

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์สารระเหย

- 1.1 มะพร้าวแก่อายุประมาณ 9-10 เดือน จากตลาดอมรพันธ์ จ.กรุงเทพมหานคร
- 1.2 ข้าวหอมพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 จาก จ.สุรินทร์
- 1.3 ข้าวเสาไห้ หรือ ข้าวเหลืองประทิว 123 จาก จ.สระบุรี

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์สารระเหย

- 2.1 สารมาตรฐาน (internal standard)
 - 2-methyl-3-heptanone (Aldrich, WI, สหรัฐอเมริกา)
 - 6-undecanone (Aldrich, WI, สหรัฐอเมริกา)
 - 2-ethylbutyric acid (Aldrich, WI, สหรัฐอเมริกา)
- 2.2 สารมาตรฐาน *n*-alkanes series (hydrocarbons, C6-C26) (Aldrich, WI, สหรัฐอเมริกา)
- 2.3 สารมาตรฐานของสารระเหยให้กลิ่น
 - ethyl caprylate (Aldrich, Steinheim, เยอรมันนี)
 - 2-undecanone (Aldrich, Steinheim, เยอรมันนี)
 - delta-decanolactone (Aldrich, Steinheim, เยอรมันนี)
 - delta-undecalactone (Aldrich, Steinheim, เยอรมันนี)
- 2.4 ไทเอทิลอีเทอร์ HPLC grade (Lab-Scan, Stillorgan, Dublin, ไอร์แลนด์)
- 2.5 เมทานอล HPLC grade (Lab-Scan, Stillorgan, Dublin, ไอร์แลนด์)
- 2.6 โซเดียมคลอไรด์ (APS, Darmstadt, ออสเตรีย)
- 2.7 โซเดียมซัลเฟตปราศจากน้ำ (Fisher Chemicals, London, อังกฤษ)
- 2.8 ก๊าซฮีเลียม ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.999
- 2.9 ก๊าซไนโตรเจนอุตสาหกรรม

3. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างกะทิและให้ความร้อนแก่กะทิ

- 3.1 เครื่องชั่งหยาบ รุ่น Model 2KS (Ohaus, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath 95 องศาเซลเซียส) (Memmert, เยอรมันนี)
- 3.3 เครื่องบด (Blender) โกลสแตนเลส ขนาด 1 ลิตร รุ่น 32BL80 (8011)
(Waring, สหรัฐอเมริกา)
- 3.4 ผ้าขาวบาง
- 3.5 ขวดรูปชมพู
- 3.6 แท่งวัดอุณหภูมิ (Thermometer probe) รุ่น TQM-500 (Delta Trak, สหรัฐอเมริกา)
- 3.7 นาฬิกาจับเวลา
- 3.8 กระดาษฟอยล์
- 3.9 เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆ

4. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างข้าวหุงสุก

- 4.1 เครื่องชั่งหยาบ รุ่น Model 2KS (Ohaus, สหรัฐอเมริกา)
- 4.2 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath 95 องศาเซลเซียส) (Memmert, เยอรมันนี)
- 4.3 เครื่องบด (Blender) โกลสแตนเลส ขนาด 1 ลิตร รุ่น 32BL80 (8011)
(Waring, สหรัฐอเมริกา)
- 4.4 กระดาษฟอยล์
- 4.5 ปีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร
- 4.6 แท่งวัดอุณหภูมิ (Thermometer probe) รุ่น Model TQM-500 (Delta Trak, สหรัฐอเมริกา)
- 4.7 นาฬิกาจับเวลา

5. อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์สารระเหย

- 5.1 เครื่องชั่งชนิดละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น AP 210-0 (Ohaus, สวิตเซอร์แลนด์)
- 5.2 เครื่องกวนแบบแม่เหล็ก (electric hotplate stirrer) รุ่น RCT Basic (Ika Werke, มาเลเซีย)
- 5.3 ตู้แช่เยือกแข็ง -40 องศาเซลเซียส (Freezer) รุ่น MDF-435 (Sanyo, ญี่ปุ่น)

- 5.4 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) รุ่น UM400 (Mettler, สหรัฐอเมริกา)
- 5.5 เครื่อง sonicator (Bransonic 32) (Branson Instruments, สหรัฐอเมริกา)
- 5.6 เครื่องกลั่นระบบสุญญากาศ (high vacuum distillation) รุ่น B62426952 (Edwards, อังกฤษ)
- 5.7 Gas chromatography (GC) รุ่น HP 6890 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, สหรัฐอเมริกา) ต่อกับ mass selective detector (MSD) รุ่น HP 5973 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, สหรัฐอเมริกา)
- 5.8 Gas chromatography (GC) รุ่น HP 5890 Series II Plus (Hewlett Packard, สหรัฐอเมริกา) ต่อกับ olfactometry detector รุ่น 093500 (SGE, ออสเตรเลีย)
- 5.9 เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆ

วิธีการ

1. วิธีคั้นกะทิ

ปอกเปลือกสีน้ำตาลออก ผ่าเอาน้ำมะพร้าวภายในทิ้ง แล้วล้างทำความสะอาดเนื้อมะพร้าวด้วยน้ำประปา จากนั้นนำไปเข้าเครื่องขูดมะพร้าว ผสมมะพร้าวขูดที่ได้กับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก ซึ่งน้ำกลั่นที่ใช้จะผ่านการต้มให้เดือดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อเป็นการกำจัดกลิ่น จากนั้นบรรจุลงใน Waring Blender ชนิดโถ สเตนเลส บดด้วยความเร็วสูงสูदनาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนบรรจุลงในถุงผ้าขาวบาง แล้วคั้นเอาเฉพาะส่วนน้ำกะทิ แบ่งกะทิที่ได้ใส่ภาชนะบรรจุ โดยส่วนหนึ่งสำหรับใช้เป็นตัวอย่างกะทิสต์ อีกส่วนหนึ่งสำหรับนำไปผ่านการให้ความร้อน

2. การศึกษาสารระเหยให้กลิ่นในกะทิสต์และกะทิที่ผ่านการให้ความร้อน

2.1 การให้ความร้อนแก่กะทิ

เทกะทิ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระดาษฟอยล์ แล้วแช่ในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิและเวลา ดังนี้

อุณหภูมิ	80 ± 1	องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
อุณหภูมิ	90 ± 1	องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
อุณหภูมิ	100 ± 1	องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2.2 การวิเคราะห์สารระเหยให้กลิ่นในกะทิ

2.2.1 การสกัดสารระเหยให้กลิ่นจากกะทิด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

สำหรับตัวอย่างกะทิสด เต็มเกลือโซเดียมคลอไรด์ 50 กรัม ลงในขวดฝาเกลียวขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกะทิสดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เต็มไดเอทิลอีเทอร์ 50 มิลลิลิตร และสารละลาย internal standard ในเมทานอล ปริมาณ 10 ไมโครลิตรลงในตัวอย่างกะทิ (internal standard ประกอบด้วย 2-methyl-3-heptanone, 6-undecanone และ 2-ethylbutyric acid เข้มข้นอย่างละ 10.59, 10.05 และ 13.14 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) กวนตัวอย่างด้วยเครื่องกวนแบบแม่เหล็ก ด้วยความเร็วรอบต่ำ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนตัวทำละลายส่วนบนออกจากตัวอย่างด้วยหลอดหยดได้เป็นสารสกัด จากนั้นจึงนำกะทิสองส่วนล่างไปสกัดซ้ำด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ต่ออีก 2 ครั้ง ครั้งละ 50 มิลลิลิตร รวมส่วนของตัวทำสารสกัดที่สกัดได้ทั้ง 3 ครั้งเพื่อนำไปทำให้เข้มข้น

สำหรับตัวอย่างกะทิที่ผ่านการให้ความร้อน หลังจากให้ความร้อนดังในข้อ 2.1 จึงนำตัวอย่างมาสกัดด้วยวิธีเดียวกับที่ใช้สกัดสารระเหยจากกะทิสดข้างต้น

ระเหยสารสกัดตัวอย่างกะทิสดและกะทิที่ผ่านการให้ความร้อนที่มีปริมาตรรวม 150 มิลลิลิตร ให้เข้มข้นด้วยการเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนจนเหลือปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำให้แห้งโดยเติม anhydrous sodium sulphate 10 กรัม จากนั้นนำไปกำจัดไขมันและสารประกอบที่ไม่ระเหย อื่น ๆ โดยวิธีกลั่นภายใต้ระบบสุญญากาศ ด้วยเครื่องกลั่นสุญญากาศ นำสารสกัดเข้มข้นใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วแช่แข็งโดยการจุ่มในไนโตรเจนเหลว กลั่นตัวอย่างที่ระบบสุญญากาศที่ความดัน 10^{-5} ทอร์รี่ โดยช่วงแรกกลั่นที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 50 องศาเซลเซียสโดยล่อน้ำอุ่นที่ขวดก้นกลมที่ใส่ตัวอย่าง แล้วกลั่นต่ออีก 1 ชั่วโมง นำสารที่กลั่นได้ในขวดกักเก็บแรก (first trap) ไปทำให้เข้มข้นโดยการเป่าก๊าซไนโตรเจนเบา ๆ จนได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และกรองผ่านหลอดหยดที่ภายในบรรจุด้วยใยแก้ว และ anhydrous sodium sulphate ทำให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้นด้วยเป่าก๊าซไนโตรเจนจนตัวอย่างมี

ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างในขวดสีชาฝาเกลียวโดยแช่ตัวอย่างในตู้แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ภายใน 24 ชั่วโมง

2.2.2 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารระเหยให้กลิ่นในกะทิ

วิเคราะห์ตัวอย่างที่ได้จากข้อ 2.2.1 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ด้วยวิธี Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS) ใช้การฉีดสารตัวอย่างแบบ splitless โดยใช้ก๊าซฮีเลียมบริสุทธิ์ 99.999% เป็นก๊าซตัวพา (carrier gas) มีอัตราไหลคงที่ที่ 1.7 มิลลิลิตรต่อ นาที แยกสารระเหยด้วยแคปิลารีคอลัมน์ 2 ชนิด คือ FFAP ความยาว 60 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 250 ไมโครเมตร ชั้นเคลือบหนา 0.25 ไมโครเมตร ร่วมกับการใช้คอลัมน์ HP-5 ความยาว 60 เมตร x 250 ไมโครเมตร x 0.25 ไมโครเมตร โดยตั้งอุณหภูมิเริ่มต้นของตูบที่ 40 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วเพิ่มเป็น 60 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 2 องศาเซลเซียสต่อนาที เพิ่มเป็น 90 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 20 องศาเซลเซียสต่อนาที จึงเพิ่มเป็น 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที คงไว้ที่อุณหภูมินี้เป็นเวลา 25 นาที ระบุชนิดของสารโดยใช้ MS ที่ใช้แหล่งกำเนิดไอออนแบบอิเล็กตรอนอิมแพคต์ (Electron–Impact Ionization, EI) และมีค่าพลังงานไอออไนเซชัน 70 อิเล็กตรอนโวลต์ ช่วงในการสแกน 30–300 m/z ที่ความเร็ว 2.74 สแกน/วินาที

การระบุชนิดของสารใช้การเปรียบเทียบข้อมูล mass spectrum ของสารแต่ละชนิดกับฐานข้อมูล Wiley 275 library ร่วมกับการเปรียบเทียบค่า retention index (RI) ของสารแต่ละชนิดกับฐานข้อมูล ESO 2000 (Essential Oil 2000) (Boelens Aroma Chemical Information Service, 1999) และเอกสารอ้างอิง Rychlik *et al.* (1998) ที่ใช้คอลัมน์ชนิดเดียวกัน ซึ่งค่า RI นี้คำนวณได้จากค่า retention time (RT) ของสารแต่ละชนิดกับค่า RT ของสารมาตรฐาน *n*-alkanes (C₆–C₂₆) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์และสภาวะการวิเคราะห์เดียวกันกับตัวอย่าง (Van den Dool and Kratz, 1963) ตามสมการข้อ 1 ในภาคผนวกเรื่องการวิเคราะห์ทางเคมี และยืนยันชนิดสารด้วยสารมาตรฐานชนิดนั้น ๆ

หาพื้นที่ใต้พีคของสารด้วย Chemstation Software B.02.05 (Copyright 1987–1997, Hewlett Packard) แล้วคำนวณหาปริมาณสาร โดยการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคของสารแต่ละชนิดกับพื้นที่ใต้พีคของ internal standard (2-methyl-3-heptanone สำหรับสารในกลุ่มคีโตน, 6-undecanone สำหรับสารในกลุ่มแอลกอฮอล์ และ 2-ethylbutyric acid สำหรับกรด) แล้วรายงานเป็นความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารชนิดนั้น ๆ ในตัวอย่างกะทิและข้าวมัน (นาโนกรัม/กรัม หรือ ppb)

3. การศึกษาสารระเหยให้กลิ่นในข้าวมันที่หุงสุกด้วยกะทิ

3.1 การเตรียมตัวอย่างข้าวหุงสุก

เตรียมวัตถุดิบดังนี้ ซังข้าวสาร (ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์เส้าไห้) น้ำหนัก 25 กรัมลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มขจัดกลิ่นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในอัตราส่วน 1:1.5 โดยน้ำหนักข้าว: น้ำ ปิดปากบีกเกอร์ด้วยกระดาษฟอยล์ นึ่งด้วยไอน้ำร้อนจนสุกใช้เวลา 30 นาที

ถ่ายตัวอย่างข้าวหุงสุกด้วยวิธีดั้งเดิมที่ได้จากการหุงข้าวทั้ง 2 พันธุ์ ตัวอย่างละ 55 กรัม ลงในขวดฝาเกลียวขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 20 กรัมบรรจุอยู่

3.2 การเตรียมตัวอย่างข้าวมันหุงสุกด้วยกะทิ

เตรียมวัตถุดิบดังนี้ ซังข้าวสาร (ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์เส้าไห้) น้ำหนัก 25 กรัมลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกะทิ (จากข้อ 1) ในอัตราส่วน 1:1.5 (ข้าว : กะทิ, w/w) ปิดปากบีกเกอร์ด้วยกระดาษฟอยล์ นึ่งด้วยไอน้ำร้อนจนสุกใช้เวลา 30 นาที

ถ่ายตัวอย่างข้าวมันที่ได้จากการหุงข้าวทั้ง 2 พันธุ์ ตัวอย่างละ 55 กรัม ลงในขวดฝาเกลียวขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 20 กรัมบรรจุอยู่

3.3 การวิเคราะห์สารระเหยให้กลิ่นในข้าวหุงสุกและข้าวมัน

3.3.1 การสกัดสารระเหยให้กลิ่นจากข้าวหุงสุก

นำตัวอย่างข้าวหุงสุกทั้ง 4 ตัวอย่างมาเติม internal standard ในเมทานอล (internal standard ประกอบด้วย 2-methyl-3-heptanone, 6-undecanone และ 2-ethylbutyric acid เข้มข้นอย่างละ 10.59, 10.05 และ 13.14 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสกัดด้วยตัวทำละลายไดเอทิลอีเทอร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยนำไปสกัดบนเครื่องกวนแบบแม่เหล็ก ด้วยความเร็วรอบต่ำ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

แยกตัวทำละลายส่วนบนออกจากตัวอย่างด้วยหลอดหยดได้เป็นส่วนของสารสกัด นำข้าวหุงสุก ส่วนล่างไปสกัดซ้ำด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ต่ออีก 2 ครั้ง รวมส่วนของตัวทำละลายที่สกัดได้ทั้ง 3 ครั้ง เพื่อนำไปทำให้เข้มข้น

ระเหยสารสกัดตัวอย่างข้าวหุงสุกที่มีปริมาตรรวม 300 มิลลิลิตร ให้เข้มข้นด้วยการเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนจนเหลือปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำให้แห้งโดยเติม anhydrous sodium sulphate 10 กรัม จากนั้นนำไปกำจัดไขมันและสารประกอบที่ไม่ระเหย (non volatile compounds) อื่น ๆ โดยวิธีกลั่นภายใต้ระบบสุญญากาศ โดยนำสารสกัดเข้มข้นใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วแช่แข็งโดยการจุ่มในไนโตรเจนเหลว กลั่นตัวอย่างที่ระบบสุญญากาศที่ความดัน 10^{-5} ทอร์รี่ โดยช่วงแรกกลั่นที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 50 องศาเซลเซียสโดยหล่อ่น้ำอุ่นที่ขวดก้นกลมที่ใส่ตัวอย่าง แล้วกลั่นต่ออีก 1 ชั่วโมง นำสารที่กลั่นได้ในขวดกักเก็บแรก (first trap) ไปทำให้เข้มข้นโดยการเป่าก๊าซไนโตรเจนเบา ๆ จนได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และกรองผ่านหลอดหยดที่ภายในบรรจุด้วยใยแก้ว และ anhydrous sodium sulphate ทำให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้นด้วยเป่าก๊าซไนโตรเจนจนตัวอย่างมีปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างในขวดสีชาฝาเกลียวโดยแช่ตัวอย่างในตู้แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ภายใน 24 ชั่วโมง

3.3.2 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารระเหยให้กลิ่นในข้าวมัน

ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2.2

4. การวิเคราะห์สารให้กลิ่นที่สำคัญในกะทิและข้าวมัน

วิเคราะห์สารให้กลิ่นที่สำคัญ (aroma active compounds) ในกะทิและข้าวมันด้วยวิธี AEDA โดยนำสารสกัดจากข้อ 2.2.1 และ 3.3.1 มาเจือจางด้วยตัวทำละลายไดเอทิลอีเทอร์ ในอัตราส่วนระหว่างสารสกัดต่อตัวอย่างที่เจือจางแล้วเท่ากับ 1:3, 1:9, 1:27, 1:81 ไปเรื่อยๆ เป็นลำดับ แล้วให้ผู้ทดสอบที่ผ่านการคัดเลือกและฝึกฝนจำนวน 2 คน ทดสอบลักษณะกลิ่นของสารระเหยในกะทิและข้าวมันแต่ละชนิดด้วยวิธี GC-O ซึ่งปลายของคอลัมน์แยกเป็นสองส่วน (1:1) เพื่อให้สารที่แยกได้ไปที่ Flame Ionization Detector (FID) ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส กับ sniffing port โดยใช้สภาวะของเครื่อง GC เช่นเดียวกับข้อ 2.2.2 กำหนดเป็น splitless mode และแยกสารระเหยโดยใช้แคปิลารีคอลัมน์ FFAP ขนาด 60 เมตร \times 0.25 มิลลิเมตร \times 0.25 ไมโครเมตร

ผู้ทดสอบจะดมกลิ่นของสารระเหยที่ sniffing port โดยสู่มลพิษการดม (ไม่เรียงลำดับการเจือจาง) เพื่อป้องกันอคติ แล้วเปรียบเทียบค่า RI ของสารที่ให้กลิ่นกับค่า RI ที่ได้ เพื่อระบุชนิดของสารที่ให้กลิ่น แล้วรายงานเป็น FD factor ของสารแต่ละชนิด ซึ่งค่านี้เป็นระดับที่เจือจางมากที่สุดที่ผู้ทดสอบยังคงได้กลิ่น

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทุกการทดลองทำ 3 ซ้ำ (triplicates) โดยการทดลองซ้ำ 2 และ 3 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ที่วัดค่าซ้ำ 2 ครั้ง ในแต่ละการทำซ้ำ (n = 6)

วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการทดลองเปรียบเทียบผลของความร้อนที่ให้แก่กะทิต่อชนิดและปริมาณสารระเหย ด้วยโปรแกรม SPSS (version 11.0) ถ้ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จะนำมาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

6. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. ระยะเวลาในการทดลอง

การทดลองเริ่มตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2547 สิ้นสุดเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2549