บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

แหล่งที่มาของข้อมูล

จากนโยบายอาหารและโภชนาการแห่งชาติ จัดทำโดยคณะกรรมการวางแผนงานและโภชนาการ สำนักงานคณะกรรมการวางแผนพัฒนาเศรษฐกิจสังคมแห่งชาติ ได้ชี้ให้เห็นว่าโรคขาดสารอาหารที่รุนแรงและเป็นปัญหามากที่สุดคือ โรคขาดโปรตีนและแคลอรี่ในทารก เด็กก่อนวัยเรียน เด็กวัยเรียน หญิงมีครรภ์และแม่ลูกอ่อน (ภาณุวรรณ, 2543) ดังนั้นควรสนับสนุนให้มีการรับประทานถั่วชนิดต่างๆ เพื่อทดแทนปริมาณโปรตีนจากเนื้อสัตว์ ทั้งนี้ถั่วเหลืองก็มีปริมาณโปรตีนสูงเมื่อเทียบกับอาหารประเภทอื่นๆ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณโปรตีนในถั่วเหลืองเมื่อเทียบกับอาหารชนิดอื่น

ชนิด	ปริมาณโปรตีน กรัม/100 กรัม
ถั่วเหลือง	34.1
ถั่วพู	32.8
ถั่วลิสงคั่ว	28.6
ถั่วเขียว	24.4
ถั่วดำ	22.7
ถั่วแดงหลวง	20.3
เนื้อวัวไม่มีมัน	20.0
เนื้อไก่	18.0
กุ้งน้ำจืด	16.2
เนื้อหมูไม่ติดมัน	14.1
ไข่เป็ด	13.2
ข้าวสาลี	11.8
ข้าวจ้าว	6.4

ที่มา : กองโภชนาการ กรมอนามัย : 2535

กระบวนการหมักที่ใช้ในการทำผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก จำเป็นต้องอาศัยจุลินทรีย์เข้ามาเกี่ยวข้อง เนื่องจากจุลินทรีย์จะไปมีบทบาทในการเปลี่ยนวัตถุดิบให้มีลักษณะของผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการ โดยการทำงานที่จำเพาะของเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น และเป็นการเพิ่มคุณค่าทางอาหารของวัตถุดิบให้มีมากขึ้น ทั้งยังช่วยทำให้สร้างสารที่ส่งเสริมให้อาหารมีรสชาติดี และช่วยทำลายส่วนประกอบที่ไม่ต้องการในอาหารให้หมดไป การหมักจะช่วยกำจัดกลิ่นถั่วเหลืองให้หมดไปได้ เนื่องจากกลิ่นของถั่วเหลืองที่เกิดจากสารพวก carboxyl compound พวก xexanol และ pentanol นอกจากนี้ *B. subtilis* ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Aspergillus* (Petchkongkaew, 2008)

กล้าเชื้อ *B. subtilis* มีบทบาทสำคัญในการทำผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก เป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในกลุ่มแกรมบวก รูปแท่งตรง มี flagella แบบ peritrichous เจริญได้ดีที่ pH 5.5-8.5 ในสภาวะที่มีอากาศ (aerobes) หรือมีอากาศเล็กน้อย (facultative anaerobes) สร้าง catalase มี endospore ที่ทำให้มีคุณสมบัติในการทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่ดีได้ ไม่ทำให้เกิดโรค สร้าง Hydrolytic enzyme ที่ย่อยสลาย polysaccharide, nucleic acid และ lipid โดยใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนและตัวให้อิเล็กตรอน มีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน บทบาทสำคัญของเชื้อตัวนี้ในการหมักคือการปล่อยเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลส ออกมาย่อยโปรตีน ช่วยปรับปรุงองค์ประกอบที่ย่อยได้ยากให้อยู่ในรูปที่ย่อยได้ง่ายและเป็นประโยชน์มากขึ้น (Feng et al., 2007; Suppadit, Sangla & Pintasean, n.d.; Inatsu et al., 2006) ซึ่งเมื่อทำการหมักถั่วจะได้สารประกอบจำพวก ester เป็นส่วนมาก เช่น ethyl, isobutyl และ isoamyl ester ของ isobutyric, a-methylbutyric, isovaleric, tiglic acids ซึ่งเกิดจากการสลายตัว และการหมักของโปรตีน กลีเซอร์ไรด์และกรดไขมันในถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังมีสารที่ให้กลิ่นหอมฉุน เช่น 2-heptanone pyrazine และ benzadehyde โดยไพราซีนจะเกิดขึ้นจากการต้มถั่วให้สุกก่อนนำไปหมัก ในขณะที่สาร 1-ออกทีน-3-ออล มีปริมาณลดลง (ภานุวรรณ, 2543) นอกจากนี้เมื่อทำการหมักยังพบสารประกอบที่ระเหยได้ เช่น butanone, 3-hydroxybutanone (acetoin), 2-methylbutanoic acid, pyrazines, 2-pentylfuran และ dimethyl disulfhide (Leejeerajumnean et al., 2001) 3-hydroxy-butanone (acetone), 2,5-dimethylpyrazine และ trimethylpyrazine (Owens et al., 1997) aldehydes, ketones และ acids (Beaumont, 2000) ซึ่งสารประกอบทั้งหมดเกิดขึ้นจากการหมักถั่วเหลืองโดยใช้กล้าเชื้อ *B. subtilis*

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าถั่วเหลืองหมักมีปริมาณธาตุเหล็กสูงกว่าถั่วเหลืองที่ยังไม่ได้ผ่านการแปรรูป และถั่วเหลืองจะมีโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรตแล้วยังประกอบด้วย เกลือแร่ที่สำคัญ เช่น โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม กำมะถัน และเหล็ก สำหรับวิตามินที่มีในถั่วเหลืองได้แก่ วิตามิน B_1 วิตามิน B_2 และไนอาซีน นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยวิตามิน A, B_6, B_{12} และวิตามิน C, D, E อีกด้วย (อภิษฐา, 2550) ดังตารางที่ 2 ซึ่งสามารถนำมาเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาโรคขาดสารอาหารต่างๆ เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ

ตารางที่ 2 คุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลืองและถั่วหมักในส่วนที่บริโภคได้ 100 กรัม

สารอาหาร	ถั่วเหลืองดิบ[b]	ถั่วเหลืองสุก[a]	ถั่วหมักเปียก[b]	ถั่วหมักแห้ง[b]
ความชื้น (%)	11.1	71.0	61.8	12.0
โปรตีน (g)	34.0	11.0	17.9	43.9
ไขมัน (g)	18.7	5.7	6.6	17.6
คาร์โบไฮเดรต (g)	26.7	10.8	5.3	13.5
แคลเซียม (mg)	245	73	198	292
ฟอสฟอรัส (mg)	500	179	223	5
เหล็ก (mg)	10.0	2.7	6.1	21
วิตามินบี1 (mg)	0.73	0.21	0.04	0.06
วิตามินบี2 (mg)	0.19	0.09	0.45	0.73
ไนอาซีน (mg)	1.5	0.6	1.6	1.5

ที่มา : [a]กองโภชนาการ กรมอนามัย : 2530, [b]กองโภชนาการ กรมอนามัย : 2535

วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

ตอนที่ 1 การคัดเลือกกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*

1. การคัดแยก *Bacillus subtilis* จากถั่วหมัก

นำถั่วเหลืองมาคัดเลือกเพื่อแยกสิ่งเจือปนออกให้หมด ล้างให้สะอาด แช่ทิ้งไว้ค้างคืนแล้วรินน้ำออก นำไปต้มเป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง ระหว่างการต้มต้องคอยเติมน้ำให้ท่วมเมล็ดถั่วเสมอ เมื่อให้ความร้อนเสร็จแล้วทิ้งให้เย็นและผึ่งให้สะเด็ดน้ำ ถ่ายใส่ตะกร้าพลาสติกที่รองด้วย อะลูมิเนียมฟอย์ย ทำการหมักที่อุณหภูมิ 35°C เป็นระยะเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างถั่วหมัก 25 กรัม ผสมกับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ peptone water 225 มิลลิลิตร ใน stomacher bag ตีบดด้วยเครื่อง stomacher โดยใช้ความเร็วรอบปานกลางเป็นเวลา 60 วินาที ได้ตัวอย่างถั่วหมักที่มีความเจือจางในระดับ 10^{-1} และทำการเจือจางเป็นลำดับจนได้ระดับความเจือจางประมาณ 10^{-5} ปิเปตตัวอย่างจากแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารวุ้น MYP เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยใช้เทคนิค spread plate ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกเก็บโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันชนิดละ 5 โคโลนี นำไปแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบน Nutrient agar ด้วยวิธีการ streak plate เก็บสายพันธุ์ *Bacillus* บริสุทธิ์ที่แยกได้ไว้ใน Nutrient broth รวมกับ Skim milk เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

2. การศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

(1) การย้อมสีแกรม โดยลักษณะของแบคทีเรีย *Bacillus* จะติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง (rod)

(2) การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลส (catalase test) โดยการหยดชัสเพนชั่น ของแบคทีเรียสร้างกรดลงบนสไลด์ 2 จุด หยดน้ำกลั่นบนหยดชัสเพนชั่นของแบคทีเรียจุดที่ 1 ใช้ไม้จิ้มฟันผสมให้เข้ากัน สังเกตว่าไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น ซึ่งแสดง catalase negative ใช้เป็นตัวควบคุม สำหรับจุดที่ 2 หยด 3% H_2O_2 บนหยดชัสเพนชั่นของแบคทีเรีย ใช้ไม้จิ้มฟันอีกด้านหนึ่งผสมให้เข้ากัน สังเกตการเกิดฟองก๊าซเปรียบเทียบกับตัวควบคุม ซึ่งแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* จะเป็น catalase positive

3. การคัดกรองสายพันธุ์ตามคุณสมบัติของการผลิตเอนไซม์ Amylase และ Proteinase

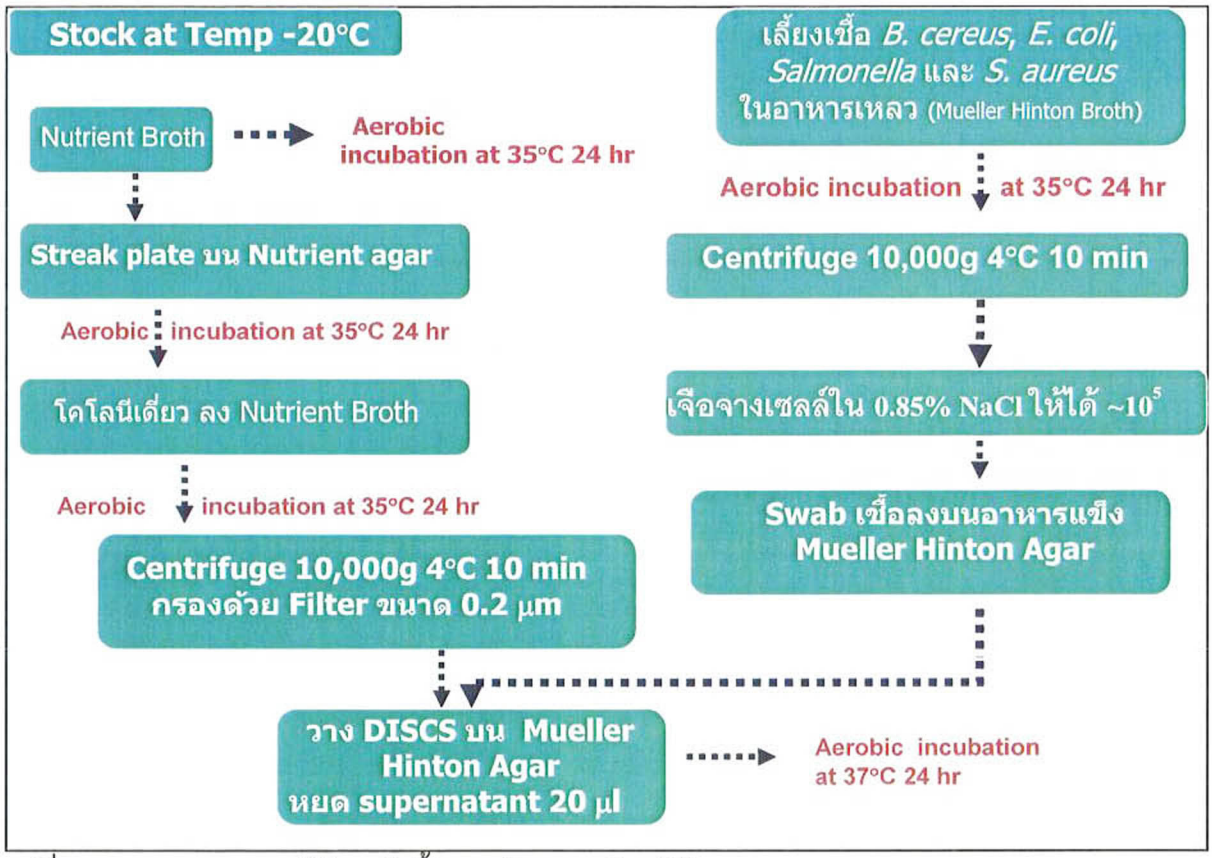
นำจำนวนแบคทีเรียที่มีคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี จำนวน 25 ไอโซเลท มาทดสอบการผลิตเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ Amylase และ Proteinase ดังรูปที่ 2 โดยการทดสอบเอนไซม์ Amylase ใช้อาหาร Nutrient agar modified ที่เติม 1% soluble starch และการทดสอบเอนไซม์ Proteinase ใช้อาหาร Nutrient agar modified ที่เติม 10% skim milk

4. การศึกษาคุณลักษณะทางสรีรวิทยา

นำจำนวนแบคทีเรียที่มีคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี จำนวน 25 ไอโซเลท มาศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา ได้แก่ ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 35°C และ 50°C ทดสอบการทนเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 0%, 7.5% และ 10% และความทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่าง ที่ pH 5.7 และ pH 6.8

5. การศึกษาคุณสมบัติเป็น Motility การย่อย citrate และคุณสมบัติการเป็น Antimicrobial

นำจำนวนแบคทีเรียที่มีคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี จำนวน 25 ไอโซเลท มาศึกษาคุณสมบัติการเป็น Motility โดยการนำโคโลนีเดี่ยว stab ลงในหลอดอาหาร Motility และอาหาร citrate ลึกประมาณ 5 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 35°C 24 ชั่วโมงแล้วจึงอ่านผล การทดสอบคุณสมบัติการเป็น Antimicrobial (Zheng & Slavik,1999) ดังรูปที่ 1 พบว่า มีเชื้อที่มีคุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจำนวน 2 ไอโซเลท



รูปที่ 1 การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

6. **การคัดเลือกด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป** API 50 CHB medium และ API 20E

(Petchkongkaew et al., 2008)

นำเชื้อที่มีคุณสมบัติการเป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจำนวน 2 ไอโซเลท จาก stock ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 35°C 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมา Streak plate บนอาหาร Nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 35°C 24 ชั่วโมง และเขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 35°C 24 ชั่วโมง และนำมา Streak plate บนอาหาร Nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 35°C 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงใน 0.85% NaCl ปริมาตร 2 ml ให้เข้มข้น และใช้ dropper หยดลงใน 0.85% NaCl ปริมาตร 5 ml เทียบกับ McFarland No.2 นับจำนวนหยด (n) และใช้ dropper หยดลงในอาหาร 50 CHB จำนวน 2n หยด ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นใช้ Micropipett หยดลงในชุด API 50 CH strips และ API 20E บ่มที่อุณหภูมิ 35°C อ่านผล 24 ชั่วโมง

7. ขั้นตอนการหา Growth rate ของกล้าเชื้อที่แยกได้จากถั่วหมัก

นำกล้าเชื้อที่คัดเลือกด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHB medium และ API 20E จำนวน 2 ไอโซเลท มาหาอัตราการเจริญเติบโตชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60 และ 72 วัดค่า OD ค่า pH รวมทั้งทดสอบการย่อยเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลส ทดสอบการผลิตสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยนำกล้าเชื้อที่มีคุณสมบัติในการผลิตสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุด จำนวน 1 ไอโซเลท มาเป็นกล้าเชื้อในการผลิตถั่วหมัก

ตอนที่ 2 การนำกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* มาทำการหมักถั่วเหลือง

1. การหมักถั่วเหลืองด้วยกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*

นำเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เป็นกล้าเชื้อในการหมัก หลังจากนั้นนำถั่วเหลืองมาคัดเลือกเพื่อแยกสิ่งเจือปนออกให้หมด ล้างให้สะอาด แช่ทิ้งไว้ค้างคืนแล้วรินน้ำ ออก ให้ความร้อน 2 แบบคือ นำไปต้มเป็นเวลานาน 7 ชั่วโมง ระหว่างการต้มต้องคอยเติมน้ำให้ ท่วมเมล็ดถั่วเสมอ และการให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความดัน 121°C 15 นาที เมื่อให้ความร้อนเสร็จแล้วทิ้งให้เย็นและผึ่งให้สะเด็ดน้ำ ถ่ายใส่ตะกร้าพลาสติกที่รองด้วยอะลูมิเนียมฟอย์ย นำ *Bacillus subtilis* อยู่ในรูป spore suspension ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิกรัม เติมลงไป 1 มิลลิลิตรต่อถั่วเหลือง 500 กรัม หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง

2. การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (FDA-BAM (2001))

เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก 25 กรัม ผสมกับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ peptone water 225 มิลลิลิตร ใน stomacher bag ตีบดด้วยเครื่อง stomacher โดยใช้ความเร็วรอบปานกลางเป็นเวลา 60 วินาที ได้ตัวอย่างถั่วหมักที่มีความเจือจางในระดับ 10^{-1} และทำการเจือจางเป็นลำดับ จนได้ระดับความเจือจางประมาณ 10^6 ปิเปตตัวอย่างจากแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารวุ้น PCA เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยใช้เทคนิค spread plate ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 (AOAC (2005), 952.20)

3.1 เตรียม stock solution

ชั่งผลึกของสารประกอบวิตามินบี 12 คือ Cyanocobalamin 5 มิลลิกรัม โดยสารประกอบวิตามินบี 12 จะละลายใน 0.05 M Acetate Buffer pH 5.0 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร จะได้สารประกอบวิตามินบี 12 ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2 การเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์

นำสารละลายจากการเก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงหลอดทดสอบ เติมสารละลายพอแทสเซียมไซยาไนด์ แอซีเตทบัฟเฟอร์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (พอแทสเซียมไซยาไนด์ 1 กรัม ในแอซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 4.6 เขย่าหลอดทดลองด้วยเครื่องผสมทันที แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นและนำ ไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไว้ เพราะระหว่างที่นึ่งฆ่าเชื้ออยู่ cobalamin จะถูกปล่อยออกมาและเปลี่ยนเป็น cyanocobalamin อยู่ในส่วนของส่วนใสด้านบน นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์โดยเจือจางส่วนใสด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้ปริมาณวิตามิน บี 12 อยู่ในช่วงที่วิเคราะห์ได้

3.3 การไล่อากาศ

นำสารละลายวิตามินบี 12 มาตรฐานและสารละลายตัวอย่างใส่เครื่อง ultrasonic bath เพื่อทำการไล่อากาศ เป็นเวลา 20 นาที

3.4 การวิเคราะห์หาวิตามินบี 12

ใช้ syringe ดูดสารละลายของสารประกอบวิตามินบี 12 และสารละลายตัวอย่างตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามลำดับ บันทึกโครมาโตแกรม นำพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 12 มาพลอตกราฟระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค (โดยให้แกน Y เป็นค่าพื้นที่ใต้พีค และแกน X เป็นความเข้มข้น) แล้วนำพื้นที่ใต้พีคของสารละลายตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ก็จะได้ความเข้มข้นหรือปริมาณวิตามินบี 12 ของสารละลายตัวอย่าง โดยทำการฉีดครั้งละ 2 ซ้ำ

3.5 สภาวะการวิเคราะห์

คอลัมน์ : Inertsil ODS-3V 5 µm (150×4.6 mm. I.D.)

เฟสเคลื่อนที่ : Acetonitrile/0.05 M Acetate Buffer pH 5.0 (10/90)

อัตราการไหล : 1.0 มิลลิลิตร/ นาที

เครื่องวัด : UV 265 nm.

4. การวิเคราะห์แคลเซียม ฟอสฟอรัสและธาตุเหล็ก (Ozden & Erkan, 2007)

4.1 การเตรียมตัวอย่างใช้เครื่อง microwave

การย่อยตัวอย่างโดยชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม เติม nitric acid ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ย่อยด้วยเครื่อง microwave นาน 30 นาที หลังจากนั้นเติม hydrogen peroxide ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ย่อยต่อด้วยเครื่อง microwave นาน 30 นาที เทสารละลายที่ได้ลงในขวดปรับปริมาตรแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร

4.2 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ICP-MS

โดยการวิเคราะห์ธาตุฟอสฟอรัส ใช้ mode no gas ในการวิเคราะห์ ส่วนการวิเคราะห์ธาตุแคลเซียมและธาตุเหล็ก ใช้ mode Hydrogen

5. วิธีวิเคราะห์หาค่า pH

นำถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักปริมาณ 2 กรัม บดให้ละเอียด เติมน้ำกลั่นปริมาณ 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จึงนำมาวัดด้วย pH meter (Omafuvbe, 2006)

6. การวิเคราะห์ค่าสีของผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก (Hunter Lab รุ่น Colour Quest XE)

ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่วหมักปริมาณ 25 กรัม ทำการวัดค่าสี Lab* ด้วยเครื่อง Hunter Lab รุ่น Colour Quest XE

7. การวิเคราะห์กลิ่นของผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก (ดัดแปลงจาก Leejeerajumnean et al., 2001)

นำตัวอย่างถั่วหมัก 200 กรัม เติมน้ำกลั่นครบ 500 มิลลิลิตร ทำการกลั่นแบบสกัดพร้อมกัน (Simultaneous steam distillation and extraction apparatus) จนได้ไอระเหยไปผสมกับตัวทำละลายคือ ไดอิทิลอีเทอร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาให้ความร้อนอย่างสม่ำเสมอที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ไอระเหยของไดอิทิลอีเทอร์จะผ่านไปยังเครื่องควบแน่น แล้วไปรวมกับไอระเหยของสารให้กลิ่นซึ่งมากับตัวอย่าง กลายเป็นของเหลวไหลผ่านลงมาส่วนล่างและเกิดการแยกชั้นของน้ำและตัวทำละลายที่มีสารให้กลิ่นละลายอยู่โดยตัวทำละลายอยู่ชั้นบน จะได้สารให้กลิ่นเพียง พอที่จะนำไปวิเคราะห์ จากนั้นเติม Sodium sulphate anhydrous เขย่าแล้วปล่อยให้ตกตะกอน จากนั้นก็เทสารละลายแยกออกจากตะกอน เพื่อที่จะเอาไปทำให้เข้มข้นโดยการไล่ไดอิทิลอีเทอร์ออกอีกด้วยการเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน จนเหลือปริมาตรประมาณ 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง Gas chromatography - mass spectrometry โดยมีสภาวะดังนี้ :

Column : DB-Wax column

Injection temperature : 200 °C

Program : 60 °C (4 min hold) จนถึง 180 °C

Rate : 2 °C/min

วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลทั้งหมดของการวิจัยมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS วิเคราะห์ CRD แบบจำนวนซ้ำเท่ากัน