 2 เวลาคือช่วงเช้า และช่วงเย็น ที่ความเร็ว 4 รอบต่อนาที

เป็นเวลา 15 นาที และเก็บตัวอย่างน้ำผึ้งไว้ที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส เพราะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการตกผลึกของน้ำผึ้ง ใช้เวลา 14 วัน สังเกตผลการตกผลึกทุกๆ 24 ชั่วโมง เมื่อเสร็จสิ้นการทดลองจะนำน้ำผึ้งดังกล่าวไปศึกษาคุณลักษณะ และขนาดของผลึกในขั้นตอนต่อไป (Rufford, 2000)

5. ศึกษาคุณลักษณะรูปร่าง และขนาดของผลึกน้ำผึ้ง

นำตัวอย่างน้ำผึ้งจากการทดลองในข้อ 4 ปริมาณ 10 กรัมไปวัดขนาดของผลึกด้วยเครื่อง Mastersizer E โดยนำตัวอย่างของน้ำผึ้งดังกล่าวใส่ลงในที่เก็บตัวอย่าง (cell) แล้วเติมสารละลายเอทานอล (ethanol) 90 เปอร์เซ็นต์ที่อิ่มตัวด้วยกลูโคส เพื่อให้ผลึกเกิดการแขวนลอย โดยไม่ทำให้ขนาดของผลึกมีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างที่ทำการวัดขนาดด้วยหลักการหักเหของแสงเลเซอร์ (laser diffraction) จากนั้นคำนวณหาขนาดของผลึกน้ำตาลที่มีอยู่ในน้ำผึ้ง (Rufford, 2000) และนำผลึกน้ำผึ้งที่ได้รับจากการทดลองมาวางบนสไลด์ จากนั้นส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายต่างๆ จนมองเห็นผลึกได้อย่างชัดเจน สังเกตรูปร่างของผลึกที่ได้รับจากการทดลอง

6. ศึกษาสี และ ค่า water activityของน้ำผึ้งหลังการตกผลึก

นำตัวอย่างน้ำผึ้งที่ผ่านการทดลองที่ 4 มา วิเคราะห์หาสี และ ค่า water activity ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (2000)

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s Mutiple Range Test (DMRT)