



**อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย**

**วัตถุดิบ**

น้ำผึ้ง 3 แหล่ง ได้แก่ น้ำผึ้งลำไย น้ำผึ้งลิ้นจี่ และน้ำผึ้งสาบเสือ เก็บที่อุณหภูมิ  $25 \pm 1$  °C โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร.สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ หัวหน้าหน่วยปฏิบัติการวิจัยผึ้ง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย บรรจุในถังพลาสติกที่มีฝาเกลียวปิดสนิท ขนาด 20 ลิตร

รอยัลเจลลี่ จากผึ้งพันธุ์ (Apis mellifera) ฟาร์มผึ้งนางพญา จังหวัดพิษณุโลก ผลิตแบบการค้าทั่วไป บรรจุในถังพลาสติก HDPE และเก็บใส่กล่องพลาสติกที่มีฝาเกลียวปิดสนิท เก็บรักษาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ  $-18$  °C เป็นเวลานานประมาณ 1 ปี ก่อนนำมาใช้

นมสดพาสเจอร์ไรซ์ ชนิดจืด ตราเมจิ ของ บริษัท ซีพี-เมจิ จำกัด

หัวเชื้อโยเกิร์ต ใช้ชนิด plain yoghurt ตราดัชมิลล์ ของ บริษัท ดัชมิลล์ จำกัด

น้ำตาลทรายขาว ตรามิตรผล ของ บริษัท น้ำตาลมิตรผล จำกัด

กรดแลคติก (lactic acid : food grade) ความเข้มข้น 80 % w/v ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท วิกีก้อนโซลิเดค จำกัด

เพคติน (pectin power type JMJ) ตรา GENU จาก บริษัท ฟู๊ดส์ แอนด์ คอสเมติคส์ จำกัด

**สารเคมี**

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

Copper sulfates, A.R. (Merck)

Potassium sulfates, A.R. (Merck)

Sulfuric acid, A.R. (Merck)

Boric acid, A.R. (Merck)

Sodium hydroxide, A.R. (Univar)

Bromocresol green-methyl red indicator, A.R. (Merck)

Phenolphthalein indicator, A.R. (Merck)

Potassium hydrogen phthalate, A.R. (Merck)

การวิเคราะห์คุณภาพด้วยเครื่อง Gas Chromatography

Standard 10-hydroxy-2-decenoic acid (Nippon Shoji, lot AU22)

Hydrochloric acid, A.R. (Merck)

Margaric acid, A.R. (Merck)

N,O-bis(trimethylsilyl) acetamide, A.R. (Merck)

Trimethylchlorosilane, A.R. (Merck)

Chloroform, A.R. (Baker Analyzed)

Hexane, A.R. (Baker Analyzed)

Acetic acid, A.R. (Baker Analyzed)

Ethyl alcohol 99 %, A.R. (Merck)

Diethyl ether, A.R. (Merck)

การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์

Plate count agar (Difco)

Potato dextrose agar (Difco)

Tartaric acid, A.R. (Merck)

Lactic agar

อุปกรณ์

การผลิตและเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

Hand homogenizer (Ystral Gmb HD-7801) ชนิด shafts 23/T

หัวปิ่นเบอร์ 34

ขวดแก้วขนาด 300 มิลลิลิตร พร้อมฝาพลาสติก

เทอร์โมมิเตอร์ (วัด 0-100 °C)

ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4-10 °C

ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -18 °C

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, WTB Binder W-Germany, B 53)

ตู้อบแห้งสุญญากาศ (Vacuum oven, Hotpack)

ชุดย่อยและกลั่นโปรตีน (Kjeldatherm and Vapodest I, Gerhardt, KT 85)

ชุดสกัดไขมัน (Gerhardt Soxtherm Automatic, S-166)

เตาเผา (muffle furnace, T 500-700°C Carbolite, EML 11-2)

pH-meter (Hanna Instruments, model 8417)

เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ชนิด top loading (Sartorius, model 1907)

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, model A 200S)

เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ทางเคมี

การวิเคราะห์คุณภาพด้วยเครื่อง Gas Chromatography

Gas Chromatography (Shimadzu, GC-9A)

column : packed column ชนิดแก้ว เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 mm

ยาว 7 m

packing : chromosorb WAW-DMCS 60-80 mesh

liquid phase; 2 % silicone OV-17

column temperature : 200 °C

inlet temperature : 250 °C

carrier gas : nitrogen gas

detector : hydrogen flame ionization detector (FID)

Rotary evaporator (Heidolph, VV 2000)

การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

Brookfield viscometer (model RVTD)

Hand refractometer (Atago N 1 brix 0-32%)

Spectrophotometer (Milton Roy, Spectronic 610)

การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์

Autoclave (Sanyo, MLS-2400)

Incubator T 25-70 °C (Memmert, B 30)

**ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย**

3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และกายภาพของวัตถุดิบ

น้ำผึ้ง 3 แหล่ง ได้แก่ น้ำผึ้งลำไย น้ำผึ้งลิ้นจี่ และน้ำผึ้งสาบเสือ

วิเคราะห์ค่า น้ำตาลรีดิวซิง (คิดเป็นน้ำตาลอินเวิร์ต) ความชื้น เถ้า และ ความเป็นกรด ตามวิธีของ AOAC (1980)

รอยัลเจลลี่สด วิเคราะห์ค่า ความชื้น โปรตีน เถ้า ไขมัน ความเป็นกรด และ ปริมาณกรดไขมัน 10-HDA ตามวิธีของ National Royal Jelly Fair Trade Conference (1980) (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ก)

นมพาสเจอร์ไรซ์ วิเคราะห์ค่า ของแข็งทั้งหมด โปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธีของ AOAC (1980)

หัวเชื้อโยเกิร์ต เพื่อให้ได้เชื้อโยเกิร์ตที่มีประสิทธิภาพในการหมัก เตรียมโดยถ่าย เชื้อโยเกิร์ต จากผลิตภัณฑ์เชกโยเกิร์ต ตราดัชมิลล์ ของ บริษัท ดัชมิลล์ จำกัด ลงในนมสด พาสเจอร์ไรซ์ในสภาวะปลอดเชื้อแล้วบ่มที่ 42-45 °C ประมาณ 5-6 ชม. ก่อนนำหัวเชื้อไปใช้

3.2 ศึกษาปริมาณน้ำผึ้งที่เหมาะสมในการเตรียมนมเปรี้ยวพร้อมดื่มกลั่นน้ำผึ้ง

คัดเลือกปริมาณน้ำผึ้งที่เหมาะสมสำหรับนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม เพื่อให้ได้กลิ่นน้ำผึ้งที่พอเหมาะโดยแปรปริมาณน้ำผึ้ง ทั้ง 3 ชนิด ดังนี้



|                        |   |    |             |     |
|------------------------|---|----|-------------|-----|
| น้ำผึ้งลำไย แปรเป็น    | 6 | 8  | 10 และ 12 % | w/w |
| น้ำผึ้งลิ้นจี่ แปรเป็น | 8 | 10 | 12 และ 14 % | w/w |
| น้ำผึ้งสาบเสือ แปรเป็น | 8 | 10 | 12 และ 14 % | w/w |

สูตรในการเตรียมนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม คือ

น้ำตาล และ น้ำผึ้ง = 14 % w/w

น้ำ = 45 % w/w

นม = 41 % w/w

ค่าความเป็นกรด (กรดแลคติก) = 0.7 % w/w

เนื่องจากความแรงของกลิ่นน้ำผึ้งแต่ละชนิดไม่เท่ากัน โดยน้ำผึ้งลำไยเป็นน้ำผึ้งที่มีกลิ่นแรงที่สุด ส่วนน้ำผึ้งลิ้นจี่ และน้ำผึ้งสาบเสือ จะมีความแรงของกลิ่นน้อยกว่า ดังนั้นจึงแปรปริมาณน้ำผึ้งลำไยในระดับที่ต่ำกว่าน้ำผึ้งอีก 2 ชนิด ตัวอย่างนมเปรี้ยวพร้อมดื่มแต่ละสูตร นำมาผ่านขั้นตอนการเตรียมดังแสดงในรูปที่ 4 และผลิตภัณฑที่ได้นำมาประเมินคุณภาพ เพื่อเลือกสูตรที่มีปริมาณน้ำผึ้งแต่ละชนิดที่เหมาะสม

ทดสอบทางประสาทสัมผัส ได้แก่ ลักษณะปรากฏ (15 คะแนน) กลิ่น (15 คะแนน) รสชาติ (15 คะแนน) และ ความชอบโดยรวม (20 คะแนน) โดยใช้ Numerical Scoring Test ผู้ทดสอบ 16 คน วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT

### 3.3 ศึกษาสูตรนมเปรี้ยวพร้อมดื่มกลิ่นน้ำผึ้งที่เหมาะสม

จากตัวอย่างที่มีปริมาณน้ำผึ้งแต่ละชนิดที่เหมาะสม ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 3.2 คือ น้ำผึ้งลำไย น้ำผึ้งลิ้นจี่ และน้ำผึ้งสาบเสือ ในปริมาณ 8 10 และ 10 % ตามลำดับ เพื่อศึกษาปริมาณน้ำตาลทรายและค่าความเป็นกรด ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้รสชาติของนมเปรี้ยวพร้อมดื่มกลิ่นน้ำผึ้งที่ผู้ทดสอบชอบรับมากที่สุด โดยแปรปริมาณน้ำตาล และค่าความเป็นกรด ดังนี้

น้ำผึ้งลำไย

แปรปริมาณน้ำตาลทราย เป็น 4 6 และ 8 %

แปรค่าความเป็นกรด เป็น 0.6 0.7 และ 0.8 % (กรดแลคติก)

ดังนั้นจะได้เป็น 9 สูตรคือ

|                    | สูตร |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                    | 1    | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   |
| น้ำตาล (%)         | 4    | 4   | 4   | 6   | 6   | 6   | 8   | 8   | 8   |
| ค่าความเป็นกรด (%) | 0.6  | 0.7 | 0.8 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.6 | 0.7 | 0.8 |

#### น้ำผึ้งล้นจี่

แปรปริมาณน้ำตาลทราย เป็น 2 4 และ 6 %

แปรค่าความเป็นกรด เป็น 0.6 0.7 และ 0.8 % (กรดแลคติก)

ดังนั้นจะได้เป็น 9 สูตรคือ

|                    | สูตร |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                    | 1    | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   |
| น้ำตาล (%)         | 2    | 2   | 2   | 4   | 4   | 4   | 6   | 6   | 6   |
| ค่าความเป็นกรด (%) | 0.6  | 0.7 | 0.8 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.6 | 0.7 | 0.8 |

#### น้ำผึ้งสาบเสือ

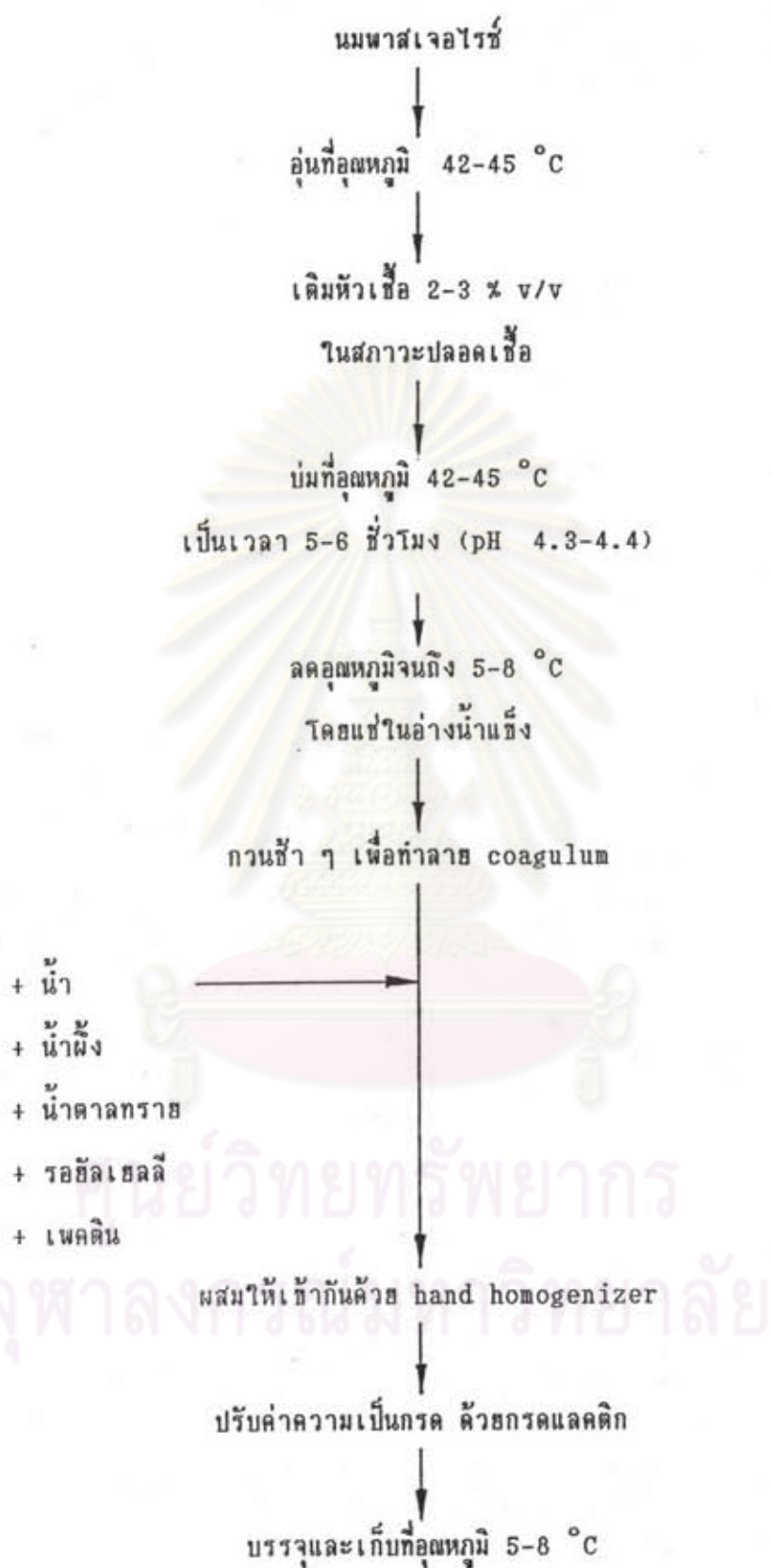
แปรปริมาณน้ำตาลทราย เป็น 2 4 และ 6 %

แปรค่าความเป็นกรด เป็น 0.6 0.7 และ 0.8 % (กรดแลคติก)

ดังนั้นจะได้เป็น 9 สูตรคือ

|                    | สูตร |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                    | 1    | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   |
| น้ำตาล (%)         | 2    | 2   | 2   | 4   | 4   | 4   | 6   | 6   | 6   |
| ค่าความเป็นกรด (%) | 0.6  | 0.7 | 0.8 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.6 | 0.7 | 0.8 |

ทดสอบทางประสาทสัมผัส เช่นเดียวกับข้อ 3.2 วางแผนการทดลองแบบ Factorial Randomized Complete Block Design ขนาด 3X3 ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT



รูปที่ 4 ขั้นตอนการผลิตนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมรอยัลเซลล์

### 3.4 คัดเลือกสูตรนมเปรี้ยวพร้อมดื่มกลิ่นน้ำผึ้งที่ผู้ทดสอบยอมรับมากที่สุด

จากตัวอย่างที่ผู้ทดสอบยอมรับมากที่สุดของน้ำผึ้งแต่ละชนิด ที่สรุปจากข้อ 3.3 รวม 3 สูตร จากนั้นนำมาคัดเลือกให้ได้ตัวอย่างที่ผู้ทดสอบยอมรับมากที่สุดเพียงสูตรเดียว โดยทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยใช้ Ranking Test ผู้ทดสอบ 16 คน ทดลอง 2 ซ้ำ

### 3.5 ศึกษาปริมาณรอซัลเฮลล์สัดที่เหมาะสม

จากข้อ 3.4 สามารถสรุปสูตรนมเปรี้ยวพร้อมดื่มกลิ่นน้ำผึ้ง ที่ผู้ทดสอบยอมรับมากที่สุด จากนั้นนำมาศึกษาปริมาณรอซัลเฮลล์ที่เหมาะสมเพื่อเติมลงในสูตรนมเปรี้ยวพร้อมดื่มกลิ่นน้ำผึ้งที่คัดเลือกได้โดยที่ผู้ทดสอบยังยอมรับ และมีปริมาณแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์ในปริมาณสูง โดยแปรปริมาณรอซัลเฮลล์ เป็น 0 6 7 และ 8 % ประเมินผลโดย

3.5.1 ทดสอบทางประสาทสัมผัส ได้แก่ สี ลักษณะปรากฏ กลิ่น รสชาติ ความรู้สึกหลังดื่ม และ ความชอบโดยรวม ใช้ 9-point Hedonic Scale Test โดย 9 หมายถึง ชอบมากที่สุด และ 1 หมายถึง ไม่ชอบมากที่สุด ใช้ผู้ทดสอบ 10 คน วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT

3.5.2 วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT

### 3.6 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการพาสเจอร์ไรส์สารละลายน้ำผึ้ง

คัดเลือกภาวะที่เหมาะสมในการพาสเจอร์ไรส์สารละลายน้ำผึ้งตามชนิดและความเข้มข้นเท่ากับตัวอย่างที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 ในสัดส่วน น้ำ : น้ำผึ้ง : น้ำตาลทราย

แปรอุณหภูมิ เป็น 60 65 และ 70 °C

แปรระยะเวลา เป็น 5 10 15 และ 20 นาที

ดังนั้นจะได้เป็น 12 treatments คือ



|                | treatment |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|----------------|-----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                | 1         | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 |
| อุณหภูมิ (°C)  | 60        | 60 | 60 | 60 | 65 | 65 | 65 | 65 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| ระยะเวลา(นาที) | 5         | 10 | 15 | 20 | 5  | 10 | 15 | 20 | 5  | 10 | 15 | 20 |

ประเมินผลโดยวิเคราะห์

3.6.1 ปริมาณสีสด/รา และจุลินทรีย์ทั้งหมด วางแผนการทดลองแบบ Asymetric Factorial Design ขนาด 3X4 ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT

3.6.2 วัดค่า absorbance ที่ 575 นาโนเมตร (yellow/light-brown) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer เพื่อติดตามการเกิดสีน้ำตาล (Crane, 1990)

3.7 ศึกษาปริมาณสารให้ความคงตัวที่เหมาะสม และอายุการเก็บของนมเปรี้ยวพร้อมดื่มผสมน้ำผึ้งและรอยัลเฮลลี

นำนมเปรี้ยวพร้อมดื่มกลิ่นน้ำผึ้งผสมรอยัลเฮลลี ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5 มาศึกษาปริมาณสารให้ความคงตัวที่เหมาะสม โดยในงานวิจัยนี้ใช้ เพคติน ชนิดเมทอกซิลสูง (GENU pectin type JMJ) ซึ่งเป็นสารให้ความคงตัวที่ใช้สำหรับผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวพร้อมดื่มโดยเฉพาะ ซึ่งเพคติน ที่เติมจะอยู่ในรูปสารละลายเพคติน แล้ว นำไปพาสเจอร์ไรซ์พร้อมกับสารละลายน้ำผึ้ง ในภาวะที่คัดเลือกได้ในข้อ 3.6

แปรปริมาณเพคติน เป็น 0 0.1 0.2 และ 0.3 % w/v

แปรระยะเวลาเก็บ เป็น 0 1 2 และ 3 สัปดาห์

โดยบรรจุผลิตภัณฑ์ในขวดแก้วที่ล้างสะอาด และผ่านการฆ่าเชื้อใน autoclave ที่ 121 °C 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5-8 °C ติดตามการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทุกสัปดาห์ประเมินคุณภาพโดยวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ดังนี้

วิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

3.7.1 ความหนืด วัดโดยใช้เครื่อง Brookfield viscometer ใช้หัวเข็มเบอร์ 2 ความเร็วรอบที่ 100 rpm ที่อุณหภูมิ 20 °C วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยวิธี Duncan's New Multiple

Range Test ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT

3.7.2 ความคงตัว โดยเก็บผลิตภัณฑ์ในกระบอกวัดปริมาณขนาด 50 ml ที่อุณหภูมิ 5-8 °C วัดปริมาณของส่วนใสที่แยกชั้น ทุก 2 วัน เป็นเวลา 30 วัน

วิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส

3.7.3 ทดสอบทางประสาทสัมผัส เช่นเดียวกับข้อ 3.5.1

วิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

3.7.4 pH ด้วยเครื่อง pH meter

3.7.5 ค่าความเป็นกรด ตามวิธีของ AOAC (1980)

3.7.6 ปริมาณ กรดไขมัน 10-Hydroxy-2-decenoic acid ตามวิธีของ National Royal Jelly Fair Trade Conference (1980) (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ก)

วิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์

3.7.7 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ซีสด์/รา และแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ทดลอง 2 ซ้ำ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย