



บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ สารเคมี และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 วัตถุดิบและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

รอยัลเชลลี (บริษัทไดมอนด์ แอนด์ โกลด์ จำกัด)

แป้งมันสำปะหลังตราปลามังกร

Lactose (food grade)

Sulfuric acid (A.R. grade)

Copper sulfate (A.R. grade)

Potassium sulfate (A.R. grade)

Sodium hydroxide (A.R. grade)

Boric acid (A.R. grade)

Hydrochloric acid (A.R. grade)

Diethyl ether (A.R. grade)

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

Trimethylchlorosilane (A.R. grade)

Sodium chloride (A.R. grade)

10-hydroxy-2-decenoic acid (A.R. grade)

3.1.2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องชั่งหยาบ (Sartorius, 1907 MP8)

เครื่องชั่งละเอียด (Sartorius, A200S)

Vacuum oven (Hotpack, 273600)

Freeze dryer (Virtis, 12525)

pH meter (Corning, M220)

Incubator	(Memmert, B30)
Muffle furnace	(Carbolite, MEL 11-2)
เครื่องปิดผนึกถุง	(Multivac, AG 500)
Still air freezer	(S.N.G. Engineering)
Autoclave	(Tomy, SS-320)
ถุง polyethylene เคลือบ aluminium foil ขนาด 10x20 เซนติเมตร หนา 0.08 มิลลิเมตร	
ถุง high density polyethylene ขนาด 10x20 เซนติเมตร หนา 0.08 มิลลิเมตร	
paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.50 เซนติเมตร	

### 3.1.3 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

Bacillus subtilis TISTR 8  
Staphylococcus aureus TISTR 118  
Escherichia coli TISTR 371  
Lactobacillus bulgaricus TISTR 451  
Lactobacillus plantarum TISTR 541

### 3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

Nutrient agar (Difco, Co.)  
 GYP agar (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข.1)  
 MRS agar (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข.2)

### 3.2 ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย

ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนคือ

1. ศึกษาสมบัติของรอยัลเซลล์แช่แข็ง
2. ศึกษาการทำแห้งรอยัลเซลล์โดยการทำแห้งเยือกแข็ง
3. ศึกษาผลของภาชนะบรรจุ อุณหภูมิ และระยะเวลาเก็บต่อคุณภาพของรอยัลเซลล์แห้ง

### 3.2.1 ศึกษาสมบัติของรอยัลเยลลี่แช่แข็ง

เก็บรอยัลเยลลี่แช่แข็งที่บรรจุในถุง HDPE ไว้ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 เดือน

#### 3.2.1.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของรอยัลเยลลี่หลังจากแช่แข็งทันที

- ปริมาณความชื้นโดยวิธีของ National Royal Jelly Fair Trade Conference (24) (วิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ค.1)
- ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ National Royal Jelly Fair Trade Conference (24) (วิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ค.2)
- ความเป็นกรด โดยวิธีของ National Royal Jelly Fair Trade Conference (24) (วิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ค.3)
- ปริมาณเถ้า โดยวิธีของ A.O.A.C. (27) (วิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ค.4)
- ปริมาณไขมัน โดยวิธีของ A.O.A.C. (27) (วิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ค.5)
- ปริมาณ 10-hydroxy-2-decenoic acid โดยวิธีของ National Royal Jelly Fair Trade Conference (24) (วิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ค.6)

3.2.1.2 ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 5 ชนิด ของรอยัลเยลลี่หลังจากแช่แข็งทันที

- B. subtilis TISTR 8
- S. aureus TISTR 118
- E. coli TISTR 371
- L. bulgaricus TISTR 451
- L. plantarum TISTR 541

ประเมินผลโดยวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของรอยัลเยลลี่ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ (Minimum Inhibition Concentration, MIC) โดยวิธี paper diffusion test (28) (วิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ข.3)

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Completely Randomized design และ Duncan's New Multiple Range Test ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

- 3.2.1.3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของรอยัลเซลล์แช่แข็ง เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส ในถุง HDPE เป็นระยะเวลา 5 เดือน
- ประเมินผลโดยติดตามการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของรอยัลเซลล์แช่แข็งดังนี้
- ปริมาณความชื้น ตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1
  - ปริมาณโปรตีน ตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1
  - ความเป็นกรด ตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1
  - ปริมาณ 10-hydroxy-2-decenoic acid ตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1
  - ค่า MIC ต่อ B. subtilis ตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.2

ทำการวิเคราะห์ทุกเดือนโดยวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ completely Randomized design และ Duncan's New Multiple Range Test ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

### 3.2.2 ศึกษาการทำแห้งรอยัลเซลล์โดยการทำแห้งเยือกแข็ง

ทำแห้งรอยัลเซลล์โดยวิธีทำแห้งเยือกแข็ง กำหนดอุณหภูมิเริ่มต้น -25 องศาเซลเซียส และให้อุณหภูมิต่ำสุดท้ายเป็น 28 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาทำแห้งทั้งหมด 30 ชั่วโมง

#### 3.2.2.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของรอยัลเซลล์แห้งดังนี้

- ปริมาณความชื้น ตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1
- ปริมาณโปรตีน ตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1
- ปริมาณไขมัน ตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1
- ปริมาณเถ้า ตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1
- ปริมาณ 10-hydroxy-2-decenoic ตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1

#### 3.2.2.2 วิเคราะห์ค่า MIC ของรอยัลเซลล์แห้งต่อแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่

B. subtilis TISTR 8, S. aureus TISTR 118, E. coli TISTR 371, L. bulgaricus TISTR 451 และ L. plantarum TISTR 541 ตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ

#### 3.2.1.2

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Completely Randomized design และ Duncan's New Multiple Range Test ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

### 3.2.2.3 ศึกษาผลการใช้สารเพิ่มปริมาณต่อการทำแห้งรอยัลเซลล์

เติมสารเพิ่มปริมาณชนิดและปริมาณต่าง ๆ กันลงในรอยัลเซลล์ผสมให้เข้ากันแล้วทำให้แห้งโดยวิธีทำแห้งเยือกแข็ง

ก. ชนิดของสารเพิ่มปริมาณทดลอง 3 ชนิด ได้แก่ แลคโตส, แป้งมันสำปะหลัง และแลคโตสผสมแป้งมันสำปะหลัง (ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก)

ข. ปริมาณที่เติม ทดลอง 3 ระดับ คือ 10, 20 และ 30%

ประเมินผลโดยวิเคราะห์ปริมาณดูดน้ำกลับของรอยัลเซลล์ที่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิในบรรยากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 75% (29) (วิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ค.7)

วางแผนการทดลองและวิธีวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Symmetric Factorial Experiment ขนาด  $3^2$  และ Duncan's New Multiple Range Test ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

### 3.2.3 ศึกษาผลของภาชนะบรรจุ อุณหภูมิ และระยะเวลาเก็บ ต่อคุณภาพของรอยัลเซลล์แห้ง

เก็บรอยัลเซลล์ที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งแล้ว โดยกำหนดภาวะในการเก็บดังนี้

ก. ภาชนะที่ใช้บรรจุ ทดลอง 2 ชนิด คือ PE/Al และ HDPE

ข. อุณหภูมิที่ใช้เก็บ ทดลอง 3 ระดับ คือ -18, 5 และ 28 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง)

ค. ระยะเวลาเก็บ ทดลอง 6 ระดับคือ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 เดือน

ประเมินผลโดยติดตามการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของรอยัลเซลล์แห้ง ดังนี้

ปริมาณความชื้น ตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1

ปริมาณโปรตีน ตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1

ปริมาณ 10-hydroxy-2-decenoic acid ตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1

ค่า MIC ต่อ *B. subtilis* ตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.2

วางแผนการทดลองแบบ  $2 \times 3 \times 6$  Asymmetric Factorial Experiment ทำการทดลอง 2 ซ้ำ