



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

การเพิ่มมูลค่าของใบและรากหญ้าแฝก

THE VALUE ADDED OF VETIVER LEAVES AND ROOTS

โดย

สมคิด ดีจริง สุภาพร แสงศรีจันทร์

สมปอง สรวมสิริ ปฏิภาณ สุทธิกุลบุตร

SOMKID DEEJING SUPAPORN SANGSRICHAN

SOMPONG SRUAMSIRI PATHIPARN SUTIGOOLABUD



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การเพิ่มมูลค่าของใบและรากหญ้าแฝก

THE VALUE ADDED OF VETIVER LEAVES AND ROOTS

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2551 และ 2552

จำนวน 511,000 บาท

หัวหน้าโครงการ สมคิด ดีจริง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ผู้ร่วมโครงการ สุภาพร แสงศรีจันทร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

สมปอง สรวมลศิริ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ปฎิภาณ สุทธิกุลบุตร คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

31/03/53

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยแก่คณะผู้วิจัย ในปีงบประมาณ 2551 และ ปี 2552 ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่และเครื่องมือสำหรับการวิจัย และขอขอบพระคุณศูนย์ปฏิบัติการขยายพันธุ์หูก้าแม่แตงซึ่งดำเนินงานโดยศูนย์ปฏิบัติการพัฒนาที่ดิน โครงการหลวงภาคเหนือ สำนักพัฒนาที่ดินเขต 6 ที่อนุเคราะห์ใบและรากหูก้าแม่แตงมาให้ในงานวิจัยนี้ ขอขอบพระคุณ ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่เป็นสถานที่วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของอาหารสัตว์

ขอขอบคุณ นักศึกษาสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ได้แก่ นางสาว อาภาพร บุญทา นางสาว พัทธรา บุญแสงสี และนางสาว ศิวพร วัฒนสุวรรณณี ที่มีส่วนสำคัญที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2553



สารบัญ

หน้า

สารบัญตาราง	ก
สารบัญภาพ	ข
บทคัดย่อ	1
คำนำ	3
วัตถุประสงค์	5
การตรวจเอกสาร	6
อุปกรณ์และวิธีการ	45
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	61
สรุปผลการทดลอง	108
เอกสารอ้างอิง	111
ภาคผนวกที่ 1 อาหารเลี้ยงเชื้อ	122
ภาคผนวกที่ 2 การเตรียมสารเคมี	123
ภาคผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานและวิธีการคำนวณ	124
ภาคผนวกที่ 4 ภาพการทดลอง	128
ภาคผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ทางสถิติ	131

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 เปรียบเทียบลักษณะที่แตกต่างของหญ้าแฝกหอมและหญ้าแฝกดอน	7
2 ค่าเฉลี่ยผลผลิตน้ำหนักรากแห้งและคุณค่าทางโภชนาการของหญ้าแฝกที่ตัดเมื่ออายุ 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์	15
3 ลักษณะภายนอกของหญ้าแฝก ที่อายุการตัด 30 วัน และหมักตามสูตรต่าง ๆ	15
4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง และกรดไขมันระเหยง่ายของหญ้าแฝกที่อายุการตัด 30 วัน โดยหมักตามสูตรต่าง ๆ	16
5 คุณค่าทางโภชนาการของหญ้าแฝกที่อายุการตัด 30 วัน โดยหมักตามสูตรต่าง ๆ (เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง)	16
6 สภาวะในการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี	51
7 ส่วนประกอบในการหมักเศษใบหญ้าแฝกหมักกับเซลล์ยีสต์	53
8 สภาวะในการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี	59
9 ลักษณะทางกายภาพและคุณค่าทางโภชนาการของเศษใบหญ้าแฝกหมักกับเซลล์ยีสต์	71
10 การกินของสัตว์ (โคนม) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 21 วัน	72
11 เปรียบเทียบทางโภชนาการของใบหญ้าแฝกหอมสด เศษใบหญ้าแฝกหอมที่ไม่ได้หมักกับเซลล์ยีสต์ และเศษใบหญ้าแฝกหอมหมักกับเซลล์ยีสต์	74
12 ผลการจำแนกองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมตามโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี	99
13 การจำแนกองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่สกัดได้ในการทดลองนี้ แบ่งตามหมู่ฟังก์ชัน	101
14 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ positive control และ negative control	103

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ตารางผนวก 3.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ของสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	125
ตารางผนวก 3.2 พื้นที่ใต้พีคที่ได้จากเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS)	127
ตารางผนวก 5.1 การวิเคราะห์ความแตกต่างของโปรตีนในเศษใบหญ้าแฝกหอมหมักกับเซลล์ยีสต์ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05	131
ตารางผนวก 5.2 การเปรียบเทียบความแตกต่างของโปรตีนในเศษใบหญ้าแฝกหอมกับเซลล์ยีสต์ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05	131
ตารางผนวก 5.3 การวิเคราะห์ความแตกต่างคุณค่าทางโภชนาของใบหญ้าแฝกหอมสดกับเศษใบหญ้าแฝกหอมที่ไม่ได้หมักกับเซลล์ยีสต์ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05	131
ตารางผนวก 5.4 การวิเคราะห์ความแตกต่างการยับยั้งการเจริญของ <i>Escherichia coli</i> โดยน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	132
ตารางผนวก 5.5 การวิเคราะห์ความแตกต่างการยับยั้งการเจริญของ <i>Proteus vulgaris</i> โดยน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	133
ตารางผนวก 5.6 การวิเคราะห์ความแตกต่างการยับยั้งการเจริญของ <i>Bacillus cereus</i> โดยน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	134
ตารางผนวก 5.7 การวิเคราะห์ความแตกต่างการยับยั้งการเจริญของ <i>Staphylococcus aureus</i> โดยน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	135

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 โครงสร้างของเซลลูโลส	17
2 กระบวนการเปลี่ยนลิโนเซลลูโลสไปเป็นสารต่าง ๆ ที่มีค่าทางเศรษฐกิจ	21
3 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อพรีทรีทไบโพลีเมอร์ <i>Vetiveria zizanoid</i> ด้วยน้ำกลั่น กรดซัลฟูริก 0.25, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร	62
4 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการเตรียมไบโพลีเมอร์ก่อนนำไปไฮโดรไลซิส 2 วิธี	64
5 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสไบโพลีเมอร์ <i>Vetiveria zizanoid</i> ด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 100, 110 และ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที	64
6 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสไบโพลีเมอร์ด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10, 20 และ 30 นาที	66
7 ความสัมพันธ์ของการเจริญ ความเข้มข้นเอทานอล ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง กับระยะเวลาในการหมักเอทานอลของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 120 ชั่วโมง	68
8 เปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการของเศษไบโพลีเมอร์หมักกับเซลล์ยีสต์	71
9 การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของไบโพลีเมอร์สด เศษไบโพลีเมอร์ที่ไม่ได้หมักกับเซลล์ยีสต์ และเศษไบโพลีเมอร์หมักกับเซลล์ยีสต์	75
10 โคโรมาโทแกรมจากการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยจากรากไบโพลีเมอร์ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS)	77
11 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 1 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากไบโพลีเมอร์ และ Mass spectrum มาตรฐานของ 9,10-dehydrogen-2-norizaene	82
12 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 2 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากไบโพลีเมอร์ และ Mass spectrum มาตรฐานของ 6-N-butyl-1,2,3,4-Tetrahydronaphthalene	82

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 3 ของน้ำมันหอมระเหยจากราก หญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Epi-bicyclosquiphellandrene	83
14	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 4 ของน้ำมันหอมระเหยจากราก หญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Caryophyllene	83
15	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 5 ของน้ำมันหอมระเหยจากราก หญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Khusimene	84
16	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 6 ของน้ำมันหอมระเหยจากราก หญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Alpha-amorphene	84
17	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 7 ของน้ำมันหอมระเหยจากราก หญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ 2H-Benzocyclohepten-2-one,3,4,4a,5,6,7,8,9-octahyd	85
18	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 8 ของน้ำมันหอมระเหยจากราก หญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Eudesma-4(14), 11-diene	85
19	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 9 ของน้ำมันหอมระเหยจากราก หญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Khusimone	86
20	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 10 ของน้ำมันหอมระเหยจากราก หญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Guaia-3-diene	86
21	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 11 ของน้ำมันหอมระเหยจากราก หญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Alpha-gurjunene	87
22	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 12 ของน้ำมันหอมระเหยจากราก หญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Epi-zonaren	87
23	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 13 ของน้ำมันหอมระเหยจากราก หญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Valencene	88
24	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 14 ของน้ำมันหอมระเหยจากราก หญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ 2,2,6- Trimethyl-1-(2-methyl- cyclobut-2-enyl)-hepta-4,6-dien-3- one	88

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
25	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 15 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม	89
26	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 16 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม	89
27	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 17 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Nepthalene, 1,2,4a,5,8,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.beta.,8a. alpha.) – (.+-.)	90
28	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 18 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม Mass	90
29	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 19 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ 9,10-dehydro-isolongifolene	91
30	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 20 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม	91
31	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 21 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ 7-(1-methyl-ethenyl)-1-hydroxy-1,4-dimethyl-1,2,4,5-[3H,6H] octahydroazulene	92
32	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 22 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ (E)-1,2,4,4-tetramethyl-3-(3'-methyl-1',3'-butadienyl)-2-cyclohexen-1-ol	92
33	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 23 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Nootkatone	93
34	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 24 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Khusenik acid	93
35	Mass spectrum ของพีคหมายเลข 25 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ 2-Naphthalenecarboxylic acid, 8-ethenyl-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-5-methylene	94

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
36 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 26 ของน้ำมันหอมระเหยจากราก หญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ 1H-3a, 6-methanoazulene-3-carboxylic acid, octahydro-7,7-dimethyl- 8-methylene-[3S-(3.alpha.,3a.alpha.,6.alpha.,8a.alpha.)]	94
37 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 27 ของน้ำมันหอมระเหยจากราก หญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Zierone	95
38 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 28 ของน้ำมันหอมระเหยจากราก หญ้าแฝกหอม	95
39 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 29 ของน้ำมันหอมระเหยจากราก หญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Hexadecanoic acid	96
40 เปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทั้ง 4 ชนิด โดยใช้น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กับ Tetracycline	106
41 เปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทั้ง 4 ชนิด โดยใช้ น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กับ Tetracycline	107
ภาพผนวก 3.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวัช	125
ภาพผนวก 3.2 กราฟมาตรฐานเอทานอล	127
ภาพผนวก 4.1 ลักษณะใบหญ้าแฝกก่อนและหลังการพริทรีทและไฮโดรไลซิส	128
ภาพผนวก 4.2 วิธีการสกัดเอทานอลโดยวิธี solid phase microextraction (SPME) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 นาที	129
ภาพผนวก 4.3 ส่วนประกอบของชุดสกัด Solid phase microextraction (SPME)	129
ภาพผนวก 4.4 วิธีการฉีดตัวอย่างจากชุดสกัด SPME เข้าเครื่อง GC-MS	129
ภาพผนวก 4.5 ลักษณะใบหญ้าแฝกหอมก่อนและหลังการพริทรีทและ เศษใบหญ้าแฝกหอมหลังการไฮโดรไลซิส	130
ภาพผนวก 4.6 ลักษณะการหมักเศษใบหญ้าแฝกกับเซลล์ยีสต์ในถุงพลาสติก บ่มที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 21 วัน	130
ภาพผนวก 4.7 ลักษณะเซลล์ยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ	130
ภาพผนวก 4.8 ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม	130

การเพิ่มมูลค่าของใบและรากหญ้าแฝก

THE VALUE ADDED OF VETIVER LEAVES AND ROOTS

สมคิด ดีจริง¹ สุภาพร แสงศรีจันทร์²

สมปอง สรวมสิริ³ ปฏิภาณ สุทธิกุลบุตร⁴

SOMKID DEEJING¹ SUPAPORN SANGSRICHAN²

SOMPONG SRUAMSIRI³ PATHIPARN SUTIGOOLABUD⁴

^{1,2}คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ³คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้

⁴คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

สภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีไบโอหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* โดยการแช่ในสารละลายกรดซัลฟูริก 1.0% (v/v) ที่อุณหภูมิห้องระยะเวลา 12 ชั่วโมง และไฮโดรไลซิสด้วยความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 19.82 กรัมต่อลิตร และการเตรียมไบโอหญ้าแฝกหอมก่อนการไฮโดรไลซิส ตามวิธีที่ 1 (ล้างและอบแห้ง) ได้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าวิธีที่ 2 (การไฮโดรไลซิสต่อเนื่อง) เท่ากับ 20.34 และ 12.67 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสไบโอหญ้าแฝกหอม คือใช้สารละลายกรดซัลฟูริก 1.0%(v/v) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 20 นาที ได้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 20.10 กรัมต่อลิตรและ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* หมักเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 0.57 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

การหมักเศษไบโอหญ้าแฝกหอมที่ผ่านการไฮโดรไลซิสกับเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 21 วัน พบว่า มีกลิ่นหอม ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.74 และค่าโปรตีนรวม เท่ากับ 10.24 เปอร์เซ็นต์ และโคนมชอบกินเศษไบโอหญ้าแฝกหอมหมักกับเซลล์ยีสต์ที่มีกากน้ำตาล ส่วนคุณค่าทางโภชนาของอาหารสัตว์เบื้องต้น ของไบโอหญ้าแฝกหอมสด และเศษไบโอหญ้าแฝกหอมที่ไม่ได้หมักกับเซลล์ยีสต์ และหมักกับเซลล์ยีสต์มีโปรตีนรวม เท่ากับ 6.71, 6.66 และ 10.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* มีโปรตีนรวม เท่ากับ 22.65 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม *V. zizanioides* โดยการกลั่นด้วยน้ำ ได้ผลผลิต เท่ากับ 0.35 เปอร์เซ็นต์ และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทเมตรี พบว่า มีสารที่สามารถระบุและไม่สามารถระบุชื่อได้จำนวน 24 และ 5 ชนิด ตามลำดับ ซึ่งสารที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมเป็นสารในกลุ่ม sesquiterpenes, ketones, alcohol และ carboxylic acid นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

ABSTRACT

The optimal condition of pretreatment of *Vetiveria zizanioides* leaves was 1.0% (v/v) H_2SO_4 at ambient temperature for 12 hrs and obtained reducing sugar concentration at 19.82 g/l. The preparation method of pretreated *V. zizanioides* leaves before hydrolysis were Treatment I (washed and dried heat) and Treatment II (continued hydrolysis). It was found that Treatment I showed higher reducing sugar concentration than Treatment II at 20.34 and 12.67 g/l, respectively. The optimal temperature and period time for hydrolysis of *V. zizanioides* leaves by using 1.0%(v/v) H_2SO_4 were at 121 °C for 20 min. Ethanol production from *V. zizanioides* leaves hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* was 0.57 % for 96 hrs at 35 °C.

The *V. zizanioides* leaves hydrolysate was incubated with *S. cerevisiae* at ambient temperature for 21 days. It was found that the fermented *V. zizanioides* leaves hydrolysate (pH 4.74) had good smell and obtained crude protein at 10.24 %. The dairy cattle loved fermented *V. zizanioides* leaves hydrolysate with yeast and molasses. The crude protein of fresh *V. zizanioides* leaves, *V. zizanioides* leaves hydrolysate without and with *S. cerevisiae* were at 6.71, 6.66 and 10.24 %, respectively. The crude protein of *S. cerevisiae* was at 22.65 % dry weight.

The essential oil of *V. zizanioides* roots was extracted using hydrodistillation. Yields of essential oil was 0.35 %. The analysis of chemical composition of vetiver oil was examined by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). It was found that 24 and 5 components in vetiver oil were identified and unidentified compounds, respectively. The identified compound of vetiver oil were in the group of sesquiterpenes, ketones, alcohol and carboxylic acid. The vetiver oil more inhibited Gram positive bacteria than Gram negative bacteria.

คำนำ

จากข่าวภัยพิบัติ น้ำป่าไหลหลาก น้ำท่วมฉับพลัน และดินถล่ม ได้ทำลายชีวิตและทรัพย์สิน สร้างความเสียหายมากมายโดยประมาณค่าไม่ได้ สาเหตุหนึ่งของภัยธรรมชาติมาจากการตัดไม้ทำลายป่าของมนุษย์ทำให้พื้นที่ป่าลดลงอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ การชะล้างพังทลายของดิน เนื่องมาจากน้ำฝนที่ไหลบ่าจะกัดเซาะและพัดพาหน้าดินซึ่งมีธาตุอาหารพืชและปุ๋ยสูญเสียไปทำให้การเพาะปลูกได้รับผลผลิตต่ำ และถ้าไม่เร่งแก้ไขหน้าดินก็就会被ชะล้างพัดพาไปจนหมดทำให้ไม่สามารถทำการเกษตรได้อีกต่อไป พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงตระหนักถึงอันตรายร้ายแรงจากปัญหาดังกล่าว จึงทรงพระอุตสาหะวิริยะคิดค้นหาวิธีแก้ปัญหาดินและน้ำ ทรงศึกษาและวิเคราะห์พบว่า "หญ้าแฝก" มีรากยาวยึดติดดินได้ดี สามารถใช้ประโยชน์ในการอนุรักษ์ดินและน้ำ ทั้งยังเป็นพืชที่ช่วยรักษาสภาวะแวดล้อม หญ้าแฝกหอมเป็นพืชที่มีประโยชน์มากมาย ไม่ว่าจะเป็นส่วนของต้น ใบ หรือราก เช่น ใช้ใบหญ้าแฝก ทำกระเป๋ากันน้ำ วัสดุเพาะเห็ด วัสดุรองพื้นคอก ปุ๋ยหมัก เชื้อเพลิง อาหารเลี้ยงสัตว์ ส่วนของรากหญ้าแฝกหอมมีประโยชน์คือ ช่วยลดปัญหาการพังทลายของดินเนื่องจากการกัดเซาะของน้ำ ป้องกันการสูญเสียหน้าดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยกรองตะกอนดินสิ่งปนเปื้อน และดูดซับสารเคมีไม่ให้ไหลลงไปทำความเสียหายแก่สิ่งแวดล้อม และรากหญ้าแฝกหอมนำมาสกัดทำน้ำหอมที่มีประโยชน์และมีคุณค่าทางการค้าได้ ใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรคบางชนิด น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อโรคบางชนิด เช่น ใช้รักษาการอักเสบที่ผิวหนัง ช่วยบรรเทาอาการปวดตามข้อ มีสารช่วยการปลูกผม นอกจากนี้ ในรากหญ้าแฝกหอมยังมีสารไลโคแมลงและปลวก (Betley *et al.* 2004) และมีสาร antioxidant (Kim *et al.*, 2004) ใบหญ้าแฝกหอมมีองค์ประกอบที่เป็นเซลล์ลูไลสและเฮมิเซลล์ลูไลสอยู่ประมาณ 36-40 และ 32-38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งหากทำการย่อยสลายโมเลกุลของเซลล์ลูไลสและเฮมิเซลล์ลูไลสโดยอาศัยวิธีการทางเคมี หรือวิธีการทางชีวภาพ จะทำให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งยีสต์สามารถหมักน้ำตาลให้ได้เอทานอล นอกจากนี้ ยังสามารถนำน้ำตาลที่ได้จากการสลายเซลล์ลูไลสและเฮมิเซลล์ลูไลสจากใบหญ้าแฝกหอมไปผลิตสารที่มีคุณค่าสูงอื่น ๆ ได้อีกด้วย

ปัจจุบัน วิกฤตพลังงานของประเทศเป็นสิ่งที่ต้องตระหนักจึงทำให้การผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน เป็นสิ่งที่ต้องเร่งสนับสนุนให้มีการศึกษาอย่างจริงจัง และการผลิตเอทานอลโดยการหมัก มักใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเซลล์ยีสต์ที่เหลือจากกระบวนการหมักเอทานอลนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายรูปแบบ เช่น ผลิตเป็นอาหารมนุษย์และสัตว์ และผลิตเป็นยีสต์สกัดเพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส (Reed และ Peplere, 1973)

เนื่องจากในเซลล์ยีสต์ ประกอบด้วย กรดอะมิโน ไนโตรเจน วิตามิน และแร่ธาตุชนิดที่ใช้เป็นธาตุอาหารสำหรับสัตว์ ประกอบกับวัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ เช่น พืชกากถั่วต่าง ๆ และปลาป่นมีราคาสูงขึ้นส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เป็นอันมาก ปัจจุบัน เกษตรกรผู้เลี้ยงโคมักประสบปัญหาการขาดโปรตีนในอาหารหยาบสำหรับโค ทำให้จำเป็นต้องใช้อาหารข้นเพิ่มมากขึ้น ส่งผลทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นตามไปด้วย ใบหญ้าแฝกหอม มีคุณค่าทางอาหารพอ ๆ กับหญ้าอื่น ๆ และไม่มีสารที่เป็นพิษ จึงไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์ ซึ่งการหมักเศษหญ้าแฝกหอมกับเซลล์ยีสต์เพื่อเสริมโปรตีน ในการเลี้ยงสัตว์ นับว่าเป็นการเพิ่มมูลค่าของเหลือทิ้งและใช้ประโยชน์จากหญ้าแฝกหอมได้อย่างคุ้มค่าและครบวงจร และไม่เหลือของเหลือทิ้งที่ก่อปัญหาเกี่ยวกับสิ่งแวดล้อม รวมทั้งเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรในด้านการลดต้นทุนการผลิตให้ต่ำลงอีก

ดังนั้น การศึกษาเพื่อนำหญ้าแฝกหอมมาใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าให้เห็นเด่นชัดมากขึ้นในเชิงพาณิชย์ โดยเฉพาะด้านพลังงานทดแทนและอาหารสัตว์ รวมทั้งการประยุกต์ใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ ของรากหญ้าแฝกหอม อาจส่งผลกระทบต่อนักเกษตรกร หรือบุคคลทั่วไป หันมาให้ความสำคัญและร่วมใจปลูกหญ้าแฝกหอมอย่างจริงจังเพื่อสนองตามแนวพระราชดำริในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว และช่วยลดปัญหาการพังทลายของดินเพื่อบรรเทาและป้องกันไม่ให้เกิดโศกนาฏกรรมจากภัยน้ำท่วมที่ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างประเมินค่ามิได้

งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้ประโยชน์จากส่วนของใบและรากหญ้าแฝกหอม โดยนำส่วนของใบหญ้าแฝกหอมมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิตเอทานอล และนำเศษใบหญ้าแฝกหอมที่เหลือจากการผลิตเอทานอล มาหมักเสริมโปรตีนกับเซลล์ยีสต์ที่เหลือจากการผลิตเอทานอล เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ และสกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม แล้ววิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม โดยใช้เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) และทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีท และไฮโดรไลซิสใบหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* เพื่อผลิตเอทานอลจากใบหญ้าแฝกหอม
2. ศึกษาคุณลักษณะของเศษใบหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* หมักกับเซลล์ยีสต์ เพื่อเป็นอาหารสัตว์
3. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides*



การตรวจเอกสาร

หญ้าแฝก (วารุณี และคณะ, 2537)

หญ้าแฝก (Vetiver grass) เป็นพืชตระกูลหญ้า อยู่ในสกุล Vetiveria มีหลายชนิด สันนิษฐานว่า มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ในประเทศอินเดีย เป็นหญ้าที่สามารถแพร่พันธุ์ได้ตามธรรมชาติ สามารถเจริญเติบโตได้ในทุกสภาพพื้นที่ และทุกสภาพอากาศ พบมากในทวีปเอเชีย ตอนกลางและตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยพบหญ้าแฝกขึ้นอยู่ตามธรรมชาติทั่วทุกภาค จากที่ราบลุ่มน้ำท่วมจนถึงที่ดอน และเทือกเขาสูงชันได้ในดินทุกชนิด ไม่ว่าจะเป็นดินร่วนปนทราย ดินเหนียว ดินเค็ม ฯลฯ และสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพอากาศที่ร้อน แห้งแล้ง จนถึงสภาพอากาศที่เย็นจัด Chiu and Wong (2005) เสนอว่า *Vetiveria zizanioides* ที่มีอยู่ตามธรรมชาติมีประสิทธิภาพในการป้องกันการถูกกัดเซาะของดินทั้งยังสามารถทนต่อสภาพของดิน และเจริญเติบโตได้ดี

ลักษณะทั่วไป

หญ้าแฝกมีลักษณะเป็นกอแน่น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางกอประมาณ 30 เซนติเมตร โคนต้นมีลักษณะแบน ใบค่อนข้างแข็ง แตกออกจากโคนกอเรียงซ้อนกันแน่น ขอบใบขนาน ส่วนปลายใบสอบ แหลมยาว ช่อดอกสูงประมาณ 20-40 เซนติเมตร ดอกมีลักษณะคล้าย กระสวย มีทั้งดอกชนิดสมบูรณ์เพศและดอกตัวผู้ เมล็ดมีรูปขอบขนาน โคนมน ปลายแหลม มีหนามแหลมสั้นที่บริเวณผิวของเมล็ด รากหญ้าแฝกเป็นระบบรากฝอย (fibrous root) รากแข็งแรง มีปริมาณมาก สานกันแน่นและหยั่งลึกลงไปในดิน ไม่แผ่ขนาน มีรากแกน รากแขนง โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีรากฝอยมาก จึงช่วยยึดเหนี่ยวดิน ช่วยป้องกันการชะล้างหน้าดินและการพังทลายของดินได้เป็นอย่างดีแผ่กว้างโดยรอบกอเพียงประมาณ 50 เซนติเมตร จึงไม่เป็นอุปสรรคต่อการปลูกร่วมกับพืชอื่น เพราะไม่เกิดปัญหาการแย่งอาหารกัน

ชนิดของหญ้าแฝก

หญ้าแฝก แบ่งตามลักษณะภายนอกได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. หญ้าแฝกหอม หรือ หญ้าแฝกลุ่ม หรือหญ้าแฝกบ้าน (*Vetiveria zizanioides* Nash) พบขึ้นอยู่ทั่วไปในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ สามารถปรับตัวเข้ากับพื้นที่นั้น ๆ ได้ดี และเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว

2. หญ้าแฝกดอน หรือ หญ้าแฝกป่า (*Vetiveria nemoralis* A. camus) พบทั่วไปในที่ค่อนข้างแห้ง หรือ ที่ดินที่มีการระบายน้ำได้ดีในทุกภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะในป่าเต็งรัง แต่จะมีน้อยในภาคใต้สามารถขึ้นได้ดีทั้งในที่แดดจัดและแดดปานกลาง ลักษณะที่แตกต่างของหญ้าแฝกหอมและหญ้าแฝกดอนแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบลักษณะที่แตกต่างของหญ้าแฝกหอมและหญ้าแฝกดอน

หญ้าแฝกหอม	หญ้าแฝกดอน
ลักษณะกอ - เป็นพุ่ม ใบยาวตั้งตรงขึ้นสูง - สูงประมาณ 150-200 เซนติเมตร - มีการแตกตะเกียงและแตกแขนงลำต้นได้	- เป็นพุ่ม ใบยาว ปลายแผ่โค้งลงคล้ายกอด ตะไคร้ไม่ตั้งมากเหมือนหญ้าแฝกหอม - สูงประมาณ 100-150 เซนติเมตร - ปกติไม่มีการแตกตะเกียง และแขนงลำต้น
ใบ - ยาว 45-100 เซนติเมตร กว้าง 0.6-1.2 เซนติเมตร - ใบสีเขียวเข้ม หลังใบโค้ง ท้องใบออกสีขาว มีรอยกั้นขวางในเนื้อใบ ส่องกับแดดเห็น ชัดเจน - เนื้อใบค่อนข้างเหนียว มีไขเคลือบมาก ทำให้ ดูนุ่มมัน	- ยาว 35-80 เซนติเมตร - กว้าง 0.4-0.8 เซนติเมตร - ใบสีเขียวซีด หลังใบพับเป็นสันสามเหลี่ยม ท้องใบสีเดียวกับด้านหลังใบแต่ ชีดกว่า แผ่นใบเมื่อส่องกับแดดไม่เห็น รอยกั้นใน เนื้อใบ - เนื้อใบหยาบ สากคาย มีไขเคลือบน้อย ทำ ให้ดูกร้าน ไม่เหนียวมัน
ช่อดอกและดอก - สูง 150-250 เซนติเมตร - ส่วนใหญ่มีสีม่วง	- สูง 100-150 เซนติเมตร - มีได้หลายสี ตั้งแต่สีขาว ครีมน ถึงม่วง
ราก - มีความหอม เนื่องจากมีน้ำมันหอมระเหย ซึ่งเป็นสารพวก Alkaloids - สามารถหยั่งลึกได้ ประมาณ ตั้งแต่ 100- 300 เซนติเมตร	- ไม่มีความหอม - มีรากสั้นกว่า โดยทั่วไปจะหยั่งลึก ประมาณ 80-100 เซนติเมตร

การใช้ประโยชน์จากหญ้าแฝกเพื่อการอนุรักษ์ดินและน้ำ

1. การปลูกเป็นแถวตามระดับขวางความลาดชัน เพื่อชะลอความเร็วของน้ำ และดักตะกอนดิน ส่วนน้ำจะไหลซึมลงสู่ดินชั้นล่างได้มากขึ้น เป็นการเพิ่ม ความชุ่มชื้นในดิน ส่วนรากหญ้าแฝกจะหยั่งลึกลงไปใต้ดินอาจถึง 3 เมตร ซึ่งสามารถยึดดินป้องกันการพังทลายได้
2. การปลูกเพื่อแก้ปัญหาการพังทลายของดินเป็นร่องน้ำลึก
3. การปลูกในพื้นที่ที่มีความลาดชัน โดยเฉพาะภาคเหนือและภาคใต้ ให้ปลูกหญ้าแฝกเป็นแนวรั้วบริเวณคันคูขอบเขา หรือริมเขื่อนบันไดดินด้านนอก โดยควรปลูกเป็นแถวตามแนวขวางความลาดเทในต้นฤดูฝน
4. การปลูกเพื่อการอนุรักษ์ความชุ่มชื้นในดิน โดยปลูกแถวหญ้าแฝกขนานไปกับ

แถวของไม้ผลปลูกแบบวงกลมรอบไม้ผลและปลูกแบบครึ่งวงกลมหยาบรับน้ำฝน

5. การปลูกเพื่อป้องกันการเสียหายของชั้นบันไดดินหรือคันคูรับน้ำรอบเขา
6. การปลูกเพื่อป้องกันตะกอนดินทับถมลงสู่คลองส่งน้ำ ระบายน้ำอ่างเก็บน้ำในไร่นา ปลูกรอบสระ หรือปลูกเป็นแถวขนานไปกับแม่น้ำลำคลองเพื่อกรองตะกอนดิน
7. การปลูกเพื่อฟื้นฟูที่ดินเสื่อมโทรม
8. การปลูกเพื่อป้องกันการพังทลายของไหล่ถนนที่ลาดชันสูง โดยปลูกหญ้าแฝกเพื่อยึดดินและเบี่ยงเบนทางน้ำไหลบริเวณไหล่ทางและปลูกขวางแนวลาดเทเพื่อป้องกันการพังทลายและเลื่อนไหลของดิน
9. การปลูกในพื้นที่ดินดาน รากหญ้าแฝกสามารถหยั่งลึกลงไปดินดาน ทำให้ดินแตก่วนขึ้นและหน้าดินจะมีความชื้นเพิ่มขึ้น
10. การปลูกเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสารพิษในแหล่งน้ำ รากหญ้าแฝกจะเป็นกำแพงกักกันดินและสารพิษที่ปะปนมากับน้ำไม่ให้ไหลลงสู่แหล่งน้ำเบื้องล่างและรากยังมีประสิทธิภาพในการดูดซับธาตุโลหะหนัก และสารเคมีบางอย่างได้ดีกว่าพืชอื่นประโยชน์อื่น ๆ ของหญ้าแฝก ได้แก่ ปลูกหญ้าแฝกบนคันนาเพื่อให้คันนาคงสภาพอยู่ได้นาน ปลูกหญ้าแฝกเพื่อใช้ประโยชน์มูลหลังคา ตับหลังคาที่ทำจากหญ้าแฝกสามารถผลิตจำหน่ายได้ ส่วนรากที่มีความหอมนี้คนไทยรุ่นเก่าเคยนำมาแขวนในตู้เสื้อผ้า ทำให้มีกลิ่นหอมและช่วยไล่แมลงที่จะทำลายเสื้อผ้าได้ หญ้าแฝกมีสรรพคุณช่วยขับลมในลำไส้ แก้อาการท้องอืดเฟ้อ และแก้ไข้ได้ ส่วนรากสามารถนำมาสกัดทำน้ำมันที่มีประโยชน์และคุณค่าทางการค้าได้ อาทิเช่น ฝรั่งเศสผลิตน้ำหอมจากรากหญ้าแฝกชื่อ “Vetiver” (วรัญญา และคณะ, 2549)

เนื่องจากในปัจจุบันได้มีการรณรงค์ให้ใช้หญ้าแฝกเพื่อการอนุรักษ์ดินและน้ำ โดยให้เกษตรกรปลูกหญ้าแฝกในพื้นที่ซึ่งมีความลาดเอียงหรือที่ซึ่งเป็นร่องน้ำเพื่อป้องกันการชะล้างหน้าดิน หรือการพังทลายของดิน ดังนั้น กองอาหารสัตว์ จึงได้ทำการศึกษาปริมาณผลผลิตและคุณค่าทางโภชนาการของหญ้าแฝก เพื่อให้เกษตรกรสามารถนำหญ้าแฝกเหล่านั้นมาใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงสัตว์ได้ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2536)

หญ้าหมัก (ไกรสิทธิ์, 2522)

หญ้าหมัก หมายถึง พืชอาหารสัตว์ต่าง ๆ ที่เก็บรักษาไว้ในสภาพความชื้นสูงในที่ไม่มีอากาศซึ่งการเก็บถนอมในลักษณะหมักนี้ สามารถอยู่ได้เป็นเวลานาน โดยส่วนประกอบต่าง ๆ และคุณค่าอาหารไม่เปลี่ยนแปลงสำหรับไว้ใช้เป็นอาหารสัตว์ในช่วงขาดแคลนหญ้าสด

ประเภทของหญ้าหมัก

หญ้าหมักสามารถแบ่งเป็น 2 ประเภท ตามวิธีการทำ คือ

1. หญ้าหมักสด คือ หญ้าหมักที่ได้จากการใช้พืชสด มีความชื้นสูง จากการตัดโดยตรงแล้วนำมาหมัก

2. หญ้าหมักแห้ง คือ หญ้าหมักที่ได้จากการใช้พืชสดนำมาผึ่งแดดระยะสั้น เพื่อให้ความชื้นออกให้เหลือความชื้น ประมาณ 25-55 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงนำมาบรรจุหลุมหมักและต้องสับให้สั้นกว่าชนิดแรกเพื่อให้การอัดแน่นไปด้วยดี เนื่องจากความชื้นต่ำ กิจกรรมจุลินทรีย์จึงค่อนข้างจำกัด อาจจะมีผลิตรกรดแลคติกน้อย พิเศษ จึงอาจลดลงเพียงเล็กน้อย หญ้าหมักชนิดนี้ต้องเก็บในหลุมหมักอย่างดีเพื่อป้องกันไม่ให้อากาศเข้าได้

ปัจจัยที่ควบคุมคุณภาพของหญ้าหมัก

ในการทำหญ้าหมัก มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง และมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพต่าง ๆ ของพืชสดเมื่อทำการเป็นพืชหมัก ดังนั้นเพื่อให้ได้พืชหมักที่มีคุณภาพสูงจะต้องคำนึงถึงปัจจัยดังต่อไปนี้

1. ชนิดของพืชที่เหมาะสมในการทำหญ้าหมักควรเลือกพืชที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งหรือน้ำตาลสูงพอสมควรเพื่อเป็นอาหารให้แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกเจริญโดยเร็ว เป็นการป้องกันไม่ให้ จุลินทรีย์พวกอื่นที่ทำให้รสและกลิ่นของพืชหมักด้อยคุณภาพเจริญเติบโตได้ทัน ลักษณะของต้นพืชควรมีลำต้นเพื่อลดช่องอากาศภายในให้น้อยที่สุด ถ้าใช้พืชที่มีลำต้นกลวงทำพืชหมักจะต้องพยายามทำให้ปล้องแตกและอัดให้แน่นเพื่อให้อากาศออกให้มากที่สุด อีกประการหนึ่งควรเลือกพืชที่ให้ผลผลิตต่อไร่สูง เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ซึ่งมีความสูงดังกล่าวแล้ว และเป็นที่นิยมใช้ทำพืชหมักมากกว่าพืชชนิดอื่น แต่ก็มีหญ้าหลายชนิดด้วยที่สามารถนำมาทำหญ้าหมักได้ เช่น หญ้าลูซี่ หญ้ากินนีสีม่วง หญ้าเนเปียร์ เศษเหลือจากการผลิตข้าวโพดฝักอ่อนก็สามารถนำมาทำหญ้าหมักได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถนำถั่วอาหารคุณภาพดี เช่น ถั่วคาวาลเคด ถั่วท่าพระสไตโล มาหมักร่วมกับหญ้าได้ ซึ่งจะช่วยให้คุณค่าทางอาหารของหญ้าหมักเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากพืชตระกูลถั่วมีโปรตีนสูงกว่าหญ้า

2. เวลาในการตัดพืชมาทำหญ้าหมัก หมายถึง อายุของพืชที่เหมาะสมไม่แก่และไม่อ่อนจนเกินไปโดยตัดในช่วงที่พืชให้ผลผลิตสูง พร้อมทั้งยังมีคุณค่าทางอาหารเพียงพอทั้งโปรตีน แร่ธาตุ และวิตามิน ตัวอย่างเช่น ข้าวโพด ควรจะตัดทำพืชหมักในระยะเมล็ดกำลังเป็นน้ำนม และก่อนที่จะเริ่มแข็งตัวถ้าเป็นข้าวฟ่างควรตัดเมื่อใกล้จะมีดอกอายุประมาณ 10-11 สัปดาห์ จนถึงระยะติดเมล็ดอ่อน ๆ สำหรับหญ้าอื่น ๆ ควรตัดในระยะเริ่มออกดอก อายุของหญ้าที่จะตัดทำหญ้าหมักไม่แน่นอนแต่ควรสังเกตได้จากเปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้งต้องไม่ต่ำกว่า 25 เปอร์เซ็นต์และไม่สูงกว่า 35 เปอร์เซ็นต์

3. ความยาวของท่อนพืช เนื่องจากหญ้าหมักต้องอยู่ในสภาพสุญญากาศ ดังนั้นการตัดหรือสับพืชให้เป็นชิ้นจะมีผลต่อการอัดแน่นเพื่อให้อากาศออก ความยาวของท่อนพืชจะเป็นเท่าใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดพืช เช่น ถ้าเป็นข้าวโพด ข้าวฟ่าง อาจจะตัดให้ยาวประมาณท่อนละ 1 นิ้ว หรือ 2-3 เซนติเมตร ถ้าเป็นพวกหญ้าก้านขึ้นอยู่กับลำต้นว่าอวบมากน้อยแค่ไหน หญ้า

หรือพืชที่มีความชื้นน้อย ควรจะหันให้สั้นกว่าหญ้าหรือพืชที่มีความชื้นสูง การที่ต้องตัดพืชเป็นท่อนสั้น ๆ นั้น ก็เพื่อที่จะช่วยในการอัดแน่นในถังหมักทำได้ง่ายและทำได้ดียิ่งขึ้น รวมทั้งเพื่อให้ น้ำตาลถูกปล่อยออกมาได้เร็ว ซึ่งจะช่วยให้เกิดกรดแลคติกเร็วขึ้น เป็นผลดีต่อคุณภาพของหญ้าหมัก

4. ระดับความชื้นที่เหมาะสมในพืชโดยปกติแล้วพืชที่จะนำไปหมักมีความชื้นอยู่

ระหว่าง 65-70 เปอร์เซ็นต์ ถ้าพืชแห้งเกินไปจะอัดให้แน่นได้ยาก ทำให้มีอากาศหลงเหลือค้างอยู่มาก เป็นผลให้เกิดเชื้อราได้ง่ายพืชหมักที่มีความชื้นต่ำจะทำให้กิจกรรมของจุลินทรีย์ที่สร้างกรดลดลงด้วย ดังนั้น ถ้าหากพืชแห้งมากไป อาจแก้ไขโดยพยายามตัดเป็นท่อนสั้น ๆ หรือใช้น้ำพรมก่อนบรรจุลงในหลุมหรือถังหมัก ในทางตรงข้ามถ้าพืชที่นำมาหมักมีความชื้นมากเกินไปโอกาสที่จะทำให้หญ้าหมักมีคุณภาพลดลงก็มีมากขึ้นอาจทำให้หญ้าหมักมีลักษณะเป็นเมือกหรือเปรี้ยวจัดเกินไป และจะดึงเอาธาตุอาหารในพืชหมักออกมาด้วย ทำให้สูญเสียกรดและธาตุอาหารที่มีประโยชน์ต่อสัตว์ ดังนั้นถ้าหากพืชมีความชื้นมากเกินไป จำเป็นต้องลดความชื้นลงไปบ้าง ทำได้โดยการตัดพืชแล้วผึ่งแดดไว้ในแปลงสัก 2-3 ชั่วโมง จะทำให้น้ำลดลงหรือที่ใช้น้ำหมัก เพื่อดูดซับความชื้นและเป็นการเพิ่มคุณค่าทางอาหารและความน่ากินของพืชหมักด้วย

5. การกำจัดอากาศออกจากหลุมหมัก ในการทำหญ้าหมักมีหลักสำคัญอยู่ที่

จะต้องทำให้เกิดกรดแลคติกให้เร็วที่สุดและมากที่สุด เพราะเป็นกรดที่รักษาคุณภาพของพืชหมัก เป็นตัวช่วยป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญเพิ่มจำนวนขึ้น ต้นพืชสดเมื่อตัดมาใหม่ ๆ เซลล์ของพืชในถังหมัก และคายคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำและความร้อนออกมา ถ้ายังมีอากาศอยู่ภายหลังจากเซลล์พืชตายแล้ว พวกเชื้อราและยีสต์จะเจริญขึ้น ทำให้หญ้าหมักมีคุณภาพไม่ดีด้วยเหตุนี้จึงต้องพยายามกำจัดอากาศให้ออกจากหลุมหมักมากที่สุด เพื่อที่เมื่อเซลล์พืชตายเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน ซึ่งเป็นพวกที่สร้าง กรดอินทรีย์ต่าง ๆ เจริญขยายจำนวนช่วยให้พืชอยู่ในรูปของพืชหมัก ฉะนั้น การอัดพืชให้แน่นและการปิดให้มิดชิด จึงมีความจำเป็นในการทำหญ้าหมักอยู่มาก

6. สารช่วยหมัก เป็นพวกสารหรือวัตถุอื่นที่ใส่เพิ่มคุณภาพของหญ้าหมักหรือรักษาหญ้าหมักให้อยู่ในสภาพหมักดอง นอกจากปัจจัยต่าง ๆ ที่กล่าวแล้ว การที่จะทำให้เกิดกรดแลคติกเร็วและมากนั้นพืชหรือหญ้าที่จะนำมาทำหญ้าหมักจะต้องมีระดับน้ำตาลที่เพียงพอถ้าหากว่าพืชขาดคุณสมบัติข้อนี้ ควรเติมสารช่วยหมัก เช่น กากน้ำตาล เมล็ดพืชบด มันเส้นบด หรือกรดชนิดต่าง ๆ

7. กากน้ำตาล จะใช้ใส่ในหญ้าหมักที่จะทำจากพืชที่มีระดับน้ำตาลต่ำ

เพราะน้ำตาลในกากน้ำตาลนี้ แบคทีเรียสามารถใช้เป็นอาหารและเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติกได้ง่าย นอกจากนี้ กากน้ำตาลยังทำให้หญ้าหมักมีรสชาติที่น่ากิน และช่วยเพิ่มคุณค่าทางอาหารของหญ้าหมักด้วย ปริมาณกากน้ำตาลที่จะใช้ผสมในหญ้าหมักขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่ใช้ทำหญ้าหมัก ถ้าหากเป็นข้าวโพด ข้าวฟ่างที่ตัดในระยะที่เหมาะสมจะมีจำนวนน้ำตาลเพียงพอไม่จำเป็นต้องเติม แต่ถ้าเป็นพืชหญ้าทั่วไปควรใช้กากน้ำตาลประมาณ 3-5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ยิ่งถ้าหากหญ้าหมักที่มีพืชตระกูลถั่วปนอาจต้องใช้กากน้ำตาลถึง 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ขึ้นอยู่กับว่ามีพืชตระกูลถั่วผสมอยู่มากน้อยแค่ไหน นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับความอ่อนแก่ของพืช คือ พืชอ่อนตัวต้องใช้กากน้ำตาลมาก พืชแก่ใช้กากน้ำตาลน้อยลง

ข. เมล็ดพืชบด มันสำปะหลังบด การใช้เมล็ดพืช (เมล็ดข้าวโพด เมล็ดข้าวฟ่าง) และมันสำปะหลังบด จะใช้ในอัตรา 5-10 เปอร์เซ็นต์ของพืชหมัก จะช่วยในการทำงานของแบคทีเรียในการสร้างกรดที่จำเป็นในการรักษาคุณภาพของหญ้าหมักเกิดขึ้นได้อย่างเพียงพอ และช่วยลดความชื้นของพืชหมักที่มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นสูงเกินไป ตลอดจนช่วยเพิ่มคุณค่าของอาหารและเพิ่มความน่ากินของพืชหมักด้วย

ค. กรดชนิดต่าง ๆ เป็นการเติมเพื่อรักษาสภาพของพืชหมักให้มีกรดที่ช่วยถนอมพืชได้ทันทีและให้มีกรดหมักที่เหมาะสม โดยการเติมกรดลงไปในพืชหมักโดยตรง กรดที่นิยมใช้ คือ กรดฟอร์มิกเนื่องจากมีฤทธิ์กัดกร่อนน้อยมากใช้ในอัตราประมาณ 2.25 ลิตรต่อน้ำหนักสดของพืช 1 ตัน หญ้าหมักที่ได้จากการเติมกรดจะมีรสชาติไม่ดีเหมือนเดิมกากน้ำตาลหรือพวกเมล็ดธัญพืชบด

เหตุผลที่ต้องทำหญ้าหมัก

เนื่องจากสภาพดินฟ้าอากาศในช่วงฤดูฝนไม่เหมาะแก่การทำหญ้าแห้งต้องการถนอมคุณค่าทางอาหาร พลังงาน ไวตามิน และแร่ธาตุ สำคัญ ๆ ของถั่วและหญ้าไว้ให้สัตว์พืชอาหารสัตว์ต่าง ๆ มักสูญเสียมากเมื่อทำเป็นหญ้าแห้งเนื่องจากวิวัฒนาการของสารกันบูด ที่ใช้ทำพืชหมัก ดีมากขึ้นเครื่องมือ เครื่องใช้ในการทำพืชหมัก ทันสมัยมากขึ้นพืชอาหารสัตว์มีมากเกินไปในฤดูฝน ถ้าปล่อยทิ้งไว้ให้แก่เกินไป จะทำให้คุณค่าทางอาหารลดลง และความน่ากิน (Palatability) ก็ลดลง วิวัฒนาการในการระเหยนํ้าออกจากพืช เพื่อจะทำพืชหมัก มีการปรับปรุงมากขึ้น

ลักษณะที่ดีของหญ้าหมัก (พาณิข, 2512)

หญ้าหมักที่ดี ควรมีลักษณะคือสี หญ้าหมักที่ดีควรมีสีเขียวแกมเหลือง ถ้าปรากฏเป็นสีน้ำตาลไหม้หรือดำแสดงว่าเกิดความร้อนมากเกินไปในขณะหมัก ทำให้สาร

สารอินทรีย์สลายตัวเป็นการสูญเสีย ซึ่งถ้าหญ้าหมักเป็นสีดำไม่ควรนำไปใช้เลี้ยงสัตว์กินหญ้าหมักที่ดีจะมีกลิ่นหอมเปรี้ยวอ่อน ๆ คล้ายผลไม้ดอง เนื้อหญ้าหมัก จะต้องไม่เป็นเมือก ไม่ละ เอมือเนื้อไม่หลุดออก ไม่มีราหรือส่วนที่บูดเน่าถ้ามีสีขาว ๆ เป็นเส้นกระจายบนหญ้าหมัก ความชื้น ควรอยู่ระหว่าง 65-70 เปอร์เซ็นต์ หากมีความชื้นสูงกว่านี้พืชหมักจะเปรี้ยวมากและเกิดการสูญเสียโภชนะออกมากับของเหลว ทดสอบโดยบีบหญ้าหมักด้วยมือ ถ้ามีน้ำเหลว ๆ ไหลออกมาแสดงว่า มีความชื้นมากเกินไป ถ้าความชื้นน้อยเกินไปทำให้แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกลดลง ทำให้หญ้าหมักเสียได้ง่าย ความเป็นกรดควรมีค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ระหว่าง 3.5-4.2 โดยมีกรด แลคติกอยู่มากกรดอะซีติกเป็นส่วนน้อย และไม่ควรมีกรดบิวทิริกหรือให้มันน้อยที่สุด หญ้าที่ดีไม่ควรเปรี้ยวจัดเกินไป หญ้าหมักที่มีคุณภาพดีควรสัดส่วนของกรดต่าง ๆ ดังนี้ กรดแลคติก 1.5-2.5 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซีติก 0.5-0.8 เปอร์เซ็นต์ กรดบิวทิริกน้อยกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์

ข้อดีของหญ้าหมัก ได้แก่ สามารถทำได้ทุกฤดูกาล สามารถใช้ทุกส่วนของต้นพืชให้เป็นประโยชน์ ส่วนของลำต้นที่แข็ง เมื่อหมักแล้วจะอ่อนนุ่ม ใช้พื้นที่ในการเก็บรักษาน้อย หญ้าหมักมีลักษณะอวบน้ำ สัตว์ชอบกิน การสูญเสียโดยการระเหยของใบพืช จากการทำหญ้าหมักมีน้อย จึงสามารถรักษา ธาตุอาหารต่าง ๆ ไว้ได้สูงกว่าหญ้าแห้ง ลดอันตรายจากอัคคีภัย ในการเก็บเมื่อเทียบกับหญ้าแห้งสามารถรักษาได้นานเป็นปี ๆ โดยคุณค่าทางอาหารไม่ลดลง ถ้าหากมีการปฏิบัติอย่างดี

ข้อเสียของหญ้าหมัก ได้แก่ ต้องมีความรู้ความชำนาญในการทำหญ้าหมัก เปลืองแรงงานและลงทุนมากกว่าการทำหญ้าแห้ง ขาดวิตามินดี เป็นราเสียหายง่าย เมื่อเปิดหุ้มาแล้ว และเนื่องจากหญ้าหมักมีฤทธิ์เป็นกรดจึงทำลายภาชนะที่เป็นโลหะได้

การใช้หญ้าหมักเลี้ยงสัตว์ (เสริมศักดิ์, 2543)

1. นิยมใช้หญ้าหมักเลี้ยงโคเนื้อ โคนม โดยใช้เป็นส่วนหนึ่งของอาหารหยาบ หรือใช้เป็นอาหารหยาบแทนพืชสด นอกจากนี้ยังใช้เลี้ยงแพะ แกะ สุกร และไก่
2. ใช้หญ้าหมักประมาณ 2.5-3 ปอนด์ แทนหญ้าแห้ง 1 ปอนด์ เพราะหญ้าหมักมีวัตถุแห้ง (dry matter) ต่ำกว่า
3. เมื่อเอาหญ้าหมักออกมาเลี้ยงสัตว์ ต่ต่อไปต้องเอาออกมาทุกวัน วันละ 2-5 นิ้ว เพื่อรักษาหญ้าให้สดอยู่เสมอ
4. การใช้หญ้าหมักเลี้ยงสัตว์ ควรใช้ในเวลาที่ทุ่งหญ้าไม่เพียงพอ หรือในระยะเวลาที่ขาดแคลนพืชสด

5. ขณะที่มีความร้อน หญ้าหมักเป็นอาหารหยาบที่ดี สำหรับใช้เลี้ยงโค ที่เลี้ยงอยู่ในโรงเรือน

การใช้หญ้าแฝกเป็นอาหารสัตว์

ปัจจุบันราคาวัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารโปรตีนทั้งที่มาจากพืช และชนิดที่มาจากสัตว์ เช่น พวกกากถั่วต่าง ๆ และปลาป่น ฯลฯ มีราคาสูงขึ้น ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ เป็นอันมาก เนื่องจากอาหารโปรตีนชนิดต่าง ๆ เหล่านี้เป็นส่วนประกอบสำคัญในสูตรอาหารชั้น หรืออาหารผสม ซึ่งใช้เป็นอาหารหลักของสัตว์กระเพาะเดี่ยว เช่น สุกร เป็ด ไก่ ฯลฯ สำหรับสัตว์ กระเพาะรวม หรือสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น โคเนื้อ โคนม กระบือ ฯลฯ การให้อาหารชั้นเป็นส่วนหนึ่ง ที่จำเป็นในการเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารหยาบ และเพิ่มผลผลิตของสัตว์เท่านั้น แนวทาง ที่นำวัสดุอาหารที่ให้โปรตีนสูง ๆ มาทดแทน อาหารโปรตีนจากธรรมชาติ ซึ่งเป็นที่ยอมรับกัน ทั่วไปคือ การใช้ไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนแท้ (Non-Protein Nitrogen หรือ NPN) มาใช้ผสมใน อาหารสัตว์นั้น เป็นไปได้มากในสัตว์เคี้ยวเอื้อง เนื่องจากสัตว์ประเภทนี้มีความสามารถใช้ ประโยชน์จากแหล่งโปรตีนคุณภาพต่ำ และจากสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน แล้ว สามารถเปลี่ยนให้เป็นโปรตีน เพื่อใช้ให้เป็นประโยชน์แก่ตัวสัตว์เองได้โดยขบวนการของ จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในกระเพาะส่วนหน้า ซึ่งสัตว์กระเพาะเดี่ยวไม่สามารถทำได้ เนื่องจากความ แตกต่างกันทางระบบย่อยอาหารของสัตว์ทั้ง 2 ชนิด แหล่งของไนโตรเจนที่ใช้ ได้แก่ ยูเรีย ไบ ยูเรต ไดแอมโมเนียม ฟอสเฟต ฯลฯ แต่ที่นิยมใช้กันมากคือ ปุ๋ยยูเรีย หรือที่รู้จักกันในหมู่ เกษตรกรผู้ใช้คือ ปุ๋ยเย็น หรือปุ๋ยน้ำตาลยูเรีย จะมีลักษณะเป็นเม็ดกลม ๆ ขนาดเล็กมีสีขาวขุ่น หาซื้อได้ง่ายราคาไม่แพง และสะดวกในการใช้ยูเรียเป็นสารประกอบมีไนโตรเจน เป็น องค์ประกอบอยู่ถึง 46 เปอร์เซ็นต์ ในการวิเคราะห์หาโปรตีนทั่วไป นิยมวัดปริมาณไนโตรเจน เป็นหลักแล้วคูณด้วยปริมาณโปรตีนเฉลี่ย 16 เปอร์เซ็นต์ (6.25) ดังนั้น ยูเรียจะมีเปอร์เซ็นต์ โปรตีนเท่ากับ 287.5 เปอร์เซ็นต์

หญ้าแฝกหมัก

เกษตรกรผู้เลี้ยงโคมักประสบกับปัญหาจากการขาดโปรตีนในอาหารหยาบสำหรับโค ทำให้จำเป็นต้องใช้อาหารชั้นจำนวนมาก ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ใบหญ้าแฝก มี คุณค่าทางอาหารพอ ๆ กับหญ้าอื่น ๆ อีกทั้งยังไม่มีสารที่เป็นพิษ จึงไม่เป็นอันตรายต่อปศุสัตว์ หญ้าแฝก เป็นหญ้าชนิดเดียวที่ปศุสัตว์สามารถใช้เป็นอาหารได้ในฤดูแล้ง ในทวีปแอฟริกันนั้น ใบอ่อนของหญ้าแฝกพื้นเมือง (*Vetiveria nigritana*) ที่ผลิออกมาหลังจากที่ถูกเผาในตอนต้น ฤดูใบไม้ผลิ เป็นอาหารอย่างดีของวัว ใบอ่อนของหญ้าแฝกหอม เช่น หญ้าแฝกแหล่งพันธุ์ กำแพงเพชร 2 สามารถใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยนำไปเลี้ยงวัวเลี้ยงควายได้ ควรตัดในช่วง

อายุ 2 ถึง 4 สัปดาห์หลังจากตัดครั้งก่อน นอกจากนี้ พันธุ์หญ้าแฝกหอมจากอินเดีย ก็ใช้เลี้ยงปลาจีนได้ ในประเทศอินเดีย มีการปลูกหญ้าแฝกเป็นขอบเขตของที่ดิน และตัดใบออกทุก ๆ 2 สัปดาห์ เอาไปเลี้ยงปลาคัสเตอร์ ใบหญ้าแฝก มีระดับของโปรตีนหยาบเหมาะสม และคุณค่าทางอาหารอื่นๆ พอเพียงที่จะใช้เลี้ยงปลาคัสเตอร์ โดยเฉพาะหากได้ผสมกับอาหารสัตว์ที่มีคุณภาพอื่น ๆ

เนื่องจากหญ้าแฝกที่เหมาะสมสำหรับการใช้เลี้ยงสัตว์ คือหญ้าแฝกที่มีช่วงอายุการตัดทุก 4 สัปดาห์ เมื่อหญ้าแฝกมีอายุมากขึ้น คุณค่าทางโภชนาจะลดลงต่ำลง ดังนั้น จึงควรนำหญ้าแฝกซึ่งมีมากในฤดูฝน และอยู่ในช่วงที่มีคุณค่าทางโภชนาที่เหมาะสมแก่การใช้เลี้ยงสัตว์ มาเก็บถนอมไว้ในรูปของหญ้าหมักเพื่อไว้ใช้เลี้ยงสัตว์ในฤดูแล้ง ซึ่งเป็นช่วงที่ขาดแคลนหญ้าสด ในการทำหญ้าแฝกหมัก เพื่อให้ได้หญ้าหมักที่มีคุณภาพดีนั้น ควรใช้หญ้าแฝกที่มีช่วงอายุการตัดทุก ๆ 30 วัน ใช้ระยะเวลาในการหมัก 30 วัน พร้อมทั้งเติมสารช่วยหมักตามสูตร ต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ **สูตรที่ 1** หญ้าแฝกกับกากน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์ **สูตรที่ 2** หญ้าแฝกกับมันเส้นบด 15 เปอร์เซ็นต์ **สูตรที่ 3** หญ้าแฝกกับยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ กับกากน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์

เมื่อครบกำหนดระยะเวลาในการหมักแล้ว จะได้หญ้าแฝกหมักที่มีคุณภาพดีและมีคุณค่าทางโภชนาสูงเพียงพอสำหรับใช้เลี้ยงสัตว์ หญ้าหมักที่มีคุณภาพดี คือ ไม่เฒ่า ไม่ลึน และไม่เหม็นฉุน สีของหญ้าหมักจะเป็นสีเขียวแกมเหลือง มีกลิ่นหอมชวนกิน มีความเป็นกรดต่ำ (pH) อยู่ในช่วง 3.9-4.3 มีกรดแลกติกอยู่ในช่วง 1.3-1.8 เปอร์เซ็นต์ และกรดบิวทิริกประมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์

คุณค่าทางโภชนาของหญ้าแฝกหมัก

เมื่อนำหญ้าแฝกที่มีช่วงอายุการตัด ทุก ๆ 30 วัน มาหมักตามสูตรต่าง ๆ เป็นเวลานาน 30 วัน จะได้หญ้าหมักที่มีคุณค่าทางโภชนาอยู่ในเกณฑ์ของพืชหมักที่ดี คือ มีวัตถุแห้งอยู่ในช่วง 28-34 เปอร์เซ็นต์ มีโปรตีนอยู่ในช่วง 10-17 เปอร์เซ็นต์ มีไขมันประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ มีเยื่อใย (NDF) อยู่ในช่วง 49-61 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเยื่อใยพวกลูโลสประมาณ 24-30 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส ประมาณ 18-25 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน ประมาณ 3-4 เปอร์เซ็นต์ มี NDS อยู่ในช่วง 39-51 เปอร์เซ็นต์ การย่อยได้ของวัตถุแห้ง (IVDMD) ของหญ้าแฝกหมักจะอยู่ในช่วง 58-62 เปอร์เซ็นต์

ในการทำหญ้าแฝกหมัก เพื่อให้ได้หญ้าหมักที่มีคุณภาพดีนั้น ควรใช้หญ้าแฝกที่มีช่วงอายุการตัดทุก ๆ 30 วัน ใช้ระยะเวลาในการหมัก 30 วัน พร้อมทั้งเติมสารช่วยหมักตามสูตรต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2, 3 และ 4

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยผลผลิตน้ำหนักแห้งและคุณค่าทางโภชนาของหญ้าแฝกที่ตัดเมื่ออายุ 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์

คุณค่าทางโภชนา	อายุการตัด (สัปดาห์)			
	2	4	6	8
ผลผลิตน้ำหนักแห้ง (กิโลกรัมต่อไร่)	1,710	2,358	2,980	ไม่มีข้อมูล
วัตถุแห้ง (เปอร์เซ็นต์)	31.5	37.2	41.2	42.3
โปรตีน (เปอร์เซ็นต์)	8.9	7.6	5.9	5.5
NDS (เปอร์เซ็นต์)	20.5	19.5	21.8	19.9
เซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)	37.8	38.3	37.1	38.6
เฮมิเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)	34.1	34.3	34.0	33.1
ลิกนิน (เปอร์เซ็นต์)	4.7	5.4	6.5	6.6
การย่อยได้ของวัตถุแห้ง (เปอร์เซ็นต์)	41.2	38.3	37.6	35.2
แคลเซียม (เปอร์เซ็นต์)	0.2	0.2	0.2	0.2
ฟอสฟอรัส (เปอร์เซ็นต์)	0.2	0.2	0.1	0.1
แมกนีเซียม (เปอร์เซ็นต์)	0.2	0.1	0.1	0.1
โปแตสเซียม (เปอร์เซ็นต์)	1.5	1.0	0.9	0.7
ไนโตรเจน (ppm)	32.0	4.4	2.3	2.4

ตารางที่ 3 ลักษณะภายนอกของหญ้าแฝก ที่อายุการตัด 30 วัน และหมักตามสูตรต่าง ๆ

ลักษณะภายนอก	สูตรที่ 1 หญ้าแฝก + กากน้ำตาล 10 (เปอร์เซ็นต์)	สูตรที่ 2 หญ้าแฝก + มันเส้นบด 15 (เปอร์เซ็นต์)	สูตรที่ 3 หญ้าแฝก + ยูเรีย 0.5 + กากน้ำตาล 10 (เปอร์เซ็นต์)
สีของพืชหมัก	เขียวเข้มแกมเหลือง	เขียวจาง	เหลืองเข้มแกมเขียว
กลิ่นของพืชหมัก	หอมกากน้ำตาลชวนกิน	หอมมากกว่า	หอมกากน้ำตาลชวนกิน
เนื้อของพืชหมัก	ไม่ลื่น ไม่เป็นเมือก	ไม่ลื่น ไม่เป็นเมือก	ไม่ลื่น ไม่เป็นเมือก

ตารางที่ 4 ค่าความเป็นกรด-ด่างและกรดไขมันระเหยง่ายของหญ้าแฝกที่อายุการตัด 30 วัน โดยหมักตามสูตรต่าง ๆ

ค่าความเป็นกรด-ด่าง และ กรดไขมันระเหยง่าย	สูตรที่ 1 หญ้าแฝก + กากน้ำตาล 10 (เปอร์เซ็นต์)	สูตรที่ 2 หญ้าแฝก + มันเส้นบด 15 (เปอร์เซ็นต์)	สูตรที่ 3 หญ้าแฝก + ยูเรีย 0.5 + กากน้ำตาล 10 (เปอร์เซ็นต์)
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	4.0	3.9	4.3
กรดแลกติก	1.3	1.4	1.8
กรดอะซิติก	0.2	0.3	0.2
กรดบิวทิริก	0.1	0.1	0.1

ตารางที่ 5 คุณค่าทางโภชนาของหญ้าแฝกที่อายุการตัด 30 วัน โดยหมักตามสูตรต่าง ๆ (เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง)

คุณค่าทางโภชนา (เปอร์เซ็นต์)	สูตรที่ 1 หญ้าแฝก + กากน้ำตาล 10 (เปอร์เซ็นต์)	สูตรที่ 2 หญ้าแฝก + มันเส้นบด 15 (เปอร์เซ็นต์)	สูตรที่ 3 หญ้าแฝก + ยูเรีย 0.5 + กากน้ำตาล 10 (เปอร์เซ็นต์)
วัตถุแห้ง (เปอร์เซ็นต์)			
โปรตีน (เปอร์เซ็นต์)	28.1	32.5	34.0
ไขมัน (เปอร์เซ็นต์)	12.3	10.1	16.9
เถ้า (เปอร์เซ็นต์)	1.4	1.1	1.3
NDS (เปอร์เซ็นต์)	11.2	8.5	11.3
เซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)	39.1	50.7	42.6
เฮมิเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)	30.1	24.6	27.9
ลิกนิน (เปอร์เซ็นต์)	25.2	17.8	22.4
IVDMD (เปอร์เซ็นต์)	3.7	3.2	3.3
	58.1	61.4	62.3

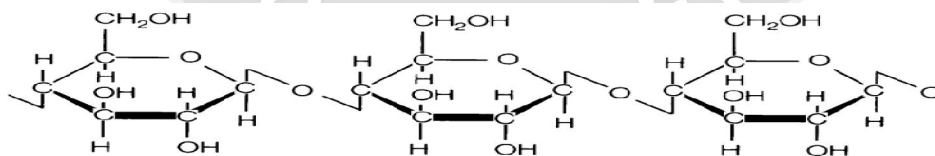
วัสดุที่มีลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ (Lignocellulosic materials)

เซลลูโลสไลกโบอิแมส (cellulosic biomass) เป็นสารที่มีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลสและมืงคืประกอบอืน ๆ คือ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) ส่วนประกอบรองจะเป็นพวกโปรตีน เ้า สารประกอบอืนทรียต่าง ๆ และแป้ง

หญ้าแป้งมืงคืประกอบทึเป็นเซลลูโลสอยู่ประมาณ 36-40 % และเฮมิเซลลูโลสประมาณ 32-38 % โครงสร้างของเซลลูโลสเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตทึประกอบด้วยหน่วยยอยคือ กลูโคสหลาย ๆ โมเลกุลตอ่กันเป็นโพลิเมอร์ด้วยพันธะ B-1,4-glycosidic โดยโมเลกุลสายยาวของเซลลูโลสประกอบด้วยกลูโคส 1,400 ถึง 10,000 ซึ่งเมื่อน้าเซลลูโลสไปแยกสลายจะให้น้าเซลโลไบออส (cellobiose) ซึ่งเป็นไดแซ็กคาไรด์ทึเกิดจากกลูโคสสองหน่วยเข้าม้ายับกันด้วยพันธะเบต้า-1,4- ไกลโคซิดิก (β -1,4-glycosidic bond) เป็นเส้นใยยาว ๆ ไม่มีกิ่งก้าน เซลลูโลสมีน้าหนักโมเลกุลต้งแต่ 50,000 ถึง 500,000 ซึ่งเท้ากับ 300 ถึง 3000 หน่วย ทึมีทั้งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสอยู่สูง ซึ่งยอยสลายแล้วดั้ได้น้าตาลกลูโคสและไซโลสทึใช้เป็นสับสเตรทสำหรับการผลิตเอทานอล

เซลลูโลส (cellulose)

โพลิแซคคาไรด์เซลลูโลส เป็นโครงสร้างของพืช เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบส่วนใหญของผนังเซลล์ ฝ้าย เยื่อกระดาษ และสารอืน ๆ อืกเป็นจ้านวนมาก เมื่อน้าเซลลูโลสไปแยกสลายยอยด้วยน้าจะให้น้า cellobiose ซึ่งเป็นไดแซ็กคาไรด์ เกิดจากกลูโคสสองหน่วยเข้าม้ายับกันเป็นพันธะ 1,4 ดังภาพทึ 1 เมือเซลลูโลสถูกแยกสลายด้วยน้าเต้มทึจะให้น้าผลผลิตกลูโคส โครงสร้างโมเลกุลของกลูโคสคล้ายคลึงกับโครงสร้างของแป้ง น้าหนักโมเลกุลของเซลลูโลสอยู่ระหว่าง 1,800-3,000 หน่วยในหนึ่งโมเลกุลของเซลลูโลส เส้นใยเซลลูโลส (cellulose fiber) เกิดจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของไซข้างเคียงทึรวมกันอยู่เป็นมัด (สมพงศ์, 2541)



ภาพทึ 1 แสดงโครงสร้างของเซลลูโลส

ที่มา: <http://www.greenspirit.org.uk/Resources/LifeChemistry.htm> 9 สิงหาคม 2552

เฮมิเซลลูโลส (Hemicelluloses)

เฮมิเซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์ของน้าตาลเพนโตสซึ่งส่วนมากเป็นดี-ไซแลนทึประกอบด้วยน้าตาลไซโลสหลาย ๆ โมเลกุลตอ่กันด้วยพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิกสายโพลิเมอร์ของเฮมิเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเฮทเทอโรจีนัสประกอบด้วยโพลิแซ็กคาไรด์หลาย ๆ ชนิดปนกัน

ลิกนิน (Lignin)

ลิกนินเป็นโพลิเมอร์ของสารประกอบอะโรมาติก หรือที่เรียกว่าฟีนอลิกโพลิเมอร์โดยหน่วยฟีนอลโพรเพนเรียงต่อกันแบบสลับที่หน่วยฟีนอลอาจ เป็นควิเอซิลหรือไซริงกิลที่ตำแหน่งแอลฟา และเบต้าของโมเลกุลลิกนินอาจเกิดการเชื่อมกันระหว่างโมเลกุลหรือคาร์บอนในหน่วยฟีนอลอาจเกิดพันธะในอีกหน่วยหนึ่งภายในสายโพลิเมอร์ที่ประกอบกันเป็นโมเลกุลของลิกนิน จึงทำให้ลิกนินมีโครงสร้างที่แข็งแรง ไม่ละลายน้ำแต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น เอทานอล หรือ เมทานอล และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

การพรีทรีทและการไฮโดรไลซิส(pretreatment and hydrolysis) ชีวมวลที่มีเซลลูโลส

การพรีทรีทวัตถุดิบ (pretreatment) เนื่องจากเซลลูโลสที่นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นอยู่ในรูปที่เป็นสารผลึกของสารประกอบเชิงซ้อน (complex) กับลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ซึ่งส่วนที่นำมาใช้จริง คือ ส่วนของเซลลูโลสเท่านั้น ขั้นตอนแรกจึงต้องแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากโครงสร้างของวัตถุดิบก่อน เพราะส่วนประกอบทั้งสองทำให้พื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ลดลง ซึ่งการมีลิกนิน ปริมาณมากจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไม่ดีเท่าที่ควร และยังเป็นอุปสรรคต่อการหมัก (fermentation) ด้วย ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนการผลิตเอทานอล คือ เพื่อแยกลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออก และเป็นการปรับโครงสร้างของเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพเหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์ วิธีการพรีทรีทแบ่งได้เป็น 4 วิธีคือ

1. การพรีทรีทด้วยวิธีทางกายภาพ (Physical pretreatment)

เป็นการลดขนาดของวัตถุดิบ และทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออกเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาให้มากขึ้น เช่น การบด การใช้ความร้อน ซึ่ง Sun and Cheng (2005) ทำการพรีทรีทต่อข้าวโดยใช้กรดซัลฟริกเข้มข้น 0.6, 0.9, 1.2 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยน้ำหนัก ตามลำดับ และใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30, 60 และ 90 นาที ตามลำดับ ได้น้ำตาลรีดิวซ์ เช่น อาราบิโนส กาแลกโทส กลูโคสและไซโลส และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรด ปริมาณของอาราบิโนส กาแลกโทส และไซโลสเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคส แล้วทำการไฮโดรไลซิสด้วย เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma reesei*

2. การพรีทรีทด้วยวิธีทางเคมี (Chemical pretreatment)

จะใช้สารละลายกรดเพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยเฮมิเซลลูโลสเพราะเฮมิเซลลูโลสสามารถย่อยสลายในสารละลายกรดได้ดีกว่าเซลลูโลส หรือใช้สารละลายด่างเพื่อเพิ่มปริมาณการละลายของเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน มีการทำพรีทรีทต้นฝ้ายโดยใช้กรดซัลฟริก

โซเดียมไฮดรอกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร และโอโซน โดยใช้ก้านฝ้าย 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 90 และ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30, 60 และ 90 นาที ตามลำดับ ส่วนการพรีทรีทด้วยโอโซนทำโดยใช้น้ำและที่อุณหภูมิคงที่ที่ 4 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อทำพรีทรีทเมนต์ด้วยกรดซัลฟูริก โซเดียมไฮดรอกไซด์และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร นาน 60 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ได้น้ำตาลที่สามารถนำมาใช้ได้และมีการละลายของลิกนิน และหลังจากการไฮโดรไลซิส พบว่า การพรีทรีทด้วยกรดซัลฟูริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้ปริมาณเซลลูโลส 23.85, 60.80 และ 49.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการพรีทรีทเมนต์ด้วยโอโซนไม่พบเซลลูโลส (Silverstein *et al.*, 2007)

3. การพรีทรีทด้วยวิธีทางเคมีฟิสิกส์ (Physico-chemical pretreatment)

เป็นวิธีที่ใช้วิธีทางกายภาพรวมกับการใช้สารเคมี ตัวอย่างการศึกษา ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และความร้อน ในสภาวะความดันสูงของการปรับสภาพฟางข้าวในกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ พบว่า ประสิทธิภาพการย่อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และความร้อนที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อใช้ความร้อนภายใต้สภาวะความดันสูงเพียงอย่างเดียว พบว่า การย่อยสลายลดลง เมื่อความร้อนเพิ่มขึ้น เนื่องจากการแตกตัวของน้ำตาล ที่เกิดขึ้น เปลี่ยนเป็นสารประเภทฟิวรัล (furfural) สารฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) หรือกรดฟอร์มิก (formic acid) ซึ่งเป็นตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังมีรายงานการแยกองค์ประกอบทางเคมีของต้นปาล์มน้ำมันด้วยวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำภายใต้สภาวะการทดลองที่แตกต่างกันของอุณหภูมิไอน้ำและระยะเวลาในการระเบิด คือ ตั้งแต่ 203 ถึง 214 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2-5 นาที ด้วยการแช่และไม่แช่ในสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.08 M ก่อนระเบิดด้วยไอน้ำ และทำการวัดค่าการละลายของน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ (กลูโคสและไซโลส) และน้ำตาลโอลิโกเมอร์ในสารละลายเอมิเซลลูโลส พบว่า เปอร์เซ็นต์ของไซโลสที่ได้อยู่ในช่วง 40.61 - 47.54 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการระเบิดขึ้นไม้สับต้นปาล์มน้ำมันในช่วงอุณหภูมิไอน้ำ 203 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และอุณหภูมิไอน้ำ 214 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และอุณหภูมิไอน้ำ 203 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยไม่ได้แช่ขึ้นไม้สับในสารละลายกรดซัลฟูริกก่อนการระเบิด เปรียบเทียบกับ 50.46 ของเปอร์เซ็นต์ไซโลสที่ได้จากการแช่ขึ้นไม้สับในกรดสารละลายซัลฟูริกก่อนการระเบิด (Punsuvon *et al.*, 2005)

4. การพรีทรีทด้วยวิธีทางชีวภาพ

เป็นการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้อยู่ในรูปโซ่ตรงและช่วยลดความเป็นผลึก

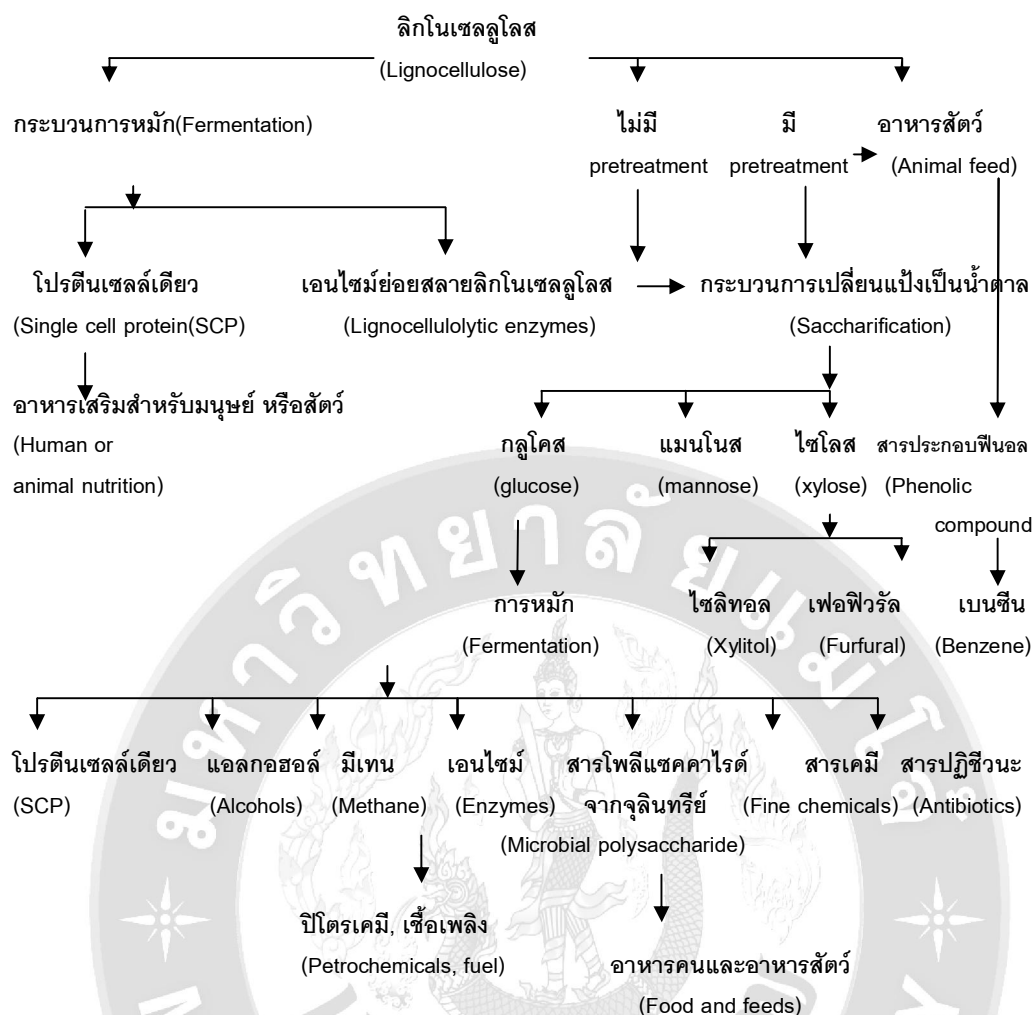
การไฮโดรไลซิสเซลลูโลส ทำได้ 2 วิธี คือ

เซลลูโลสเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นผลึก หรือเป็น linear homopolymer ของกลูโคสที่จับกันด้วย β -1,4-glucosidic linkage ซึ่งยากต่อการย่อยสลาย นอกจากนี้โดยธรรมชาติจะมี lignin จับเป็นตัวขัดขวางปฏิกิริยาการย่อยสลาย การย่อยสลายเซลลูโลสทำได้ 2 วิธี คือ

1. วิธีการทางเคมี หรือการย่อยสลายด้วยกรดเข้มข้น หรือกรดเจือจาง(acid hydrolysis) เช่น กรดซัลฟูริกและกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งต้องทำภายใต้อุณหภูมิสูง วิธีนี้จะมีข้อจำกัดในการแยกน้ำตาลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ออกจากกรด และเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ

2. วิธีการทางชีวภาพ หรือการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) จะเกิดภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรงคือที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ความดันบรรยากาศ เพราะเอนไซม์มีความจำเพาะต่อเซลลูโลส ไม่เกิดผลผลิตที่ไม่ต้องการ การสูญเสียกลูโคสระหว่างการเกิดปฏิกิริยา พืช สัตว์ และจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ พืช ได้แก่ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวมอลท์ รากและในต้นยาสูบ สัตว์ ได้แก่ ไล่เดือนบางชนิดและปลวก จุลินทรีย์ ได้แก่ ยีสต์ *Kluyveromyces fragilis* เชื้อรา เช่น *Trichoderma viride* แอคติโนมัยซีต เช่น *Tetrahymena thermophila* แบคทีเรีย เช่น *Clostridium cellobiopsrus* แต่จุลินทรีย์มีข้อได้เปรียบมากกว่าพืช และสัตว์คือ สามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เพาะเลี้ยงง่าย ใช้พื้นที่น้อย และผลิตเอนไซม์ได้มาก น้ำตาลที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสซึ่งจัดเป็นพอลิเมอร์ในเซลลูโลส (lignocellulose) สามารถนำไปใช้ประโยชน์คือเป็นสารตั้งต้น (substrate) ในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มขึ้นได้มากมาย โดยอาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ ซึ่งกระบวนการในการเปลี่ยนลิแกโนเซลลูโลสไปเป็นสารต่าง ๆ ที่มีมูลค่ามากขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 2 นอกจากนี้ ส่วนเฮมิเซลลูโลสยังสามารถย่อยสลายจนได้น้ำตาลไซโลส ซึ่งมีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอลได้

ชมพูนุช (2547) รายงานว่า วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประกอบด้วยเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส โดยโมเลกุลเหล่านี้สามารถถูกย่อยสลายเป็นน้ำตาล (ไซโลส กลูโคส และอะราบินอส) และน้ำตาลที่ได้สามารถเปลี่ยนเป็นสารไซลิทอล โดยสามารถนำไปใช้ในงานด้านอาหารและการไฮโดรไลซ์โมเลกุลของชานอ้อย เปลือกทุเรียน และฟางข้าว เพื่อให้เป็นน้ำตาลนั้นสามารถใช้ในการทำจกและเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ คือ กรดซัลฟูริกเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30



ภาพที่ 2 กระบวนการเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสไปเป็นสารต่าง ๆ ที่มีค่าทางเศรษฐกิจ
(Howard *et al.*, 2003)

นาที่ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากขาน้อย เปลือกทุเรียน และฟางข้าว คือ 53.73, 47.83 และ 49.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 100 kGy ร่วมกับการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นทำให้ได้น้ำตาลจากขาน้อย เปลือกทุเรียนเพิ่มขึ้น 3 และ 1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนฟางข้าวเพิ่มขึ้นประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ที่ 75 kGy นอกจากนี้ Linde *et al.* (2007) ทำพรีทรีทฟางข้าวสาธิตโดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 190 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ได้น้ำตาลกลูโคสและไซโลสสูงที่สุด 102 และ 96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อใช้กรดซัลฟูริกได้ปริมาณกลูโคสร้อยละ 92 และไซโลสร้อยละ 86 จากกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 0.5 ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที (Sassner *et al.*, 2008)

เอทานอล

เอทานอล (ethanol) หรือเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) คือสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นสารละลายไม่มีสีระเหยง่ายสูตรทางเคมีอย่างง่าย คือ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ เอทานอลมีจุดเดือด 78.32 องศาเซลเซียส ความถ่วงจำเพาะ 1.794 ที่ 60 องศาเซลเซียส จุดเยือกแข็ง -117.3 องศาเซลเซียส สามารถให้พลังงานความร้อน (Calorific value) ได้ 12,800 Btu/lb ละลายในน้ำและสารอินทรีย์อื่น ๆ ได้ดี เช่น เมทิลแอลกอฮอล์ อีเธอร์ คลอโรฟอร์ม ฯลฯ

กระบวนการผลิตเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis) และกระบวนการหมัก (fermentation)

(1) เอทานอลที่ผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis) เป็นการผลิตจากอนุพันธ์สารปิโตรเลียม เช่น เอทิลีนด้วยปฏิกิริยาการระเหยน้ำ (dehydration) เป็นต้น

(2) กระบวนการหมัก (fermentation) เป็นการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลด้วยเชื้อยีสต์ จะประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกยีสต์จะใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) เป็นอาหารและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยกระบวนการไกลโคไลซิส ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ดังสมการ



โดยตามทฤษฎีน้ำตาลกลูโคส 100 เปอร์เซ็นต์ จะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอล 48.89 และ 51.11 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ แต่ในทางปฏิบัติจะเกิดการสูญเสียได้เป็นสารประกอบอื่น ๆ หรือใช้ ในการสร้างเซลล์ของยีสต์ ทำให้ได้เอทานอลประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้เอทานอลแล้ว ขั้นตอนที่ 2 จึงเป็นการทำให้เอทานอลมีความเข้มข้นและบริสุทธิ์สูงขึ้นโดยการกลั่น

วัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอล

ในปัจจุบันการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมจะใช้กระบวนการหมัก ซึ่งวัตถุดิบที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลจะเป็นสารประกอบจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอยู่ในโครงสร้างโมเลกุล สามารถแบ่งออกได้ 3 ประเภท คือ

วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ น้ำอ้อย กากน้ำตาล และบีทน้ำตาล ยีสต์สามารถใช้วัตถุดิบประเภทนี้ได้โดยตรง และไม่ต้องผ่านกระบวนการใด ๆ

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ส่วนมากวัตถุดิบกลุ่มนี้จะเป็นผลิตผลพลอยได้จากการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร ได้แก่ ฟางข้าว กากอ้อย ชังข้าวโพด และของเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ เป็นต้น ซึ่งวัตถุดิบประเภทนี้ประกอบด้วยส่วนประกอบสำคัญ

4 ชนิด คือ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ลิกนิน (lignin) และ สารประกอบอื่น ๆ

เอทานอลผลิตได้จากวัตถุดิบหลายชนิด เช่น มันสำปะหลัง น้ำตาลทราย (อ้อย) โมลาส (กากน้ำตาล) ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าว ส่วนเมทานอล ผลิตจากวัตถุดิบที่เหลือใช้ทางการเกษตร เช่น เยื่อกระดาษ กระดาษใช้แล้ว เศษไม้ กากปาล์ม ไม้ไผ่ ยูคาลิปตัส ปอแก้ว ฟางข้าว ชัง ข้าวโพด ชานอ้อย หล้าแฉก เป็นต้น ทั้งนี้โดยผ่านกรรมวิธีทางเคมี ความร้อนและทางกายภาพ ที่ทำให้ได้เอทานอล หรือ เมทานอล ที่บริสุทธิ์ และมีน้ำปนน้อยที่สุด (99.5%) (อำพล และ ชำนาญ, 2550)

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

ลักษณะที่ดีของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักในการผลิตเอทานอล ได้แก่ ให้ผลผลิตสูง มีอัตราการผลิตเอทานอลสูง ทนอุณหภูมิสูง มีความทนต่อเอทานอล ไม่เปลี่ยนแปลงง่ายในสถานะต่าง ๆ ของการหมัก ทนพีเอชต่ำหรือทนกรด มีพันธุกรรมที่เสถียร มีความสามารถในการตกตะกอน และทนแรงดันออสโมซิสได้

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์มีมากมายหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย รา แต่ที่มีการใช้กันอย่างกว้างขวางและแพร่หลายในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ ยีสต์

ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum* (*carlbergensis*), *Schizosaccharomyces pombe* และ *Kluyveromyces fragilis* ยีสต์เหล่านี้มีความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่าง ๆ แต่เนื่องจาก *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่ายีสต์ชนิดอื่น ๆ ดังนั้น การผลิตเอทานอลส่วนใหญ่จึงใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* เป็นสำคัญ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการผลิตเอธิลแอลกอฮอล์ โดยใช้กลุ่มแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* และ *Clostridium Thermocellum* เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน สามารถหมักเซลลูโลสและเจรีนได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 °C แต่แบคทีเรียดังกล่าวมีความทนต่อเอธิลแอลกอฮอล์ ได้ต่ำกว่ายีสต์ (สิทธิศักดิ์, 2547)

สรุทธิ และ คณะ (2545) รายงานสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสชานอ้อยที่ได้ปริมาณน้ำตาลสูงสุดคือ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส พีเอช 4.0 และที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส สำหรับฟางข้าว แล้วหมักเอทานอลจากชานอ้อยและฟางข้าวโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน ได้เอทานอลเท่ากับ 0.95 และ 0.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ วรณี และวิชัย (2546) ผลิตเอทานอลจากฟางข้าวได้ปริมาณน้ำตาลสูงสุดเมื่อใช้กรดซัลฟริก 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เวลา 8 ชั่วโมงในการไฮโดรไลซิส และหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ Sweden ได้เอทานอลมากที่สุดหลังจากหมักนาน 5 วัน

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักเพื่อผลิตแอลกอฮอล์

ในการหมักเพื่อผลิตแอลกอฮอล์ให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดนั้นขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ เช่น สารอาหาร เกลือแร่ วิตามิน อุณหภูมิ pH ความเข้มข้นของน้ำตาลและอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ เป็นต้น ธาตุอาหาร ธาตุอาหารที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ มีดังนี้

คาร์บอน ถูกใช้เป็นแหล่งให้พลังงาน ส่วนใหญ่เป็นสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต จะมีบางส่วนที่จะถูกนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของเซลล์ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาวะการเจริญและความสามารถนำไปใช้ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ เช่น น้ำตาล 6 คาร์บอน (กลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส) ยีสต์สามารถใช้ได้ *Candida utilis* สามารถใช้ไซโลส ซึ่งเป็นน้ำตาล 5 คาร์บอน ยีสต์ส่วนใหญ่สามารถใช้โมเลกุลได้ เช่น มอลโตส ซูโครส แต่ยีสต์บางชนิดเช่น *Saccharomyces cerevisiae* สามารถใช้ได้เฉพาะในสภาวะที่มีอากาศ แต่จะไม่สามารถนำน้ำตาลนี้มาหมักได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ หรือ *C. utilis* สามารถใช้มอลโตสได้ในสภาวะที่มีอากาศเท่านั้น นอกจากนี้ ยีสต์บางชนิด เช่น *Saccharomyces diastatic*, *S. chevalier*, *Endomycopsis fibuligera* สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน

ไนโตรเจน ยีสต์มีไนโตรเจนมีองค์ประกอบประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักแห้ง) ดังนั้น ไนโตรเจน จึงเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับยีสต์ โดยทั่วไปยีสต์สามารถใช้ free ammonium ion เป็นแหล่งไนโตรเจนได้แต่ยีสต์บางชนิดสามารถใช้ยูเรียได้ดีกว่าหรือใช้กรดอะมิโนในการเจริญได้ดีกว่าเพราะว่ากรดอะมิโนจะเป็นส่วนช่วยควบคุมการทำงานของกลไกภายใน ยีสต์บางส่วนแหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ ได้แก่ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

แร่ธาตุอื่น (Trace element) ยีสต์ต้องการแร่ธาตุในการเจริญ โดยเริ่มต้นจะต้องมี K และ Mg เป็นธาตุหลัก (macroelements) ซึ่งมีความต้องการประมาณ 0.1-1 มิลลิโมลาร์ ธาตุรอง (microelements) ยีสต์ต้องการประมาณ 0.1-100 มิลลิโมลาร์ เช่น Mn Ca Fe Zn Cu Ni Co และ Mo แต่ยังมีกลุ่มโลหะที่เป็นพิษต่อยีสต์ (inhibitors) เช่น Ag As Ba Cs Cd Hg Li และ Pb ถ้าหากความเข้มข้นของโลหะไอออนมีมากกว่า 10 - 100 มิลลิโมลาร์ ก็จะทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์ ในบางครั้งถ้ามี macroelement และ microelements ในปริมาณมากเกินไปอาจมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตของยีสต์ได้เช่นกัน

วิตามิน เป็นตัวควบคุมเมตาบอลิซึมของยีสต์ โดยควบคุมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง วิตามินทำหน้าที่เป็น coenzymes ทำให้เอนไซม์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ วิตามินที่ยีสต์ต้องการ ได้แก่ biotin และ pentatonic acid นอกจากนี้ยังมี thiamine niacin folic acid เป็นต้น ความต้องการแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์

สารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญ เป็นสารอินทรีย์เชิงซ้อนที่ยีสต์มีความต้องการในระดับความเข้มข้นต่ำ มีความจำเพาะต่อปฏิกิริยาหรือมีบทบาทต่อโครงสร้างในเซลล์ยีสต์แต่ไม่ได้

เป็นแหล่งพลังงาน เช่น กรดนิวคลีอิก กรดอะมิโน กรดไขมัน และสเตียรอยด์

พีเอช เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งในการผลิตแอลกอฮอล์โดยเฉพาะในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจาก pH มีผลต่ออัตราการหมัก การสร้างผลพลอยได้ ตลอดจนควบคุมการปนเปื้อน ซึ่งมีผลต่อการเจริญของยีสต์ ซึ่งยีสต์เจริญได้ในช่วง pH กว้าง โดยพบว่ามียีสต์ที่สามารถเจริญได้ใน pH ต่ำสุดประมาณ 1.5 ส่วน pH สูงสุดที่ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดี คือ 8.0 – 8.5 สำหรับ pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของยีสต์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป ส่วนใหญ่จะอยู่ระหว่าง pH 4.0 – 4.5 และยีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้ไม่ดีในสภาวะที่เป็นด่าง

อุณหภูมิ การผลิตแอลกอฮอล์ที่มีอัตราการหมักสูงจะมีอัตราการเกิดความร้อนสูงตามมา ซึ่งจะเป็นอันตรายต่อยีสต์ที่เพราะเลี้ยงทำให้กระบวนการหมักหยุดชะงักเนื่องจากยีสต์ตาย นอกจากนั้น อุณหภูมิสูงยังทำให้แอลกอฮอล์ระเหยจากระบบมากขึ้น ดังนั้นกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรมที่มีขนาดใหญ่จำเป็นต้องมีระบบหล่อเย็นเพื่อลดอุณหภูมิในระหว่างการหมักสำหรับการเจริญของยีสต์ ยีสต์บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิถึง 35-47 องศาเซลเซียสและบางสายพันธุ์เจริญได้ดีในอุณหภูมิ 0 – 5 องศาเซลเซียส แต่ก็มียีสต์บางชนิดเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส เช่น *Candida frigida*, *C. geotha* และ *C. nivalis* ซึ่งสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ -5 ถึง -7 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ 15 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญได้ ในที่มีอุณหภูมิมากกว่า 20 องศาเซลเซียส

ความชื้น ยีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในสภาพที่มีความชื้นเพียงพอ แต่มียีสต์บางชนิดที่สามารถเติบโตในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือหรือน้ำตาลสูงได้ ได้แก่ ออสโมฟิลิกยีสต์ และยีสต์ทนเกลือ ยีสต์ส่วนใหญ่ต้องการความชื้นในการเติบโตมากกว่า แต่น้อยกว่าแบคทีเรีย ส่วนค่าน้ำอิสระเป็นน้ำที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.88 – 0.94 ยีสต์แต่ละชนิดต้องการค่านี้อย่างต่างกัน เช่น กลุ่มออสโมฟิลิกยีสต์ ต้องการค่าน้ำอิสระอยู่ระหว่าง 0.62 – 0.65 เป็นต้น นอกจากค่าน้ำอิสระจะขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์แล้ว ยังขึ้นกับลักษณะของอาหาร พีเอช อุณหภูมิ ออกซิเจน การมีหรือไม่มีสารยับยั้งการเจริญ

ออกซิเจน ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพวกที่ใช้และไม่ใช้ออกซิเจนได้ โดยทั่วไปยีสต์จะเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจนยีสต์จะเจริญเติบโตได้เข้าในสภาพที่มีอากาศยีสต์จะใช้น้ำตาลให้ได้พลังงานอย่างสมบูรณ์มีผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นพลังงานและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนเป็นตัวสุดท้าย ในสภาวะที่มีอากาศ ยีสต์จะใช้น้ำตาลในการหมัก ส่วนใหญ่ในการหมักน้ำตาลด้วยยีสต์จะได้เอทานอล ในการหมักเอทานอล หากมีออกซิเจนในการหมัก น้ำตาลจะถูกสลายได้อย่างสมบูรณ์เป็นน้ำและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งแทนที่จะได้เอทานอล หรืออีกความหมายหนึ่งก็คือ การหมักถูกการยับยั้งด้วยกระบวนการหายใจ ยกเว้นในยีสต์บางชนิด ได้แก่ *Brettanomyces* ซึ่งจะถูกระตุ้นให้เกิดการหมักเมื่อมีออกซิเจน ยีสต์บางชนิดจะเจริญได้เฉพาะสภาวะที่มีอากาศแต่ไม่มีความสามารถในการหมัก ได้แก่ *Rhodotomili*, *Sporolomyces*, *Endomycosis* เป็นต้น

คาร์บอนไดออกไซด์ โดยทฤษฎีการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ จะพบปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 33 % (โมลคาร์บอนไดออกไซด์ต่อโมลกลูโคส) ซึ่งมีปริมาณรองลงมาจากเอทานอล และพบว่าในการหมักระบบที่ใหญ่จะมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มาก แรงดันในระบบจะเพิ่มตามปริมาณก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์ในการเพาะเลี้ยงจำเป็นต้องให้ระบบมีการระบายก๊าซเพื่อป้องกันการระเบิด เนื่องจากแรงดันก๊าซเพิ่มขึ้น และยังต้องจัดระบบที่นำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไป โดยคุณสมบัติทางเคมีของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นก๊าซที่สามารถละลายได้ในน้ำปริมาณหนึ่งที่สภาวะหนึ่ง เมื่อละลายในน้ำจะอยู่ในรูปกรดคาร์บอนิก ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ pH ในระบบต่ำลง แต่กรดคาร์บอนิกไม่ใช่กรดแก่จึงมี pH คงที่สภาวะหนึ่ง หรือ pH จะไม่ลดลงไปอีกตามปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มขึ้น การหมักทั่วไปจะมี pH ค่อย ๆ ลดลงมาแล้วคงที่ ค่าประมาณ 4.5 – 5.0 ซึ่งเป็นช่วงที่ยีสต์เจริญได้โดยปกติ

ความเข้มข้นของเอทานอล เอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลักของการหมักและเมื่อเอทานอลมีการสะสมในระหว่างการหมักมากขึ้นยีสต์จะเกิดความเครียดมากขึ้น เนื่องจากเอทานอลเป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ การเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลจะเริ่มจากการยับยั้งยีสต์จนกระทั่งฆ่ายีสต์ กลไกการเป็นพิษของเอทานอลต่อยีสต์มีผู้คนศึกษาอย่างกว้างขวางของเอทานอลเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (non competitive inhibitor) ของอัตราการเจริญของยีสต์ อิทธิพลของเอทานอลต่อหน้าที่สรีรวิทยาของยีสต์

ความเข้มข้นของสารตั้งต้น ยีสต์จะตอบสนองต่อสารที่ละลายในอาหาร ซึ่งมีผลต่อการปรับตัวของยีสต์ได้หลายทางกรณีที่เกี่ยวข้องกับความเครียด เนื่องจากแรงดันออสโมซิสหากในลักษณะปกติที่ความเข้มข้นภายนอกมากกว่าภายในเซลล์น้ำภายในเซลล์จะมีทิศทางการเคลื่อนที่ออกสู่ภายนอกเซลล์ ทำให้เซลล์เสียสภาพหมดตัวจะมีขนาดเล็กลง เพื่อปกป้องกิจกรรมภายในเซลล์ให้คงอยู่ ยีสต์จึงมีระบบที่ลดปัญหานี้ เช่น *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae* หรือ *Zygosaccharomyces rouxii* เมื่อเจริญในอาหารที่มีเกลือและน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า มีการสังเคราะห์กลีเซอรอล และสะสมมากขึ้นจนมีผลต่อแรงดันออสโมซิสที่เกิดจากเกลือเหนียวมากขึ้น เมื่อเลี้ยงไปอีกหลายชั่วโมงพบว่ามียังมีองค์ประกอบของ K^+ , Na^+ และ trehalose เพิ่มขึ้น เป็นต้น

การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบพวกเซลลูโลสจะคุ้มค่าในเชิงพาณิชย์หรือไม่นั้น อาจมีข้อจำกัดอยู่ที่ขั้นตอนของการฟักรีด เพื่อแยกส่วนของเฮมิเซลลูโลสและลิกนินรวม ทั้งขั้นตอนของการไฮโดรไลซิสเพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวซึ่งต้องเหมาะสม

มีรายงานการผลิตเอทานอลจากวัสดุที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ Sun and Cheng (2005) ผลิตเอทานอลจากฟางข้าวไรน์ทำการฟักรีดด้วยกรดซัลฟริกที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.6, 0.9, 1.2 และ 1.5%w/w ที่ 121 องศาเซลเซียส โดยใช้ที่ระยะเวลา(30, 60 และ 90 นาที) พบว่า ได้น้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้น เช่น arabinose, galactose, glucose และ xylose

และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรด พบว่า ปริมาณของ arabinose และ galactose เพิ่มขึ้น และปริมาณน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกแต่ไม่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคส และพบว่า ระหว่างที่ทำการ pretreatment มีน้ำตาล arabinose, galactose และ xylan เกิดขึ้น แล้วทำการไฮโดรไลซ์ด้วย เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* และ Kanimi *et al.* (2006) ผลิตเอทานอลจากฟางข้าวโดยใช้วิธี Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) โดยทำการ pretreatment ฟางข้าวด้วยกรดเจือจาง และย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าและการหมักเอทานอลด้วยเชื้อ *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae* และ *Saccharomyces cerevisiae* บ่มที่ 38 องศาเซลเซียส ใช้ น้ำหนักวัตถุดิบ 50 กรัม น้ำหนักแห้งต่อลิตร บ่มไว้ระยะเวลา 7 วัน พบว่า 2-3 วันแรกได้ ผลผลิตเอทานอลสูงสุด 40-74 % ของค่าทางทฤษฎี และ เชื้อ *R. oryzae*, *M. indicus* ให้ ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 74% ของค่าทางทฤษฎี และ 68 % ของค่าทางทฤษฎี ตามลำดับ

Chandel *et al.* (2006) ผลิตเอทานอลจากวัชพืชน้ำ (Aquatic weed) ซึ่งเซลลูโลส เป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 43.50 % ของน้ำหนักแห้ง และ pentosan 26.7 % ของน้ำหนักแห้ง ทำการแยกกลีนินออกได้โดยใช้ sodium sulfite ได้น้ำตาล 550 มิลลิกรัมต่อกรัม แล้วทำการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์จากเชื้อ *Trichoderma reesei* ได้น้ำตาล 77 % แล้วทำการหมักด้วยเชื้อ *Candida shehatae* ในถังหมักขนาด 15 ลิตร โดยใช้วิธีการหมักแบบ batch และ fed batch พบว่า ได้เอทานอล 9.74 g/l (productivity 0.202 g/l/h) และ 28.5 g/l (productivity 0.237 g/l/h) ตามลำดับ

ศิริพงษ์ และคณะ (2550) ผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF ที่ใช้ปอสา (paper mulberry) และ microcrystalline cellulose (MC) ซึ่งใช้เป็นเซลลูโลสมาตรฐานเป็น วัสดุในการหมักร่วมกับยีสต์ *Candida krusei* NBRC1664 และเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *T. reesei* QM9414 เป็นเวลา 7 วัน พบว่า MC จะให้เอทานอลสูงที่สุดคือ 1.628 เปอร์เซ็นต์ หรือ 0.5427 กรัมต่อกรัม และ 1.3766 เปอร์เซ็นต์ หรือ 0.4588 กรัมต่อกรัมจากปอสา

ยีสต์ เป็นจุลินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากตั้งแต่สมัยโบราณ เช่น นำมาเป็น ส่วนผสมในการทำขนมปัง นอกจากนี้ ยีสต์ยังเป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในกลุ่มที่มีประโยชน์ต่อ ร่างกายของมนุษย์และสัตว์ซึ่งในปัจจุบันนี้ได้มีการนำยีสต์มาเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ เพื่อ ประโยชน์ใน 2 ทางด้วยกันคือ เป็นแหล่งโปรตีนที่เราเรียกว่า โปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) และอีกในแง่หนึ่งคือเป็นตัวช่วยเสริมสุขภาพของสัตว์หรือที่เราเรียกว่าเป็น โปรไบโอติก (probiotic) ให้กับสัตว์เลี้ยง ซึ่งจะทำให้สัตว์แข็งแรง และมีภูมิคุ้มกันโรคสูงขึ้น รูปแบบ การนำยีสต์มาใช้ก็ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการใช้ คือ ถ้าต้องการให้ยีสต์เป็นแหล่งโปรตีนก็ไม่ ต้องคำนึงว่ายีสต์ยังมีชีวิตอยู่หรือไม่ แต่ถ้าให้ยีสต์ทำหน้าที่เป็นโปรไบโอติก จะต้องใช้ในสภาพ ที่ยังมีชีวิตอยู่นั่น แต่ไม่ว่ายีสต์จะทำหน้าที่ใดก็ตามในสองข้อดังกล่าว ก็ถือว่าเป็นประโยชน์ ต่อสัตว์เลี้ยงทั้งสิ้น ดังนั้น ในประเทศไทย เทคโนโลยีการผลิตยีสต์น่าจะได้รับการพัฒนาให้

สามารถทำได้ง่ายขึ้น รวมทั้งสามารถใช้วัตถุดิบราคาถูกจากของเหลือใช้ทางเกษตร ที่มีอยู่อย่างมากมายในประเทศไทย Anadon *et al.* (2006) เสนอว่า โปรไบโอติก (Probiotics) เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ เช่น แบคทีเรีย และยีสต์ เมื่อนำอาหารหรือยาที่ถูกหลักโภชนาการเข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่เพียงพอจะส่งผลดีต่อสุขภาพ โปรไบโอติก อาจส่งผลต่อการได้รับอาหารและส่งผลต่อสุขภาพหรือการสุขภาพิบาล จุลินทรีย์ที่ใช้ในอาหารสัตว์ในทวีปยุโรป โดยส่วนมากแล้วจะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก จำพวก *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* และยีสต์จำพวก *Saccharomyces cerevisiae* และ *Kluyveromyces* ถึงอย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ในสปีชีส์และจีโนมที่ปลอดภัยมากที่สุดนั้นยังหาข้อสรุปไม่ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Enterococci* และ *Bacilli* นั้นสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะได้ โดยลักษณะพิเศษของกลุ่ม *Bacillus cereus* นั้นจะเป็นเชื้อก่อโรคลำไส้อักเสบ และทำให้อาเจียน ในอดีตและปัจจุบันทางยุโรปได้มีการออกกฎหมายเกี่ยวกับการใช้โปรไบโอติกในอาหาร เพื่อความปลอดภัยของสัตว์ ผู้บริโภค ผู้ปฏิบัติงาน และสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ ดวงพร (2530) ยังรายงานว่ โปรตีนเซลล์เดี่ยวเป็นที่น่าสนใจ เพราะขาดแคลนวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตโปรตีนจากเนื้อสัตว์ และปัญหาการกำจัดของเหลือใช้เนื่องจาก เนื่องจากวัสดุเหลือใช้ส่วนใหญ่จะมีส่วนประกอบของสารอินทรีย์อยู่สูง เป็นที่ยอมรับของนักเทคโนโลยีชีวภาพว่าการแปรรูปสารอินทรีย์และอื่น ๆ สูง เหมาะสมสำหรับเป็นอาหารสัตว์หรืออาหารเสริมสำหรับสัตว์ ยีสต์ เป็นจุลินทรีย์ที่พบทั่วไปในธรรมชาติ มักไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ โดยในการหมักแอลกอฮอล์ หรือไวน์ ยีสต์มักจะถูกใช้ในรูปของส่า ยีสต์ส่วนใหญ่มีความสามารถในการสร้างแอลกอฮอล์แตกต่างกันออกไปตามสายพันธุ์ ยีสต์ที่นิยมใช้ในการหมักแอลกอฮอล์คือ ยีสต์ในสกุล *Saccharomyces* โดยทั่วไปยีสต์ จะมีการเจริญใน 2 ลักษณะคือ ในสภาพที่มีอากาศยีสต์จะใช้น้ำตาลไปในการเจริญเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่ในสภาพไม่มีอากาศยีสต์จะใช้น้ำตาลไปเพื่อสร้างแอลกอฮอล์ ดังนั้น ในการหมักแอลกอฮอล์การควบคุมปริมาณอากาศที่ยีสต์ได้รับจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อปริมาณของแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตไวน์เป็นยีสต์ที่มีลักษณะเฉพาะคือสามารถทนต่อแอลกอฮอล์และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ความเข้มข้นสูงกว่ายีสต์ปกติ ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ ให้ไวน์ที่มีกลิ่นรสดี ยีสต์ที่ใช้ทำไวน์มักขายใน 3 รูปแบบ คือ ยีสต์ผง ยีสต์น้ำ และยีสต์บนวุ้น การเลือกชนิดยีสต์ มักขึ้นอยู่กับชนิดของไวน์ที่ต้องการทำเป็นสำคัญ ยีสต์ มีองค์ประกอบภายในเซลล์ที่อุดมไปด้วยแหล่งของสารอาหารสำคัญ ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต วิตามินบีรวม เกลือแร่ ไขมัน เส้นใย ซึ่งโปรตีนจากยีสต์มีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายอย่างครบถ้วนโดยเฉพาะไลซีนมีอยู่ในปริมาณสูง ยีสต์สกัด เป็นผลิตภัณฑ์จากยีสต์ประกอบด้วยโปรตีนเป็นหลักและองค์ประกอบอื่นที่แยกได้จากเซลล์ยีสต์ด้วยกระบวนการการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) หรือได้จากการใช้สารเคมีและเอนไซม์ยีสต์สกัดที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายตัวเองเรียกว่า “ยีสต์ออโตไลเซท” (yeast autolysate) และถ้ากระบวนการผลิตมีการแยกเอาผนังเซลล์ส่วนที่ไม่ละลายออกด้วยวิธีการกรอง เรียกว่า “autolysed yeast extract” วิธี

การโดยทั่วไปที่ใช้ในการสกัดยีสต์ ได้แก่ วิธีทางเคมี อาศัยกระบวนการพลาสโมไลซิส ด้วยการใช้โซเดียมคลอไรด์ หรือตัวทำละลายอินทรีย์ (non-polar organic solvents) เช่น โทลูอิน คลอโรฟอร์ม เอทิลเอซิเตต ไอโซโพรพานอล วิธีทางชีวภาพคือ การเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (proteolytic enzymes) และวิธีทางกายภาพคือการใช้เครื่องโฮโมจีไนซ์

ยีสต์ เป็นจุลินทรีย์พวกยูคาริโอต เซลล์ยีสต์ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม หรือรี นอกจากนี้ อาจมีรูปร่างเป็นรูปไข่ รูปเลนซัน ทรงกระบอก สามเหลี่ยม หรือยาวเป็นสาย ขนาดของยีสต์ แตกต่างกันในแต่ละชนิด ลักษณะเด่นของยีสต์คือ เป็นพวกเซลล์เดี่ยวและมีหน่อ การแตกหน่อ บางครั้งไม่หลุดออกจากกัน แต่เกาะกันเป็นกลุ่ม บางครั้งมีการเปลี่ยนแปลงโดยเซลล์ตรงกลาง ยาวต่อกันเป็นสาย เรียก pseudomycelium เป็นจุลินทรีย์ที่รู้จักกันดีในแง่ที่เปลี่ยนน้ำตาลเป็น แอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ แต่มียีสต์บางชนิดที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ ยีสต์มีเซลล์เดี่ยว ไม่มีคลอโรฟิลล์ มีนิวเคลียส มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปทรงกลม รูปไข่ รูป ทรงกระบอก รูปสามเหลี่ยม รูปร่างยาวที่มีปลายด้านหนึ่งกลม ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งเป็น ปลายแหลม และรูปคล้ายผลมะนาว ยีสต์มีขนาดแตกต่างกันมาก โดยทั่วไปเซลล์มีขนาดใหญ่ กว่าแบคทีเรีย บางชนิดยาวเพียง 2-3 ไมครอน แต่มียีสต์บางชนิดอาจยาวถึง 20-50 ไมครอน และมีส่วนกว้างอยู่ในช่วง 1-10 ไมครอน (นวลจิตต์, 2543) ยีสต์ทำให้อาหารเสื่อมเสีย โดยการ เปลี่ยนน้ำตาลในอาหารให้เป็นแอลกอฮอล์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้เกิดฝ้าขาวบนผิว ของอาหารและยีสต์ชนิดที่ทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูง จึงเป็นสาเหตุให้อาหารที่มีรสหวาน จัด เช่น น้ำผึ้ง น้ำหวานและน้ำผลไม้เข้มข้นเสื่อมเสียได้ด้วย แม้แต่มนุษย์ก็ยังสามารถใช้ ประโยชน์จากยีสต์ในการทำอาหารหมักดอง เช่น การทำเบียร์ การทำไวน์ เหล้า น้ำส้มสายชู และขนมปัง

บทบาทของยีสต์ในอาหารสัตว์

ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ประกอบด้วยเอนไซม์จำนวนมาก บางส่วนถูกขับ ออกมาในลำไส้และช่วยเสริมเอนไซม์ที่มีอยู่แล้วในทางเดินอาหาร จึงช่วยให้เพิ่มอัตราการย่อย ได้ ทำให้การกินอาหารเพิ่มขึ้น ผลที่ได้คือการเพิ่มน้ำหนักหรือผลผลิต ช่วยสนับสนุนสมดุลย์ ของจุลชีพในลำไส้ หากมีการให้อย่างสม่ำเสมอ ด้วยเหตุนี้ ยีสต์หลายชนิดจึงถูกนำมาใช้ในสัตว์ กระเพาะรวมจนถึงปัจจุบัน สำหรับการศึกษาการใช้ยีสต์ในสัตว์กระเพาะเดี่ยว มีผู้ทำการวิจัยไว้ ไม่มาก (Jonewell, 1993) และการใช้ *S. cerevisiae* ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณโปรตีนในแป้ง มันสำปะหลัง ที่ใช้เป็นอาหารของหนูเพศเมียที่อยู่ในระหว่างตั้งท้องและการให้นม และจากการ ใช้ *S. cerevisiae*, *Lactobacillus delbrueckii* และ *L. coryneformis* หมักกับมันสำปะหลัง มีผลทำให้ปริมาณของโปรตีนเพิ่มขึ้นและในขณะที่มีไฮโดรเจนไซยาไนด์ลดลง (Oliveira et al., 2001) นอกจากนี้ Guedes et al., 2007 เสนอว่า ผลของยีสต์ *S. cerevisiae* ในกระเพาะหมัก และการแตกตัวของสารประกอบที่เป็นเส้นใยของข้าวโพดหมัก ซึ่งศึกษา 3 ลักษณะคือ การให้ ข้าวโพดหมัก อาหารสัตว์ชนิดละเอียดและมีเส้นใยน้อย และหญ้าแห้ง (วัตถุแห้ง 48 : 42 : 10)

วันละ 2 ครั้ง แกโค และเสริมด้วยยีสต์ 0 กรัม (SC0) 0.3 กรัม (SC0.3) และ 1.0 กรัม (SC1.0) ต่อวัน พบว่า ข้าวโพดหมัก 40 กรัม ใช้เวลาหมักในกระเพาะหมักนาน 36 ชั่วโมง จึงจะทำให้ Neutral Detergent Fibre (NDFdeg) เสื่อมสภาพลง หญ้าหมักจะถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ตาม NDFdeg ซึ่งจะทำให้อาหารกลุ่มที่มีเส้นใยต่ำ (Low Fiber Degradation; LFD) (NDFdeg : 0.20-0.30) และกลุ่มที่มีเส้นใยสูง (High Fiber Degradation; HFD) (NDFdeg : 0.35-0.45) ของเหลวในกระเพาะรูเมนจะสะสมไว้ 2 ส่วนไม่ต่อเนื่องกัน ที่ 0, 2, 4, และ 8 ชั่วโมง การรวมกันของ *Saccharomyces cerevisiae* ทำให้ พีเอช ในกระเพาะรูเมนเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของแลคเตทลดลง แต่ไม่มีผลกระทบต่ออัตราส่วนอะซีเตตต่อโพรพิโอเนทลดลง Azoulay *et al.* (1980) ใช้เชื้อ *Candida tropicalis* เพิ่มโปรตีนให้กับมันสำปะหลังด้วยขบวนการหมัก ได้ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถใช้เป็นอาหารคนและอาหารสัตว์ได้ และส่วนเหลือที่เป็นเปลือกมันสำปะหลังมีปริมาณของคาร์โบไฮเดรต 42.6 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 1.6 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 12.1 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 5.0 เปอร์เซ็นต์และเยื่อใย 22.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเกษตรโดยใช้หมักกับเชื้อจุลินทรีย์พวก *A. niger*, *A. flavus* และ *A. fumigatus* สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนให้กับเปลือกมันสำปะหลังได้ (Obadina *et al.*, 2006)

ในการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมัก มักใช้จุลินทรีย์ ได้แก่ *S. cerevisiae* ซึ่งในอุตสาหกรรมนิยมใช้ และเป็นยีสต์ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่ายีสต์อื่น ๆ และยังมีแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถผลิตเอทานอลได้ กากยีสต์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเอทานอลถูกนำมาใช้หลายรูปแบบ เช่น ผลิตเป็นอาหารสัตว์ อาหารมนุษย์ และผลิตเป็นยีสต์สกัดเพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส เป็นต้น (Reed และ Peplere, 1973) ในเซลล์ยีสต์ ประกอบด้วย กรดอะมิโน ไนโตรเจน วิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ หลายชนิด ที่เหมาะสมจะใช้เป็นธาตุอาหารสำหรับสัตว์ ดังนั้น อีกแนวทางหนึ่งที่น่าากากยีสต์มาใช้ให้เกิดประโยชน์คือนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ ซึ่งนอกจากจะเพิ่มมูลค่าให้กับของเหลือทิ้งแล้วยังลดสภาพแวดล้อมสภาพแวดล้อมที่เป็นพิษลง รวมทั้งเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรในด้านการลดต้นทุนการผลิตให้ต่ำลงอีกด้วย นอกจากนี้ กรดอะมิโนที่ได้จากเซลล์ยีสต์ยังเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารสำคัญมากมาย เช่น สารเร่งการเจริญเติบโตของพืช ได้อีกด้วย จะเห็นได้ว่าในเซลล์ของยีสต์จะมีสารประกอบไนโตรเจนเป็นส่วนใหญ่จึงสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตของสัตว์ทุกชนิด

มีรายงานการนำกากยีสต์มาใช้เป็นโปรตีนเสริมในอาหารสัตว์ ได้แก่ Rameshwari and Karthikeyan (2005) ใช้กากยีสต์จากกระบวนการหมักสุรากลั่นเพื่อใช้เป็นอาหารไก่ เมื่อให้อาหารไก่โดยใช้ยีสต์ 0, 10, 30, 50 และ 70% ระยะเวลา 45 วัน พบว่า มีผลทำให้ไก่มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น Sun and Cheng (2004) ผลิตเอทานอลจากฟางข้าวโพดทำการฟักรีดด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.6, 0.9, 1.2 และ 1.5% w/w ที่ 121 องศาเซลเซียส โดยใช้ที่ระยะเวลา (30, 60 และ 90 นาที) พบว่า ได้น้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้น เช่น arabinose, galactose,

glucose และ xylose และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรด พบว่า ปริมาณของ arabinose และ galactose เพิ่มขึ้น และปริมาณน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกแต่ไม่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคส และพบว่า ระหว่างที่ทำการ pretreatment มีน้ำตาล arabinose, galactose และ xylan เกิดขึ้น แล้วทำการไฮโดรไลซ์ด้วย เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* มีพลังงานต่ำกว่ากากถั่วเหลืองเล็กน้อยอุดมสมบูรณ์ด้วย ฟอสฟอรัสและกรดอะมิโนที่จำเป็น ยกเว้นเมทไธโอนีนและทริป-โตเฟน DBY เป็นแหล่งที่มีวิตามินบีเกือบทุกชนิดอุดมสมบูรณ์ ยกเว้นวิตามินบี 12 และเชื่อว่ามี unidentified growth factors (UGF) อยู่สูง สุกและสัตว์ปีกย่อยโปรตีนใน DBY ได้สูง คือ ประมาณ 90-96% ส่วนที่ย่อยไม่ได้ส่วนใหญ่เป็นไนโตรเจนในกรดนิวคลีอิก(Raghavan,1990) จึงสามารถใช้ในอาหารสุกรและสัตว์ปีกได้ทุกช่วงอายุ ระดับที่แนะนำให้ใช้คือ 10-15% ในอาหารสุกร ส่วนในสัตว์ปีก DBY สามารถทดแทนปลาป่นได้ทั้งหมด หรือใช้ในระดับ 5-12% ของอาหาร โปรตีน 42-44% เยื่อใย 3% มีพลังงานและแร่ธาตุสูง แทนที่แหล่งโปรตีนจากสัตว์ ในอาหารสุกร ไก่ ได้ถึง 80% ใช้เป็นแหล่งเสริม B รวม และ unidentified growth factors ทำให้สัตว์ต้านทานโรคได้ดีกว่าเดิม เพราะไปกระตุ้นกระบวนการ Phagocytosis สารต้านความเครียด (วัคซีน การหย่านม) การย่อยได้ในสุกร-ไก่ 90-81% สัตว์เคี้ยวเอื้อง 79% (<http://feedmeal.igetweb.com/index.pbhmo=3&art=368504> 6 สิงหาคม 2552)

น้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย (Essential oils) เป็นผลิตภัณฑ์จากการสกัดพืชสมุนไพร นานาชนิดตามธรรมชาติ ซึ่งอาจสกัดมาจากส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชนั้น เช่น กลีบดอก ใบ ผิวของผล เกสร ราก หรือเปลือกของลำต้น

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2548)

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย ประกอบด้วยสารสำคัญ 2 กลุ่ม คือ เทอร์ปีน (terpenes) และ ฟีนิลโพรพานอยด์ (phenyl pro- panoids) สารเทอร์ปีนที่พบมากในน้ำมันหอมระเหย เป็นพวกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ได้แก่ โมโนเทอร์ปีน (monoterpenes, C-10) เช่น limonene, citral, geraniol, menthol, camphor และเสสควิเทอร์ปีน (sesquiterpenes, C-15) เช่น b-bisabolene, b-caryophyllene ฟีนิลโพรพานอยด์ (C6-C1) พบได้น้อยกว่าสารกลุ่มเทอร์ปีน ได้แก่ eugenol และ anethole

ความสำคัญของน้ำมันหอมระเหย(สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2548)

มีการนำน้ำมันหอมระเหยมาใช้ประโยชน์ในการแต่งกลิ่นอาหารในอุตสาหกรรมอาหารต่าง ๆ เช่น ชุป ลูกกวาด เครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์นม เป็นต้น น้ำมันหอมระเหยจากดอกไม้ นำไปใช้

ในอุตสาหกรรมน้ำมันหอม เช่น น้ำมันกุหลาบ น้ำมันกระดังงา น้ำมันมะลิ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำน้ำมันหอมระเหยไปใช้ในอุตสาหกรรมยา เช่น น้ำมันกานพลู สามารถฆ่าเชื้อโรคจึงนำมาใช้ผสมในน้ำยาบ้วนปาก น้ำมันยูคาลิปตัส แก้หวัด น้ำมันไพลแก้อาการปวดบวม ฟกช้ำ น้ำมันเปปเปอร์มินต์ ใช้ขับลม และแต่งกลิ่นยา น้ำมันหอมระเหยยังใช้ในสวคนธบำบัด ซึ่งกำลังเป็นที่สนใจของนักธรรมชาติบำบัดอย่างมากในทุกวันนี้ ตัวอย่างของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ได้แก่ น้ำมันกระดังงา น้ำมันลาเวนเดอร์ น้ำมันคาโมมายล์ น้ำมันโหระพา น้ำมันเปปเปอร์มินต์ ช่วยให้สงบและผ่อนคลาย น้ำมันมะนาว น้ำมันยูคาลิปตัส น้ำมัน เปปเปอร์มินต์ ทำให้รู้สึกสดชื่นกระปรี้กระเปร่า น้ำมันตะไคร้หอมใช้ไล่แมลง ตามท้องตลาดจะมีผลิตภัณฑ์กันยุงจากน้ำมันตะไคร้หอมทั้งในรูปแบบครีม โลชั่น น้ำมันตะไคร้ประกอบด้วยสาร เบต้าไอโอโนนสูง ใช้เป็นสารเริ่มต้นในการสังเคราะห์ วิตามินเอได้

ประโยชน์ของน้ำมันหอมระเหย

ประโยชน์ของน้ำมันหอมระเหยมีมากมาย ความรู้สึกที่เราได้กลิ่น รู้สึกสัมผัสได้ หรือได้ยินจะถูกส่งไปเก็บไว้ที่สมอง สมองเป็นประสบการณ์ของชีวิต และจากประสบการณ์ของมนุษย์ที่หลากหลาย เราจึงชอบสิ่งต่าง ๆ ไม่เหมือนกัน รวมทั้งกลิ่นหอมต่าง ๆ ด้วย ดังนั้น การตอบสนองทางอารมณ์ต่อกลิ่นในแต่ละบุคคลจึงอาจแตกต่างกันได้ น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการรักษาผิว รักษาอาการผิวแพ้ง่าย รักษาผิวหม่นหมองและโลหิตคั่ง แผลงัดต่อย ช่วยฟื้นฟูเซลล์ผิวที่อ่อนล้า สามารถใช้นวดโดยผสมน้ำมันพื้นฐานหรือโลชั่นในอัตราส่วน 0.5-2 เปอร์เซ็นต์ สูดดมโดยใส่ในเตาระเหย หรือหยดในน้ำร้อนให้ไอระเหยขึ้นมา ควรใช้ด้วยความระมัดระวัง

น้ำมันหอมระเหยที่ใช้รักษาโรคน้ำกัดเท้าหรือเชื้อราบนเท้า สามารถใช้นวดโดยผสมน้ำมันพื้นฐานหรือโลชั่นในอัตราส่วน 5-2 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันหอมระเหยที่ช่วยกระตุ้นการงอกของผม ช่วยจัดและป้องกันรังแค สามารถใช้ได้การผสมน้ำมันพื้นฐานหรือเบสแชมพู/ครีมนวดในอัตราส่วน 0.5-2 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันหอมระเหยที่ช่วยรักษาอาการ ตุ่ม พุพอง น้ำร้อนลวก บวม รักษาผิวหนังแตกแห้งเป็นตาข่าย รักษาแผลอักเสบ ช่วยแก้ผื่นระคายเคืองและผื่นติดเชื้อ แก้ผดผื่นคัน รักษาบาดแผล สามารถใช้นวดโดยผสมน้ำมันพื้นฐานหรือโลชั่นในอัตราส่วน 0.5-2 เปอร์เซ็นต์ ประคบด้วยผ้า หรือ หยดใส่ในอ่างอาบน้ำ น้ำมันหอมระเหยที่ใช้รักษาแผล ถลอก ปอกเปิด รักษาอาการเส้นเลือดฝอยแตกบวม สามารถใช้นวดโดยผสมน้ำมันพื้นฐานหรือโลชั่นในอัตราส่วน 0.5-2 เปอร์เซ็นต์ ประคบด้วยผ้าหรือสำลี น้ำมันหอมระเหยที่ช่วยบรรเทาแผลไหม้ รักษาบาดแผลจากของมีคม โดยใช้ประคบด้วยผ้าหรือสำลี ควรใช้ด้วยความระมัดระวัง น้ำมันหอมระเหยที่ช่วยรักษาแผลน้ำเหลืองตามมือและเท้า ช่วยบรรเทาแผลตักสะเก็ด ลดพิษเมื่อแมลงสัตว์กัดต่อย รักษาฝ้า กระ จุดด่างดำ ไม่ควรใช้น้ำมันหอมระเหยเหล่านี้ ก่อนหรือ

ในขณะออกแดด จะทำให้ระคายเคือง (Phototoxic) รักษา ปุ่ม หูด หรือตาปลา สามารถใช้โดยผสมน้ำมันพื้นฐานหรือเบสครีม เบสโลชั่นในอัตราส่วน 5-2 เปอร์เซ็นต์ ควรใช้ด้วยความระมัดระวัง น้ำมันหอมระเหยที่ช่วยรักษาผิวแห้ง แพ้ง่าย เช่นซีทีพี รักษาแผลเปื่อย ช่วยลดอาการผิวหนังอักเสบเห่อมากเกินไป ช่วยชะลอความแก่ของเซลล์ผิว และช่วยลดริ้วรอย ใช้นวดโดยผสมน้ำมันพื้นฐานหรือเบสครีม เบสโลชั่นในอัตราส่วน 5-2 เปอร์เซ็นต์ หยดใส่ในอ่างอาบน้ำ น้ำมันหอมระเหยที่ช่วยลดอาการผิวหนัง หรือหนังศีรษะมัน ช่วยบรรเทาอาการเส้นเลือดโป่งพองหรือ ริดสีดวงทวาร ไโล่ เหา เ็บ หิด ไร โยน แก่โรคซึ่กลาก เกื้อย และเชื้อราสามารถใช้โดยผสมน้ำมันพื้นฐานหรือเบสโลชั่น ใช้นวดตัว หรือเบสแชมพูใช้สระผม ในอัตราส่วน 5-2 เปอร์เซ็นต์ หยดใส่ในอ่างอาบน้ำ น้ำมันหอมระเหยที่มีคุณสมบัติลดรอบแผลเป็น และเนื้อแตกลาย ใช้นวดโดยผสมน้ำมันพื้นฐานหรือเบสครีม เบสโลชั่น ในอัตราส่วน 5-2 เปอร์เซ็นต์ โดยนวดตรงจุดที่มีรอยแผลเป็นและเนื้อแตกลายเป็นประจำ (Salts, 2003)

Sirinan *et al.* (ม.ป.ป.) ได้ทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ แล้วนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี พบว่ามีสารกลุ่ม sesquiterpene เป็นองค์ประกอบหลัก เช่น khusimol, α -vetivone และ β -vetivone เป็นต้น นอกจากนี้ พัทธวิทย์ และคณะ (ม.ป.ป.) ได้ทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบที่เกี่ยวข้องกับความหอมในรากหญ้าแฝกหอม (*Vetiveria zizanioides* Nash) พบว่ามีองค์ประกอบที่ทราบโครงสร้างทางเคมี ได้แก่ Nootkatone, Khusimene และ Khusimone ตามลำดับ และคาดว่าสารเหล่านี้จะเกี่ยวข้องกับความหอมของรากหญ้าแฝกหอม จากการศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย *Vetiveria zizanioides* จากสภาพภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกัน พบว่า มีสารพวก hydrocarbons เป็นองค์ประกอบ เช่น β -vetivenene, β -vetispiene, α -amorphene และ Khusimene นอกจากนี้ยังมีสารประเภท alcohol เป็นองค์ประกอบ เช่น khusimol และ vetiselinol เป็นต้น และมีสารประเภท ketones เป็นองค์ประกอบ เช่น α -vetivone, β -vetivone และ Khusimone เป็นต้น (Champagnat *et al.*, 2006)

Yajing *et al.* (2002) ศึกษาสารให้กลิ่นจากขิง (*Zingiber officinale*) โดยวิธี Solid-phase micro-extraction-comprehensive two-dimensional gas chromatography ทดสอบโดยใช้ PDMS fiber การวิเคราะห์โดยใช้ SPME-GC-MS เป็นการระบุองค์ประกอบของสารให้กลิ่น ส่วนการใช้ Solid phase microextraction (SPME) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการเปรียบเทียบคุณภาพของตัวอย่าง และทำให้เห็นความแตกต่างของขิงสดกับขิงหวานซึ่งขิงหวานมีองค์ประกอบของสารให้กลิ่นน้อยแต่มีองค์ประกอบของสารที่ช่วยผ่อนคลายมากกว่าขิงสด

วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหย (โครงการปลูกหญ้าแฝกเฉลิมพระเกียรติ, 2550)

การสกัดกลิ่นหอมออกจากพืชหอม ได้มีการทำมาเป็นเวลานานแล้ว โดยในสมัยโบราณ จะนิยมนำดอกไม้หอมมาแช่น้ำทิ้งไว้ และนำน้ำที่มีกลิ่นหอมนั้น ไปใช้ดื่มหรืออาบ ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการสกัดกลิ่นหอม เพื่อให้ได้กลิ่นหอม หรือ น้ำมันหอมระเหยที่มีคุณภาพ และปริมาณสูงสุด วิธีการดังกล่าวนี้มีหลายวิธี การที่จะเลือกใช้วิธีใดนั้น ต้องพิจารณาลักษณะของพืชที่จะนำมาสกัดด้วย วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหย ได้แก่

1. การกลั่นโดยใช้น้ำ วิธีนี้สามารถทำได้โดยใช้อุปกรณ์สำหรับการกลั่น เช่น หม้อกลั่น เครื่องควบแน่น และภาชนะรองรับน้ำมัน วิธีการก็คือ บรรจุพืชที่ต้องการสกัดน้ำมันหอมระเหยลงในหม้อกลั่น เติมน้ำพอท่วม แล้วต้มจนน้ำเดือด เมื่อน้ำเดือดระเหยเป็นไอ ไอน้ำจะช่วยพาน้ำมันหอมระเหยที่อยู่ในเนื้อเยื่อของพืชออกมาพร้อมกัน เมื่อผ่านเครื่องควบแน่น ไอน้ำและไอของน้ำมันหอมระเหยจะควบแน่นเป็นของเหลว ได้น้ำมันหอมระเหย และน้ำ แยกชั้นจากกัน สำหรับการกลั่นพืชปริมาณน้อย ๆ ในห้องปฏิบัติการ เราสามารถทำได้ โดยใช้ชุดกลั่นที่ทำจากเครื่องแก้ว เรียกว่า ชุดกลั่นชนิด Clevenger ส่วนการกลั่นพืชปริมาณมาก ควรใช้เครื่องกลั่นที่มีขนาดใหญ่ขึ้น อาจทำได้ด้วยเหล็กสแตนเลส หรือทองแดง โดยอาศัยหลักการเดียวกัน

ข้อดีของการกลั่นโดยใช้น้ำนี้ คือ ทำได้ง่าย อุปกรณ์ในการกลั่น ไม่ยุ่งยากซับซ้อน และค่าใช้จ่ายต่ำ แต่ก็มีข้อเสีย คือ ในกรณีที่ต้องกลั่นพืชปริมาณมาก ๆ ความร้อนที่ใส่สู่มห้อมกลั่น จะไม่สม่ำเสมอตลอดทั้งหม้อกลั่น พืชที่อยู่ด้านล่างใกล้กับเตา อาจเกิดการไหม้ได้ ทำให้น้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้ มีกลิ่นเหม็นไหม้ติดปนมา อีกทั้งการกลั่นโดยวิธีนี้ พืชจะต้องสัมผัสกับน้ำเดือดโดยตรงเป็นเวลานาน ทำให้องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย เกิดการเปลี่ยนแปลงไปบ้างบางส่วน

2. การกลั่นโดยใช้น้ำและไอน้ำ วิธีนี้มีหลักการคล้ายกับการกลั่นโดยใช้น้ำ แต่แตกต่างกันที่ ภายในหม้อกลั่นจะมีตะแกรงสำหรับวางพืชไว้เหนือระดับน้ำ เมื่อให้ความร้อน โดยเปลวไฟหรือไอน้ำจากเครื่องกำเนิดไอน้ำ (Boiler) น้ำภายในหม้อกลั่น จะเดือดกลายเป็นไอ การกลั่นโดยวิธีนี้ พืชที่ใช้กลั่นจะไม่สัมผัสกับความร้อนโดยตรง ทำให้คุณภาพของน้ำมันหอมระเหยดีกว่าวิธีแรก

3. การกลั่นโดยใช้ไอน้ำ วิธีนี้คล้ายกับวิธีที่ 2 แต่ไม่ต้องเติมน้ำลงในหม้อกลั่น เมื่อบรรจุพืชลงบนตะแกรงแล้ว ผ่านความร้อนจากไอน้ำที่ได้จากเครื่องกำเนิดไอน้ำ ไอน้ำจะช่วยพาน้ำมันหอมระเหยในพืช ระเหยออกมาอย่างรวดเร็ว วิธีนี้มีข้อดี คือ เวลาที่ใช้ในการกลั่นจะสั้นกว่า ปริมาณน้ำมันมีคุณภาพ และปริมาณดีกว่า แต่ไม่เหมาะกับพืชที่มีลักษณะบาง เช่น กลีบกุหลาบ เพราะไอน้ำจะทำให้กลีบกุหลาบรวมตัวกันเป็นก้อน น้ำมันหอมระเหยที่อยู่ในกลีบกุหลาบไม่สามารถออกมาพร้อมไอน้ำได้ทั้งหมด ทำให้ได้ปริมาณน้ำมันหอมระเขยน้อยลง หรือไม่ได้เลย การกลั่นน้ำมันกุหลาบ จึงควรใช้วิธีการกลั่นด้วยน้ำจะเหมาะสมกว่า

4. การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากดอกไม้ที่ไม่สามารถใช้วิธีการกลั่น โดยใช้ไอน้ำได้ เนื่องจากองค์ประกอบของสารหอมระเหยในดอกไม้จะสลายตัวเมื่อ ถูก

ความร้อนสูง ดังนั้น จึงใช้ตัวทำละลาย เช่น เฮกเซน สกัดน้ำมันหอมระเหยออกมา หลังจากนั้น จะระเหยไล่ตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิและความกดดันต่ำ ก็จะได้หัวน้ำหอม ชนิด concrete

สมนึก (ม.ป.ป.) ศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดจากรากหญ้าแฝกหอม 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ศรีลังกาและพันธุ์สุราษฎร์ธานี โดยสกัดด้วยเครื่อง soxhlet โดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล และทดสอบ คุณสมบัติการไล่แมลงและการเป็นสารฆ่าแมลง กับแมลงผีเสื้อหนอนเจาะสมอฝ้าย อเมริกัน พบว่า สารสกัดจากรากหญ้าแฝกหอมพันธุ์ศรีลังกา แสดงคุณสมบัติเป็นสารไล่แมลง ได้ผลดีกว่าสารสกัดจากรากหญ้าแฝกพันธุ์สุราษฎร์ธานี สารสกัดจากรากหญ้าแฝกพันธุ์ศรีลังกาในอัตราความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้หนอนตายถึง 71.7 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สารสกัดจากรากหญ้าแฝกพันธุ์สุราษฎร์ธานี ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ทำให้หนอนตายเพียง 61.7 เปอร์เซ็นต์

Leupin (2001) ทำการเปรียบเทียบวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันหอมระเหยของ *Vetiver zizanioides* โดยใช้น้ำและตัวทำละลาย พบว่า การกลั่นโดยใช้น้ำ เป็นการสกัดสารที่ระเหยได้จากรากเท่านั้น เนื่องจากจำเป็นต้องใช้ระบบทำความเย็น สามารถกลั่นได้ 2-3 ตัวอย่างพร้อมกัน ใช้ 0.5 M phosphate buffer ที่ pH 8.0 การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง สามารถสกัดได้หลายตัวอย่างเช่นกัน แต่จะได้สารประกอบที่ไม่ระเหยซึ่งเป็นการสกัดจากส่วนประกอบของราก การวิเคราะห์โดยแก๊สโครมาโทกราฟี จะแสดงในรูปของสารประกอบที่ระเหยได้ โดยการสกัดกับ hexane, methyl, tert-butyl ether, ethyl acetate และ ethanol การสกัดโดยใช้ hexane จะได้สารประกอบพวก alcohol และ hydrocarbons และสารที่ไม่ระเหย gas chromatograms เป็นการแสดงการเปรียบเทียบสิ่งที่กลั่นได้และการสกัดโดยใช้ hexane

5. การสกัดโดยใช้ไขมัน (enfleurage) การสกัดโดยใช้ไขมันเป็นวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม มักใช้กับดอกไม้กลีบบาง เช่น มะลิ ช่อนกลิ่น โดยจะใช้ไขมันประเภทน้ำมันหมู่อเลี่ยนบนกระดาษ แล้วนำ ดอกไม้มาเกลี่ยทับเป็นชั้นบาง ๆ จนเต็มถาด ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนดอกไม้ ชุดใหม่ ทำซ้ำประมาณ 7 - 10 ครั้ง ไขมันจะดูดซับสารหอมไว้เรียกไขมันที่ดูดซับ สารหอมนี้ว่า pomade หลังจากนั้นใช้เอทานอลละลายสารหอมออกจากไขมัน นำไประเหยไล่ตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิและความกดดันต่ำ จะได้หัวน้ำหอมชนิด concrete เมื่อแยกส่วนที่เป็นไขมันออกโดยการนำมาละลายเอทานอลแล้ว แตะเย็นเพื่อแยกส่วนที่เป็นไขออก หลังจากระเหยไล่ตัวทำละลายออกจะได้หัวน้ำหอมชนิด absolute ซึ่งจัดเป็นหัวน้ำหอมชนิดดีและราคาแพงที่สุด

6. วิธีปั๊ม วิธีนี้มักใช้กับเปลือกผลไม้ตระกูลส้ม เช่น ส้ม มะนาว มะกรูด น้ำมันหอมระเหยที่ได้จะมีกลิ่นและคุณภาพดี นอกจากนี้ ยังมีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากดอกไม้โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลว โดยเรียกวิธีนี้ว่า Supercritical carbon dioxide fluid extraction ซึ่งเป็นเทคนิคใหม่ เหมาะสำหรับสกัดสารที่ละลายตัวง่ายเมื่อ ได้รับความร้อน แต่สูญเสียค่าใช้จ่ายมาก

พัชรีย์ และคณะ (ม.ป.ป.) ศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่ปลูกด้วยวิธีที่ต่างกัน 3 วิธี ได้แก่ วิธีที่ปลูกแบบไร้เชื้อจุลินทรีย์ วิธีที่ปลูกโดยเชื้อจุลินทรีย์ และวิธีที่ปลูกแบบเคมี - ไฮโดรโปนิค โดยเทคนิคการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็งในระดับจุลภาคที่ต่อเข้ากับเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกเมตรี ผลจากโครมาโทแกรมของสารระเหยในน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่ได้จากวิธีการปลูกที่ต่างกัน แสดงให้เห็นว่ามีสารที่เป็นองค์ประกอบเหมือนกันและมีจำนวนใกล้เคียงกัน ซึ่งสารระเหยส่วนใหญ่เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มเซสควิเทอร์พีนและสารอนุพันธ์ แต่พบว่า สารระเหยเหล่านี้มีความแตกต่างกันในเชิงปริมาณ นอกจากนี้ Patcharee *et al.* (2006) ศึกษาองค์ประกอบหลักของสารให้กลิ่นหอมจากรากหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* ซึ่งสกัดโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ พบว่า yields ของน้ำมันหอมระเหยมี 0.27, 0.18 และ 0.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การวิเคราะห์โครงสร้างองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยทำโดยวิธี two-dimensional gas chromatography จะแสดงองค์ประกอบทั้งหมด 156 องค์ประกอบ และวิธี solid phase microextraction (SPME) จะแสดงองค์ประกอบทั้งหมด 48 องค์ประกอบ น้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากการเพาะเลี้ยง 3 สภาวะมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบหลักโดยวิธี SPME-GC-MS พบว่า มีองค์ประกอบหลักเหมือนกัน 42 องค์ประกอบ ในดินปกติและเคมี-ไฮโดรโปนิค มีองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยเหมือนกัน ขณะที่ระบบที่เพาะเลี้ยงในดินปกติที่ใส่จุลินทรีย์ลงไปจะมีความแตกต่างกันในเชิงปริมาณ และยังได้ทำการตรวจวิเคราะห์หาองค์ประกอบที่เกี่ยวข้องกับความหอมในรากหญ้าแฝก (*Vetiveria zizanioides*, Nash) ทำโดยเปรียบเทียบองค์ประกอบสารระเหยในรากหญ้าแฝกหอมและรากหญ้าแฝกดอน (*Vetiveria nemolaris* A. camus) ที่สกัดด้วยวัฏภาคของแข็งในระดับจุลภาค จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีและแมสสเปกโทเมตรี เมื่อนำโครมาโทแกรมที่ได้จากรากหญ้าแฝกหอมมาเปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมที่ได้จากรากหญ้าแฝกดอนพบองค์ประกอบมากกว่า 60 องค์ประกอบที่ปรากฏเฉพาะในโครมาโทแกรมของรากหญ้าแฝกหอมและคาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับความหอมของรากหญ้าแฝกหอมโดยมีองค์ประกอบที่ทราบโครงสร้างทางเคมี ได้แก่ nootkatone, khusimene และ khusimone ตามลำดับ (พัชรีย์ และสุกัญญา (ม.ป.ป.)

Giulia *et al.* (2007) ใช้วิธีการ headspace-solid phase microextraction ในการตรวจสอบองค์ประกอบของสารให้กลิ่นในดอกกุหลาบ โดยการรวม headspace-solid phase microextraction กับ capillary gas chromatography (HS-SPME-GC) เข้าด้วยกัน ตรวจสอบโดยใช้ SPME fibre จำนวน 4 อัน ที่อุณหภูมิ 40 และ 60 องศาเซลเซียส แต่ละตัวอย่างใช้เวลา 30 นาที แต่ละองค์ประกอบของสารให้กลิ่นพบโดย FID หรือ olfactometry การทดสอบ fiber ทำโดยใช้กลิ่นกุหลาบสด จากการคัดเลือกอุณหภูมิตัวอย่างและผสมสารให้กลิ่นกุหลาบ 18 ลักษณะในน้ำและนำไปเปรียบเทียบ fiber โดยทำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส Polydimethylsiloxane-divinylbenzene (PDMS-DVB) fibre ที่อุณหภูมิตัวอย่าง 60 องศา

เซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อตัวอย่าง rose alcohol phenyl ethanol, citronellol, nerol, geraniol และ eugenol เช่นเดียวกับการทดสอบโดยใช้ GC - olfactometry ที่ไม่ได้มาจากกลีบสดเพียงอย่างเดียว แต่มักจะมาจากกระบวนการผลิตกลีบดอกและผลิตสารอาหาร PDMS-DVB fibre มีอิทธิพลต่อโครงสร้างของสารให้กลิ่น ซึ่งวิธีการให้ทำหลายซ้ำให้เพิ่มจำนวน โดยจำกัด rose alcohol ที่ระดับความเข้มข้นระหว่างน้อยกว่า 1 ถึง 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Singh *et al.* (1999) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝก *Vetiver zizanioides* โดยใช้วิธีการกลั่น ซึ่งพบว่า ความสดของรากหญ้าแฝก และน้ำมันที่สกัดได้จะลดลง หากเก็บเกี่ยวมาช้าและขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการเก็บ การใช้วิธีการกลั่นระยะเวลา 12 ชั่วโมง สามารถสกัดได้น้ำมัน 96.9 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันทั้งหมดน้ำมันหอมระเหยจะได้ปริมาณมากที่สุดในช่วง 2 ชั่วโมงแรกของกาการกลั่น และการตัดรากหญ้าแฝกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ไม่มีผลที่ทำให้ได้น้ำมันหอมระเหยมากขึ้น การกลั่นด้วยไอน้ำจะให้น้ำมันเท่ากับ 0.23 เปอร์เซ็นต์ และพบว่า จะได้น้ำมันหอมระเหย 0.15-0.29 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

Betty *et al.* (2004) ทดสอบน้ำมันหอมระเหยจากพืช 8 ชนิดคือ Vetiver grass, Cassia leaf, Clove bud, Cedarwood, Eucalyptus globules, Eucalyptus citrodora, Lemon grass และ Geranium ในการทำลายปลวก พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกมีผลในการทำลายปลวกมากที่สุด องค์ประกอบทางเคมีจากพืชทั้ง 8 ชนิดที่มีผลในการทำลายปลวก ได้แก่ eucalyptol, citronellal, citral, citronellol, cinnamaldehyde, eugenol, thujopsene และ alpha และ beta-vetivone ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกช่วยทำลายปลวกจะส่งผลดีต่อสภาพแวดล้อม

Kim *et al.* (2004) ศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย(essential oil) จากรากหญ้าแฝกโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี พบว่า มี β -vetivenene , β -vetivone และ alpha-vetivone ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสาร antioxidant

การทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย จะใช้หลักในการทดสอบเดียวกับการทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะ ที่นิยม ได้แก่

1. Agar disc diffusion method ใช้แผ่นกระดาษกรอง หรือกระดาษกรองวงกลมโดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.0 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มลงในสารต้านจุลชีพแล้วนำมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วดูผลจากวงใสที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (กฤติยา, 2541)
2. Dilution method วิธีนี้ต้องทำให้สารที่จะทดสอบเจือจางลงเป็นลำดับ จนได้ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้วนำไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นอาหารเหลวหรืออาหารแข็งก็ได้ จากนั้นจึงนำไปเพาะเชื้อ แล้วสังเกตการณ์เจริญของแบคทีเรีย (ดำรง, 2537)

ปัจจัยที่มีผลต่อการทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพ

(บัญญัติ, 2536) ได้แก่

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ สารต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ นั้นจะถูกกระทบจากส่วนประกอบต่าง ๆ ที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน เช่น

1.1

ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของ จุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ส่วนมากจะเจริญเติบโตได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่าง 6.8-7.2 แต่ถ้า pH ต่ำหรือสูงกว่าระดับนี้จะมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

1.2 บัฟเฟอร์ (buffer) ในอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดนั้น อาจมีผลต่อการออกฤทธิ์ของ สารต้านจุลชีพบางชนิดได้ เช่น การทดสอบ gentamicin ในอาหารที่มีความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ ที่มีค่าต่างกันก็จะทำให้ผลการตรวจสอบความไวที่แตกต่างกัน นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดก็สามารถอยู่ได้ในที่มี pH ในช่วงแคบ ๆ ถ้า pH สูงหรือต่ำกว่าในระดับนี้จะทำให้ตายได้ เช่น *Legionella pneumophila* สามารถอยู่ได้ที่ pH 6.8-7.0 ดังนั้น จึงต้องใช้บัฟเฟอร์ช่วยเพื่อไม่ให้ ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น ๆ เปลี่ยนแปลงไปมากนัก

1.3 ปริมาณอิออนในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อความไวของเชื้อและการออกฤทธิ์ของ สารต้านจุลชีพบางชนิดได้ เช่น ผลของ aminoglycoside ที่ทำให้บริเวณใส (clear zone) ของ แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ลดลง นอกจากนี้ยา tetracyclines ฤทธิ์ของยาจะ ลดลงเมื่อปริมาณของ divalent cation เช่น Ca^{2+} และ Mg^{2+} เพิ่มขึ้น

1.4 วุ้น (agar) วุ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นโพลีแซคคาไรด์ ที่เตรียมได้จากสาหร่ายทะเลบางชนิด มักมีประจุลบ เนื่องจากมีหมู่ acidic sulfate บนโพลีแซคคาไรด์ ดังกล่าวนั้น นอกจากนี้ สารต้านจุลชีพที่มีโครงสร้างโมเลกุลเป็น cationic จะสามารถ จับหมู่ acidic sulfate ในวุ้นได้ ซึ่งจะมีผลทำให้การออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพนั้นลดลงได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่ม polymyxins ความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทั่วไปกำหนดให้มีความหนาประมาณ 4 มิลลิเมตร ซึ่งไม่ทำให้กระทบต่อขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้นมากนัก โดยการเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขนาด 25 และ 60 มิลลิเมตร ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 9 และ 15 เซนติเมตร ตามลำดับ จะทำให้ได้ความหนาดังกล่าว ส่วน plate ที่เทอาหารไว้แล้วถ้าต้องการเก็บไว้ใช้เกิน 5 วัน ควรใส่ถุงพลาสติกไว้ในที่มีอุณหภูมิ 4 - 8 องศาเซลเซียส แต่ไม่ควรเกิน 2 สัปดาห์ และก่อนใช้ควรให้พื้นผิว agar แห้งเสียก่อน

1.5 ความชื้นหรือน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีบทบาทโดยตรงต่อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง แรงดันออสโมซิสของเซลล์ เพราะผลของแรงดันออสโมซิสที่มีผลต่อจุลินทรีย์จะมีผลแตกต่างกัน ออกไป โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายและชนิดของจุลินทรีย์นั้น ๆ เช่น เซลล์ของ *Escherichia coli* น้ำจะแพร่ออกนอกเซลล์ (plasmolysis) เมื่อเจริญในสารละลายซูโครส

เข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 5 - 20 นาที ส่วนเซลล์ของแบคทีเรียพวก *Bacillus* มีความสามารถทนต่อสภาวะละลายของเกลือเข้มข้น 10 - 15 เปอร์เซ็นต์ หรือสภาวะละลายน้ำตาลเข้มข้น 30-60 เปอร์เซ็นต์ ได้ดี

2. ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบนั้น มีผลต่อการทดสอบเป็นอย่างมาก เช่น การใช้จุลินทรีย์มากเกินไปก็จะทำให้ขนาดบริเวณใสมีขนาดเล็กเกินไป ดังนั้น การทดสอบทุกครั้งจึงต้องมีการปรับปริมาณของเชื้อทดสอบให้อยู่ในปริมาณที่แน่นอนและเป็นมาตรฐาน เช่น การปรับปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบให้มีความเข้มข้นประมาณ 1.5×10^9 เซลล์ต่อมิลลิเมตร โดยเทียบกับ 0.5 McFarland standard

3. ความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพใน disc ที่ใช้ทดสอบ ในกรณีที่ใช้แผ่นกระดาษกรองที่มีสารต้านจุลชีพที่เตรียมขึ้นเอง โดยการชุบ disc ลงในสารต้านจุลชีพ อาจจะมีผลทำให้ปริมาณความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพใน disc แต่ละอันแตกต่างกัน และจะส่งผลต่อขนาดของบริเวณใสที่เกิดจากสารต้านจุลชีพโดยตรง

4. อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ มีผลกระทบอย่างมากต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งโดยปกติเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 20-45 องศาเซลเซียส ได้แก่ แบคทีเรียที่สามารถก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์ เช่น เชื้อ *Salmonella typhi* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น ดังนั้น อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิด จึงควรปรับอุณหภูมิให้เหมาะสม ในส่วนของเชื้อที่สามารถทำให้เกิดโรคต่อมนุษย์จะใช้อุณหภูมิในการบ่มเชื้อประมาณ 35-37 องศาเซลเซียส

5. เวลาที่ใช้ในการบ่ม การบ่มจะใช้เวลาประมาณ 18 - 24 ชั่วโมง

6. บรรยากาศขณะบ่มเชื้อ มีผลต่อการทดสอบเป็นอย่างมากโดยเฉพาะ เมื่อบ่มเชื้อที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ จะทำให้เกิด carbonic acid บนพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดสภาวะกรดขึ้น ทำให้มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพบางชนิด

7. การวัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น มีความสำคัญอย่างมาก ที่จะทำให้ผลที่แปลออกมาผิด หรือถูกได้เช่นกัน โดยทั่วไป การวัดขนาดบริเวณใสต้องการความละเอียดเป็นมิลลิเมตร ซึ่งจะวัดได้โดยใช้ไม้บรรทัด หรือเครื่องมือไฟฟ้า นอกจากนี้การที่ขอบบริเวณส่วนใสไม่ชัดเจน คือ ขอบบวม ๆ ที่ยังมีเชื้อจุลินทรีย์ยังเจริญประปรายหรือเชื้อจุลินทรีย์ยังไม่หมด การวัดขนาดบริเวณใสในลักษณะนี้จะต้องวัดเฉพาะขอบนอกที่ใสสม่ำเสมอ

แบคทีเรียทดสอบ

1. *Escherichia coli* หรือ อี โคไล (นิยมใช้ชื่อย่อ *E. coli*)

แบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม เป็นตัวชี้การปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำ มีอยู่ตามธรรมชาติในลำไส้ใหญ่ของสัตว์และมนุษย์ แบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เกิดอาการท้องเสียบ่อยที่สุดทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ทำให้ถ่ายอุจจาระเหลว หรือเป็นน้ำ แต่อาการมักไม่รุนแรง เพราะทั้งเด็กและผู้ใหญ่มักมีภูมิคุ้มกันอยู่บ้างแล้ว เนื่องจาก ได้รับเชื้อนี้เข้าไปทีละน้อยอยู่เรื่อย ๆ เชื้อนี้มักปนเปื้อนมากับอาหาร น้ำ หรือ มือของผู้ประกอบอาหาร ปกติเชื้อเหล่านี้อาจพบในอุจจาระได้อยู่แล้วแม้จะไม่มีอาการอะไร (วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี, 2550) *E. coli* เป็นเชื้อแบคทีเรียในแฟมิลี *Enterobacteriaceae* ที่พบได้ทั่วไปในลำไส้ของสัตว์เลือดอุ่น ซึ่งในลำไส้ของมนุษย์นั้น สันนิษฐาน เริ่มมี *E. coli* ก่อตัวขึ้นภายหลังจากคลอด 1 - 2 วัน ผ่านทางอาหารและน้ำที่เราใช้ในการเลี้ยงดูเด็ก ในลำไส้ของผู้ใหญ่นั้นจะ พบว่าโดยเฉลี่ยแล้วจะมีแบคทีเรีย 1 กิโลกรัม ซึ่ง 0.1 % ของแบคทีเรียทั้งหมด คือ *E. coli*

E. coli มีความสำคัญในด้านสุขภาพของมนุษย์ เพราะพบว่าเชื้อสามารถสร้างวิตามิน K และ B - complex ลำไส้ของมนุษย์ ซึ่งร่างกายสามารถดูดซึมไปใช้ได้ แม้ว่าเชื้อ *E. coli* จะอาศัยอยู่ในลำไส้ แต่เชื้อก็สามารถมีชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมภายนอกร่างกายเช่น ในน้ำ ได้เป็นระยะเวลานาน ซึ่งเราสามารถนำคุณสมบัติดังกล่าวมาใช้ในการปนเปื้อนสิ่งปฏิกลของน้ำได้

2. *Bacillus cereus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สามารถสร้างสปอร์ได้ทั้งในที่ที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนลักษณะเซลล์เป็นแท่งขนาดใหญ่ และ sporangium ลักษณะสปอร์ไม่บวม ลักษณะพิเศษเหล่านี้และอื่น ๆ รวมถึงลักษณะสำคัญทางชีวเคมี ซึ่งใช้บอกความแตกต่างและยืนยันลักษณะเฉพาะของ *B. cereus* แม้ว่าลักษณะลักษณะพิเศษนี้จะมีอยู่ใน *B. cereus* var. *mycoides*, *B. thuringiensis* และ *B. anthracis*

อาการที่เกิดจาก *B. cereus* คือท้องร่วงที่เกิดจากอาหารเป็นพิษซึ่งจะเหมือนกับอาการท้องร่วงที่เกิดจากการได้รับเชื้อ *Clostridium perfringens* เมื่อถ่ายอุจจาระเป็นน้ำมีอาการปวดและเกร็งที่ช่องท้อง ประมาณ 6 -15 ชั่วโมง หลังจากบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อน มีอาการคลื่นไส้พร้อม ๆ กับปวดท้อง แต่อาการอาเจียนเกิดขึ้นไม่บ่อย

3. *Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะกลม เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น หรือเป็นคู่ หรือเป็นสายสั้น ๆ ไม่เคลื่อนที่ โคโลนีมีสีเหลืองหรือสีทองเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศที่มีออกซิเจน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตคือ 35-40 องศาเซลเซียส ช่วง pH หรือความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเติบโตอยู่ที่ 7-7.5 ส่วนค่า Aw (ปริมาณน้ำอิสระในอาหารที่จุลินทรีย์นำไปใช้ในการเติบโต) ต่ำสุดสำหรับการเติบโตในสภาพมีออกซิเจนประมาณ 0.86 สภาพไม่มีออกซิเจน 0.90

แหล่งที่มาของ *Staphylococcus aureus* มีชีวิตอยู่ได้ในอากาศ ฝุ่นละออง ขยะมูล ฝอย น้ำ อาหารและนม หรืออาหารบรรจุเสร็จ สภาวะแวดล้อมภายนอกมนุษย์และสัตว์ ซึ่งมนุษย์และสัตว์นั้นเป็นแหล่งของเชื้อชนิดนี้โดยจะพบอยู่ตามทางเดินหายใจ ลำคอ หรือ เส้นผมและผิวหนังถึง 50 เปอร์เซ็นต์ หรือมากกว่านี้ในคนที่มีสุขภาพดี บางอาจพบเชื้อชนิดนี้ 60-80 เปอร์เซ็นต์ ในผู้ที่สัมผัสโดยตรงกับผู้ป่วยหรือผู้ที่สัมผัสกับสภาพแวดล้อมในโรงพยาบาล ตลอดจนผู้ประกอบอาหาร รวมทั้งในขั้นตอนของการบรรจุและสภาพแวดล้อมภายนอกนั้นก็เป็นสาเหตุส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน สิ่งที่ต้องคำนึงถึงอีกอย่างหนึ่งก็คือ การเก็บอาหารไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมเป็นผลให้อาหารที่มีการปนเปื้อนอยู่แล้วมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อ และสร้างสารพิษได้อย่างรวดเร็ว อาหารที่มักพบ *Staphylococcus aureus* ปนเปื้อน ได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ เนื้อสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์จากไข่ อาหารประเภทสลัดเช่น ไข่ ทูน่า เนื้อ ไก่ มันฝรั่ง และมักกะโรนี ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ครีมพาย เค้ก แครกเกอร์ ช็อกโกแลต แซนวิช และ ผลิตภัณฑ์นม ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม และเก็บไว้เป็นเวลานานก่อนรับประทาน

Staphylococcus aureus บางสายพันธุ์ผลิตสารพิษที่ เรียกว่า เอนเทอโรทอกซิน ทำให้อาหารเป็นพิษ ซึ่งเอนเทอโรทอกซินที่ผลิตมีหลายชนิด แต่ชนิดที่พบว่าทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ ซึ่งเอนเทอโรทอกซินที่ผลิตมีหลายชนิด แต่ชนิดที่พบว่าทำให้เกิดอาหารเป็นพิษบ่อย คือ ชนิดเอ และดี โดยช่วงอุณหภูมิที่เชื้อชนิดนี้จะผลิตเอนเทอโรทอกซินอยู่ระหว่าง 15.6 และ 46.1 องศาเซลเซียส และผลิตได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ลักษณะอาการที่บ่งบอกว่าติด *Staphylococcus aureus* นั้นจะแสดงให้เห็นอย่างรวดเร็วและรุนแรงในหลาย ๆ กรณี ซึ่งอาการทั่วไปของผู้ได้รับเชื้อที่พบคือ ผู้ป่วยจะมีอาการ คลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียน เป็นตะคริวในช่องท้องและอ่อนเพลียในผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการอื่นแทรกซ้อน หลายรายจะมีอาการปวดหัว เป็นตะคริวที่กล้ามเนื้อ และมีการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตเป็นระยะ ๆ รวมทั้งอาจมีการเต้นของชีพจรผิดปกติซึ่งโดยทั่วไปอาการจะดีขึ้นภายใน 2-3 วัน ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับสภาพความต้านทานสารพิษของร่างกาย ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารและปริมาณสารพิษที่สร้างขึ้นในอาหาร รวมทั้งสภาพร่างกาย ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารและปริมาณสารพิษที่สร้างขึ้นในอาหาร รวมทั้งสภาพร่างกายโดยทั่วไปของผู้ที่ได้รับเชื้อด้วยปริมาณที่ทำให้เกิดโรค เมื่อเรารับประทานอาหารที่มีสารพิษปนเปื้อนในปริมาณน้อยกว่า 1 ไมโครกรัมจะสามารถทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยได้ ซึ่งสารพิษชนิดนี้จะมีปริมาณสูงมากเมื่อมี *Staphylococcus aureus* ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร 100,000 ต่อกรัมอาหาร

Proteus sp. จัดเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* *Proteus* เป็น facultative anaerobic แกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่ง เคลื่อนที่ได้ มี frimbriae ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการเกาะติดกับเยื่อผิวเนื้อเยื่อของ host ของ *Proteus mirabilis* พบได้ในขยะ ดิน และอาจพบในอุจจาระคนปกติบ้าง และ *Proteus mirabilis* เป็น normal flora ที่อยู่ใน *Proteus* spp.

ทำให้เกิดโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะในชุมชนเป็นอันดับสองรองจาก *E. coli* โดยเฉพาะ *Proteus mirabilis* ซึ่งเป็นสาเหตุในการทำให้เกิดโรคติดเชื้อจาก *Proteus* ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อมีการติดเชื้อ *Proteus mirabilis* ในทางเดินปัสสาวะแล้วจะทำให้มีโอกาสติดเชื้อที่ไตได้มากกว่า *E. coli* เมื่อมีการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะจะทำให้กระเพาะปัสสาวะอักเสบซึ่งจะมีอาการเจ็บแสบ หรือปวดเมื่อปัสสาวะและปัสสาวะบ่อย รู้สึกหนาวสั่น มีอาการเจ็บที่ท้องน้อย การที่ *Proteus mirabilis* มี frimbriae ซึ่งช่วยในการเกาะติดกับเยื่อเมือกของทางเดินปัสสาวะและสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็วและสามารถสร้างเอนไซม์ urease ได้นั้นส่งผลทำให้เกิดโรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะส่วนบนได้อีกด้วย

Inouye et al. (2001) ใช้น้ำมันหอมระเหย ได้แก่ d-Limonene, perillaldehyde, perillyl alcohol, perillic acid camphor, 1,8-cineole, cinnamic acid, linalool, menthol, menthone, nonanal, alpha-pinene, thymol, citral, cinnamaldehyde, octanal, geranio ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย พบว่า น้ำมันหอมระเหยส่วนใหญ่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *Haemophilus influenzae* รองลงมาคือ เชื้อ *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* และน้ำมันหอมระเหยที่ประกอบด้วย cinnamon bark, lemongrass and thyme มีค่า Minimal inhibitory dose(MID) ต่ำสุด และน้ำมันหอมระเหยที่ประกอบด้วย terpene, ketone ether มีค่า MID สูงสุด Sirinan et al. (ม.ป.ป.) ใช้วิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ สกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝก *Vetiveria zizaniodes* (L.) แล้ววิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทรเมทรี (GC-MS) พบว่า มีองค์ประกอบของสารหอมระเหยที่อยู่ในกลุ่ม sesquiterpene เช่น khusimol, alpha-vertivone, B-vetivone และสารหอมระเหยเหล่านี้มีผลลดการเคลื่อนที่ของหนู (rat) และ Somporn et al. (2005) ศึกษา น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกจากรากหญ้าแฝก *Vetiver zizanioides* ที่ได้จาก พื้นที่ปลูกในประเทศไทยที่ต่างกัน 6 แห่ง เช่น สุราษฎร์ธานี พิมาย ปางพอง ราชบุรี อินโดนีเซีย และดอยตุง ซึ่งนำมาสกัดโดยใช้ methanolic และทดสอบการต้านจุลินทรีย์ พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากทั้ง 6 แห่ง สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* ที่ความเข้มข้น 1 %w/v และสายพันธุ์จากปางพอง มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 278533 ที่ความเข้มข้น 10 %w/v มากที่สุด และได้นำรากหญ้าแฝกจากสุราษฎร์ธานี มาสกัดและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์และทำ Thin layer chromatography ซึ่งพบว่า มีสารต้านเชื้อรา (antifungal) *T. mentagrophytes* และศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยใช้เทคนิค agar well diffusion method และค่า minimum inhibitory concentration(MIC) เท่ากับ 78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และช่วยทำลายเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคผิวหนังได้

Janssen et al. (1986) ใช้วิธีการ agar overlay คัดเลือกสารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) จากน้ำมันหอมระเหยจำนวน 53 ชนิด เพื่อทดสอบการยับยั้ง จุลินทรีย์ 5 ชนิดคือ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*

Hammer et al. (1999) ศึกษาผลการยับยั้งแบคทีเรีย (Antibacterial activity) ของ น้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืช 52 ชนิด โดยวิธี Agar diffusion method พบว่า สามารถ ยับยั้งเชื้อ *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii* biogroup *sobria*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp., *Enterica* serotype *typhimurium*, *Serratia marcescens* และ *Staphylococcus aureus* โดย ตะไคร้ oregano และ bay สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทุกชนิดที่กล่าวมา ส่วน rosewood, coriander, palmarosa, tea tree, niaouli, peppermint, spearmint, sage และ marjoram สามารถยับยั้ง แบคทีเรียได้ทุกชนิด ยกเว้น *Ps. aeruginosa* ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจากพืชเหล่านี้มีบทบาทใช้ ในเภสัชกรรม

เกษร และคณะ (2541) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของรากหญ้าแฝก โดยวิธี Agar diffusion method พบว่า สารสกัดหยาบ เมทานอลรากหญ้าแฝก ทั้ง 6 สายพันธุ์ มีฤทธิ์ต้าน เชื้อรา *Trichophyton mentagrophyte* และหญ้าแฝกบางสายพันธุ์มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 สารสกัดบริสุทธิ์ 4 สาร มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Trichophyton mentagrophyte* นอกจากนี้ พบว่า สารสกัดรวมที่ค่าความเข้มข้นต่ำสุด 78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต *Trichophyton mentagrophyte* จาก ผลการวิจัยนี้ นอกจากจะได้มาตรฐานเอกลักษณ์ทางเภสัชเวชของรากหญ้าแฝก 6 สายพันธุ์ ยังพบว่า สารสกัด เมทานอลของรากหญ้าแฝกมีฤทธิ์รักษาโรคกลากด้วย นอกจากนี้ ยังพบว่า สารสกัดหยาบ เมทานอลมีฤทธิ์ต้าน *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 67120, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Trichophyton mentagrophytes* และ *Microsporum gypseum* ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป สำหรับสารบริสุทธิ์ ที่แยกได้ 5 ชนิด พบว่า สาร 4 ชนิดมีฤทธิ์ ต่อ *Trichophyton mentagrophytes* และ *Microsporum gypseum* เท่านั้น โดย 1 ใน 4 ของสารนี้มีความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง การเจริญของ *Trichophyton mentagrophytes* (MIC) เท่ากับ 1,628 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารผสมที่แยกจาก Column chromatography มีค่า MIC เท่ากับ 78 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิเมตร จากข้อมูลเหล่านี้แสดงว่า รากหญ้าแฝก (*Vetiveria zizanioides*, Nash) มีสารหลายชนิดที่ออกฤทธิ์ต้าน จุลชีพร่วมกัน นอกจากนี้ Seenivasan *et al.* (2006) หาค่ากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ ของน้ำมันหอมระเหยพืช 21 ชนิด ทำโดยใช้วิธี disc diffusion และทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยใช้วิธี two agar dilution พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่า 1 ชนิด

สมภพ และนุชนารถ (ม.ป.ป.) นำรากและใบของแฝกหอม มาสกัดด้วยเมทานอล เฮกเซน และอะซีโตน สารสกัดที่ได้นำมาผสมกับอาหาร PDA แล้วนำเชื้อโรคพืช *Alternaria solani* ไปปลูกบนอาหาร PDA โดยวิธี Culture disc ผลปรากฏว่าสารสกัดอะซีโตนจากราก ที่ความเข้มข้น 15,000, 10,000 และ 5,000 ppm และสารสกัดจากรากด้วยเฮกเซน เมทานอล ที่ 15,000 และ 10,000 ppm ให้ประสิทธิภาพสูงสุด (77.41-79.25 เปอร์เซ็นต์) สารสกัดจากใบให้ผลยับยั้งต่ำกว่ามาก (18.37 เปอร์เซ็นต์) นำสารสกัดอะซีโตนจากราก ที่ความเข้มข้น 5,000 10,000 15,000 และ 20,000 ppm มาทดสอบผลต่อการงอกของสปอร์ พบว่า การสกัดทุกความเข้มข้นให้ผลการยับยั้ง 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความเข้มข้นต่ำกว่า คือ 1,000 และ 500 ppm ยับยั้งได้เพียง 60 เปอร์เซ็นต์ และ 22 เปอร์เซ็นต์ (อะซีโตนเพียงอย่างเดียวยับยั้งได้ 18 เปอร์เซ็นต์) นำสารสกัดอะซีโตนจากรากที่มีความเข้มข้น 5,000 และ 10,000 ppm มาทดสอบเปรียบเทียบกับสารกำจัดราไดเทน เอ็ม-45 และเทียบกับสารสกัดที่ผสมสารกำจัดรา โดยใช้ครึ่งหนึ่งของอัตราที่แนะนำ ในการควบคุมโรคเหี่ยวใบ (ปลูกเชื้อทำในกระถางทดลอง) พบว่า ทุกวิธีสามารถลดเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบที่เป็นโรคต่อต้นได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และทำการทดสอบในลักษณะเดียวกันในแปลงปลูก (มีการติดโรคโดยธรรมชาติ) พบว่า ไม่มีวิธีใดได้ผลในการควบคุม การวิเคราะห์สารสกัดจากรากใช้วิธี TLC โดยมีไดคลอโรมีเทน 2 เปอร์เซ็นต์ ในเอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลาย แสดงผลการแยกสารออกเป็นแถบ 4 ตำแหน่ง แผ่น TLC ที่พ่นด้วยสปอร์ของเชื้อราสาเหตุ ปรากฏผลการยับยั้งที่ Rf 0.55 -0.93

ฤดีวรรณ และสัจจา (2542) พัฒนาดำรับครีมต้านเชื้อราจากสารสกัดรากแฝกหอม และเพื่อประเมินคุณภาพยาเตรียมที่ได้ การสกัดสารสำคัญจากรากแฝกหอมด้วยวิธีหมักกับเมทานอลแล้วระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ ได้สารสกัดหยาบเหนียวข้นสีน้ำตาลเข้มเปอร์เซ็นต์ yield เท่ากับ 4.61 จากการสังเกตลักษณะทางกายภาพ พบว่า ได้ดำรับครีมที่น่าพอใจ 1 ตำรับ เมื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Tricophyton mentagrophyte* โดยวิธี Agar diffusion method เปรียบเทียบกับยาครีมในท้องตลาด 2 ชนิดคือ 1 เปอร์เซ็นต์ Tolnaftate และ 2 เปอร์เซ็นต์

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1

การผลิตเอทานอลจากใบหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides*

อุปกรณ์

ตะแกรงกรอง กระบอกตวง (cylinder) หลอดทดลอง (test tube) ขวดรูปชมพู่ (flask) ที่วางหลอดทดลอง (rack) ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) บีกเกอร์ขนาด (beaker) จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ช้อนตักสาร (spatula) ปิเปต (pipette) หลวงเชื้อเชื้อ (loop) สำลี (cotton) กรรไกร

สารเคมี

- สารละลายกรดซัลฟริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- สารละลาย Somogyi-Nelson I ประกอบด้วย Sodium sulfate, Sodium potassium tartate, Sodium carbonate, Sodium hydrogen carbonate
- สารละลาย Somogyi II ประกอบด้วย Sodium sulfate, Copper sulfate
- สารละลาย Nelson ประกอบด้วย Ammonium molybdate, Conc. sulfuric acid Sodium hydrogen arsenate

อื่น ๆ เช่น กลูโคส น้ำกลั่น (Distilled water) เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Yeast extracts peptone dextrose (YPD) ยีสต์สกัด (yeast extracts) เปปโตน (peptone) ผงวุ้น (agar) กลูโคส (glucose) แอมโมเนียมซัลเฟต (NH_4SO_4)

เครื่องมือ

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เครื่องชั่ง (balance) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ตู้อบ (hot air oven) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ไมโครปิเปต (micropipette) เครื่องผสมแบบเขย่า (vortex mixer) เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) แก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (Gas chromatography mass spectrometry, GC-MS), ชุดสกัดสารเฟสของแข็ง (Solid phase microextraction; SPME holder), SPME fiber (Carbowax TM/DVB)

การทดลองที่ 2

การหมักเชื้อใบหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* กับ เซลล์ยีสต์ที่เหลือจากการผลิตเอทานอลเพื่อเป็นอาหารสัตว์

อุปกรณ์

ผ้าขาวบาง กระบอกตวง (cylinder) หลอดทดลอง (test tube) ที่วางหลอดทดลอง (rack) ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขวดปริมาตร (volumetric flask) บีกเกอร์ (beaker) ช้อนตักสาร (spatula) ปิเปต (pipette) ห่วงเปียเชื้อ (loop) สำลี (cotton) จานเพาะเชื้อ (petri dish) ถาดอะลูมิเนียม กรดซัลฟูริก น้ำกลั่น ยีสต์สกัด (yeast extract) เปปโตน (peptone) ผงวุ้น (agar) กลูโคส (glucose) กากน้ำตาล ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ไมโครปิเปต (micropipette) ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (incubator shaker) หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เครื่องชั่ง (balance) เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) แท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic bar) เครื่องสลายเซลล์คลื่นความถี่สูง (sonicator)

อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ความชื้น

เตาอบแห้ง (hot air oven) โถอบแห้ง (desiccator) คีม (tong) เครื่องชั่ง (analytical balance) ถ้วยอะลูมิเนียม ช้อนตักสาร (spatula)

อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์เถ้า

โถอบแห้ง (desiccator) คีม (tong) ถ้วยกระเบื้อง (porcelain crucible) เตาเผา (muffle furnace) แผ่นให้ความร้อน (hot plate) ตู้ควัน (fume cupboard) เครื่องชั่ง (analytical balance) ช้อนตักสาร (spatula)

อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์โปรตีน

เครื่องย่อยไนโตรเจน ชุดเครื่องกลั่นไนโตรเจน หลอดย่อยโปรตีน น้ำกลั่น ขวดรูปชมพู่ ชุดไตเตรท ช้อนตักสาร (spatula)

อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ไขมันรวม

เครื่องสกัดไขมัน คีม (tong) ถ้วยอะลูมิเนียม Soxhlet apparatus โถอบแห้ง (desiccator) Thimble เตาอบแห้ง (hot air oven) แผ่นให้ความร้อน (hot plate) ช้อนตักสาร (spatula)

อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์เยื่อใย

แผ่นให้ความร้อน (hot plate) ผ้ากรอง (filter membrane) โถอบแห้ง (desiccator) บีกเกอร์ (beaker) ถ้วยกระเบื้อง (porcelain crucible) เตาเผา (muffle furnace) เตาอบแห้ง (hot air oven)

การทดลองที่ 3

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม

อุปกรณ์

บีกเกอร์ (beaker) กระบอกตวง (cylinder) ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ปิเปต (pipette) เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer) ขวดดูแรน (duran) จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish) หลอดทดลอง (test tube) แท่งแก้วคนสาร (glass stirrer) ช้อนตักสาร (spatula) ห่วงเชี่ยเชื้อ (loop) ไมโครปิเปต (micropipette) กระจาดกรอง (filter) กระจาดกรองแผ่นกลม (paper disc) แท่งแม่เหล็กคนสาร (magnetic stirrer) ที่วางหลอดทดลอง (rack) เวอร์เนีย แคลิเปอร์ (vernier caliper) เตาไฟฟ้า (hot plate) ตู้บ่มเชื้อ (incubator) หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ตู้อบแห้ง (hot air oven) ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar air flow) เครื่องชั่งสาร (digital balance) ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย (cleverger) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys 20 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (Gas Chromatography Mass Spectrometry, GC-MS) รุ่น Agilent 6890

สารเคมี

น้ำกลั่น (distilled water) ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (70 % ethanol) ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO) 0.85 % NaCl (normal saline) เตตราซัยคลิน (tetracycline) อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) และ Nutrient agar (NA)

แบคทีเรียที่ใช้ทดลอง

Escherichia coli, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Proteus vulgaris*

วิธีการทดลอง

วิธีการทดลอง แบ่งเป็น 3 การทดลองคือ

การทดลองที่ 1 การผลิตเอทานอลจากใบหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides*

การทดลองที่ 2 การหมักเศษใบหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* กับ เซลล์ยีสต์ที่ผลิตจากการผลิตเอทานอลเพื่อเป็นอาหารสัตว์

การทดลองที่ 3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม

วิธีการทดลองที่ 1

การผลิตเอทานอลจากใบหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides*

1. การพรีทรีทและไฮโดรไลซิสใบหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides*

1.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีทใบหญ้าแฝกหอม *V. zizanioides*

เตรียมใบหญ้าแฝกหอมแห้งโดยหั่นขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร บรรจุลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นพรีทรีทใบหญ้าแฝกหอมด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.25, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร (%v/v) และน้ำกลั่น โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100, 110 และ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที ด้วยหม้อนิ่งความดันไอน้ำ โดยใช้อัตราส่วนใบหญ้าแฝกหอม : สารละลายกรด เท่ากับ 1 : 10 หลังจากนั้นนำใบหญ้าแฝกหอม ที่ผ่านการพรีทรีทตามสภาวะข้างต้น มาล้างด้วยน้ำจนกระทั่งเป็นกลาง แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำใบหญ้าแฝกหอม ที่ผ่านการพรีทรีทแล้ว ไปไฮโดรไลซิสอีกครั้งด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ในอัตราส่วนใบหญ้าแฝกหอม : สารละลายกรด เท่ากับ 1 : 10 ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที โดยใช้หม้อนิ่งความดันไอน้ำ และแช่ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองให้ได้ส่วนใสแล้วปรับสารละลายให้เป็นกลาง และวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi (1952) เลือกสภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีทที่ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดไว้ศึกษาต่อไป

1.2 การหาวิธีการเตรียมใบหญ้าแฝกหอม *V. zizanioides* ก่อนการไฮโดรไลซิส

เตรียมใบหญ้าแฝกหอมแห้งโดยหั่นขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร บรรจุลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำใบหญ้าแฝกหอมแห้งมาพรีทรีท โดยใช้อัตราส่วนใบหญ้าแฝก

หอม : สารละลายกรดเท่ากับ 1 : 10 หลังจากได้ใบหญ้าแฝกหอมที่ผ่านการพรีทรีทแล้ว แบ่งการเตรียมใบหญ้าแฝกหอมก่อนการไฮโดรไลซิส เป็น 2 วิธีคือ

วิธีที่ 1 นำใบหญ้าแฝกหอมที่ผ่านการพรีทรีทแล้วนำไปล้างและอบให้แห้ง ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 ชั่วโมง

วิธีที่ 2 ไฮโดรไลซิสต่อเนื่องโดยไม่ล้างและไม่อบแห้ง โดยไฮโดรไลซิสด้วยกรดซัลฟริก ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซนต์ปริมาตรโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ และวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogyi (1952)

เลือกวิธีการเตรียมใบหญ้าแฝกหอมก่อนการไฮโดรไลซิสที่ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดไว้ทดลองต่อไป

1.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสใบหญ้าแฝกหอม

V. zizanioides

1.3.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสใบหญ้าแฝกหอม

V. zizanioides

เตรียมใบหญ้าแฝกหอมแห้งโดยหั่นขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร บรรจุลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการพรีทรีทใบหญ้าแฝกหอมตามสภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 1.1 และเตรียมใบหญ้าแฝกหอมก่อนการไฮโดรไลซิสตามสภาวะที่เหมาะสมตามวิธีการในข้อ 1.2 นำใบหญ้าแฝกหอมที่ผ่านการพรีทรีทแล้วมาไฮโดรไลซิสในสารละลายกรดซัลฟริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซนต์ปริมาตรโดยปริมาตร โดยใช้อัตราส่วนใบหญ้าแฝกหอม : สารละลายกรดเท่ากับ 1 : 10 ที่อุณหภูมิ 100, 110 และ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ และวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogyi (1952) เลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสที่ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดไว้ศึกษาต่อไป

1.3.2 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสใบหญ้าแฝกหอม

V. zizanioides

นำใบหญ้าแฝกหอมที่ผ่านการเตรียมตามสภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 1.1 และ 1.2 แล้วมาบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการไฮโดรไลซิสด้วยกรดซัลฟริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซนต์ปริมาตรโดยปริมาตร โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมตามข้อ 1.3.1 ระยะเวลา 10, 20 และ 30 นาที และวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogyi (1952) เลือกระยะเวลาที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสที่ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด ไว้ศึกษาต่อไป

2. การผลิตเอทานอลจากใบหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides*

2.1 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

เพาะเลี้ยงยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในอาหารดัดแปลง Yeast extract peptone dextrose (YPD) agar อายุ 24 ชั่วโมง จากนั้นเชื้อเชื้อ 1 – 2 หลูป ลงในอาหารเหลว YPD ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 20 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 การหมักเอทานอล

นำใบหญ้าแฝกหอม มาเตรียมตามสภาวะที่เหมาะสมคือ พรีทรีทโดยแช่ไว้ในสารละลายกรดซัลฟริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำจนกระทั่งเป็นกลาง แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 ชั่วโมง นำใบหญ้าแฝกหอมแห้งที่ผ่านการพรีทรีทแล้วมาไฮโดรไลซิสด้วยสารละลายกรดซัลฟริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 20 นาที จากนั้นกรองแยกสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิส แล้วนำมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายน้ำตาล ให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.5 บรรจุสารละลายที่ได้ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็น แล้วเติมเชื้อเริ่มต้นของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่เตรียมได้จาก ข้อ 2.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เชื้อเริ่มต้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าหมุนวนแบบควบคุมอุณหภูมิได้ ที่ความเร็ว 80 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างครั้งละ 15 มิลลิลิตร ทุก 24 ชั่วโมง ระยะเวลา 120 ชั่วโมง และนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 15 นาที แล้วนำเซลล์ยีสต์ไปวัดการเจริญของเซลล์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และนำส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าความเป็นกรดต่าง วิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi (1952) และ วิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอลโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (Gas Chromatography mass spectrometry, GC-MS)

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอลด้วย GC-MS

วิธีการสกัดเอทานอลโดยวิธี Solid phase microextraction (SPME)

นำส่วนใสของตัวอย่างที่ได้จากการหมักที่ระยะเวลาต่าง ๆ จากข้อ 2.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดไวแอล (vial) ขนาด 20 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท จากนั้นนำขวดไวแอล

ไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ แล้วนำชุดสกัด SPME(SPME holder) ที่มี SPME fiber เป็น Carbowax™/DVB stable Flex™ 70 µm แทะลงในขวดโวลแฟลค ที่มีสารละลายตัวอย่างน้ำหมัก จากนั้นนำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิ จนอุณหภูมิถึง 70 องศาเซลเซียส ดึง fiber ออกเพื่อทำการสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาในการสกัดดึง fiber เข้าที่เดิม จากนั้นนำไปวิเคราะห์เอทานอลด้วย GC-MS

การวิเคราะห์เอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี

- ก) นำตัวอย่างที่สกัดโดยวิธี SPME ไปฉีดเข้า injection port ของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี วิธีการฉีดตัวอย่างเข้า GC-MS โดยดันให้ fiber ออกมาที่ injector port โดยที่ injection port โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี แสดงในตารางที่ 6 จากนั้นนำค่าพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์มาคำนวณหาความเข้มข้นของเอทานอลหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานเอทานอล (ภาคผนวกที่ 3 ภาพผนวก 3.1)

ตารางที่ 6 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี และชนิดของ SPME fiber ที่ใช้ในการทดลอง

รายละเอียด	สภาวะการทำงาน
SPME fiber	Carbowax™/DVB stable Flex™ for manual holder 70 µm
Mass Selective Detector (MS)	HP 5973
แก๊สพา (carrier gas)	Helium (ca. 0.5 ml/min)
ชนิดของคอลัมน์ column	Capillary column (AT-WAX) 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm
Inlet temperature	220 องศาเซลเซียส
Detector temperature	300 องศาเซลเซียส
Mode	Splitless
Flow rate	1.5 มิลลิลิตร/นาที
Oven temperature program	อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 40 องศาเซลเซียส 3 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิขึ้น 80 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 280 องศาเซลเซียส

วิธีการทดลองที่ 2

การหมักเชื้อใบหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* กับเซลล์ยีสต์ที่เหลือจากการผลิตเอทานอลเพื่อเป็นอาหารสัตว์

1. การหมักเชื้อใบหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* ที่ผ่านการไฮโดรไลซิสแล้วกับเซลล์ยีสต์

1.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้นและการเพาะเลี้ยงยีสต์

นำยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารดัดแปลง Yeast extract peptone dextrose (YPD) slant อายุ 24 ชั่วโมง แล้วเพาะเชื้อ 1-2 หลูป ลงในอาหารเหลว YPD ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 20 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้สำหรับเป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นเพาะเลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* ให้มีเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ ลงในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิสใบหญ้าแฝกหอม (pH 4.5) ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 300 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าหมุนวนแบบควบคุมอุณหภูมิได้ ที่ความเร็ว 80 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 120 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง แล้วเทส่วนใสทิ้ง เก็บเซลล์ยีสต์ที่ได้เป็นตัวแทนของยีสต์ที่เหลือจากการผลิตเอทานอลที่ได้จากการทดลองที่ 1

1.2 การหมักเชื้อใบหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* กับเซลล์ยีสต์

นำเชื้อใบหญ้าแฝกหอมที่ผ่านการไฮโดรไลซิสตามวิธีการที่เหมาะสม มาหมักกับเซลล์ยีสต์โดยผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ตามตารางที่ 7 ผสมให้เข้ากันแล้วบรรจุในถุงพลาสติก รีดอากาศออกจากถุงพลาสติกให้หมดเพื่อให้มีอากาศเหลือน้อยที่สุด แล้วมัดถุงพลาสติกให้แน่น จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 21 วัน (ทำการทดลองเดือนมีนาคม) แต่ละชุดการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ

หลังจากหมักเชื้อใบหญ้าแฝกหอมกับเซลล์ยีสต์ไว้ที่อุณหภูมิห้องระยะเวลา 21 วัน ทำการวิเคราะห์และบันทึกผลการทดลอง 2 ส่วนคือ

ส่วนที่ 1

1. คุณลักษณะทางกายภาพของเชื้อใบหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* หมัก

- สีของเชื้อใบหญ้าแฝกหอมหมัก โดยเปรียบเทียบสีของเชื้อใบหญ้าแฝกหอมหมักกับชุดควบคุม

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบในการหมักเศษใบหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* หมักกับเซลล์ยีสต์

ชุดการทดลอง	ส่วนประกอบ			
	เศษใบหญ้าแฝกหอม (กรัม)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ยีสต์ (กรัม)	กากน้ำตาล (กรัม)
ชุดควบคุม	100	150	-	-
1	100	150	10	-
2	100	150	-	7.5
3	100	150	10	7.5

- กลิ่นของเศษใบหญ้าแฝกหอมหมัก ดมกลิ่นเศษใบหญ้าแฝกหอมหมักโดยจมูกเปรียบเทียบกับกลิ่นกับชุดควบคุม

- เนื้อสัมผัสของเศษใบหญ้าแฝกหมัก ตรวจสอบโดยการใช้มือกำเศษใบหญ้าแฝกหอมหมักแล้วค่อย ๆ คลายมือออก ซึ่งเศษใบหญ้าแฝกหอมหมักที่ดีจะไม่จับตัวกันเป็นก้อน แต่ถ้าเศษใบหญ้าแฝกหอมหมักมีความชื้นมากเกินไปจะจับตัวเป็นก้อนซึ่งจะทำให้เกิดการเน่าเสียได้ง่าย

2. การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

ซึ่งเศษใบหญ้าแฝกหอมหมัก น้ำหนัก 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3. การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของอาหารสัตว์เบื้องต้น (Proximate analysis)

วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของอาหารสัตว์เบื้องต้น เช่น วิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความชื้น (Moisture) โปรตีนรวม (Crude protein, CP) เถ้า (Ash) ไขมัน (Ether extract, EE) และเยื่อใย (Crude fiber, CF) โดยวิเคราะห์ตามคู่มือปฏิบัติการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาในตัวอย่างอาหารสัตว์ ซึ่งใช้วิธี Proximate analysis โดยอ้างอิงตาม Association Official Analytical Chemists (1998) (AOAC) ในการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของอาหารสัตว์เบื้องต้น ทำการวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ โดยตัวอย่างของแต่ละชุดการทดลอง ทำการวิเคราะห์ จำนวน 3 ซ้ำ

วิธีการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของอาหารสัตว์เบื้องต้น (Proximate analysis)

การวิเคราะห์หาความชื้น (Moisture)

วิธีการ อบด้วยอะลูมิเนียมที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำถ้วยเข้าโถอบแห้ง 15 นาที ซึ่งถ้วยเปล่าและบันทึกน้ำหนัก ซึ่งตัวอย่างใส่ประมาณ 2-3 กรัม นำถ้วยที่ซึ่งเสร็จแล้วเข้าตู้อบ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำถ้วยออกจากตู้อบใส่โถอบแห้ง 15 นาที ซึ่งถ้วยที่มีตัวอย่างหลังอบแล้ว และบันทึกน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{(A-B) \times 100}{W}$$

A = น้ำหนักถ้วยอะลูมิเนียมรวมตัวอย่างก่อนอบ

B = น้ำหนักถ้วยอะลูมิเนียมรวมตัวอย่างหลังอบ

W = น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้

การวิเคราะห์หาเถ้า (Ash)

วิธีการ นำถ้วยกระเบื้องไปเผาที่ 600 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นนำถ้วยกระเบื้องที่เผาเข้าโถอบแห้งจนเย็นตัว ซึ่งน้ำหนักถ้วยกระเบื้อง และบันทึกน้ำหนัก ตักตัวอย่างใส่ประมาณ 2-3 กรัม บันทึกน้ำหนัก เผาให้หมดควันในตู้ดูดควันแล้วนำไปเผาที่ 600 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง (จนเถ้ามีสีขาวหรือสีเทา) แล้วนำไปใส่ไว้ในโถอบแห้งนาน 15 นาที ซึ่งน้ำหนักและบันทึกน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์เถ้า} = \frac{(A-B) \times 100}{W}$$

A = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องรวมตัวอย่างหลังเผา

B = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องเปล่า

W = น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้

การวิเคราะห์หาโปรตีนรวม (Crude protein, CP)

วิธีการ เตรียมเครื่องย่อยโปรตีน ตามจำนวนตัวอย่างรวมหลอด blank 1 หลอด ซึ่งตัวอย่าง 0.5-1.0 กรัม ลงในหลอดย่อย เติม catalyst mixture 2 กรัม กรดซัลฟูริก 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทุกหลอดรวมทั้ง blank ด้วย จากนั้นนำเข้าเครื่องย่อย ตั้งอุณหภูมิย่อย 420 องศาเซลเซียส ทำการย่อย 2 ชั่วโมง (ตัวอย่างจะเป็นสีเขียวใสเมื่อย่อยสมบูรณ์) ปิดเครื่องให้ความร้อน เปิดพัดลมดูดไอรกไว้ และทิ้งให้เย็น นำหลอดย่อยไปกลั่นกับเครื่องกลั่น

ไนโตรเจน เติม H_3BO_3 ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ เติม SC MR (screened methyl red indicator) 2 หยด เตรียมไว้รอการกลั่น หลังหลอดยืนยันตัว เติมน้ำ 50 มิลลิลิตร แล้วนำมากลั่นกับเครื่องกลั่น ซึ่งเครื่องกลั่นจะเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 45 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยอัตโนมัติใช้ H_3BO_3 ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรเป็นตัวจับไนโตรเจน แล้วนำสารละลายที่ได้มาไทเทรตกับ 0.1 นอร์มอล กรดซัลฟูริก จนถึงจุดยุติ (สารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงอ่อน)

การคำนวณ

0.1 นอร์มอลกรดซัลฟูริก 1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาพอดีกับไนโตรเจน 0.014007 กรัม

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน} = \frac{(A-B) \times 0.014007 \times 0.1 \times 100}{W}$$

A = ปริมาตรสารละลาย 0.1 นอร์มอลกรดซัลฟูริก (มิลลิลิตร) ที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

B = ปริมาตรสารละลาย 0.1 นอร์มอลกรดซัลฟูริก (มิลลิลิตร) ที่ใช้ไทเทรต blank

C = ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก (0.1 นอร์มอล)

W = น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้

เปอร์เซ็นต์โปรตีนรวม = เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน $\times$ 6.25

6.25 = ค่าคงที่ในการหาปริมาณโปรตีนรวม

การวิเคราะห์หาเยื่อใย

วิธีการ ชั่งตัวอย่าง 2-3 กรัม ลงในบีกเกอร์ เติมสารละลายกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น

1.25 เปอร์เซ็นต์ 200 มิลลิลิตร ตั้งบนแผ่นความร้อน หยด antifoam 1-2 หยด นำไปต้มให้เดือดนาน 30 นาที นำไปกรองบนผ้าลินินและล้างด้วยน้ำกลั่นร้อนจนหมดฤทธิ์กรด ถ่ายตะกอนใส่บีกเกอร์ เติมด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.25 เปอร์เซ็นต์ 200 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนาน 30 นาที นำไปกรองด้วยผ้าลินินล้างด้วยน้ำกลั่นร้อนจนหมดฤทธิ์ด่าง ล้างด้วยอะซิโตน 20-30 มิลลิลิตร แล้วถ่ายตะกอนลงในถ้วย crucible ที่ผ่านการชั่งน้ำหนักแล้ว จากนั้นนำ crucible ไปอบแห้งที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ชั่ง crucible หลังอบและบันทึกน้ำหนัก นำ crucible เเผาที่ 600 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ชั่งน้ำหนัก crucible หลังเผาและบันทึกน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์เยื่อใย} = \frac{(A-B) \times 100}{W}$$

A = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องรวมตะกอนหลังย่อยและอบแล้ว

B = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องรวมเถ้าหลัง

W = น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้

การวิเคราะห์หาไขมัน

วิธีการ นำถ้วยอะลูมิเนียมอบที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถอบแห้ง นาน 15 นาที ชั่งน้ำหนักและบันทึกน้ำหนักถ้วยอะลูมิเนียม ซึ่งตัวอย่าง 1-2 กรัม บนกระดาษกรอง ห่อตัวอย่างลงใน Thimble แล้วปิดด้วยสำลี นำ Thimble ไปใส่ใน Soxhlet ต่อ Soxhlet เข้ากับเครื่องควบแน่น เติมน้ำ Dichloromethane ลงในถ้วยอะลูมิเนียม ประมาณ 2 ใน 3 ของถ้วย (150 มิลลิลิตร) แล้วนำไปต่อเข้ากับ Soxhlet และแผ่นความร้อน เปิดน้ำผ่านเครื่องควบแน่น เปิดความร้อนของแผ่นความร้อน โดยให้อุณหภูมิระหว่างการสกัดประมาณ 35-38 องศาเซลเซียส ใช้ เวลาสกัดประมาณ 4 ชั่วโมง นำ Thimble ออกจาก Soxhlet และถ่ายสารละลายออกจาก Soxhlet ให้เหลือสารละลายถ้วยอะลูมิเนียม ถอด Soxhlet ออกจากถ้วยอะลูมิเนียมและเครื่องควบแน่น นำถ้วยอะลูมิเนียมไปใส่ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นนำไปใส่ในโถอบแห้ง นาน 15 นาที ชั่งน้ำหนักและบันทึกน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไขมัน} = \frac{(A-B) \times 100}{W}$$

A = น้ำหนักถ้วยอะลูมิเนียมหลังสกัดไขมันและอบแล้ว

B = น้ำหนักถ้วยอะลูมิเนียม

W = น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้

ส่วนที่ 2

ทดสอบการกินเศษใบหญ้าแฝกหอมหมักของสัตว์ (โคนม)

นำตัวอย่างเศษใบหญ้าแฝกหอมหมักกับเซลล์ยีสต์ ใส่ถาดอะลูมิเนียมแล้วนำไปให้สัตว์ทดลองคือโคนมลูกผสม (ไฮสไดน์ฟริเซียน × พื้นเมือง) จำนวน 3 ตัว การทดลองนี้ ทำการทดลองที่ฟาร์มโคนม สาขาโคนม-โคเนื้อ ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้

2. การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของใบหญ้าแฝกหอมสดและเศษใบหญ้าแฝกหอมที่ไม่ได้หมักกับเซลล์ยีสต์

นำใบหญ้าแฝกหอมสดและเศษใบหญ้าแฝกหอมที่ไม่ได้หมักกับเซลล์ยีสต์ มาวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของอาหารสัตว์เบื้องต้น เช่น วิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความชื้น (Moisture) โปรตีนรวม (Crude protein, CP) เถ้า (Ash) ไขมัน (Ether extract, EE) และเยื่อใย (Crude fiber, CF) โดยวิเคราะห์ตามคู่มือปฏิบัติการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาในตัวอย่างอาหารสัตว์ ซึ่งใช้วิธี Proximate analysis โดยวิธีที่จะใช้นั้นอ้างอิงตาม Association Official Analytical Chemists (1998) (AOAC) ทำการวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ โดยในแต่ละชุดการทดลองทำการวิเคราะห์จำนวน 3 ซ้ำ

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมในเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

นำเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* มาอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 8-10 ชั่วโมง แล้วบดให้ละเอียด แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวม (Crude protein, CP) ตามคู่มือปฏิบัติการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาในตัวอย่างอาหารสัตว์ ซึ่งใช้วิธี Proximate analysis โดยวิธีที่จะใช้ในการวิเคราะห์อ้างอิงตาม Association Official Analytical Chemists (1998) (AOAC) ซึ่งทำการวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ทำการวิเคราะห์ จำนวน 3 ซ้ำ

วิธีการทดลองที่ 3

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดย น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides*

1. การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides*

นำรากหญ้าแฝกหอม จากศูนย์ปฏิบัติการขยายพันธุ์หญ้าแฝกแม่แดง ซึ่งดำเนินการโดยศูนย์ปฏิบัติการพัฒนาที่ดิน โครงการหลวงภาคเหนือ สำนักงานพัฒนาที่ดินเขต 6 มาผึ่งให้แห้งในอากาศประมาณ 2 สัปดาห์ จากนั้นตัดรากหญ้าแฝกหอมให้มีขนาด 0.5 เซนติเมตร แล้วนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมโดยการกลั่นด้วยน้ำ โดยชั่งรากหญ้าแฝกหอมที่ตัดแล้วน้ำหนัก 30 กรัม ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 1 ลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำขวดก้นกลมตั้งบนเตาไฟฟ้า แล้วต่อเข้ากับชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นเก็บน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้โดยเปิดวาล์วของชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหยใส่ในขวดไวแอล (vial) ฝาเกลียวขนาดเล็ก ที่สะอาด หากมีบางส่วนของน้ำมันหอมระเหยที่ยังค้างอยู่ในชุดกลั่น ให้ใส่ไดคลอโรมีเทนลงในชุดกลั่นเพื่อให้ไดคลอโรมีเทนชะน้ำมันหอมระเหยที่เหลือติดค้างอยู่ในชุดกลั่นออกมา และแยกใส่ไวแอลสะอาดที่เตรียมไว้ ซึ่งในส่วนนี้ จะเห็นน้ำมันหอมระเหยรวมกับชั้นของไดคลอโรมีเทน แต่แยกชั้นกับน้ำโดยส่วนที่เป็นน้ำจะอยู่ชั้นบน จากนั้นดูดน้ำมันหอมระเหยที่อยู่รวมเป็นเนื้อเดียวกับชั้นของไดคลอโรมีเทนออกมาใส่ขวดไวแอลสะอาด ให้คล้ายฝาเกลียวไวแอลเล็กน้อย แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ไดคลอโรมีเทนระเหยออกไป จากนั้นนำน้ำมันหอมระเหยไปเก็บรวมไว้กับน้ำมันหอมระเหยในส่วนแรก ปิดฝาขวดไวแอลให้แน่น พันทับฝาเกลียวขวดไวแอล ด้วย parafilm แล้วหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันแสง และนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากราก หญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides*

นำน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากรากหญ้าแฝกหอม ไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) โดยดูดน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง GC-MS ซึ่งสภาวะในการวิเคราะห์ด้วย GC-MS แสดงตารางที่ 8

ตารางที่ 8 สภาวะในการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมด้วย
เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี

รายละเอียด	สภาวะการทำงาน
Gas Chromatography (GC)	Agilent 6890
Mass Selective Detector (MS)	HP 5973
แก๊สพา (carrier gas)	Helium (ca. 0.5 ml/min)
ชนิดของคอลัมน์ column	Fused silicaCapillary column (HP-5MS), (30.0 m × 250 µm, i.d. 0.25 µm film thickness)
Injector temperature	250 องศาเซลเซียส
Detector temperature	280 องศาเซลเซียส
Oven temperature program	อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 105 องศาเซลเซียส 3 นาที แล้ว เพิ่มขึ้น 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 145 องศา เซลเซียส แล้วเพิ่มอุณหภูมิขึ้น 1 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 170 องศาเซลเซียส และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอีก 20 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 260 องศาเซลเซียส

3. การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม

Vetiveria zizanioides

3.1 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

นำแบคทีเรียทดสอบ 4 ชนิดคือ *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* มาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นผิวแข็ง Nutrient agar (NA) slant อายุ 24 ชั่วโมง จากนั้นเช็ดเชื้อ 1-2 หลูป ใส่ลงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 20 มิลลิลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 18 ชั่วโมง เจือจางซัสเพนชันเชื้อให้ได้ค่าความขุ่นมาตรฐานเท่ากับ Mc Farland No. 0.5 จากนั้นดูดซัสเพนชันแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมได้แต่ละชนิด ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหาร NA ในแต่ละจานเพาะเลี้ยงเชื้อ แล้วใช้แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อปาดจากเชื้อ เกลี่ยให้แบคทีเรียทดสอบกระจายทั่วผิวน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2 การเตรียมกระดาศูบสารทดสอบ

นำกระดาศูบแผ่นกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ใส่จานเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที จากนั้นทำให้กระดาศูบแผ่นกลมแห้งโดยนำไปอบในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 ชั่วโมง

การเตรียมน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมและสารทดสอบที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ คือ

1. น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่ไม่ได้เจือจาง
2. น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่เจือจางด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) โดยเตรียมอัตราส่วนดังนี้ คือ
 - 2.1 อัตราส่วนของน้ำมันหอมระเหย : DMSO เท่ากับ 1:1
 - 2.2 อัตราส่วนของน้ำมันหอมระเหย : DMSO เท่ากับ 1:5
 - 2.3 อัตราส่วนของน้ำมันหอมระเหย : DMSO เท่ากับ 1:10
3. Tetracyclin ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อแผ่น ใช้เป็น positive control
4. Dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นสารที่ใช้ในการเจือจางน้ำมันหอมระเหย

ใช้เป็น negative control

ทำการเตรียมกระดาศูบสารทดสอบโดย นำกระดาศูบแผ่นกลมปราศจากเชื้อ วางลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และสารทดสอบดังกล่าวข้างต้น มาหยดลงบนกระดาศูบแผ่นกลม ปริมาตรแผ่นละ 40 ไมโครลิตร ฝั่งกระดาศูบแผ่นกลมไว้ประมาณ 1 นาที

3.3 การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียโดยวิธี disc agar diffusion

ใช้ปากคีบปราศจากเชื้อ คีบกระดาศูบแผ่นกลมที่มีสารทดสอบแต่ละชนิด จากข้อ 3.2 วางลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพาะเลี้ยงแบคทีเรียทดสอบไว้แล้วในข้อ 3.1 ในการทดลองนี้ แต่ละเชื้อทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone) หรือบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) โดยใช้ vernier caliper และบันทึกผลการทดลอง หน่วยเป็น มิลลิเมตร (mm)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1

การผลิตเอทานอลจากใบหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides*

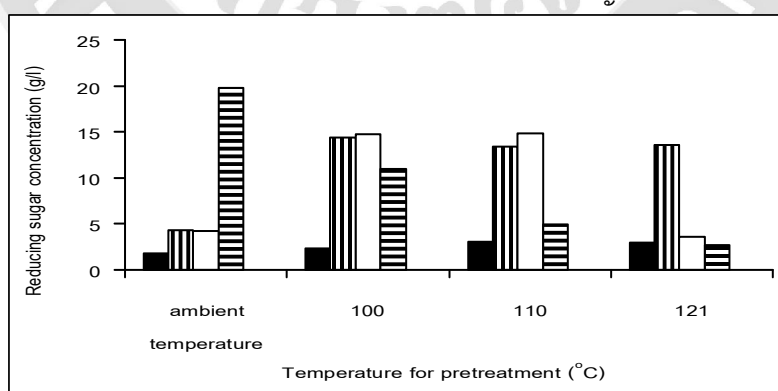
1. การพรีทรีทและไฮโดรไลซิสใบหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides*

1.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีทใบหญ้าแฝกหอม

จากการพรีทรีทใบหญ้าแฝกหอม ด้วยกรดซัลฟริกความเข้มข้น 0.25, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรโดยปริมาตร (%v/v) และน้ำกลั่น ให้ความร้อนที่ อุณหภูมิ 100, 110 และ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที และแช่ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ จากนั้นนำใบหญ้าแฝกหอม ที่ผ่านการพรีทรีทตามสภาวะข้างต้น มาล้างด้วยน้ำ แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 ชั่วโมง และนำไปไฮโดรไลซิส ด้วยกรดซัลฟริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ และปรับสารละลายให้เป็นกลาง และวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi (1952)

จากผลการทดลองในภาพที่ 3 การพรีทรีทโดยการแช่ใบหญ้าแฝกหอมในสารละลายกรดซัลฟริก 1.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 12 ชั่วโมง แล้วไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดเท่ากับ 19.82 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับสภาวะอื่น จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการพรีทรีทให้สูงขึ้น ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ลดลง ทั้งนี้ อาจเป็นผลมาจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดการเสียสภาพ หรือถูกไฮโดรไลซ์เป็นสารอื่น ที่อุณหภูมิสูง (Hinman *et al.*, 1992; Cara *et al.*, 2008) และการใช้สารละลายกรดในการพรีทรีทใบหญ้าแฝกหอม เป็นการเพิ่มความสามารถในการย่อยเฮมิเซลลูโลส เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสสามารถย่อยสลายในสารละลายกรดได้ดีกว่าเซลลูโลส ซึ่ง Esteghlalian *et al.* (1997) อธิบายว่า อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญในการพรีทรีทวัสดุที่มีเซลลูโลสมากกว่าความเข้มข้นของกรดที่ใช้ และ Sun and Cheng (2002) รายงานว่า ความเข้มข้นของกรดซัลฟริกและระยะเวลาในการพรีทรีทฟางข้าวไรน์ไม่มีผลต่อความเข้มข้นของกลูโคสที่ได้ แต่มีผลอย่างยิ่งต่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในการพรีทรีทหญ้า และเมื่อใช้ความเข้มข้นของกรดซัลฟริกและใช้เวลานานขึ้นจะมีผลทำให้ได้ความเข้มข้นน้ำตาลไฮโดรไลสมากขึ้น ซึ่ง William *et al.* (1986) อธิบายว่า การพรีทรีทเซลลูโลสด้วยความดันไอน้ำมีผลทำให้ขนาดของรูในบริเวณพื้นผิวของวัตถุ และมีผลเพิ่มการทำให้ไฮโดรไลซิสได้ดียิ่งขึ้น โดยมีผลต่อโครงสร้างส่วนที่เป็นผลึก (crystalline) ของเซลลูโลส (Carrasco *et al.*, 1994) ซึ่งในการทดลองนี้คล้ายกับการไฮโดรไล

ซีส 2 ขั้นตอนของ Sanchez *et al.* (2004) คือขั้นตอนแรกใช้สภาวะที่นุ่มนวลเพื่อไฮโดรไลซ์เฮมิเซลลูโลส ส่วนขั้นตอนที่ 2 เมื่อไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ หรือกรดเจือจางจะมีผลทำให้สามารถไฮโดรไลซ์เซลลูโลสได้ดีขึ้น จากงานทดลองของ Nguyen *et al.* (2000) พบว่า การพรีทรีทไม้เนื้ออ่อนด้วยกรดซัลฟริกเจือจาง 2 ครั้ง มีผลทำให้ได้ผลผลิตของน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการพรีทรีทเพียงครั้งเดียว ถึงร้อยละ 10 นอกจากนี้ Silverstein *et al.* (2007) รายงานการพรีทรีทต้นฝ้ายโดยใช้กรดซัลฟริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร และโอโซน โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 90 และ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30, 60 และ 90 นาที ตามลำดับ พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีทด้วยกรดซัลฟริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คือที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร ระยะเวลา 60 นาที และยังพบว่าการละลายของลิกนินละลายออกมาด้วย ได้ปริมาณเซลลูโลส 23.85, 60.80 และ 49.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่การพรีทรีทด้วยโอโซนไม่พบเซลลูโลส ซึ่ง Viola *et al.* (2008) ทำพรีทรีท eel grass ที่ผ่านการระเบิดด้วยความดันไอน้ำและไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ พบว่า ได้ soluble sugar 5.06 กรัม และ น้ำตาลกลูโคส 52.9 กรัม ตามลำดับ เมื่อพรีทรีทด้วยกรดออกซาลิกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 300 วินาที นอกจากนี้ Kumar and Murthy (2010) ศึกษาผลของการพรีทรีทต่อผลผลิต (yield) ของการไฮโดรไลซิสของ Perennial rye grass, Tall fescue และ Bent grass โดยพรีทรีทที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที โดยใช้น้ำร้อน กรดเจือจาง และด่างเจือจาง จากนั้นทำการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า ตัวอย่างที่ถูกพรีทรีทมีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพการไฮโดรไลซิสได้ดีกว่าหญ้าที่ไม่ได้ผ่านการพรีทรีท



ภาพที่ 3 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อพรีทรีทใบหญ้าแฝกหอม *V. zizanioides* ด้วย น้ำกลั่น (■) กรดซัลฟริก 0.25 (▨), 0.5 (□) และ 1.0 (▤) เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิห้อง (12 ชั่วโมง) 100, 110 และ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วย 1.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที

ในการทดลองนี้ จึงเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีทไบโหม้แผลกหอมที่ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดคือ การพรีทรีทด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซนต์ปริมาตรโดยปริมาตร โดยแช่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ไว้ทำการทดลองต่อไป

1.2 การเตรียมไบโหม้แผลกหอมก่อนนำไปไฮโดรไลซิส

เมื่อนำไบโหม้แผลกหอมที่ผ่านการพรีทรีทด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซนต์ปริมาตรโดยปริมาตร โดยแช่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มาเตรียม 2 วิธีคือ **วิธีที่ 1** นำไบโหม้แผลกหอมที่ผ่านการพรีทรีทแล้วไปล้างและอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 ชั่วโมง และ **วิธีที่ 2** ทำการไฮโดรไลซิสต่อเนื่องโดยไม่ล้างและอบแห้ง เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการเตรียมไบโหม้แผลกหอมก่อนนำไปไฮโดรไลซิสทั้ง 2 วิธี จะเห็นได้ว่า การเตรียมไบโหม้แผลกหอม วิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 ได้ ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 20.34 และ 12.67 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4) ในการทดลองนี้ การเตรียมไบโหม้แผลกหอม โดยนำไปล้างด้วยน้ำแล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปไฮโดรไลซิสในวิธีที่ 1 มีผลให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการไฮโดรไลซิสต่อเนื่องในวิธีที่ 2 ทั้งนี้ อาจเป็นผลมาจากการอบด้วยความร้อนแห้งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลลูโลสคือมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโดยเฉพาะบริเวณที่ไม่เป็นรูปร่าง (amorphous region) ของเซลลูโลสมากกว่าบริเวณที่เป็นผลึก (crystalline regions) ซึ่งเป็นบริเวณที่ถูกย่อยสลายได้ยาก (Shimazu and Sterling, 2006) นอกจากนี้ Nagle *et al.* (2002) พบว่า การล้างวัตถุดิบด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิระหว่าง 130-150 องศาเซลเซียสก่อนการนำไปไฮโดรไลซิสมีผลทำให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการไม่ได้ล้าง ซึ่ง Soderstrom *et al.* (2004) อธิบายว่า การล้างวัตถุดิบด้วยน้ำเป็นการแยกส่วนที่เป็นพิษและส่วนที่เป็นลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกไป และผลของการพรีทรีทวัตถุดิบด้วยกรดเจือจาง มีผลทำให้เกิดการขยายขนาดของบริเวณสัมผัสกับกรด หรือเอนไซม์ในขั้นตอนของการไฮโดรไลซิสได้อีกด้วย (William *et al.*, 1986) นอกจากนี้ ความร้อนอาจทำให้เกิดสารที่เป็นผลผลิตพลอยได้ (by products) ที่ไม่ต้องการเกิดขึ้น เช่น formic acid, acetic acid, furfural and 5-hydroxymethylfurfural (5HMF) (Soderstrom *et al.*, 2004)

ในการทดลองนี้ ผู้ทดลองเลือกวิธีที่ 2 คือนำไบโหม้แผลกหอมไปล้างและอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนนำไปไฮโดรไลซิส เป็นสภาวะที่ใช้ในการทดลองต่อไป

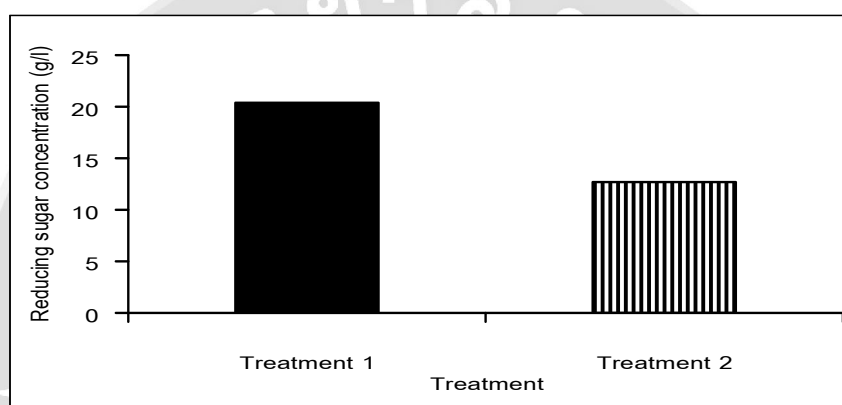
1.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสไบโหม้แผลกหอม

1.3.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสไบโหม้แผลกหอม

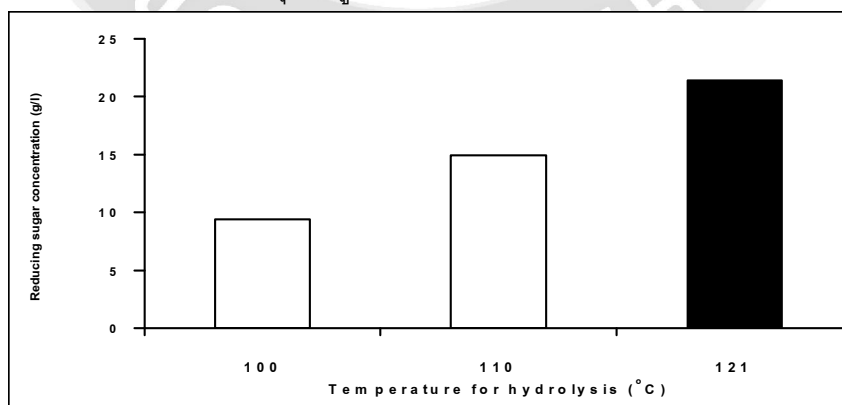
จากการนำไบโหม้แผลกหอมมาทำการพรีทรีทด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซนต์ปริมาตรโดยปริมาตร โดยแช่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไปล้าง

และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปไฮโดรไลซิสด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 100, 110 และ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที จากผลการทดลองในภาพที่ 5 จะเห็นได้ว่าเมื่อทำการไฮโดรไลซิสด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา เวลา 30 นาที ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดเท่ากับ 21.39 กรัมต่อลิตร

ในการทดลองนี้ จึงเลือกสภาวะในการไฮโดรไลซิสด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการเตรียมใบหญ้าแฝกหอมก่อนนำไปไฮโดรไลซิส 2 วิธี คือ **วิธีที่ 1** ล้างและอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 ชั่วโมง (■) และ**วิธีที่ 2** ไฮโดรไลซิสต่อเนื่องโดยไม่ล้างและไม่อบแห้ง (▨) สภาวะในการไฮโดรไลซิส คือ กรดซัลฟูริก 1.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที



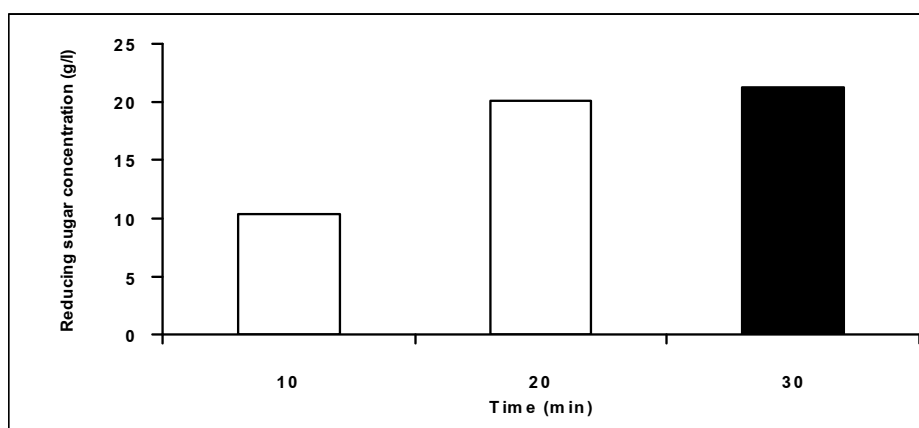
ภาพที่ 5 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสใบหญ้าแฝกหอมด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก 1.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิ 100 (□), 110 (▨) และ 121 (■) องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที

1.3.2 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสใบหญ้าแฝกหอม

Vetiveria zizanioides

เมื่อนำใบหญ้าแฝกหอมมาทำการพรีทรีทด้วยสารละลายกรดซัลฟริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร โดยแช่ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 12 ชั่วโมง แล้วล้างและอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 ชั่วโมง และไฮโดรไลซิสด้วยสารละลายกรดซัลฟริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10, 20 และ 30 นาที จากผลการทดลองในภาพที่ 6 เมื่อไฮโดรไลซิสด้วยสารละลายกรดซัลฟริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10, 20 และ 30 นาที ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 10.30, 20.10 และ 21.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในการทดลองนี้ เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสด้วยกรดซัลฟริกเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 20 และ 30 นาที พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่ง วุฒิชัย (2549) รายงานว่า สภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสใบหญ้าแฝกหอมคือ ใช้สารละลายกรดซัลฟริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 111 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที นอกจากนี้ Zhisheng and Zhang (2004) ทำการไฮโดรไลซิสโดยวัสดุที่มีเซลลูโลสด้วยสารละลายกรดซัลฟริกความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 20 นาที ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูงสุด เท่ากับ 17.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง Canettier *et al.* (2006) พบว่า สภาวะที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซิสเฮมิเซลลูโลสของยูคาลิปตัสด้วยสารละลายกรดซัลฟริกความเข้มข้น 0.65 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 157 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 20 นาที ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 13.65 กรัมต่อลิตร และ Yang *et al.* 2009 พรีทรีท switch grass พบว่า เมื่อพรีทรีทด้วยกรดซัลฟริก 1.5 % ระยะเวลา 60 นาที กลูแคนใน switch grass เปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ 91.8 % ซึ่ง Wu and Lee (1997) ใช้กรดซัลฟริกความเข้มข้น 0.078 % (w/w) ในการพรีทรีท 2 ขั้นตอน มีผลทำให้แยกเฮมิเซลลูโลสออกได้เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ และการใช้กรดซัลฟริกเจือจางมีผลอย่างยิ่งที่ช่วยเพิ่มอัตราการไฮโดรไลซิสให้สูงขึ้น (Lloyd and Wyman, 2005)

ในการทดลองนี้ เลือกระยะเวลาในการไฮโดรไลซิสใบหญ้าแฝกหอมด้วยกรดซัลฟริกเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 20 นาที ไว้ศึกษาต่อไป เนื่องจากผู้ทดลองเห็นว่า น่าจะช่วยประหยัดพลังงานและช่วยลดต้นทุนการผลิตเอทานอลจากวัสดุที่เป็นเซลลูโลสได้

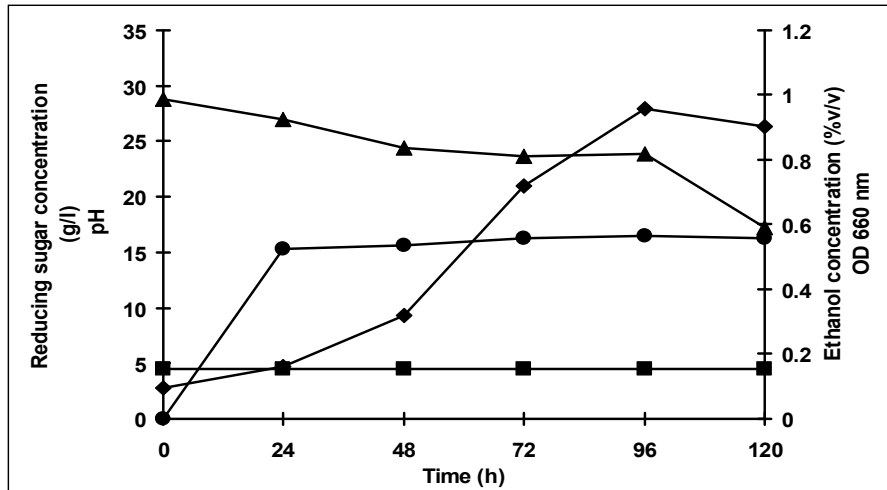


ภาพที่ 6 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสโบหญาแฝกหอมด้วย สารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาณโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 (□), 20 (▨) และ 30 (■) นาที

2. การผลิตเอทานอล

จากการพรีทรีทโบหญาแฝกหอมด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรโดยปริมาตร โดยแช่ที่อุณหภูมิห้องระยะเวลา 12 ชั่วโมง แล้วไฮโดรไลซิสด้วย สารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาณโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศา เซลเซียส ระยะเวลา 20 นาที แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายน้ำตาลที่ได้จาก การไฮโดรไลซิสโบหญาแฝกหอม เท่ากับ 4.5 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 80 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองในภาพที่ 7 จะเห็น ว่า ยีสต์ *S. cerevisiae* มีการเจริญสูงสุดที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง และผลิตเอทานอลสูงสุด ที่ เวลา 96 ชั่วโมง เท่ากับ 0.57 เปอร์เซ็นต์ เช่นกัน จะเห็นได้ว่า ยีสต์ *S. cerevisiae* มีการ ผลิตเอทานอลสัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์ จากผลการทดลองนี้ ยีสต์นี้ผลิตเอทานอลได้ ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับรายงานอื่น ทั้งนี้ อาจเป็นเนื่องมาจากสภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ยีสต์ไม่เหมาะสม เนื่องจากผู้ทดลองมิได้เติมแหล่งไนโตรเจนลงไปในสารละลายน้ำตาลที่ได้จาก การไฮโดรไลซิสโบหญาแฝกหอม จึงทำให้เชื้อมีการเจริญและผลิตเอทานอลได้ต่ำ นอกจากนี้ ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ เช่น ความเข้มข้นของ สับสเตรทเริ่มต้น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งในการทดลองนี้ ทำการทดลองเพียง สภาวะเดียวซึ่งยังไม่ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ และการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* และในการทดลองนี้ใช้เชื้อเริ่มต้นเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมธาวิและคณะ (2547) ศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเข้มข้นของยีสต์ สายพันธุ์ *S. cerevisiae* ที่ เหมาะสมต่อการหมัก พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลจากน้ำบีบสดเปลือกและ แก่นสับปะรดคือใช้ยีสต์เริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.0 ได้ป ผลิตเอทานอลสูงสุด 1.58 เปอร์เซ็นต์ และธีระพงษ์ และคณะ (2549) ได้ทำการผลิตเอทานอลจาก

น้ำอ้อย โดยทำการทดลองแบบเติมแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟตและแบบไม่เติมแหล่งไนโตรเจน พบว่า การเติมแอมโมเนียมซัลเฟต มีผลให้ผลิตเอทานอลได้มากที่สุด เท่ากับ 9.13 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง Martin *et al.* (2002) รายงานว่า ในกระบวนการไฮโดรไลซิสเซลลูโลสโดยใช้สารละลายกรดซัลฟูริกมีผลทำให้ได้สารที่ไม่ต้องการ หรือเป็นสารพิษที่เกิดจากกระบวนการไฮโดรไลซิส เช่น formic acid, acetic acid, furfural และ 5-hydroxymethylfurfural (5HMF) ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ด้วยเช่นกัน ในการทดลองนี้ เมื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์หลังการหมัก พบว่า มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงจากความเข้มข้นเริ่มต้นก่อนการหมัก ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์และความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้ แสดงว่า ยีสต์มีการใช้น้ำตาลไปในการสร้างเซลล์และผลิตเอทานอล ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่อสิ้นสุดการหมัก ทั้งนี้ อาจเป็นผลมาจากผลผลิตที่ได้จากการหมักอาจมีผลผลิตอื่น ๆ นอกเหนือจากเอทานอลเกิดขึ้นจากการหมัก ซึ่ง Paturau (1969) รายงานว่า ในการหมัก เอทานอลจากอ้อยนั้นยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลและสารอื่น ๆ ดังนี้ ethanol 48.4 เปอร์เซ็นต์ carbodioxide 46.5 เปอร์เซ็นต์ acetaldehyde 0.003 เปอร์เซ็นต์ acetic acid 0.05-0.25 เปอร์เซ็นต์ glycerol 2.5-3.6 เปอร์เซ็นต์ lactic acid 0-0.2 เปอร์เซ็นต์ succinic acid 0.5-0.77 เปอร์เซ็นต์ fusel oil 0.25-0.5 เปอร์เซ็นต์ และ furfural จึงมีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักลดลงเล็กน้อย และเมื่อคำนวณหาผลผลิต (yield) เอทานอลที่ได้ ในการทดลองนี้ มีค่าเท่ากับ 11.50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง Narong (2002) ผลิตเอทานอลจากใบหญ้าแฝกหอมโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ได้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 13 เปอร์เซ็นต์ และ Shen *et al.* (2008) ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดจากการหมักซังข้าวโพดเท่ากับ 20 กรัม ต่อลิตร เอทานอล ที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่ง Viola *et al.* (2008) หมักเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิส eel grass โดยยีสต์ *S. cerevisiae* ได้เอทานอล 4.7 % เมื่อใช้ eel grass เริ่มต้น 243 กรัม ต่อมา Yang *et al.* (2009) หมักเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิส switch grass โดยยีสต์ *S. cerevisiae* ATCC 24859) พบว่า ได้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.082 กรัมเอทานอลต่อกรัมของ switch grass ซึ่งได้ 53.5 % ของค่าทางทฤษฎี ต่อมา Digman *et al.* (2010) หมักเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิส perennial grasses เช่น switch grass, reed canary grass โดยยีสต์ *S. cerevisiae* D5A พบว่า ใน reed canary grass ยีสต์เปลี่ยนกลูโคสไปเป็นเอทานอลได้ 22-83 % และ switch grass เปลี่ยนได้ 16-46 % นอกจากนี้ Kumar and Murthy (2010) ผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิส Tall fescue, perennial rye และ Bent grass ได้เอทานอลจาก 360, 297 และ 276 L/ton ของชีวมวล ตามลำดับ



ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ของการเจริญ ความเข้มข้นเอทานอล ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง กับระยะเวลาในการหมักเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 120 ชั่วโมง ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm (—◆—) ความเข้มข้นของเอทานอล (—●—) ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (—▲—) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (—■—)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 2

การหมักเศษใบหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* กับ เซลล์ยีสต์ที่เหลือจากการผลิตเอทานอลเพื่อเป็นอาหารสัตว์

1. การหมักเศษใบหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* กับเซลล์ยีสต์

จากการนำเศษใบหญ้าแฝกหอมที่ผ่านการไฮโดรไลซิสแล้ว มาหมักกับเซลล์ยีสต์ ที่
อุณหภูมิห้อง (ทำการทดลองเดือนมีนาคม) ระยะเวลา 21 วัน โดยแบ่งการทดลองเป็น

ชุดควบคุม คือเศษใบหญ้าแฝกหอม : น้ำกลั่น (100 กรัม : 150 มิลลิลิตร)

ชุดการทดลองที่ 1 คือเศษใบหญ้าแฝกหอม : น้ำกลั่น : เซลล์ยีสต์ (100 กรัม : 150
มิลลิลิตร : 10 กรัม)

ชุดการทดลองที่ 2 คือเศษใบหญ้าแฝกหอม : น้ำกลั่น : กากน้ำตาล (100 กรัม : 150
มิลลิลิตร : 7.5 กรัม)

ชุดการทดลองที่ 3 คือเศษใบหญ้าแฝกหอม : น้ำกลั่น : กากน้ำตาล : เซลล์ยีสต์
(100 กรัม : 150 มิลลิลิตร : 10 กรัม : 7.5 กรัม)

หลังจากหมักเศษใบหญ้าแฝกหอมกับเซลล์ยีสต์ไว้ที่อุณหภูมิห้องระยะเวลา 21 วัน
แบ่งเศษใบหญ้าแฝกหอมหมักออกเป็น 2 ส่วน คือ **ส่วนที่ 1** บันทึกลักษณะทางกายภาพของ
เศษใบหญ้าแฝกหอมหมัก วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของ
อาหารสัตว์เบื้องต้น **ส่วนที่ 2** ทดสอบการกินเศษใบหญ้าแฝกหอมหมักของสัตว์ (โคนม)

จากผลการทดลองในตารางที่ 9 เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของเศษใบหญ้า
แฝกหอมหมัก เช่น สี กลิ่น เนื้อสัมผัส ค่าความเป็นกรด-ด่าง และคุณค่าทางโภชนาเบื้องต้น
ของชุดการทดลองที่ 1, 2 และ 3 กับชุดควบคุม จะเห็นได้ว่า เศษใบหญ้าแฝกหอมหมักทั้ง 3 ชุด
มีสีเขียวซีมัวคล้ายชุดควบคุม เมื่อเปรียบเทียบกลิ่นของเศษใบหญ้าแฝกหอมหมักของชุด
ควบคุมกับแต่ละการทดลอง พบว่า ชุดควบคุมมีกลิ่นอ่อนเล็กน้อย ส่วนชุดการทดลองที่ 2 และ 3
มีกลิ่นหอมของกากน้ำตาล และกลิ่นแอลกอฮอล์เล็กน้อย และชุดการทดลองที่ 2 มีกลิ่นเปรี้ยว
เล็กน้อย มีเนื้อสัมผัสนุ่ม ไม่ลื่น และไม่เป็นเมือก เมื่อวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของเศษใบหญ้า
แฝกหอมหมัก พบว่า ทุกชุดการทดลองมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ไม่แตกต่างกับชุดควบคุม คือ
อยู่ระหว่าง 4.74-5.24 ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่าง ของเศษใบหญ้าแฝกหอมหมักในการทดลองนี้
มีค่าใกล้เคียงกับ รายงานของ พาณิข (2512) ที่กล่าวว่า พืชหมักที่ดีควรมี ความเป็นกรด-ด่าง
ประมาณ 3.5-4.2 และเมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของอาหารสัตว์
เบื้องต้น โดยแสดงผลการทดลองเป็นแผนภูมิแท่ง ในภาพที่ 8 เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์
โปรตีนรวมของชุดควบคุม กับชุดการทดลองที่ 1, 2, และ 3 มีความแตกต่างกันอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาคผนวกที่ 5 ตารางผนวก 5.1 และ 5.2) ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์โปรตีนรวม เท่ากับ 7.54, 8.57, 8.50 และ 10.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง เถ้า ไขมัน และเยื่อใย ของชุดควบคุมกับการทดลองที่ 1, 2 และ 3 มีค่าไม่แตกต่างกันมาก ซึ่งวารุณี และคณะ (2539) รายงานการหมักใบหญ้าแฝกคือ หญ้าแฝกกับกากน้ำตาล 10%, หญ้าแฝกกับมันเส้นบด 15% หรือหญ้าแฝกกับยูเรีย 0.5% และ กากน้ำตาล 10% และผลการทดลองหมักหญ้าแฝกอายุ 30 วัน ด้วยกากน้ำตาล 10% หมักระยะเวลา 30 วัน และวิเคราะห์วัตถุแห้งได้เท่ากับ 28.1% โปรตีน 12.28% เยื่อใย 26.42% ไขมัน 1.45% NFE 48.64%, NDF 60.90% และ ADF 35.73% ของวัตถุแห้ง และหญ้าแฝกหมักที่ได้มีคุณภาพดี มีค่าฟิเชซเท่ากับ 5.18 ปริมาณกรดไขมันระเหยง่าย ได้แก่ กรดอะซิติก กรดบิวทีริก และกรดแลคติก เท่ากับ 0.81%, 0.34% และ 1.21% ตามลำดับ ส่วนหญ้าที่หมักมีคุณภาพเกือบดี มีค่าฟิเชซเท่ากับ 4.27 ปริมาณกรดไขมันระเหยง่าย (กรดอะซิติก กรดบิวทีริก และกรดแลคติก) เท่ากับ 2.33%, 0.72% และ 5.34% ตามลำดับ ส่วนรายงานของสมคิด และคณะ (2525) ใช้หญ้าหมักที่ทำจากหญ้าขนอายุ 42 วันผสมกากน้ำตาล 5% เลี้ยงโคนมรุ่นเพศเมียลูกผสมไฮลส์ไต้หวัน เขียน น้ำหนักตัวเฉลี่ย 170 กิโลกรัม เสริมอาหารข้น 1.5 กิโลกรัมต่อตัวต่อวัน พบว่า โคมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นได้วันละ 299 กรัม ซึ่งหญ้าที่ สามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่นและนำมาปรับปรุงคุณภาพโดยเติมกากน้ำตาล 5% ซึ่ง Desnoyers *et al.* 2009 ศึกษาผลของการเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* ต่อกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องและการผลิตน้ำนมของวัวนม พบว่า การเสริมยีสต์ช่วยเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะรูเมน 0.03 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของกรดระเหยได้ 2.17 เปอร์เซ็นต์ และช่วยลดความเข้มข้นของกรดแลคติก 0.9 mM แต่ไม่มีผลต่ออัตราส่วน acetate : propionate และการย่อยได้ของสารประกอบอินทรีย์เพิ่มขึ้น 0.8 % การเสริมยีสต์ช่วยเพิ่ม dry matter intake(DMI) 0.44 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ช่วยเพิ่มผลผลิตของน้ำนม 1.2 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว และช่วยเพิ่มปริมาณไขมันในน้ำนม 0.05 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณโปรตีนในน้ำนม Durand *et al.* (2008) ศึกษาผลของ Active dry yeast (ADY) ต่อระบบนิเวศของจุลินทรีย์ในกระเพาะวัว พบว่า ยีสต์ช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง นอกจากนี้ ADY ที่มีกิจกรรมในลำไส้ และมีผลเป็นโปรไบโอติก สำหรับการย่อยอาหารของสัตว์ด้วย นอกจากนี้ ADY ยังช่วยปรับสมดุลของค่าความเป็นกรด-ด่าง และยังกระตุ้นการเจริญและช่วยให้จุลินทรีย์ที่ย่อยไฟเบอร์มีกิจกรรมได้ดีขึ้น Longuski *et al.* (2009) ศึกษาผลการเสริมยีสต์ *S. cerevisiae* ต่อการใช้พลังงานและในช่วงให้นมของวัวนม พบว่า มีผลเสริมปริมาณน้ำนมแก่วัวนม และมีผลการเพิ่มอินซูลิน และเพิ่มความเข้มข้น oestradiol เพื่อเพิ่มขนาด ovulatory follicle และ

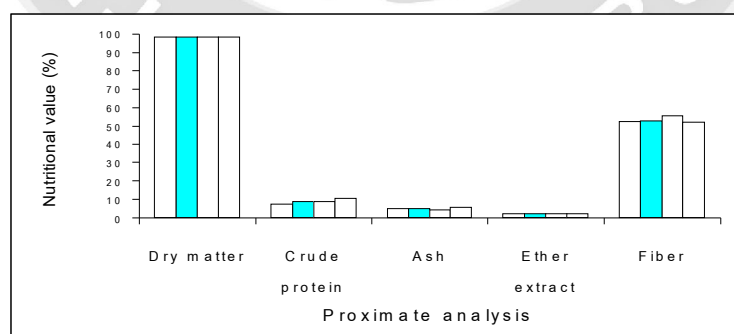
ตารางที่ 9 ลักษณะทางกายภาพและคุณค่าทางโภชนาการของเศษใบหญ้าแฝกหมักกับ
เซลล์ยีสต์ที่อุณหภูมิต่ำ (ทำการทดลองเดือนมีนาคม) ระยะเวลา 21 วัน

ชุดการ ทดลอง	ลักษณะทางกายภาพ				คุณค่าทางอาหาร (เปอร์เซ็นต์)				
	สี	กลิ่น	เนื้อสัมผัส	pH	วัตถุแห้ง	โปรตีน	เถ้า	ไขมัน	เยื่อใย
ชุดควบคุม	เขียว ขี้ม้า	กลิ่นอับ	นุ่ม ไม่ลื่น ไม่เมือก	5.07	98.15 ^a	7.54 ^b	4.90 ^b	2.33 ^a	52.09 ^b
1	เขียว ขี้ม้า	กลิ่นออก เปรี้ยว	นุ่ม ไม่ลื่น ไม่เมือก	5.24	98.18 ^a	8.50 ^b	4.17 ^b	2.38 ^a	55.40 ^b
2	เขียว ขี้ม้า	หอมกาก น้ำตาล มีกลิ่น แอลกอฮอล์	นุ่ม ไม่ลื่น ไม่เมือก	4.96	98.14 ^a	8.57 ^b	4.84 ^b	2.41 ^a	52.45 ^b
3	เขียว ขี้ม้า	หอมกาก น้ำตาล มีกลิ่น แอลกอฮอล์	นุ่ม ไม่ลื่น ไม่เมือก	4.74	98.26 ^a	10.24 ^b	5.61 ^b	2.10 ^a	51.83 ^b

หมายเหตุ a หมายถึง ชุดทดลองที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

b หมายถึง ชุดทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 8 เปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการของเศษใบหญ้าแฝกหมักกับเซลล์

ยีสต์ ชุดควบคุม (■) ชุดการทดลองที่ 1 (■) ชุดการทดลองที่ 2 (■)
และชุดการทดลองที่ 3 (■)

การทดสอบการกินเศษใบหญ้าแฝกหอมหมักกับเซลล์ยีสต์ของสัตว์ (โคนม)

เมื่อนำเศษใบหญ้าแฝกหอมหมักกับเซลล์ยีสต์มาทดสอบการกินของสัตว์ โดยใช้สัตว์ทดลองเป็นโคนมลูกผสม (ไฮสโตนีฟรีเซียน × พันเมือง) จำนวน 3 ตัว ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 10 โดยให้โคนมกินใบหญ้าแฝกหมักในชุดควบคุม เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ 1, 2 และ 3 พบว่า โคนมเลือกกินเศษใบหญ้าแฝกหอมหมักกับเซลล์ยีสต์ ในชุดการทดลองที่ 2 และ 3 ซึ่งเป็นชุดที่มีกากน้ำตาลผสมอยู่ แต่ไม่กินชุดควบคุมซึ่งมีเฉพาะเศษใบหญ้าแฝกซึ่งไม่มีกากน้ำตาล และไม่มียีสต์ อาจเป็นเพราะในชุดทดลองที่ 2 และ 3 มีกากน้ำตาล ซึ่งช่วยเพิ่มความหอมและมีลักษณะชวนให้สัตว์กินได้มากกว่าชุดควบคุม เทอดชัย (2548) รายงานว่า ถ้าอาหารหยาบมีโปรตีนต่ำกว่า 6-8 เปอร์เซ็นต์แล้ว ความน่ากินของอาหารหยาบจะลดน้อยลง ทำให้สัตว์กินอาหารหยาบนั้นลดน้อยลงไปด้วย แต่ถ้ามีการเสริมโปรตีนอาหารสัตว์ชนิดอื่น หรือเสริมด้วยยูเรีย (Urea) ในระดับที่เหมาะสมแล้ว ก็จะช่วยให้อาหารที่สัตว์จะกินได้เพิ่มขึ้นสูงถึง 16-82 เปอร์เซ็นต์ได้ ซึ่งในเซลล์พืชมีส่วนประกอบที่สัตว์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายจึงมีเพียง 44.60-48.16 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ซึ่ง Neutral Detergent Fibre (NDF) ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช หรือเยื่อใยต่าง ๆ ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน คิวติน และ แทนนิน สัตว์เคี้ยวเอื้องเท่านั้นที่สามารถย่อยได้ นอกจากนี้ NDF ยังมีอิทธิพลต่อปริมาณอาหารสัตว์ที่สามารถจะกินได้ (Voluntary feed intake) โดยอาหารที่มีเยื่อใยสูงหรือ NDF สูง นั้นมีการไหลผ่านของอาหารจากกระเพาะช้า ทำให้สัตว์กินอาหารได้น้อยลง (วรพงษ์, 2535)

ตารางที่ 10 การกินของสัตว์ (โคนม) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 21 วัน
(ทำการทดลองเดือนมีนาคม)

ชุดการทดลอง	การทดสอบการกินของสัตว์		
	โคตัวที่ 1	โคตัวที่ 2	โคตัวที่ 3
ชุดควบคุม	ไม่กิน	ไม่กิน	ไม่กิน
1	ไม่กิน	กิน	กิน
2	ไม่กิน	กิน	กิน
3	กิน	กิน	กิน

2. การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของใบหญ้าแฝกหอมสด และเศษใบหญ้าแฝกหอมที่ไม่ได้หมักกับเซลล์ยีสต์

จากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของใบหญ้าแฝกหอมสดและเศษใบหญ้าแฝกหอมที่ไม่ได้หมักกับเซลล์ยีสต์ และผู้ทดลองนำผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของเศษใบหญ้าแฝกหอมหมักกับเซลล์ยีสต์ ผลการทดลองในตารางที่ 11 และเปรียบเทียบโดยแสดงเป็นแผนภูมิแท่ง (ภาพที่ 9) จะเห็นว่า เปอร์เซ็นต์วัตถุแห้งของใบหญ้าแฝกหอมสดและเศษใบหญ้าแฝกหอมที่ไม่ได้หมักกับเซลล์ยีสต์ และเศษใบหญ้าแฝกหอมหมักกับเซลล์ยีสต์ มีค่าไม่แตกต่างกัน คือเท่ากับ 97.36, 98.09 และ 98.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นต์ไขมันในใบหญ้าแฝกหอมสด เศษใบหญ้าแฝกหอมที่ไม่ได้หมักกับเซลล์ยีสต์ และเศษใบหญ้าแฝกหอมหมักกับเซลล์ยีสต์ เท่ากับ 1.64, 1.18 และ 2.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นต์เยื่อใย ของทั้ง 3 ชุดการทดลอง ในการทดลองนี้ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาคผนวกที่ 5 ตารางผนวก 5.3) คือมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เยื่อใย เท่ากับ 36.93, 49.63 และ 51.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งวารุณีและคณะ (2537) รายงานว่า หญ้าแฝกหอมและหญ้าแฝกหอมดอมีปริมาณโปรตีนเฉลี่ยใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ หญ้าแฝกหอมและหญ้าแฝกหอมดอที่มีปริมาณโปรตีนสูงสุด คือ สายพันธุ์กำแพงเพชร 2 และ สายพันธุ์กำแพงเพชร 1 มีโปรตีน 8 เปอร์เซ็นต์ ตามมาตรฐานอาหารสัตว์ ปริมาณโปรตีนในพืชอาหารสัตว์ไม่ควรต่ำกว่า 6.8 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองนี้ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนของใบหญ้าแฝกสด เศษใบหญ้าแฝกหอมที่ไม่ได้หมักกับเซลล์ยีสต์ และเศษใบหญ้าแฝกหอมหมักกับเซลล์ยีสต์ มีโปรตีนรวม เท่ากับ 6.71, 6.66 และ 10.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า เศษใบหญ้าแฝกหอมหมักกับเซลล์ยีสต์มีปริมาณโปรตีนที่สูงกว่าใบหญ้าแฝกหอมสดและเศษใบหญ้าแฝกหอมที่ไม่ได้หมักกับเซลล์ยีสต์ ซึ่งในกากเซลล์ยีสต์ มีโปรตีน เยื่อใย มีพลังงานต่ำกว่ากากถั่วเหลืองเล็กน้อย อุดมสมบูรณ์ด้วยฟอสฟอรัสและกรดอะมิโนที่จำเป็น เป็นแหล่งที่มีวิตามินบีเกือบทุกชนิดอุดมสมบูรณ์ ยกเว้นวิตามินบี 12 และเชื่อว่ามี unidentified growth factors (UGF) อยู่สูง สามารถทดแทนปลาป่นได้ทั้งหมด หรือใช้ในระดับ 5-12 % ของอาหารซึ่งในเซลล์ยีสต์ มีโปรตีน 42% ไขมัน 2.20% เยื่อใย 1.10% เถ้า 8.60% แคลเซียม 0.50% ฟอสฟอรัส 1.20% ไลซีน 3.62% เมทไทโอนีน 0.70% เมทไทโอนีนและซิสเตอีน 1.20% ทรีปโตฟาน 0.50% ทรีโอนีน 2.45% การใช้หญ้าแฝกหมัก น่าจะใช้ในช่วงฤดูแล้งขาดแคลนพืชอาหารสัตว์ เกษตรกรก็สามารถนำใบของหญ้าแฝกซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการปลูกหญ้าแฝกเพื่อการอนุรักษ์ดินและน้ำ นำมาเป็นเสบียงสัตว์ให้สัตว์กินในรูปของการเก็บถนอมอาหารสัตว์โดยการหมักและใช้กากน้ำตาลจะทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตได้ (<http://feedmeal.igetweb.com/index.phpmo=3&art=368504> 6 สิงหาคม 2552) นอกจากนี้ เซลล์ยีสต์ยังเป็นแหล่งโปรตีนคุณภาพ ย่อยสลายได้ทันที มีคุณค่าสูง เหมาะอย่างยิ่งที่จะนำมาทำเป็นอาหารสัตว์ได้หรือใช้ทำปุ๋ย ปัจจุบันมีการนำยีสต์มาเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์เพื่อประโยชน์ใน 2 ทาง

ด้วยกันคือ เป็นแหล่งโปรตีนที่เราเรียกว่า โปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) และอีกในแง่หนึ่งคือเป็นตัวช่วยเสริมสุขภาพของสัตว์หรือที่เราเรียกว่าเป็น โปรไบโอติก (probiotic) ให้กับสัตว์เลี้ยง ซึ่งจะทำให้สัตว์แข็งแรง และมีภูมิต้านทานโรคสูงขึ้น รูปแบบการนำยีสต์มาใช้ก็ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการใช้ คือ ถ้าต้องการให้ยีสต์เป็นแหล่งโปรตีนก็ต้องคำนึงว่ายีสต์ยังมีชีวิตอยู่หรือไม่ แต่ถ้าต้องการให้ยีสต์ทำหน้าที่เป็นโปรไบโอติก จะต้องใช้ในสภาพที่ยังมีชีวิตอยู่เท่านั้น แต่ไม่ว่ายีสต์จะทำหน้าที่ใดก็ตามในสองข้อดังกล่าว ก็ถือว่าเป็นประโยชน์ต่อสัตว์เลี้ยงทั้งนั้น ดังนั้นในประเทศไทย เทคโนโลยีการผลิตยีสต์น่าจะได้รับการพัฒนาให้สามารถทำได้ง่ายขึ้น รวมทั้งสามารถใช้วัตถุดิบราคาถูกจากของเหลือใช้ทางเกษตร ที่มีอยู่ในบ้านเรา ซึ่งประโยชน์จากยีสต์ต่อการเลี้ยงสัตว์และปศุสัตว์ มีระดับโปรตีนสูง และอยู่ในรูปที่นำไปใช้ได้ทันที โปรตีน ประมาณ 50 % สามารถนำไปใช้โดยให้สัตว์กินโดยตรง หรือนำไปผสมในอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มโภชนา หรือลดฝุ่นในอาหารสัตว์ นอกจากนี้ยีสต์เอง จะทำหน้าที่เป็นตัวช่วยย่อยได้ดีด้วย ทำให้สัตว์ไม่เกิดอาการท้องอืด สามารถนำอาหารไปใช้ประโยชน์ได้เต็มที่ สัตว์โตดี โตเร็ว ป่วยน้อย ในโคนมจะเร่งให้น้ำนมออกมามากขึ้น นอกจากนี้ ยีสต์ยังทำให้สัตว์ต้านทานโรคได้ดีกว่าเดิม เพราะไปกระตุ้นกระบวนการ Phagocytosis มีสารต้านความเครียด (วัคซีน การหย่านม) การย่อยได้ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง 79% ([http://www.thaicattle.org/board/index.php.topic 6](http://www.thaicattle.org/board/index.php.topic%206) สิงหาคม 2552)

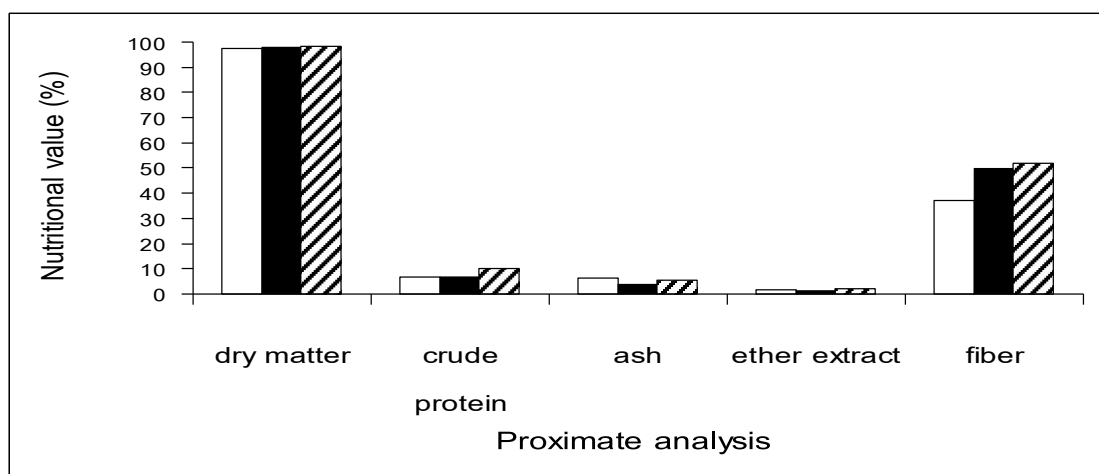
ตารางที่ 11 เปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาของใบหญ้าแฝกหอมสด เศษใบหญ้าแฝกหอมที่ไม่ได้หมักกับเซลล์ยีสต์ และเศษใบหญ้าแฝกหอมหมักกับเซลล์ยีสต์

ชุดทดลอง	คุณค่าทางอาหาร (เปอร์เซ็นต์)				
	วัตถุดิบ	โปรตีน	เถ้า	ไขมัน	เยื่อใย
ใบหญ้าแฝกหอมสด	97.32 ^b	6.71 ^a	6.39 ^b	1.64 ^b	36.95 ^b
เศษใบหญ้าแฝกหอมที่ไม่ได้หมักกับเซลล์ยีสต์	98.09 ^b	6.66 ^a	3.98 ^b	1.18 ^b	49.63 ^b
เศษใบหญ้าแฝกหอมหมักกับเซลล์ยีสต์	98.26	10.24	5.61	2.1	51.83

หมายเหตุ a หมายถึง ชุดทดลองที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($P < 0.05$) b หมายถึง ชุดทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ ($P > 0.05$) เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 9 การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของแป้งกล้วยหอมสด (□) แป้งกล้วยหอมที่ไม่ได้หมักกับเซลล์ยีสต์ (■) และแป้งกล้วยหอมหมักกับเซลล์ยีสต์ (▨)

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมในเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

จากการนำเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* แห่งมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวม (Crude protein, CP) พบว่า ยีสต์นี้มีโปรตีนรวม เท่ากับ 22.65 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่ง ดุษณี (2546) รายงานว่า โปรตีนของเซลล์ยีสต์จะมีประมาณ 45-55 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งผนังเซลล์ของยีสต์มีโปรตีนประกอบอยู่ด้วย ผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* มีโปรตีน 6-8 เปอร์เซ็นต์ (นงลักษณ์และปรีชา, 2547) ซึ่งดวงพร (2530) รายงานว่า ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ยีสต์ พบว่า ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, และ *Saccharomyces fragilis* มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 50, 55 และ 54 กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง, ไขมัน 6, 5 และ 6 กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง, ความชื้น 5, 6 และ 7 กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง, เถ้า 7, 8 และ 9 กรัมต่อ 100 กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง โซเดียม 0.3, 0.001 และ 0 กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และยีสต์ที่เหลือจากกระบวนการหมักเอทานอลมีวิตามินบีรวม ได้แก่ Thiamine, Riboflavin, Pantothentic, Niacin, Folic acid เป็นต้น นอกจากนี้ ยีสต์ยังมีกรดอะมิโนมากมาย เช่น lysine, valine, leucine, isoleucine, threonine, methionine, phenylalanine, cystine, tryptophan, histidine, tyrosine และ arginine และ Li Peng and Gatlin (2003) ใช้กากยีสต์ *Saccharomyces scerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์จากการหมักเบียร์ ซึ่งในเซลล์ยีสต์นี้ ประกอบด้วย ปริมาณโปรตีน 40% ไขมัน 10% และสารที่ให้พลังงานที่สามารถย่อยได้ 3.5 kcal/g ใช้เป็นอาหารเสริมในการเลี้ยงปลาซึ่งเป็นปลาลูกผสม ระหว่าง *Morone chrysops* x *M. saxatilis* พบว่า ช่วยทำให้ปลามีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้น สามารถต้านทานต่อการทำลายจากเชื้อก่อโรค *Streptococcus iniae* ได้

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 3

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม

1. ผลการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides*

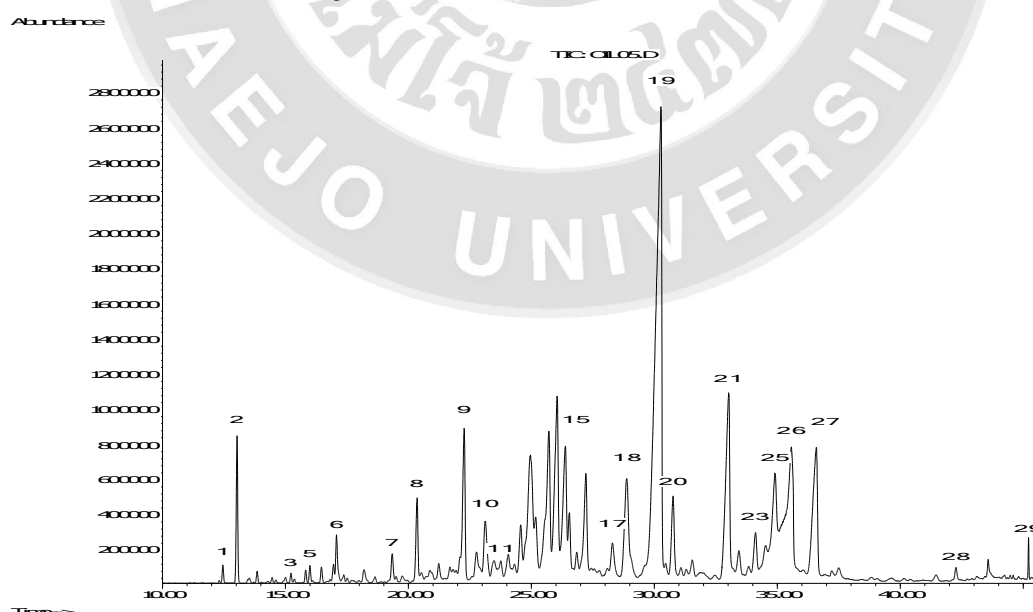
จากการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม โดยการกลั่นด้วยน้ำ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 ชั่วโมง ผลจากการสกัด ได้น้ำมันหอมระเหยที่มีลักษณะเป็นของเหลว สีเหลืองใส มีลักษณะหนืด และซึ่งน้ำหนักของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการสกัดได้เท่ากับ 0.11 กรัม คิดเป็นผลผลิตที่ได้ (Yield) จากการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมในการทดลองนี้ เท่ากับ 0.35 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเห็นได้ว่า ผลผลิตที่ได้จากการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมแห้ง มีปริมาณที่ไม่สูงมาก ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจาก ในการทดลองนี้ใช้รากหญ้าแฝกหอมที่แห้งมากเกินไป เนื่องจากปล่อยให้แห้งไว้นาน 2 สัปดาห์ จึงมีผลทำให้ผลผลิตที่ได้จากการสกัดน้ำมันหอมระเหยมีค่าน้อย แต่ในการทดลองนี้ผลผลิตที่ได้จากการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมมีค่าสูงกว่าน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* ที่รายงานโดย Singh *et al.* (1999) ที่สกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมได้ผลผลิต 0.23 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Roy *et al.* (2009) สกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมโดยการกลั่นด้วยน้ำ ได้ผลผลิตน้ำมันหอมระเหย 0.28 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง ซึ่งได้น้ำมันหอมระเหยมีลักษณะสีเหลืองออกน้ำตาลและมีกลิ่นคล้ายเนื้อไม้และมีความหนืดเล็กน้อย ซึ่ง Martinez *et al.* (2004) รายงานการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash ของบราซิลโดยการสกัดด้วย super critical CO₂ ให้ผลผลิตสูงสุดถึง 3.2 เปอร์เซ็นต์ และใช้ระยะเวลาในการสกัดน้อยกว่าวิธีการอื่น ๆ โดย Singh *et al.* (1999) อธิบายว่า ปัจจัยที่มีผลต่อผลผลิตที่ได้จากการสกัดของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมโดยวิธีกลั่นด้วยไอน้ำ ได้แก่ ความสดของรากหญ้าแฝกหอม อายุการเก็บเกี่ยวรากหญ้าแฝกหอม รวมทั้งระยะเวลาในการเก็บรักษารากหญ้าแฝกหอม คือ หากเก็บรากหญ้าแฝกหอมไว้นานเกินไปอาจมีผลทำให้ผลผลิตที่ได้จากการสกัดน้ำมันหอมระเหยลดลง นอกจากนี้ ระยะเวลาในการสกัด อาจมีผลต่อผลผลิตที่ได้ คือใช้ระยะเวลาในการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม โดยการกลั่นด้วยไอน้ำ นาน 12 ชั่วโมง สามารถสกัดได้น้ำมัน 96.9 เปอร์เซ็นต์ โดยจะได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากที่สุดในช่วง 2 ชั่วโมงแรก

ของการกลั่น นอกจากนี้ ยังพบว่า การตัดรากหญ้าแฝกหอมเป็นชิ้นขนาดเล็ก ไม่มีผลทำให้ได้น้ำมันหอมระเหยมากขึ้น ซึ่งโครงการปลูกหญ้าแฝกหอมเฉลิมพระเกียรติ (2550) รายงานว่าวิธีการที่นำมาใช้ในการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมนั้นมีผลต่อผลผลิตที่ได้คือถ้าใช้วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ จะช่วยทำให้น้ำมันหอมระเหยในพืช ระเหยออกมาเร็วกว่า ปริมาณน้ำมันมีคุณภาพดีกว่าการกลั่นด้วยน้ำ แต่ข้อดีของการกลั่นด้วยน้ำ คือ ทำได้ง่าย อุปกรณ์ในการกลั่นไม่ยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายต่ำ แต่มีข้อเสียคือ พืชจะต้องสัมผัสกับน้ำเดือดโดยตรงเป็นเวลานาน อาจมีผลทำให้องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย เปลี่ยนแปลงไปบ้าง

2. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS)

จากการนำน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม ไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี จากผลการทดลอง ได้โครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ ดังแสดงในภาพที่ 10

เมื่อเทียบ Mass spectrum ของพีคหมายเลข 1 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน (ภาพที่ 11) พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 93 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมีค่าสูง ดังนั้น สารในพีคหมายเลข 1 คาดว่าน่าจะเป็น 9,10-dehydrogen-2-norzizaene ส่วน Mass spectrum ของพีคหมายเลข 2 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมเปรียบเทียบกับ Mass



ภาพที่ 10 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม
ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS)

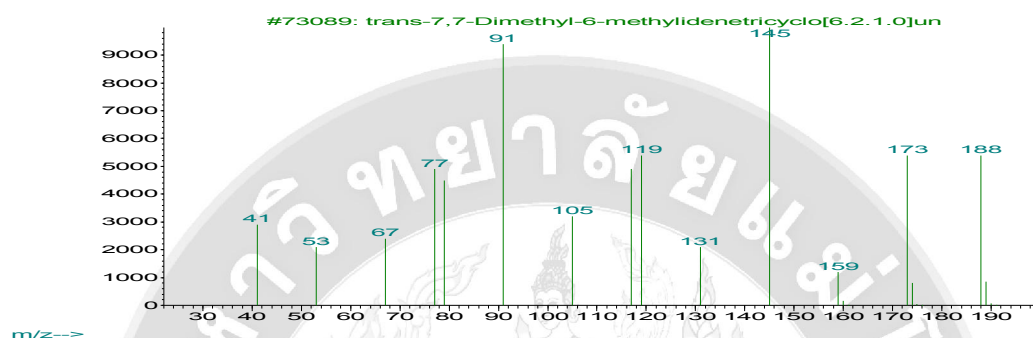
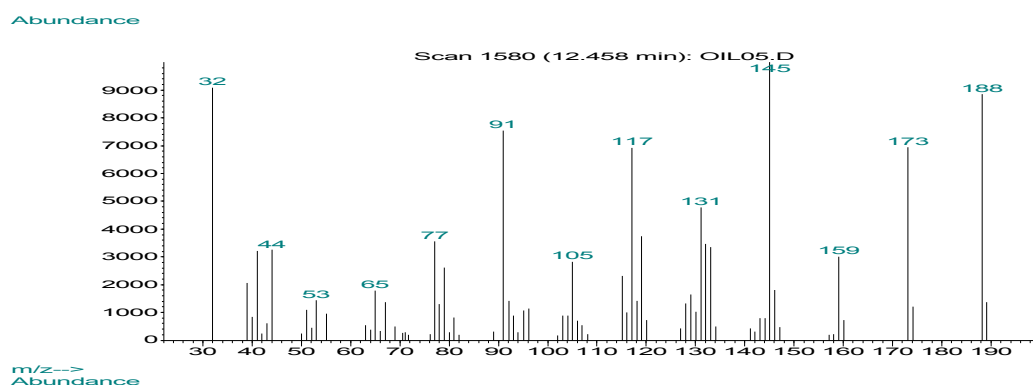
spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน เท่ากับ 89 เปอร์เซนต์ ซึ่งสารใน
 พืชหมายเลข 2 คาดว่าน่าจะเป็น 6-N-butyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (ภาพที่ 12) ใน
 พืชหมายเลข 3 ซึ่งเปรียบเทียบ Mass spectrum ของพืชหมายเลข 3 ของน้ำมันหอมระเหย
 จากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน
 เท่ากับ 94 เปอร์เซนต์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมีค่าสูง ดังนั้น สารในพืชหมายเลข 3 คาดว่า
 น่าจะเป็น Epi-bicyclosquisphellandrene (ภาพที่ 13) พืชหมายเลข 4 ของน้ำมันหอม
 ระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมเปรียบเทียบกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า มี
 เปอร์เซ็นต์ความเหมือน เท่ากับ 49 เปอร์เซนต์ ซึ่งสารในพืชหมายเลข 4 คาดว่าน่าจะเป็น
 Caryophyllene (ภาพที่ 14) แต่เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของ Mass spectrum ของน้ำมันหอม
 ระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมและสารมาตรฐาน มีค่าต่ำเล็กน้อย ซึ่งสารดังกล่าวอาจจะใช่หรือ
 ไม่ใช่ Caryophyllene จากการเปรียบเทียบ Mass spectrum ของ พืชหมายเลข 5 ของน้ำมัน
 หอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์
 เท่ากับ 93 เปอร์เซนต์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมีค่าสูง ดังนั้น สารในพืชหมายเลข 5 คาดว่า
 น่าจะเป็น Khusimene (ภาพที่ 15) ในพืชหมายเลข 6 เมื่อเปรียบเทียบ Mass spectrum
 ของพืชหมายเลข 6 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสาร
 มาตรฐาน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน เท่ากับ 98 เปอร์เซนต์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมี
 ค่าสูง ดังนั้น สารในพืชหมายเลข 6 คาดว่าน่าจะเป็น Alpha-amorphene (ภาพที่ 16) เมื่อ
 เปรียบเทียบ Mass spectrum ของพืชหมายเลข 7 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้า
 แฝกหอมกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน เท่ากับ 93
 เปอร์เซนต์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมีค่าสูง ดังนั้น สารในพืชหมายเลข 7 คาดว่าน่าจะเป็น
 (+)-(6S,10R)-6,10- dimethylbicyclo(4,4,0)dec-1-en-3-one (ภาพที่ 17) พืชหมายเลข 8
 เมื่อเทียบ Mass spectrum ของพืชหมายเลข 8 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม
 กับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า เปอร์เซนต์ความเหมือน เท่ากับ 66 เปอร์เซนต์
 ซึ่งสารในพืชหมายเลข 8 คาดว่าน่าจะเป็น Eudesma-4(14),11-diene (ภาพที่ 18) เมื่อเทียบ
 Mass spectrum ของพืชหมายเลข 9 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass
 spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน เท่ากับ 97 เปอร์เซนต์ ซึ่ง
 เปอร์เซ็นต์ความเหมือนมีค่าสูง ดังนั้น สารในพืชหมายเลข 9 คาดว่าน่าจะเป็น Khusimone
 (ภาพที่ 19) ในพืชหมายเลข 10 เมื่อเทียบ Mass spectrum ของน้ำมันหอมระเหยจากราก
 หญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน เท่ากับ
 81 เปอร์เซนต์ ซึ่งสารในพืชหมายเลข 10 คาดว่าน่าจะเป็น (+)-Longifolene (ภาพที่ 20) ใน

ภาพที่ 18 เป็นการเปรียบเทียบ Mass spectrum ของพืชหมายเลข 11 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมีค่าสูง ดังนั้น สารในพืชหมายเลข 11 คาดว่าน่าจะเป็น Alpha-gurjunene (ภาพที่ 21) เมื่อเปรียบเทียบ Mass spectrum ของพืชหมายเลข 12 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมีค่าสูง ดังนั้น สารในพืชหมายเลข 12 คาดว่าน่าจะเป็น Epi-zonaren (ภาพที่ 22) ในพืชหมายเลข 13 เมื่อเทียบ Mass spectrum ของพืชหมายเลข 13 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมีค่าสูง ดังนั้น สารในพืชหมายเลข 13 คาดว่าน่าจะเป็น Valencene (ภาพที่ 23) พืชหมายเลข 14 เมื่อเปรียบเทียบ Mass spectrum ของพืชหมายเลข 14 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 35 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสารในพืชหมายเลข 14 คาดว่าน่าจะเป็น 2,2,6-Trimethyl-1-(2-methyl-cyclobut-2-enyl)-hepta-4,6-dien-3-one (ภาพที่ 24) แต่เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน มีค่าต่ำเล็กน้อย ซึ่งอาจทำให้ใช่หรือไม่ใช่สารดังกล่าว พืชหมายเลข 15 เมื่อเทียบ Mass spectrum ของพืชหมายเลข 15 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า ไม่มีความเหมือนกันกับสารมาตรฐานใด ๆ จึงไม่สามารถระบุชื่อสารของพืชหมายเลข 15 ได้ (ภาพที่ 25) เมื่อเปรียบเทียบ Mass spectrum ของพืชหมายเลข 16 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า ไม่มีความเหมือนกันกับสารมาตรฐานใด ๆ จึงไม่สามารถระบุชื่อสารของพืชหมายเลข 16 ได้ (ภาพที่ 26) พืชหมายเลข 17 เมื่อเทียบ Mass spectrum ของพืชหมายเลข 17 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมีค่าสูง ดังนั้น สารในพืชหมายเลข 17 คาดว่าน่าจะเป็น Nepthalene,1,2,4a,5,8,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1(1-methylethyl) (1.alpha., 4a.beta., 8a. alpha.) (ภาพที่ 27) พืชหมายเลข 18 เมื่อเทียบ Mass spectrum ของพืชหมายเลข 18 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า ไม่มีความเหมือนกันกับสารมาตรฐาน จึงไม่สามารถระบุชื่อสารของพืชหมายเลข 18 ได้ (ภาพที่ 28) ในพืชหมายเลข 19 เมื่อเทียบ Mass spectrum ของพืชหมายเลข 19 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสาร

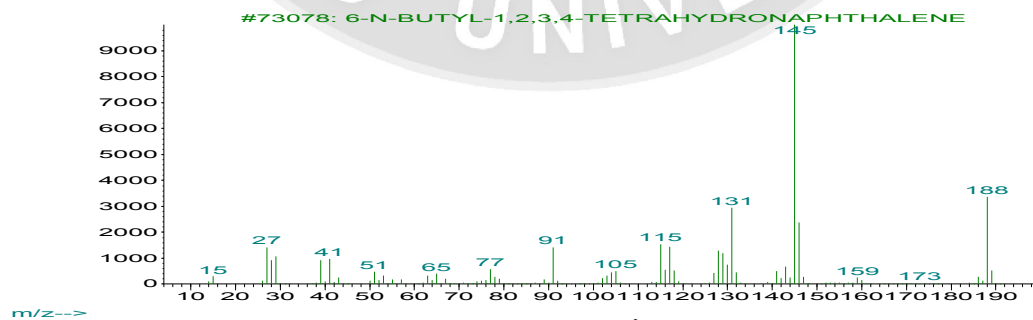
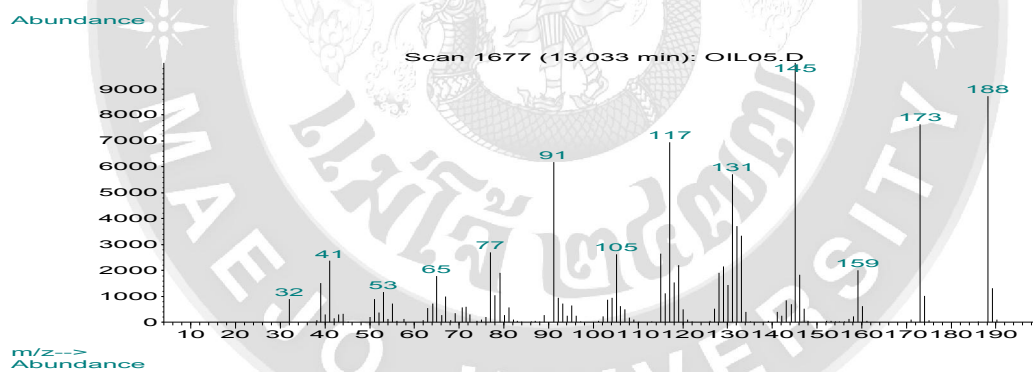
มาตรฐาน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน เท่ากับ 92 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมีค่าสูง ดังนั้น สารในพิกหมายเลข 19 คาดว่าน่าจะเป็น 9,10-dehydro-isolongifolene (ภาพที่ 29) พิกหมายเลข 20 เมื่อเทียบ Mass spectrum ของพิกหมายเลข 20 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า ไม่มีความเหมือนกันกับสารมาตรฐานใด ๆ จึงไม่สามารถระบุชื่อสารของพิกหมายเลข 20 ได้ (ภาพที่ 30) พิกหมายเลข 21 เมื่อเทียบ Mass spectrum ของพิกหมายเลข 21 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน เท่ากับ 46 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสารในพิกหมายเลข 21 คาดว่าน่าจะเป็น 7-(1-methyl-ethenyl)-1-hydroxy-1,4-dimethyl-1,2,4,5-[3H,6H] octahydroazulene (ภาพที่ 31) แต่เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน มีค่าต่ำเล็กน้อย ซึ่งอาจจะใช่หรือไม่ใช่สารดังกล่าวในพิกหมายเลข 22 เมื่อเทียบ Mass spectrum ของพิกหมายเลข 22 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน เท่ากับ 86 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมีค่าสูง ดังนั้น สารในพิกหมายเลข 22 คาดว่าน่าจะเป็น (E)-1,2,4,4-tetramethyl-3-(3'-methyl-1', 3'-butadienyl)-2-cyclohexen-1-ol (ภาพที่ 32) พิกหมายเลข 23 เมื่อเทียบ Mass spectrum ของพิกหมายเลข 23 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมีค่าสูง ดังนั้น สารในพิกหมายเลข 23 คาดว่าน่าจะเป็น Nootkatone (ภาพที่ 33) เมื่อเปรียบเทียบ Mass spectrum ของพิกหมายเลข 24 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน เท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสารในพิกหมายเลข 24 คาดว่าน่าจะเป็น Khusenin acid (ภาพที่ 34) พิกหมายเลข 25 เมื่อเทียบ Mass spectrum ของพิกหมายเลข 25 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน เท่ากับ 38 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสารในพิกหมายเลข 25 คาดว่าน่าจะเป็น 2-Naphthalenecarboxylic acid, 8-ethenyl-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-5-methylene (ภาพที่ 35) แต่เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน มีค่าต่ำเล็กน้อย ในพิกหมายเลข 26 เมื่อเปรียบเทียบ Mass spectrum ของพิกหมายเลข 26 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน เท่ากับ 64 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสารในพิกหมายเลข 26 คาดว่าน่าจะเป็น 1H-3a,6-methanoazulene-3-carboxylic acid, octahydro-7,7-dimethyl-8-methylene-, [3S-(3.alpha.,3a.alpha.,6.alpha.,8a.alpha.)] (ภาพที่ 36) พิกหมายเลข 27

เมื่อเทียบ Mass spectrum ของพีคหมายเลข 27 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม กับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน เท่ากับ 41 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสารในพีคหมายเลข 27 คาดว่าน่าจะเป็น Zierone (ภาพที่ 37) แต่เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน มีค่าต่ำเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบ Mass spectrum ของพีคหมายเลข 28 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า ไม่มีความเหมือนกันกับสารมาตรฐานใด ๆ จึงไม่สามารถระบุชื่อสารของพีคหมายเลข 28 ได้ (ภาพที่ 38) พีคหมายเลข 29 เมื่อเทียบ Mass spectrum ของพีคหมายเลข 29 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมกับ Mass spectrum ของสารมาตรฐาน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน เท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมีค่าสูง ดังนั้น สารในพีคหมายเลข 29 คาดว่าน่าจะเป็น Hexadecanoic acid (ภาพที่ 39)

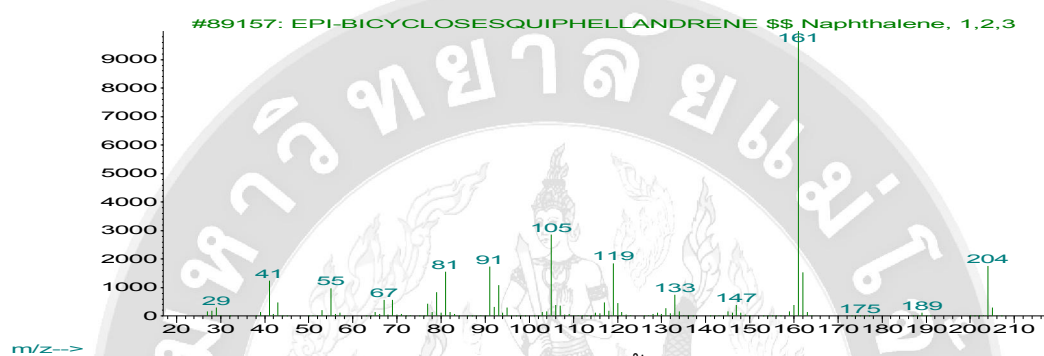
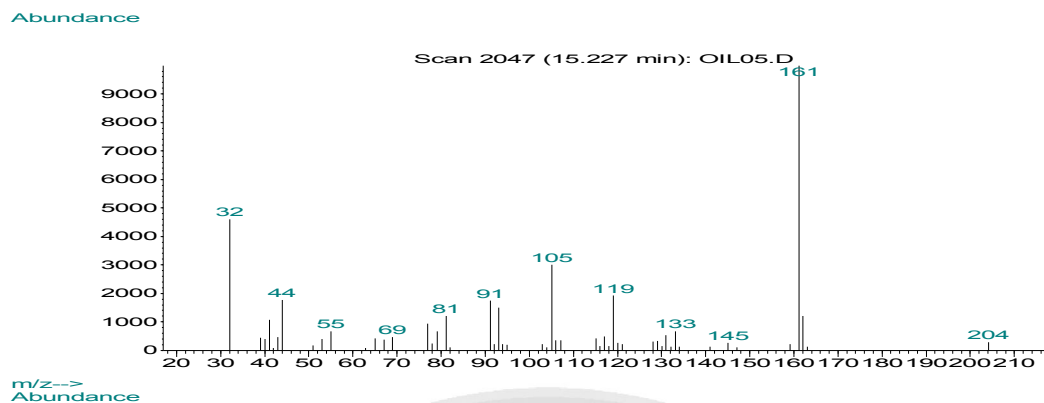
จากผลการทดลองนี้ จะเห็นได้ว่า มีพีคหลักโดยดูจากพื้นที่ใต้พีคที่มีมากกว่าสารอื่น ๆ อยู่จำนวน 5 พีคหลัก คือ พีคที่ 14 ซึ่งมี Retention time เท่ากับ 25.71 มีพื้นที่ใต้พีคเท่ากับ 5.17 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสาร 2,2,6-Trimethyl-1-(2-methyl-cyclobut-2-enyl)-hepta-4,6-dien-3-one พีคที่ 19 ซึ่งมี Retention time เท่ากับ 30.27 มีพื้นที่ใต้พีคเท่ากับ 22.91 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสาร (E)-1,2,4,4-tetramethyl-3-(3'-methyl-1',3'-butadienyl)-2-cyclohexen-1-ol พีคที่ 21 ซึ่งมี Retention time เท่ากับ 33.02 มีพื้นที่ใต้พีคเท่ากับ 6.04 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสาร 7-(1-methyl-ethenyl)-1-hydroxy-1,4-dimethyl-1,2,4,5-[3H,6H] octahydroazulene พีคที่ 26 ซึ่งมี Retention time เท่ากับ 35.57 มีพื้นที่ใต้พีคเท่ากับ 7.73 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสาร 1H-3a,6-methanoazulene-3-carboxylic acid, octahydro-7,7-dimethyl-8-methylene-, [3S- 3.alpha., 3a.alpha., (6.alpha. 8a.alpha.)] พีคที่ 27 ซึ่งมี Retention time เท่ากับ 36.59 มีพื้นที่ใต้พีคเท่ากับ 4.67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสาร Zierone



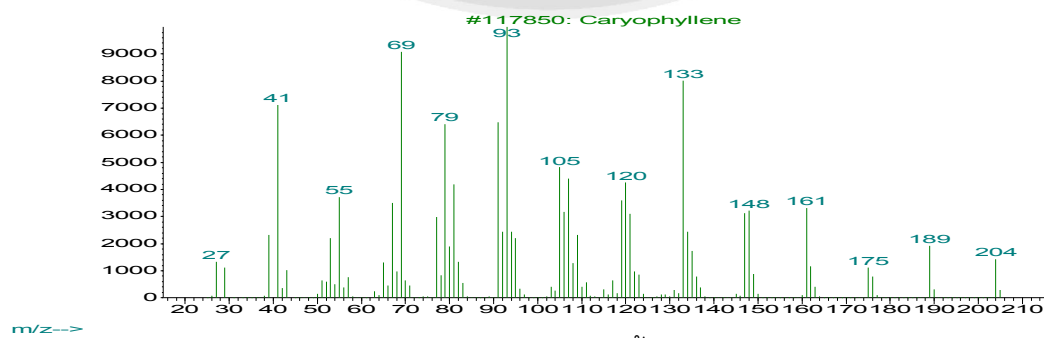
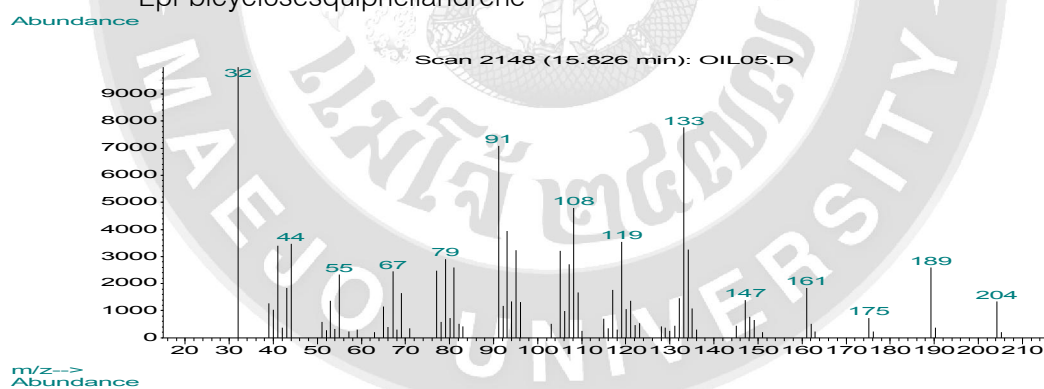
ภาพที่ 11 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 1 ของน้ำมันหอมระเหย
จากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ 9,10-
dehydrogen-2-norizaene



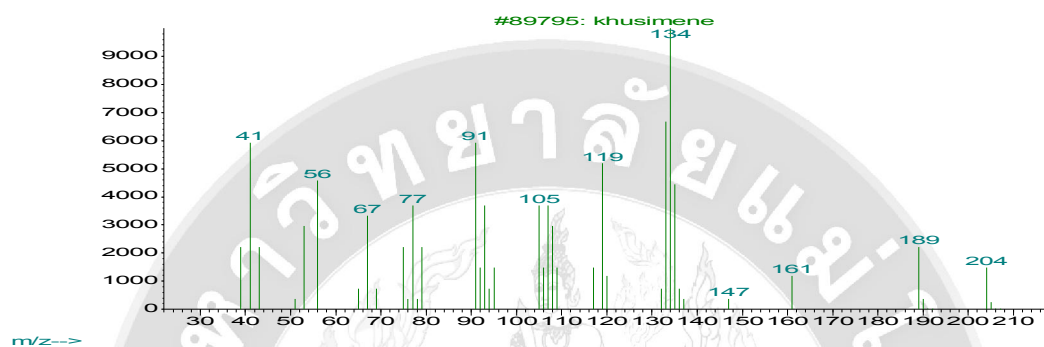
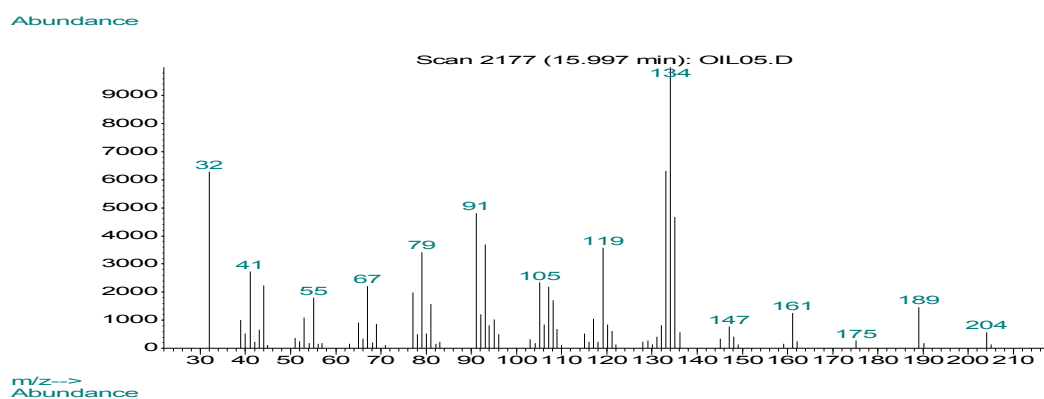
ภาพที่ 12 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 2 ของน้ำมันหอมระเหย
จากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ 6-N-butyl-
1,2,3,4-tetrahydronaphthalene



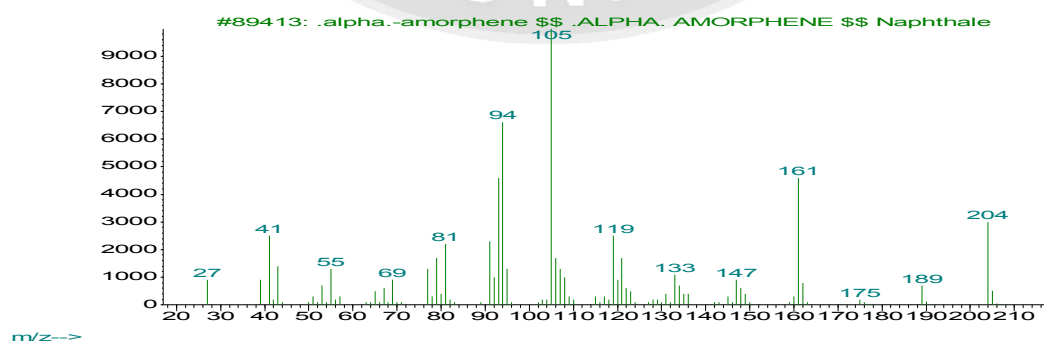
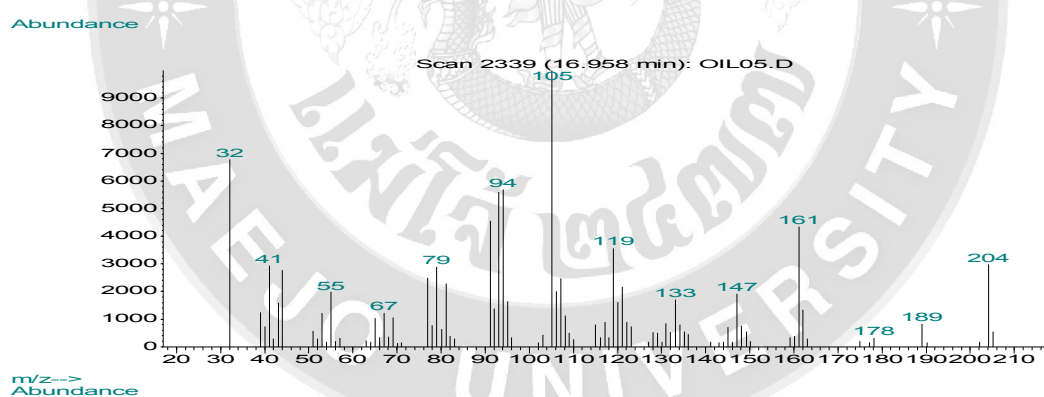
ภาพที่ 13 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 3 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Epi-bicyclosquiphellandrene



ภาพที่ 14 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 4 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Caryophyllene

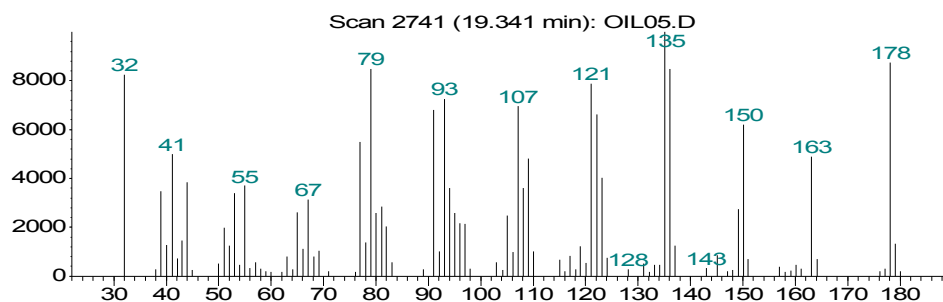
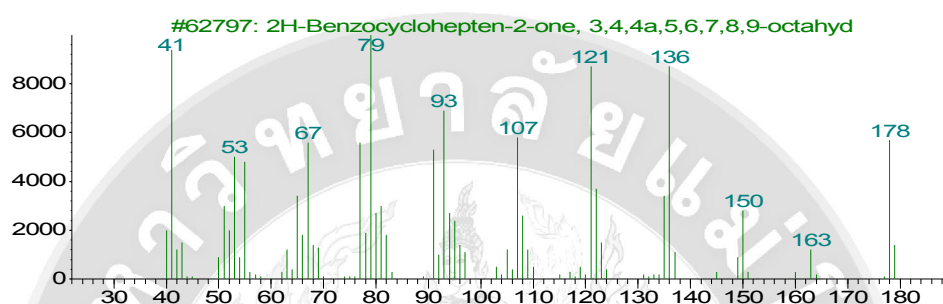


ภาพที่ 15 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 5 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Khusimene



ภาพที่ 16 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 6 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Alpha-amorphene

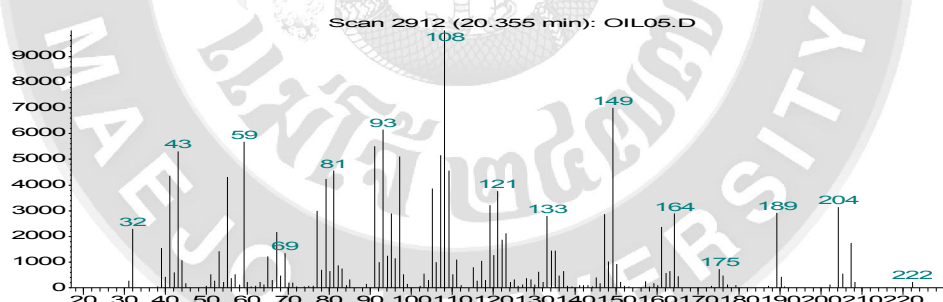
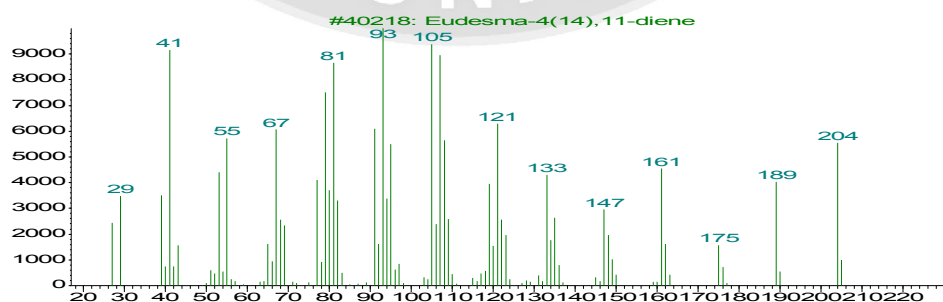
Abundance

m/z-->
Abundance

m/z-->

ภาพที่ 17 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 7 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ 2H-Benzocyclohepten-2-one,3,4,4a,5,6,7,8,9-octahyd

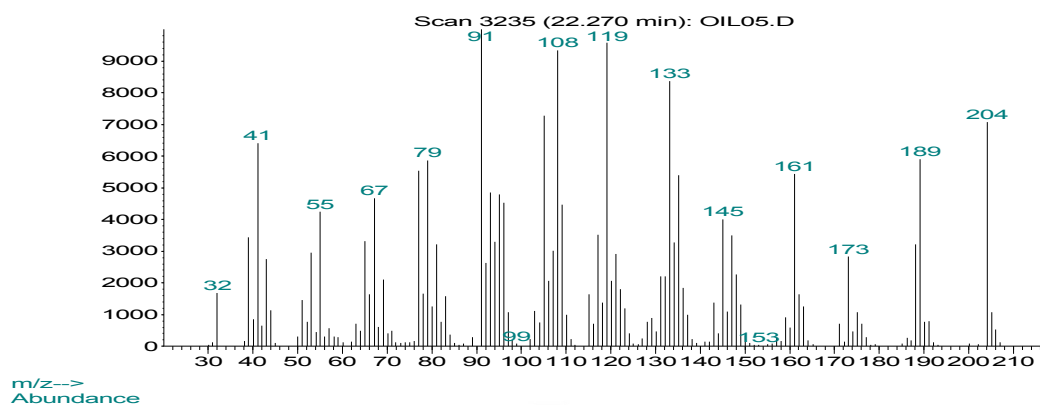
Abundance

m/z-->
Abundance

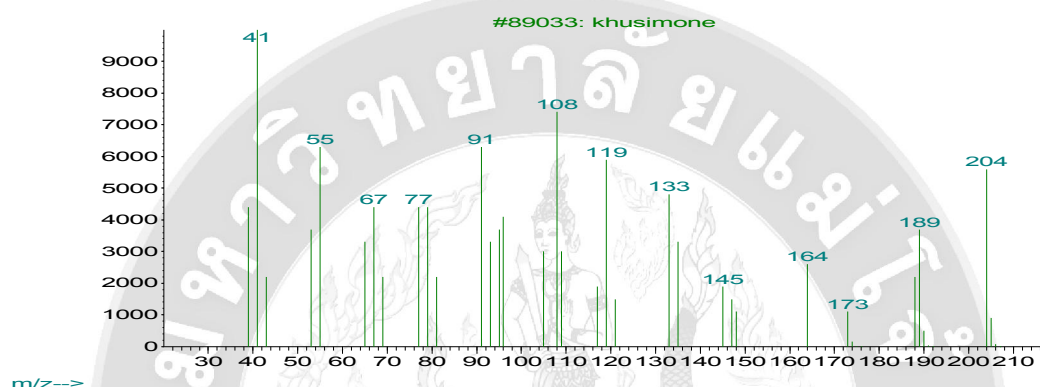
m/z-->

ภาพที่ 18 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 8 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Eudesma-4(14),11-diene

Abundance

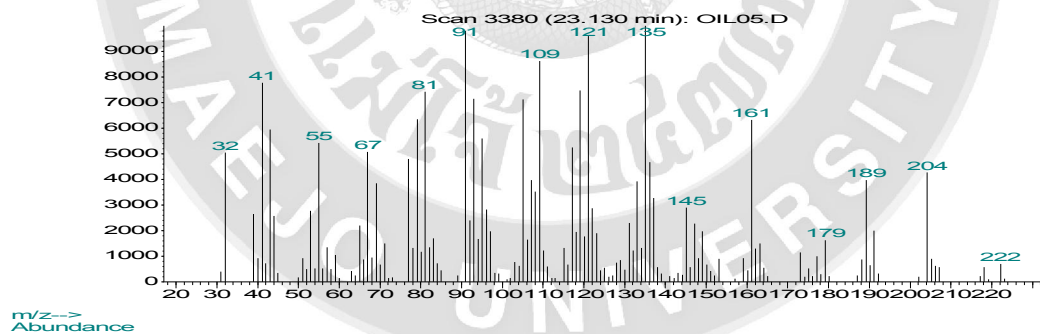


Abundance

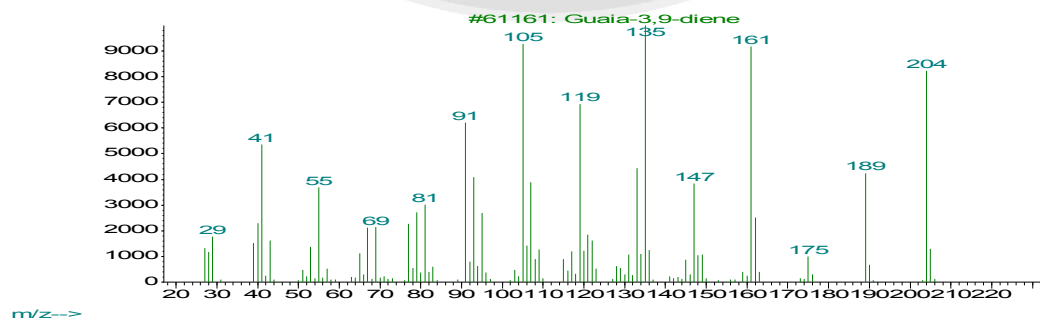


ภาพที่ 19 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 9 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Khusimone

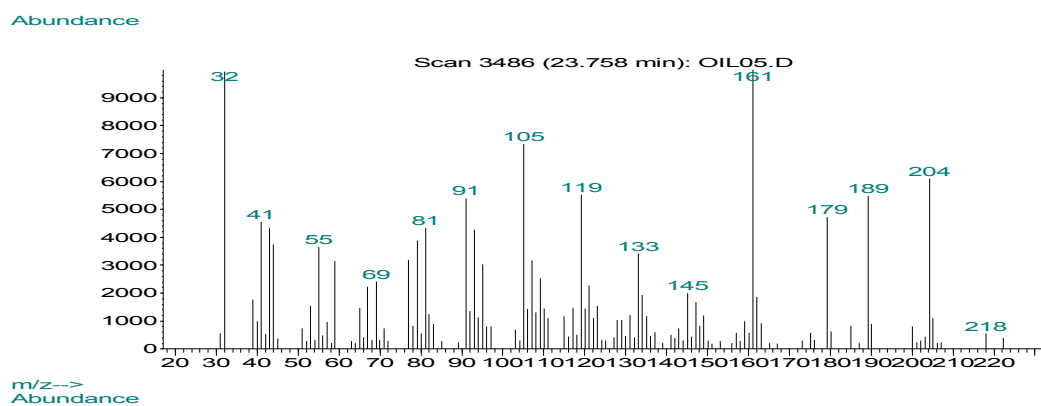
Abundance



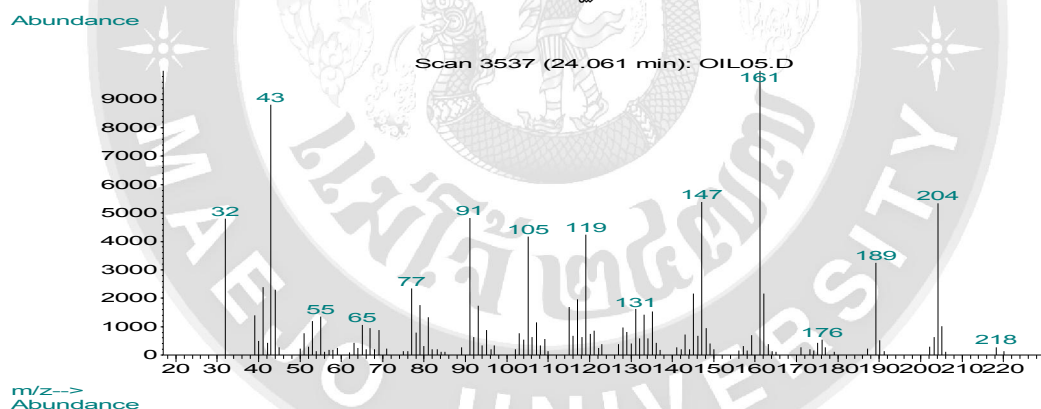
Abundance



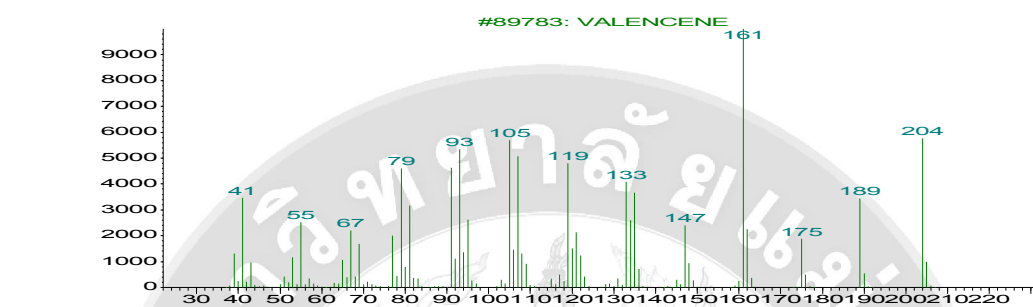
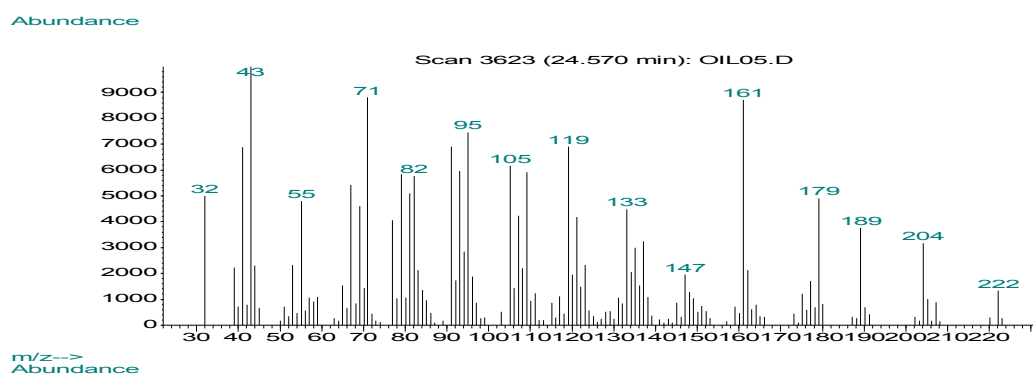
ภาพที่ 20 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 10 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Guaia-3-diene



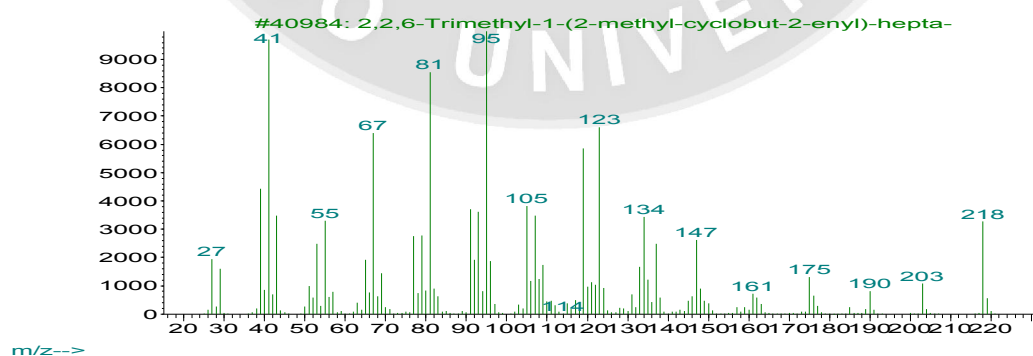
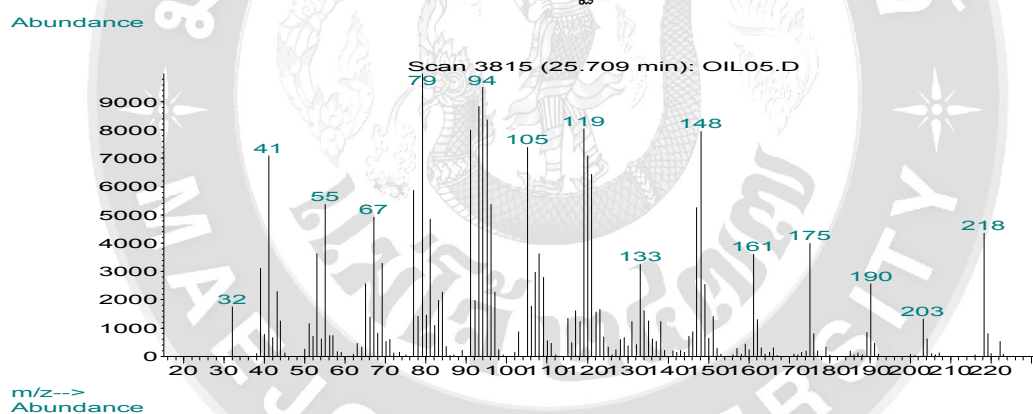
ภาพที่ 21 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 11 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Alpha-gurjunene



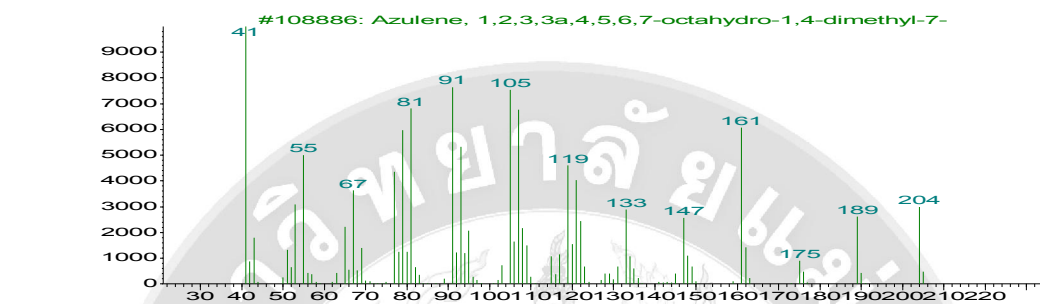
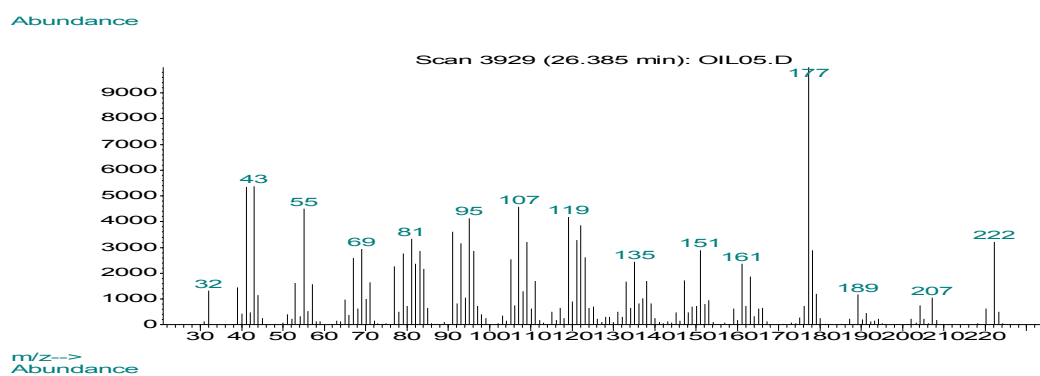
ภาพที่ 22 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 12 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Epi-zonaren



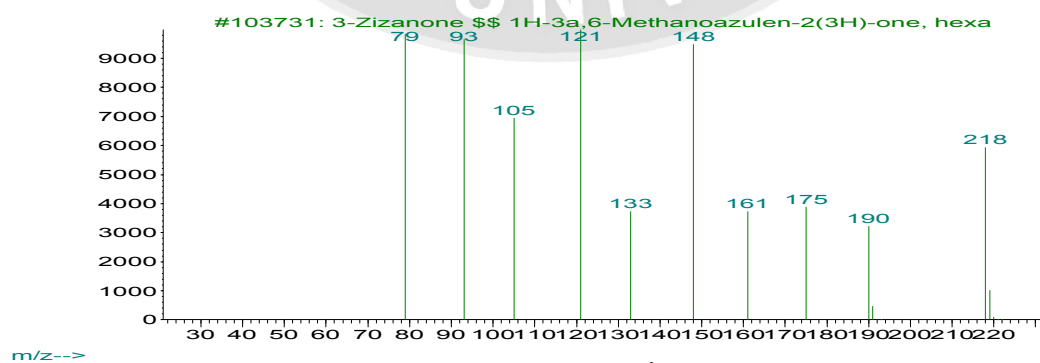
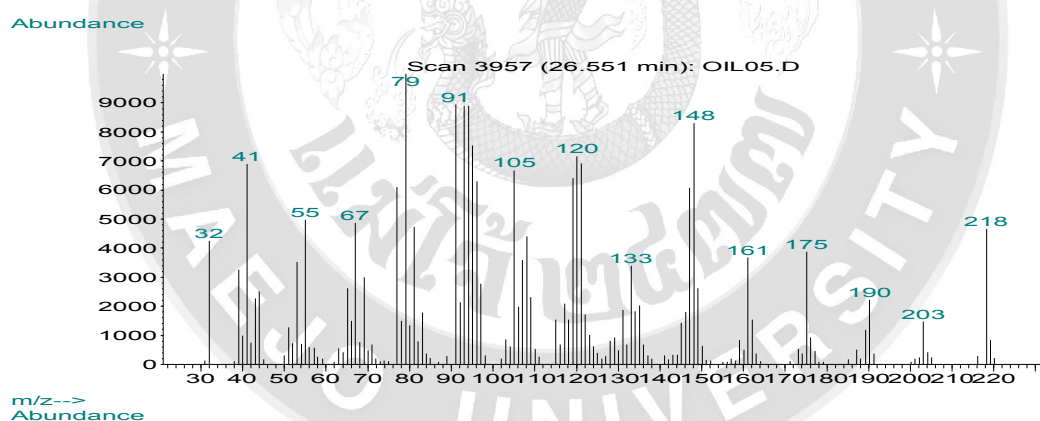
ภาพที่ 23 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 13 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Valencene



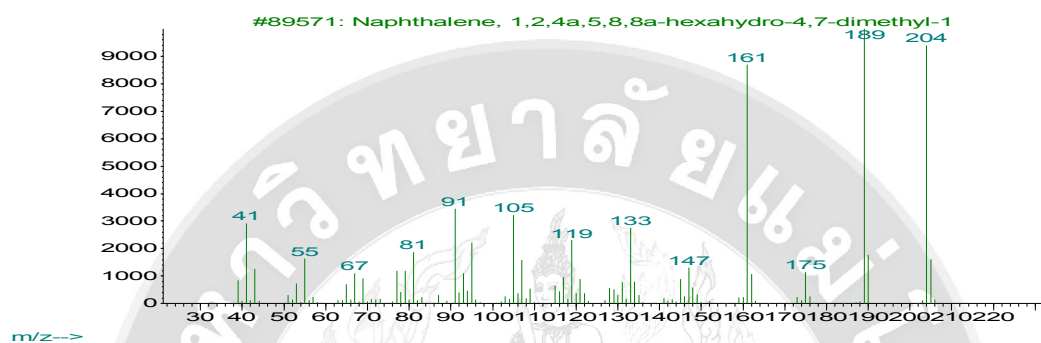
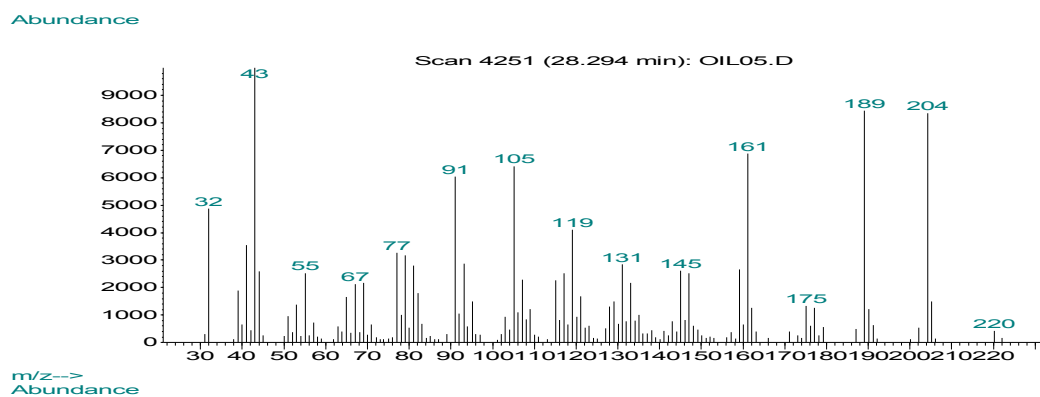
ภาพที่ 24 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 14 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ 2,2,6-Trimethyl-1-(2-methyl-cyclobut-2-enyl)-hepta-4,6-dien-3-one



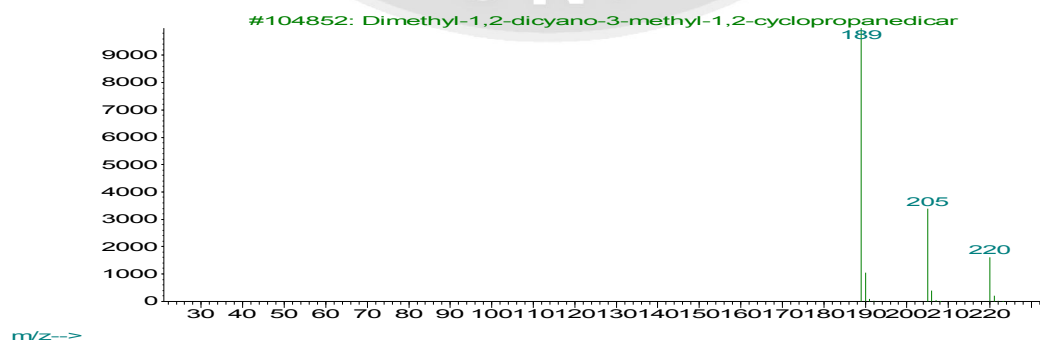
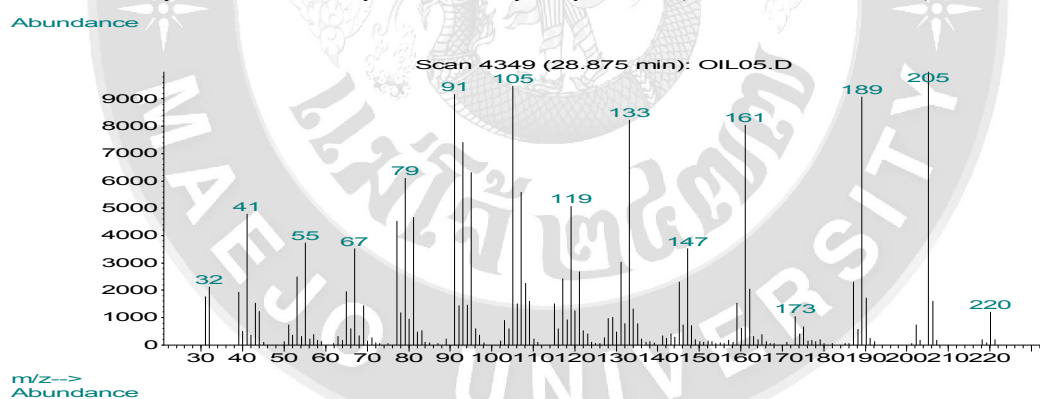
ภาพที่ 25 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 15 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้า
แฝกหอม



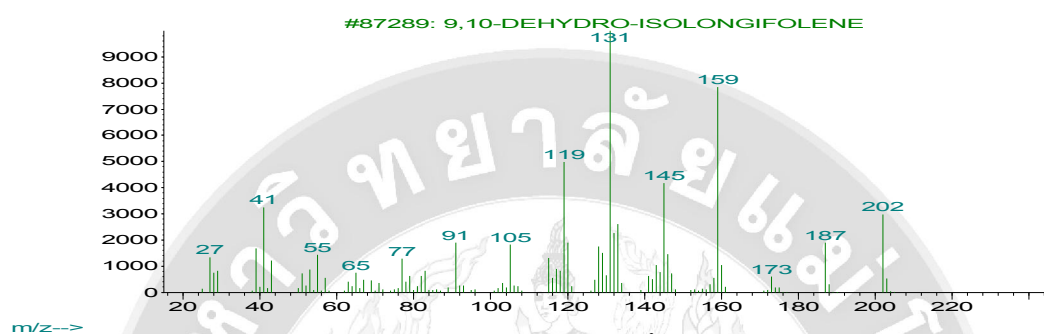
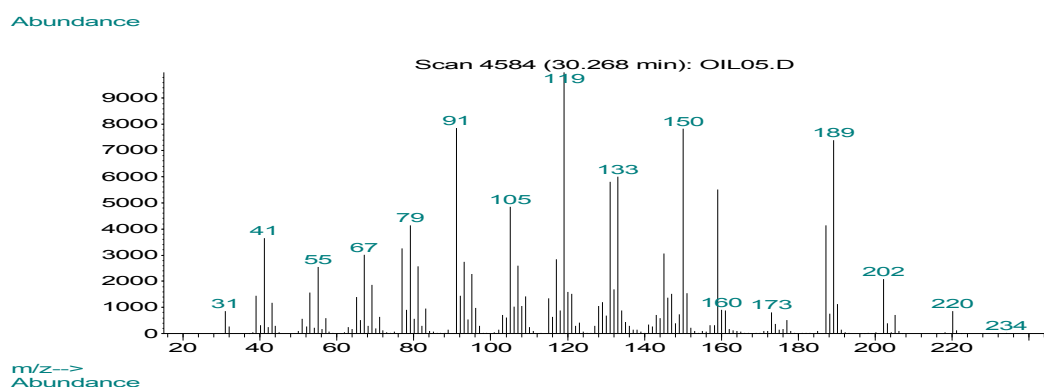
ภาพที่ 26 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 16 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้า
แฝกหอม



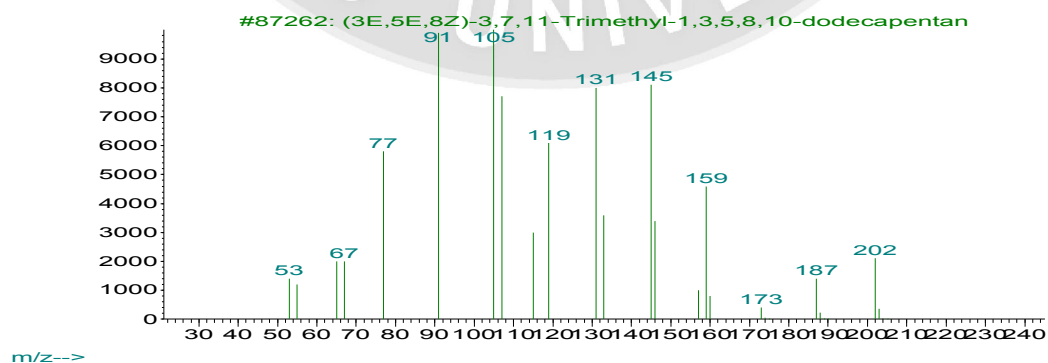
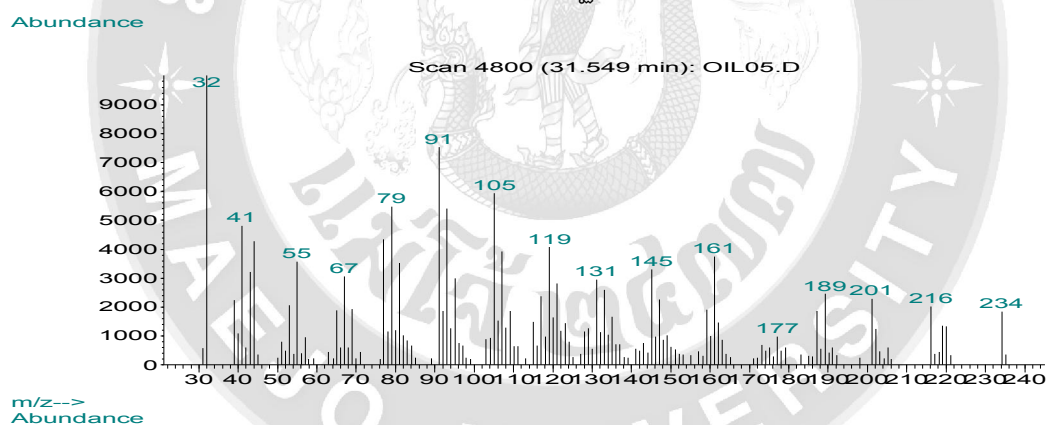
ภาพที่ 27 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 17 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Nepthalene, 1,2,4a,5,8,8a-Hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.beta.,8a. alpha.) – (.+.-.)



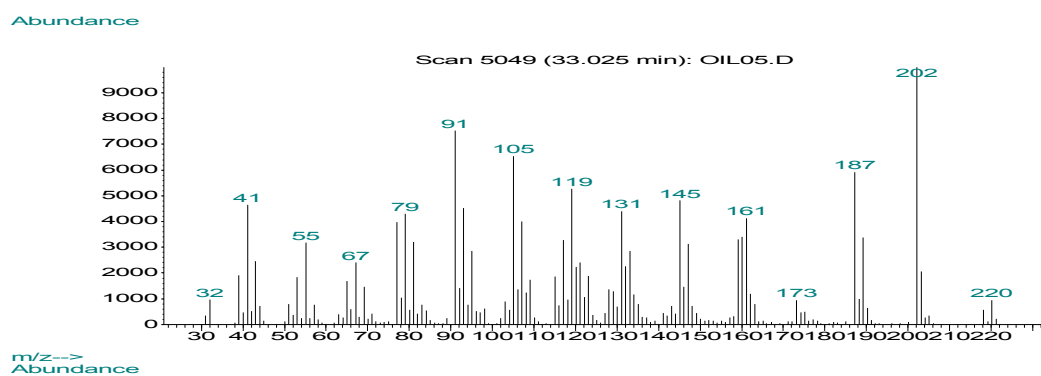
ภาพที่ 28 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 18 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม



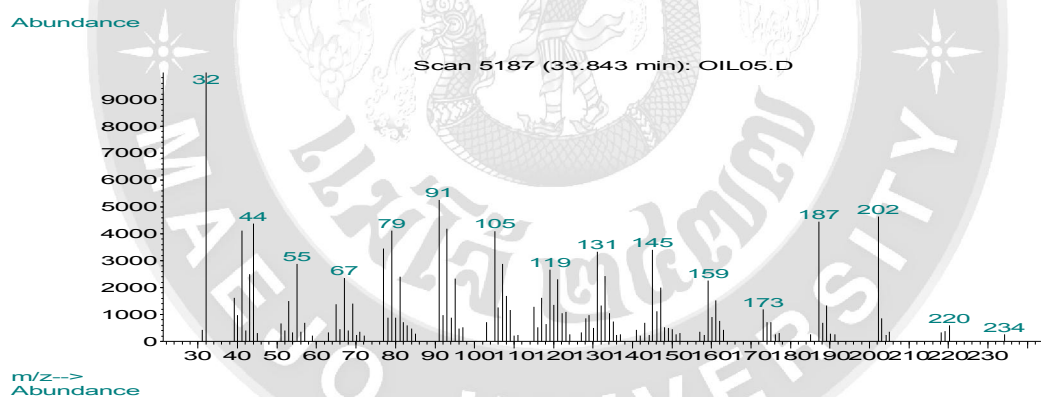
ภาพที่ 29 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 19 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้า
แฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ 9,10-dehydro-isolongifolene



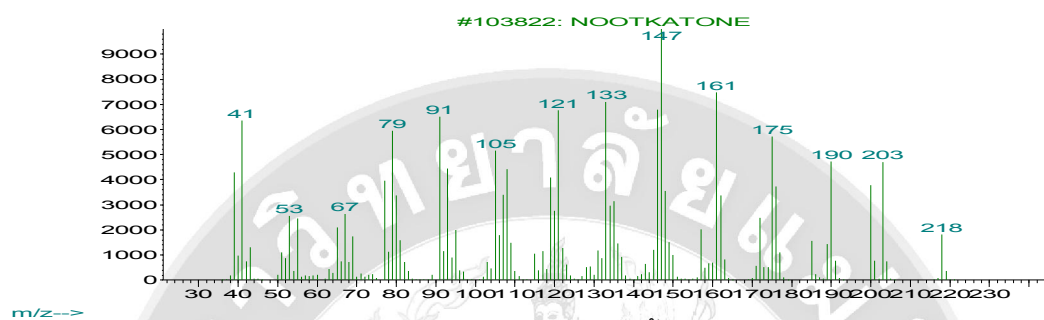
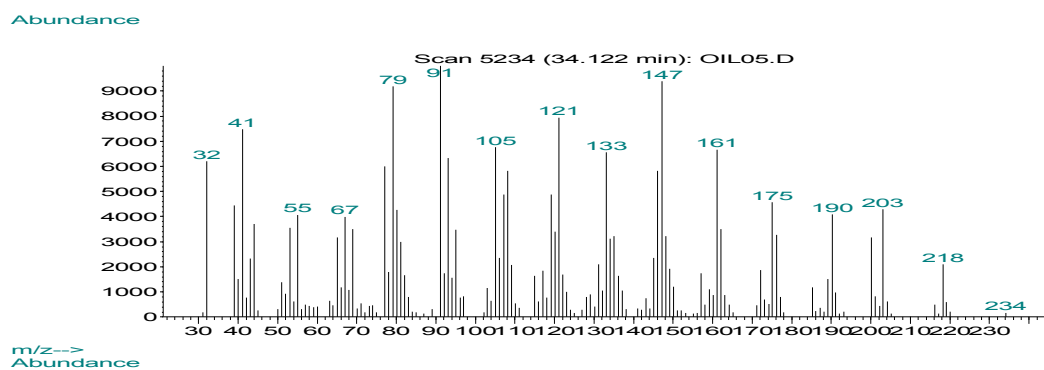
ภาพที่ 30 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 20 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้า
แฝกหอม



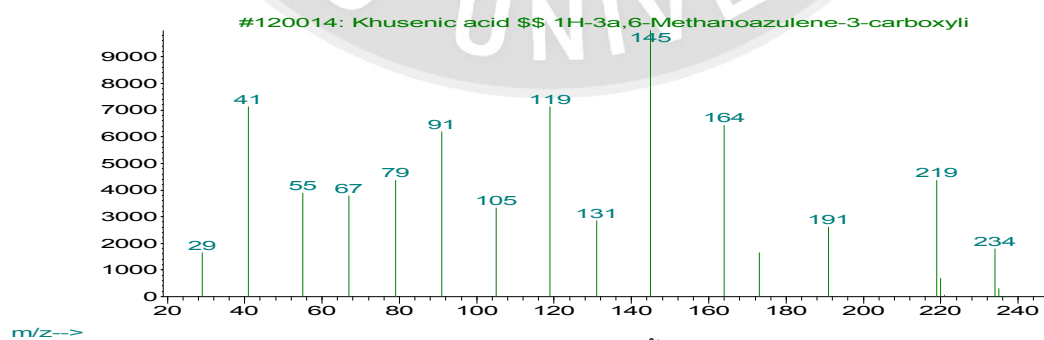
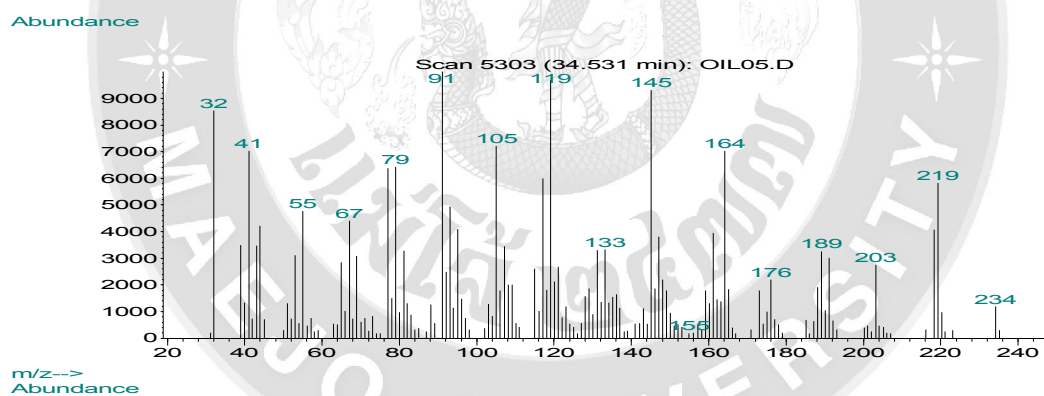
ภาพที่ 31 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 21 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้า
เผือกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ 7-(1-methyl-ethenyl)-1-hydroxy-
1,4-dimethyl-1,2,4,5-[3H,6H] octahydroazulene



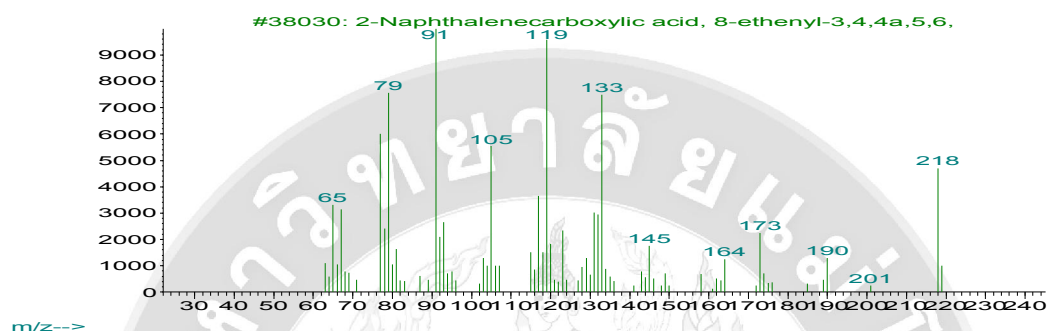
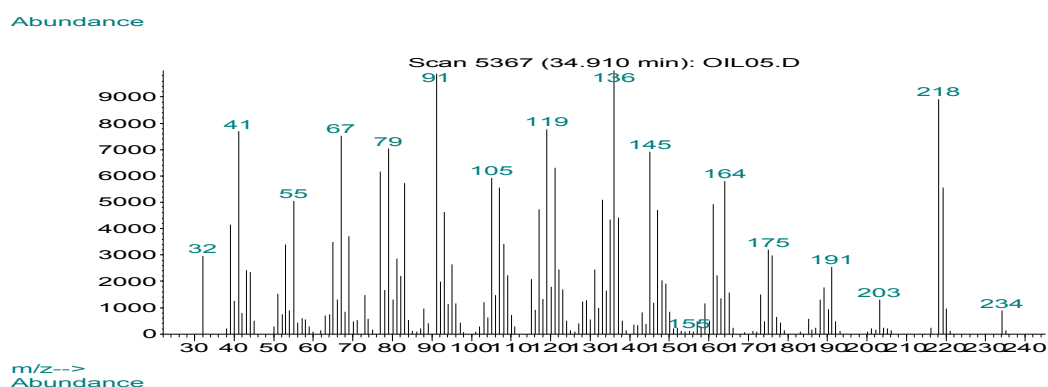
ภาพที่ 32 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 22 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้า
เผือกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ (E)-1,2,4,4-tetramethyl-3-(3'-
methyl-1',3'-butadienyl)-2-cyclohexen-1-ol



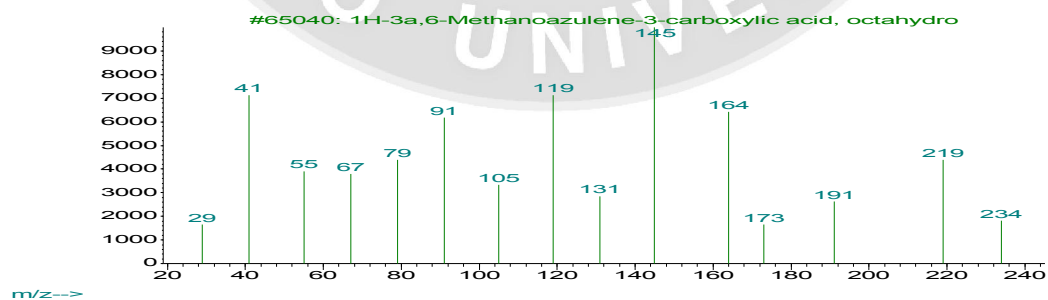
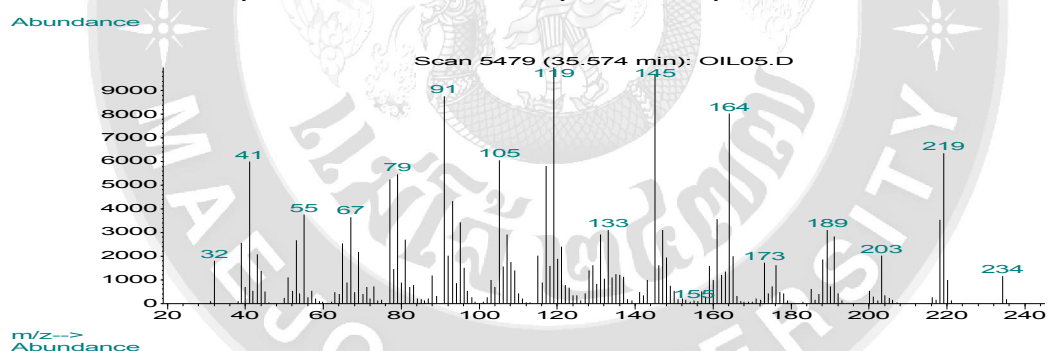
ภาพที่ 33 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 23 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้า
แฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Nootkatone



ภาพที่ 34 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 24 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้า
แฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Khusenik acid

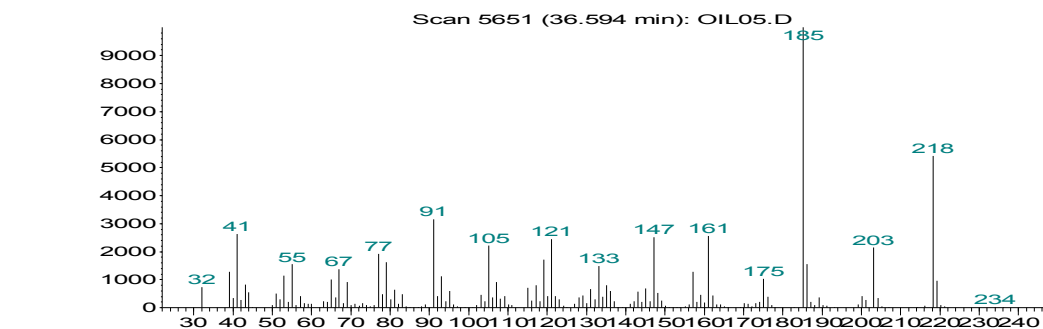


ภาพที่ 35 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 25 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ 2-Naphthalenecarboxylic acid, 8-ethenyl-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-5-methylene

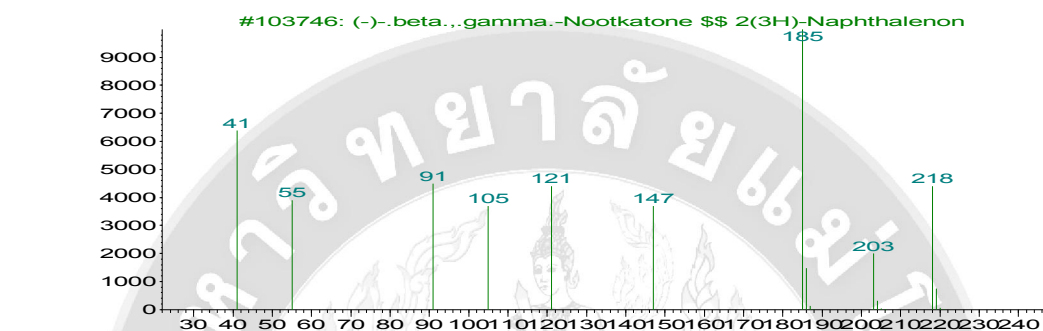


ภาพที่ 36 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 26 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ 1H-3a,6-methanoazulene-3-carboxylic acid, octahydro-7,7-dimethyl-8-methylene-[3S-(3.alpha., 3a.alpha.,6.alpha.,8a.alpha.)]

Abundance

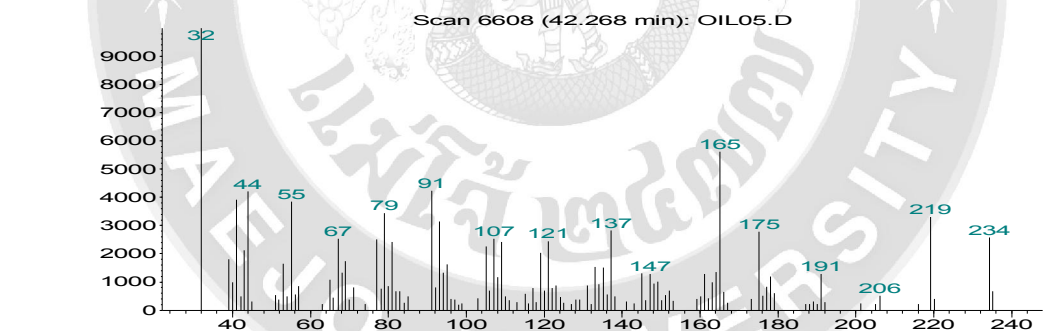


Abundance

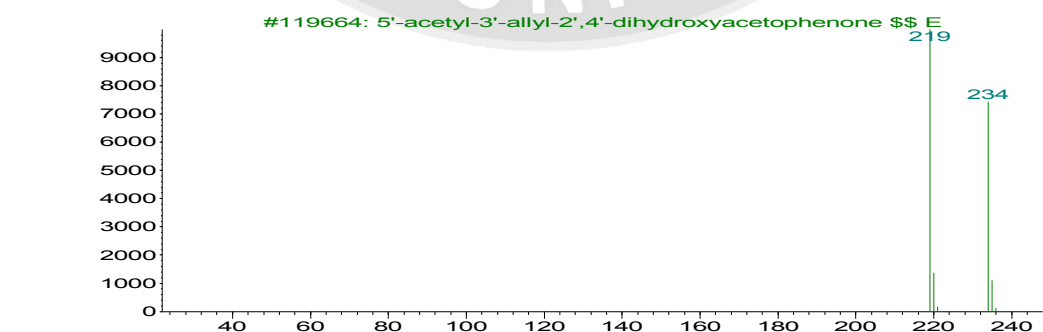


ภาพที่ 37 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 27 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้า
เผือกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Zierone

Abundance



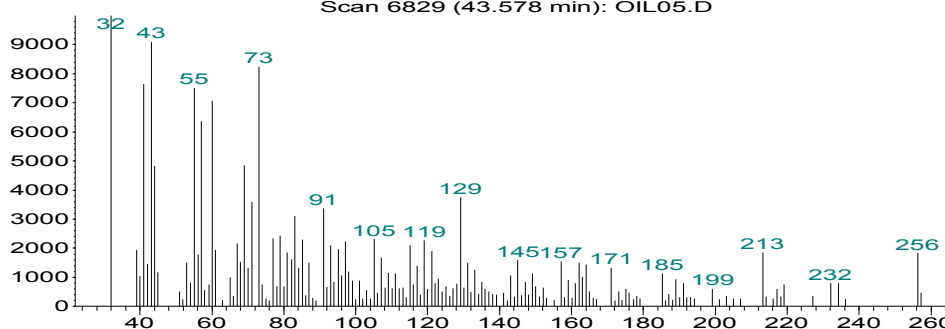
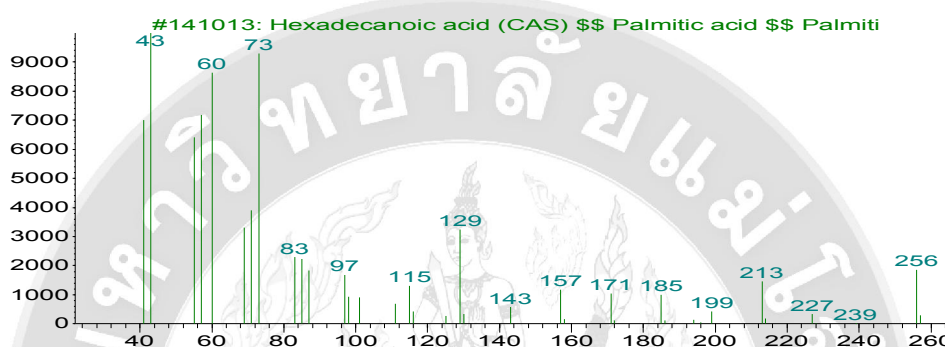
Abundance



ภาพที่ 38 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 28 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้า
เผือกหอม

Abundance

Scan 6829 (43.578 min): OIL05.D

m/z-->
Abundance

m/z-->

ภาพที่ 39 Mass spectrum ของพีคหมายเลข 29 ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้า
แฝกหอม และ Mass spectrum มาตรฐานของ Hexadecanoic acid

ในการทดลองนี้ จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้า
แฝกหอม *Vetiveria zizanioides* ด้วย GC-MS พบสารที่จัดอยู่ในกลุ่ม sesquiterpenes
ได้แก่ 9,10-dehydrogen-2-norzizaene, 6-N-butyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene, Epi-
bicyclosesquiphellandrene, Caryophyllene, Khusimene, Alpha-amorphene, Eudesma-
4(14),11-diene, (+)-Longifolene, Alpha-gurjunene, Epi-zonaren, Valencene,
Nepthalene, 1,2,4a,5,8,8a-hexahydro-4,7- dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.
beta.,8a. alpha.) – (+-), 9,10-dehydro-isolongifolene, 7- (1-methyl-ethenyl) - 1-
hydroxy - 1,4 - dimethyl- 1,2,4,5-[3H,6H] octahydroazulene และพบสารที่อยู่ในกลุ่ม
ketone ได้แก่ (+)-(6S,10R)-6,10-dimethylbicyclo(4,4,0)dec-1-en-3-one, Khusimone,
2,2,6-Trimethyl-1-(2-methyl-cyclobut-2-enyl)-hepta-4,6-dien-3-one, Nootkatone,
Zierone และพบสารในกลุ่ม alcohol ได้แก่ (E)-1,2,4,4-tetramethyl-3-(3'-methyl-1',3'-
butadienyl)-2-cyclohexen-1-ol นอกจากนี้ ในการทดลองนี้ ยังพบสารในกลุ่ม carboxylic
acid ได้แก่ Khusenic acid, 2-Naphthalenecarboxylic acid, 8-ethenyl - 3,4, 4a, 5,6,7,8,

8a- octahydro-5-methylene, 1H-3a,6-methanoazulene-3-carboxylic acid, octahydro-7,7- dimethyl - 8 - methylene-, [3S - (3.alpha., 3a.alpha., 6.alpha., 8a.alpha.)] และ Hexadecanoic acid จากรายงานของ Patcharee *et al.* (2006) พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* มีสาร 9,10-dehydrogen-2-norizaene, Khusimene, Alpha-amorphene,(+)-(6S,10R)-6,10-dimethylbicyclo(4,4,0)dec-1-en-3-one, Khusimone, Nootkatone และ 9,10-dehydro-isolongifolene ซึ่งในการทดลองนี้ ก็พบสารทั้ง 7 ชนิดเช่นเดียวกัน สารดังกล่าวจัดเป็นสารในกลุ่ม sesquiterpenes และอนุพันธ์ของ sesquiterpenes ซึ่งพบเป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม Roy *et al.* (2009) พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม มีองค์ประกอบคือ sesquiterpene และอนุพันธ์ของ sesquiterpene โดยมีองค์ประกอบหลักคือ γ -cadinene, Clovene, amorphene, aromadendrene, junipene, β -bisabolene, cis-caryophyllene, khusimol, epiglobulol, spthulenal, khusinol, khusinone, khusimone, khusinol acetate และในน้ำมันหอมระเหยยังประกอบด้วย eugenol, isougenol, khusinol acetate Pribdeevech *et al.* (2010) เปรียบเทียบการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกโดย GC-MS และ GCxGCxMS โดยทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมแห้ง *Vetiveria zoziioides* ต่างกัน 4 แบบ คือ Simultaneous steam distillation, supercritical fluid, microwave assisted และ soxlet extraction วิธีการสกัดที่แตกต่างกันมีผลให้ผลผลิตคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมแตกต่างกัน พบว่า เมื่อวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมด้วย GCxGC-MS สามารถวิเคราะห์ได้ 245 ชนิด และสามารถระบุชนิดของสารระเหยได้ 43 ชนิด ซึ่งสามารถวิเคราะห์สารได้จำนวนมากกว่า GC-MSนอกจากนี้ Lavania (2003) รายงานว่า ในน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมยังพบ Carbonyl และ Ester เป็นองค์ประกอบหลักอีกด้วย และ Sirinan *et al.* (ม.ป.ป.) พบว่า ในน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมมีสารในกลุ่ม sequiterpenes เช่น khusimol, longipinene, valerenol, epizizanal, α -vetivone และ β - vetivone เป็นต้น และสารในกลุ่ม sesquiterpenes alcohol ซึ่งมี khusimol เป็นองค์ประกอบหลัก และสาร khusimol ในน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมจะมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ vasopressin ในตับหนู นอกจากนี้ สาร khusimol, epizizanal, α -vetivone และ β -vetivone ในน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม สามารถขับไล่แมลงได้ ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมพันธุ์ *Vetiveria zizanioides* Nash สามารถนำมาทำเป็นส่วนประกอบของยา ระวังประสาท ทำให้คลายเครียด ลดความวิตกกังวล คลายเส้นประสาท แก้ปัญหาอาการนอน

ไม่หลับ และมีการใช้ประโยชน์จากน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม ได้แก่ ใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางและเป็นอะโรมาเธอราปี น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมทำให้การทำงานของต่อมไขมันสัมพันธ์กัน ช่วยให้ผิวหนังผลิตไขมันเป็นไปอย่างปกติ กำจัดสิว เสริมความชุ่มชื้นให้ผิวหนังที่แห้งทำให้ผิวหนังดูเป่งปร่ง ช่วยรักษาอาการคันเคঁรา นอนไม่หลับ กังวล เครียด กล้ามเนื้อตึง นอกจากนี้ ยังประยุกต์ใช้รักษาอาการปวดข้อ ปวดเอว ปวดหลัง เคล็ดขัดยอก ทำให้ฟันไข้เร็วขึ้น ลดอาการอักเสบระคายเคืองกระเพาะอาหาร และจะเห็นได้ว่าสารอีก 3 ชนิด ที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมในการทดลองนี้ ก็คือ Nootkatone, Khusimone และ (+)-(6S,10R)-6,10-dimethylbicyclo(4,4,0)dec-1-en-3-one ซึ่งสารเหล่านี้จัดเป็นสารในกลุ่ม ketones และเป็นสารที่น่าสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่าง ๆ ได้แก่ ผสมลงในเครื่องสำอาง หรือประยุกต์ใช้ในการกำจัดแมลง เนื่องจาก Nootkatone ในน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม เป็นองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งหมีด ไร เห็บ แมลงสาบ และไม่เป็นพิษต่อคนอีกด้วย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อสภาพแวดล้อม เนื่องจากการลดปริมาณการใช้สารเคมี เพื่อกำจัดแมลงต่าง ๆ ดังกล่าวอีกด้วย

มีรายงานการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* ได้แก่ Sellier *et al.* (1991) วิเคราะห์โครงสร้าง sesquiterpenes ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมโดย GC-MS พบว่า ประกอบด้วย 118 ชนิด และมี 20 ชนิดที่จำแนกชื่อสารและโครงสร้างของสารได้ และ Martinez *et al.* (2004) และวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝก *Vetiveria zizanioides*(L.) Nash ของบราซิล พบว่า องค์ประกอบทางเคมีน้ำมันจากรากหญ้าแฝกหอมของบราซิลกับตัวอย่างของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมทางการค้าอื่น ๆ มีปริมาณกรด zizanoic acid มากกว่าตัวอย่างอื่น ๆ เมื่อสกัดแยกเอา zizanoic acid ออกแล้วเปลี่ยนเป็น khusimol ที่ไม่มี zizanoic acid สามารถประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมน้ำหอม นอกจากนี้ Bhuiyan *et al.* (2008) วิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides*(L.) Nash ex small จากบังคลาเทศโดยใช้ GC-MS พบสารที่จำแนกชนิดได้ 14 ชนิด คือ Caryophyllene oxide, Juniper camphor , 2-Methylenecholestan-3-ol, tau.-Muurolol, Tricyclo[8.6.0.0(2,9)]hexadeca-3,15-diene, trans-2,9-anti-9,10-trans-1,10-, Androstan-17-one, 3-ethyl-3-hydroxy-, (5.alpha.)-, 1H Cycloprop[e]azulen-7 -ol,decahydro -1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1ar(1a.alpha.,4a.alpha.,7.beta.,7a.beta.,7b.alpha.)]-β-Vatirenene,3a,7-Methano-3aH-cyclopentacyclooctene, 1,4,5,6,7,8,9, 9a -octahydro - 1,1,7-trimethyl-, [3aR (3a.alpha.,7.alpha., 9a.beta.)]-2-(4a,8-Dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-naphthalen-2-yl)-prop-2-en-1-ol 12.442(3H)-Naphthalenone,4,4a,5,6,7,8-hexahydro-4,4a-dimethyl-6-(1-methylethenyl)

-2(1H) Naphthalenone,3,5,6,7,8,8a- hexahydro-4, 8a-dimethyl-6-(1-methylethenyl)-, Naphthalene, 1,2,3,5,6,7,8,8a- octahydro- 1,8a-dimethyl -7-(1-methylethenyl)-,[1R-(1.alpha., 7.beta.,8a.alpha.)]-2,6-Dimethyl -10- methylene- 12 -oxatricyclo [7.3.1.0(1,6)] tridec-2-ene

ในการทดลองนี้ จะเห็นได้ว่า ในน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม มีสารองค์ประกอบหลายชนิด ซึ่งพบว่า มีสารที่สามารถระบุชื่อได้แน่นอนประมาณ 24 ชนิด และสารที่ไม่สามารถระบุชื่อได้แน่นอน 5 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 12

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่พบในการทดลองนี้ ได้จัดจำแนกชนิดตามหมู่ฟังก์ชัน ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 12 ผลการจำแนกองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้า

แฝกหอมตามโครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี

Peak No	Retention time (min)	Retention area (%)	Retention Index	Compound
1	12.46	0.19	1363	9,10-dehydrogen-2-norzizaene
2	13.03	1.65	1379	6-N-butyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene
3	15.23	0.09	1441	Epi-bicyclosesquiphellandrene
4	15.83	0.14	1457	Caryophyllene
5	16.00	0.19	1455	Khusimene
6	16.96	0.23	1485	Alpha-amorphene
7	19.34	0.41	1544	(+)-(6S,10R)-6,10-dimethylbicyclo(4,4,0)dec-1-en-3-one
8	20.36	1.28	1567	Eudesma-4(14),11-diene
9	22.27	3.27	1604	Khusimone
10	23.13	1.59	1410	(+)-Longifolene
11	23.76	0.51	1493	Alpha-gurjunene
12	24.07	0.79	1641	Epi-zonaren
13	24.57	1.29	1650	Valencene
14	25.71	5.17	1671	2,2,6-Trimethyl-1-(2-methylcyclobut-2-enyl)-hepta-4,6-dien-3-one

ตารางที่ 12 (ต่อ)

Peak No	Retention time (min)	Retention area (%)	Retention Index	Compound
15	26.38	3.97	1682	Unidentified
16	26.54	1.40	1685	Unidentified
17	28.30	1.12	1714	Nepthalene, 1,2,4a,5,8,8a- hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.beta.,8a.alpha.) – (.+-.)
18	28.87	3.79	1724	Unidentified
19	30.27	22.91	1746	9,10-dehydro-isolongifolene
20	31.55	0.50	1766	Unidentified
21	33.02	6.04	1787	7-(1-methyl-ethenyl)-1-hydroxy-1,4-dimethyl-1,2,4,5-[3H,6H] octahydroazulene
22	33.84	0.31	1799	(E)-1,2,4,4-tetramethyl-3-(3'-methyl-1',3'-butadienyl)-2-cyclohexen-1-ol
23	34.12	1.17	1807	Nootkatone
24	34.53	1.23	1809	Khusenilic acid
25	34.91	4.50	1815	2-Naphthalenecarboxylic acid, 8-ethenyl-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-5-methylene
26	35.57	7.73	1824	1H-3a,6-methanoazulene-3-carboxylic acid, octahydro-7,7-dimethyl-8-methylene-, [3S-3.alpha.,3a.alpha.,6.alpha.,8a.alpha.]
27	36.59	4.67	1839	Zierone
28	42.27	0.22	1937	Unidentified
29	43.58	0.34	1980	Hexadecanoic acid

ตารางที่ 13 การจำแนกองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากราก
หญ้าแฝกหอมที่สกัดได้ในการทดลองนี้ แบ่งตามหมู่ฟังก์ชัน

หมู่ฟังก์ชัน	สารองค์ประกอบ
1. Sesquiterpenes	- 9,10-dehydrogen-2-norizaene - 6-N-butyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene - Epi-bicyclosesquiphellandrene - Caryophyllene - Khusimene - Alpha-amorphene - Eudesma-4(14),11-diene - (+)-Longifolene - Alpha-gurjunene - Epi-zonaren - Valencene - Nephthalene, 1,2,4a,5,8,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.beta.,8a. alpha.) – (.+-.) - 9,10-dehydro-isolongifolene - 7-(1-methyl-ethenyl)-1-hydroxy-1,4-dimethyl-1,2,4,5-[3H,6H] octahydroazulene
2. Ketones	- (+)-(6S,10R)-6,10-dimethylbicyclo(4,4,0)dec-1-en-3-one - Khusimone - 2,2,6-Trimethyl-1-(2-methyl-cyclobut-2-enyl)-hepta-4,6-dien-3-one - Nootkatone - Zierone
3. Alcohol	- (E)-1,2,4,4-tetramethyl-3-(3'-methyl-1',3'-butadienyl)-2-cyclohexen-1-ol

ตารางที่ 13 (ต่อ)

หมู่ฟังก์ชัน	สารองค์ประกอบ
4. Carboxylic acid	- Khusenic acid -2-Naphthalenecarboxylic acid, 8-ethenyl-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-5-methylene -1H-3a,6-methanoazulene-3-carboxylic acid, octahydro-7,7-dimethyl-8-methylene-[3S-(3.alpha.,3a.alpha.,6.alpha.,8a.alpha.)] - Hexadecanoic acid

3. ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม

จากผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด คือ *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* โดยใช้น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ Tetracycline ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ในการทดลองนี้ใช้ Tetracycline เป็น positive control ซึ่ง Tetracycline เป็นยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หลายชนิด หรือเรียกว่าเป็น Broad spectrum antibiotic และ Tetracycline เป็นยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียได้ดีคือสามารถทำลายแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยที่จะขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งเป็นขบวนการที่สำคัญสำหรับการสร้างและซ่อมแซมเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดการเจริญเติบโต ดังนั้น การยับยั้งหรือขัดขวางขบวนการสังเคราะห์โปรตีนทำให้ไม่สามารถสร้างสายเปปไทด์ขึ้นมาได้ จึงทำให้เซลล์แบคทีเรียตาย (บัญญัติ, 2536) ในการทดลองนี้ ทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยใช้น้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ น้ำมันหอมระเหยที่ไม่เจือจาง และน้ำมันหอมระเหย : DMSO อัตราส่วน 1:1, 1:5 และ 1:10 จากผลการทดลองในตารางที่ 14 จะเห็นได้ว่า น้ำมันหอมระเหยทุกระดับความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทั้ง 4 ชนิด ได้น้อยกว่า Tetracycline มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส่น้อยกว่าบริเวณใสของ Tetracycline ทุก treatment ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ positive control และ negative control

แบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใส (มม.)					
	อัตราส่วนน้ำมันหอมระเหย รากหญ้าแฝกหอม : DMSO				Tetracycline (positive control)	DMSO (negative control)
	ไม่เจือ จาง	1:1	1:5	1:10		
<i>E. coli</i>	9.12	8.32	8.27	8.20	14.27	-
<i>P. vulgaris</i>	8.93	8.23	8.12	8.68	9.87	-
<i>B. cereus</i>	13.80	14.38	14.52	15.72	13.33	-
<i>S. aureus</i>	10.52	11.63	10.18	9.75	17.43	-

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่ปรากฏบริเวณใส (clear zone)

เมื่อนำผลการทดลองในตารางที่ 14 มาเขียนเป็นแผนภูมิแท่งในภาพที่ 40 โดยเปรียบเทียบผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กับ Tetracycline เมื่อใช้น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่ไม่เจือจาง และน้ำมันหอมระเหย : DMSO อัตราส่วน 1:1, 1:5 และ 1:10 ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่า ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (จากตารางภาคผนวกที่ 5 ตารางผนวก 5.4) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* ได้ดี แม้ใช้ระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมต่ำ และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กับ Tetracycline พบว่า ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่ง Somporn *et al.* (2005) ได้ทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม แล้วนำน้ำมันหอมระเหยที่บริสุทธิ์เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่า สามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้ และสามารถยับยั้ง *T. mentagrophytes* ได้แต่ยับยั้งเมื่อใช้ความเข้มข้นต่ำและสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมสามารถรักษาโรคผิวหนังบางประเภทได้

จากผลการทดสอบ การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Proteus vulgaris* เมื่อใช้น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่ไม่เจือจาง และน้ำมันหอมระเหย : DMSO อัตราส่วน 1:1, 1:5 และ 1:10 ในภาพที่ 40 จะเห็นได้ว่า ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ภาคผนวกที่ 5 ตารางผนวก 5.5) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *P. vulgaris* ได้ดี แม้ใช้ระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมต่ำ และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กับ Tetracycline พบว่า ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่ง Seenivason et al. (2006) พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม สามารถยับยั้ง *B. cereus* และ *P. vulgaris* ได้เช่นกัน

จากผลการทดสอบ การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus cereus* เมื่อใช้น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่ไม่เจือจาง และน้ำมันหอมระเหย : DMSO อัตราส่วน 1:1, 1:5 และ 1:10 ในภาพที่ 40 จะเห็นได้ว่า ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ภาคผนวกที่ 5 ตารางผนวก 5.6) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *B. cereus* ได้ดีมาก แม้ใช้ระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมต่ำ และจะเห็นได้ว่าการทดลองนี้น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *B. cereus* ได้ดีกว่าแบคทีเรียทดสอบชนิดอื่น ๆ และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กับ Tetracycline พบว่า ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่ไม่เจือจาง และน้ำมันหอมระเหย : DMSO อัตราส่วน 1:1, 1:5 และ 1:10 ในภาพที่ 40 จะเห็นได้ว่า ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสในแต่ละระดับความเข้มข้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ภาคผนวกที่ 5 ตารางผนวกที่ 5.7) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ได้ดี แม้ใช้ระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมต่ำ และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กับ Tetracycline พบว่า ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีรายงาน เกษรและคณะ (2541) พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม (*Vetiveria zizannoides*, Nash) มีผลยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* แต่ไม่มี

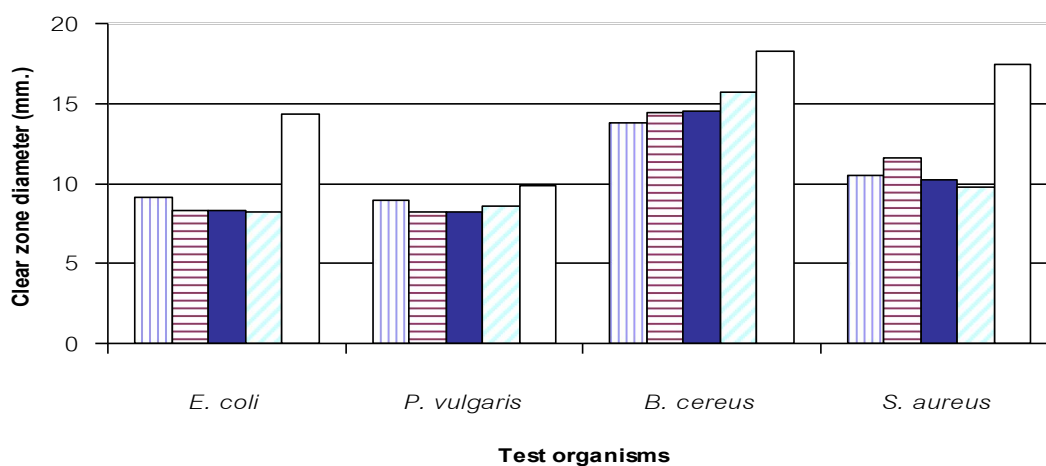
ผลยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli*, *Ps. aeruginosa* และ *K. pneumoniae* นอกจากนี้ Hammer (1999) รายงานว่า น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* ได้เช่นกัน

เมื่อเขียนแผนภูมิเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดด้วยน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในภาพที่ 41 จะเห็นได้ว่า น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมมีแนวโน้มที่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวกในการทดลองครั้งนี้คือ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ส่วนแบคทีเรียแกรมลบในการทดลองนี้คือ *Escherichia coli* และ *Proteus vulgaris* ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น อาจเป็นผลมาจากแบคทีเรียแกรมบวกมีโครงสร้างของผนังเซลล์ที่แตกต่างจากแบคทีเรียแกรมลบคือ องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ มีความซับซ้อนมากกว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ประกอบด้วย เพปติโดไกลแคนเพียงประมาณ 5-20 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น นอกจากนี้ประกอบด้วย ลิโปโปรตีน ลิพอพลิแซ็กคาไรด์ และยังมีกรดไดอะมิโนพิมิสิกแทนที่กรดอะมิโนไลซีน แบคทีเรียแกรมลบ มีเมมเบรนชั้นนอก (outer membrane) ล้อมรอบเพปติโดไกลแคนไว้ เมมเบรนชั้นนอกยังทำหน้าที่เป็นเครื่องกั้นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเจริญของผนังเซลล์ไม่ให้ออกจากช่องว่างเพอริพลาสติก (periplasmic space) และยั้งกันสารเคมีและเอนไซม์จากภายนอกไม่ให้เข้าไปทำลายเซลล์ ดังนั้น ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจึงถูกทำลายด้วยเอนไซม์

ไลโซไซม์ ได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เมมเบรนชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบยึดกับเพปติโดไกลแคนที่อยู่ข้างใต้ด้วยลิโปโปรตีน (เนงลักษณ์และปรีชา, 2547)

จากผลการทดลองในภาพที่ 41 จะเห็นได้ว่า DMSO เป็นสารที่ใช้ในการเจือจางน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมซึ่งเป็น negative control ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทุกชนิด ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เป็นผลมาจากน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมเท่านั้น Nanthachit et al. (1998) ศึกษาสารสกัดจากรากหญ้าแฝก *Vetiveria zizanioides* โดยใช้สารสกัดจากเมทานอล พบว่า ยับยั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* 2593, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 67120, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *T. mentagophytes* และ *M. gypseum* และ Burt and Reinders (2003) ใช้วิธี disc agar diffusion เพื่อทดสอบการยับยั้งน้ำมันหอมระเหยจากพืชชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญของ *Escherichia coli* 0157:H7 พบว่า น้ำมันหอมระเหยจาก oregano และ thyme มี

ผลยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด ต่อมา Putiyanan *et al.* (2005) สกัดน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากรากหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* 6 สายพันธุ์คือสุราษฎร์ธานี พิมาย เวียงชัย ปางบงราชบุรี และอินโดนีเซีย ด้วยเมทานอล พบว่า สารสกัดจากรากหญ้าแฝกหอมทั้ง 6 สายพันธุ์มีผลยับยั้งเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* และสารสกัดจากแฝกบางสายพันธุ์ยับยั้งแบคทีเรีย เช่น *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichai coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 278533 และสารสกัดจากรากหญ้าแฝกหอมปางบงมีประสิทธิภาพดีที่สุด และจากรายงานของ Prabuseenivasan *et al.* (2006) พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากพืชต่าง ๆ มีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichai coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* และแบคทีเรียแกรมบวก 2 สายพันธุ์คือ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* เมื่อใช้ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 1:1, 1:5, 1:10 และ 1: 20 เมื่อทดสอบโดยวิธี disc agar diffusion และพบว่า MIC เท่ากับ 0.2-25.6 mg/ml



ภาพที่ 40 เปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสในการยับยั้งการเจริญของ

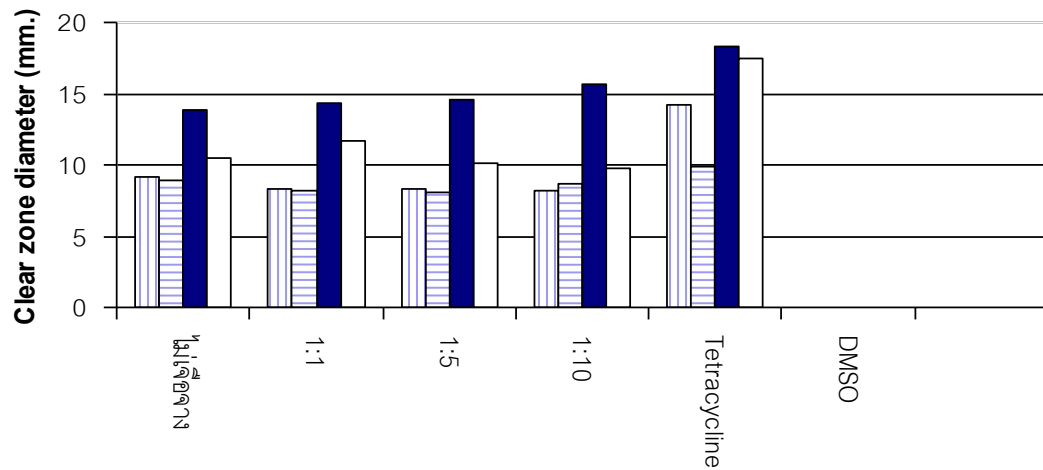
แบคทีเรียทดสอบทั้ง 4 ชนิด โดยใช้ น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม

ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กับ Tetracycline (positive control)

น้ำมันหอมระเหยไม่เจือจาง (■) น้ำมันหอมระเหย : DMSO อัตราส่วน 1:1 (■)

น้ำมันหอมระเหย : DMSO อัตราส่วน 1:5 (■) น้ำมันหอมระเหย : DMSO

อัตราส่วน 1:1 (■) และ Tetracycline (□)



Test organisms

ภาพที่ 41 เปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทั้ง 4 ชนิด โดยใช้น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กับ Tetracycline
E. coli (□) *P. vulgaris* (■) *B. cereus* (■) *S. aureus* (□)

สรุปผลการทดลอง

สรุปผลการทดลองที่ 1

การผลิตเอทานอลจากใบหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides*

การพรีทรีทใบหญ้าแฝกหอม *V. zizanioides* ด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.25, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร และน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 100, 110 และ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 12 ชั่วโมง แล้วไฮโดรไลซิสด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีทใบหญ้าแฝกหอม คือการแช่ในสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 19.82 กรัมต่อลิตร

การเตรียมใบหญ้าแฝกหอมก่อนการไฮโดรไลซิส ตามวิธีที่ 1 คือนำใบหญ้าแฝกหอมที่ได้จากการพรีทรีทไปล้างและอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนนำไปไฮโดรไลซิสด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที ได้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่า การเตรียมใบหญ้าแฝกหอมตามวิธีที่ 2 คือการไฮโดรไลซิสต่อเนื่อง เท่ากับ 20.34 และ 12.67 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสใบหญ้าแฝกหอม โดยนำใบหญ้าแฝกหอมที่ผ่านการพรีทรีทตามสภาวะที่เหมาะสมไปไฮโดรไลซิสด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 100, 110 และ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที พบว่า ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสใบหญ้าแฝกหอมที่ได้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด เท่ากับ 21.39 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการไฮโดรไลซิสใบหญ้าแฝกหอมที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10, 20 และ 30 นาที พบว่า การไฮโดรไลซิสใบหญ้าแฝกหอมที่ระยะเวลา 20 และ 30 นาที ได้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 20.10 และ 21.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การผลิตเอทานอล โดยใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิสใบหญ้าแฝกหอมตามสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า ยีสต์นี้สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 0.57 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 96 ชั่วโมง

สรุปผลการทดลองที่ 2

การหมักเชื้อใบหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides* กับเซลล์ยีสต์ที่เหลือจากการผลิตเอทานอลเพื่อเป็นอาหารสัตว์

การหมักเชื้อใบหญ้าแฝกหอมที่ผ่านการไฮโดรไลซิสกับเซลล์ยีสต์ ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 21 วัน แล้ววิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ และวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของอาหารสัตว์เบื้องต้น พบว่า เชื้อใบหญ้าแฝกหอมหมักกับเซลล์ยีสต์ มีกลิ่นหอมจากน้ำตาล และมีกลิ่นแอลกอฮอล์เล็กน้อย ส่วนชุดควบคุมมีกลิ่นอับ และค่าความเป็นกรด-ด่างของเชื้อหญ้าแฝกหมักกับเซลล์ยีสต์ทุกชุดทดลอง มีค่าระหว่าง 4.74-5.24 เชื้อใบหญ้าแฝกหอมหมักกับเซลล์ยีสต์ มีค่าโปรตีนรวมสูงสุด เท่ากับ 10.24 เปอร์เซ็นต์ และการทดสอบการกินของสัตว์ (โคนม) พบว่า โคนมชอบกินเชื้อใบหญ้าแฝกหอมหมักกับเซลล์ยีสต์และกากน้ำตาล

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาของอาหารสัตว์เบื้องต้น ของใบหญ้าแฝกสด เชื้อใบหญ้าแฝกหอมที่ไม่ได้หมักกับเซลล์ยีสต์ และเชื้อใบหญ้าแฝกหอมหมักกับเซลล์ยีสต์ พบว่า มีค่าเฉลี่ย โปรตีนรวม เท่ากับ 6.71, 6.66 และ 10.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และโปรตีนรวมของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* มีค่าเท่ากับ 22.65 เปอร์เซ็นต์

สรุปผลการทดลองที่ 3

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม *Vetiveria zizanioides*

จากการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม *V. zizanioides* ด้วยการกลั่นด้วยน้ำ ได้น้ำมันหอมระเหย ที่มีลักษณะเป็นของเหลว สีเหลืองใส หนืด และได้ผลผลิตของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม เท่ากับ 0.35 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทเมตรี พบว่า มีสารที่สามารถระบุชื่อได้แน่นอนจำนวน 24 ชนิด และมีสารที่ยังไม่สามารถระบุชื่อได้แน่นอนอีกจำนวน 5 ชนิด และองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม ที่ปรากฏใน GC-MS Chromatogram เป็นพีคหลัก 5 ชนิด คือ 2,2,6-Trimethyl-1-(2-methyl-cyclobut-2-enyl)-hepta-4,6-dien-3-one, 9,10- dehydro-isolongifolene, 7-(1-methyl-ethenyl) -1- hydroxy- 1,4- dimethyl- 1,2,4,5-[3H,6H] octahydroazulene, 1H-3a,6-methanoazulene-3-carboxylic acid, octahydro-

7,7-dimethyl-8-methylene-, [3S-(3.alpha.,3a.alpha.,6.alpha.,8a.alpha.)] และ Zierone สารที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม มีทั้งกลุ่มที่เป็น sesquiterpenes, ketones, alcohol และ carboxylic acid นอกจากนี้ ยังพบ nookatone เป็นองค์ประกอบของ น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม ซึ่งน่าจะนำไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดแมลงได้อีกด้วย

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม *V. zizanioides* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอม มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกคือ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบคือ *Escherichia coli* และ *Proteus vulgaris*



เอกสารอ้างอิง

- กรมพัฒนาที่ดิน. 2536. คู่มือการดำเนินงานและฝึกอบรม การพัฒนาและรณรงค์การใช้ หญ้า
แฝก อันเนื่องมาจากพระราชดำริ. กองฝึกอบรม กรมพัฒนาที่ดิน. กรุงเทพฯ. 87 น.
- กฤติยา ณ เชียงใหม่. 2541. ผลการยับยั้งสารสกัดจากเห็ดรับประทานได้ต่อเชื้อ
แบคทีเรียบางชนิด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- เกษร นันทจิต อัจจิมา บุญชู บรรยง คันธวะ และจันทนา คำวรรณ. 2541.ฤทธิ์ต้านจุลชีพของ
รากหญ้าแฝก. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://thvn.rdpb.go.th/research.php#>.
(15 ธันวาคม 2550).
- ไกรสิทธิ์ แสงแจ่ม. 2522. พืชอาหารสัตว์. คณะเกษตรศาสตร์วิทยาลัยเทคโนโลยีและ
อาชีวศึกษา วิทยาเขตเกษตรบางพระ. 86 น.
- โครงการปลูกหญ้าแฝกเฉลิมพระเกียรติ. 2550. หญ้าแฝกเฉลิมพระเกียรติ. [ระบบออนไลน์].
แหล่งที่มา http://www.idd.go.th/link_vetiver/index.htm. (16 ธันวาคม 2550)
- ชมพูนุช หาญนันท์วิวัฒน์. 2547. การผลิตน้ำตาลจากการย่อยสลายโมเลกุลจากวัสดุเหลือทิ้ง
ทางการเกษตรโดยใช้การฉายรังสีแกมมาพร้อมกับกรดซัลฟิวริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 156 หน้า.
- ดวงพร คันธโชติ. 2530. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม (ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์). กรุงเทพฯ.
โอ เอส พรีนติ้งเฮาส์. 191 น.
- ดุชนี ธนะบริพัฒน์. 2546. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: โครงการ
ตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระเจ้าเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- ดำรง พงศ์พุทธชาติ. 2537. ผลยับยั้งของสมุนไพรบางชนิดต่อการยับยั้งเชื้อราทำให้เกิดโรค
ผิวหนัง 4 ชนิด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ธีระพงษ์ สิงหาปัด กรรณิกา แสงศรีเรือง และสุรัสวดี บัณฑิต. 2549. การผลิตแอลกอฮอล์โดย
การหมักจากน้ำอ้อย. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- นงลักษณ์ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 4. จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 735 น.
- นวลจิตต์ เขาวงกตพิงส์. 2543. การถนอมอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. ไทยวัฒนาพานิช:

กรุงเทพฯ.

- บัญญัติ สุขศรีงาม. 2536. เครื่องเทศที่ใช้เป็นสมุนไพร(เล่ม 2). อมรการพิมพ์. กรุงเทพฯ. 104 น.
- พาณิช ทินนิมิตร. 2512. อาหารและการให้อาหารสัตว์. วิทยาลัยเกษตรกรรม. 159 น.
- พัชรีย์ พริบดีเวช และ สุกัญญา วงศ์พรชัย. ม.ป.ป. การวิเคราะห์สารให้กลิ่นหอมในรากหญ้า
แผ่หอมโดยเทคนิค SPME-GC-MS. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่ http://www.scisoc.or.th/stt/30/sec_c/paper/stt30_C0088.pdf. (12 พฤศจิกายน 2550).
- พัชรีย์ พริบดีเวช สุกัญญา วงศ์พรชัย และ อำพรพรณ พรมศิริ. ม.ป.ป. การวิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยของรากหญ้าแผ่หอมด้วยเทคนิคการสกัดโดยวัฏภาคของแข็ง ในระดับจุลภาคและเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://thvn.rdpb.go.th/research.php#>. (15 ธันวาคม 2550).
- เทอดชัย เวียรศิลป์. 2548. โภชนศาสตร์เคี้ยวเอื้อง. ทรีโอ แอดเวอร์ไทซิง แอนด์ มีเดีย จำกัด. เชียงใหม่. 357 น.
- เมธาวิ ศิริสวัสดิ์ วุฒิชัย ศรีภิญโญ เชิดชัย พลศรี และพรพจน์ นาราคาม. 2547. การผลิตเอทานอลจากเปลือกและแกนสับปะรดโดยการหมักแบบกะ. วิศวกรรมศาสตร์บัณฑิต คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- วรณี แผงจันทิก และ วิชัย เพ็ชรดี. 2546. การศึกษาการสกัดเอทานอลจากฟางข้าว. รายงานโครงการของนักศึกษาชั้นปีที่4 หลักสูตรวิศวกรรมศาสตร์บัณฑิต. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- วรพงษ์ สุริยจันทราทอง. 2535. เยื่อใยอาหารสัตว์. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 250 น.
- วรัญญา งามเลิศศิริชัย จันทรัตน์ สีนประจักษ์กุล และ เพชรรัตน์ วันมงคลชัย. 2549. ทฤษฎีการป้องกันการเสื่อมโทรมและพังทลายของดินโดยหญ้าแฝก. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา www.thaigoodview.com/library/studentshow/2549/m6/sri10/the_king_and_technology/ka-set_3.htm. (19 พฤศจิกายน 2550) .
- วารุณี พานิชผล สมพล ไวยัญญา เมธิน ศิริวงศ์ และเจลิยว ศรีฐ. 2537. การศึกษาคุณค่าทางอาหารของหญ้าแฝก (*Vetiveria zizanioides* Nash.) เพื่อใช้เป็นพืชอาหารสัตว์. รายงานผลงานวิจัยและรายงานประจำปี 2537. กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 158-182.
- วารุณี พานิชผล ชิต ยุทธวรวิทย์ และสมพล ไวยัญญา. 2539. คุณค่าทางโภชนาของหญ้าแฝกหมักที่เติมสารชนิดต่าง ๆ. กองอาหารสัตว์. กรมปศุสัตว์. กรุงเทพฯ. 25 น.

- วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2550. อี โคล. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา. (4 เมษายน 2551).
- วุฒิชัย เขตกรณ์. 2549. การไฮโดรไลซิส์ส่วเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีเซลลูโลสโดยวิธีการทางเคมีเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล. ปัญหาพิเศษ. เทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่.
- ศิริพงษ์ เปรมจิตร บุญทริก ภูมิรา และดวงพร เปรมจิตร. 2550. การผลิตเอทานอลโดยใช้ปอสา (Paper Mulberry) เป็นวัสดุหมักด้วยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (SSF). มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2548. พืชให้น้ำมันหอมระเหย. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา www.rspg.thaigov.net/plants.data/use/perfume1-1.htm. (16 พฤศจิกายน 2550).
- สมคิด พรหมมา อภิชาติ รัตนวนิช สมเพชร ดุ้ยคำภีร์ นิพนธ์ วิทยากร และอรรณ สุภาพ. 2525. การทดลองใช้ฟางข้าวซึ่งได้รับการปรับปรุงคุณภาพแล้วเป็นอาหารหยาบหลักสำหรับเลี้ยงโคนมรุ่น. รายงานผลงานวิจัย สาขาสัตวศาสตร์ การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 20 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 1-5 กุมภาพันธ์ 2525. หน้า 1-10.
- สมนึก วงศ์ทอง. ม.ป.ป. การใช้ประโยชน์จากสารสกัดรากหญ้าแฝกในการควบคุมการระบาดของแมลงศัตรูพืช. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://thvn.rdpb.go.th/research.php#>. (15 ธันวาคม 2550)
- สมภพ กิวยศิริพงษ์ และ นุชนารถ จงเลขา. ม.ป.ป. ประสิทธิภาพของสารสกัดจาก รากและใบของแฝกหอมในการควบคุมโรคเหอลีไบลท์ของมะเขือเทศ. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://plantpro.doae.go.th/disease-research/P-24.pdf>. (16 พฤศจิกายน 2550)
- สรุฒิ พรหมทอง พรพงศ์ พวงจินดา และอนิรุทธิ์ ชื่นเหมื่อน. 2545. การผลิตเอทานอลจากผลผลิตทางการเกษตรที่มีปริมาณเซลลูโลสสูง. งานวิจัยหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวัสดุศาสตร์ โรงเรียนนายเรืออากาศ กองบัญชาการฝึกศึกษาทหารอากาศ.
- สิทธิศักดิ์ อุปวิวงศ์. 2547. การผลิตเชื้อเพลิงแอลกอฮอล์แข็งจากมันสำปะหลังในภาคอีสาน. โครงการวิจัยทุนอุดหนุนการวิจัยประเภททุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- เสริมศักดิ์ สุวรรณศิลป์. 2543. เอกสารประกอบการสอน. พืชอาหารสัตว์และการจัดการทุ่งหญ้า. ไม่ปรากฏสถานที่พิมพ์.

- อำพล เสนาณรงค์ และ ชำนาญ บุญญาพิทักษ์. 2550. พลังงานแห่งทางเลือก. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.energyfantasia.com> (15/12/2550).
- ฤดีวรรณ จันสร้อย และ สัจจา วีละชั้นคำ. 2542. การพัฒนาครีมต้านเชื้อราจากแฟกทอม. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://thvn.rdpb.go.th/research.php#>. (15 ธันวาคม 2550).
- Anadon, A.; M. R. Martinez and M. A. Martinez. 2006. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. Regulatory Toxicol. Pharmacol. 45 : 91-95.
- Azoulay, E.; F. Jouanneau; J.C. Bertrand; A. Raphael; J. Janssens and J. M. Lebeault. 1980. Fermentation methods for protein enrichment of cassava and corn with *Candida tropicalis*. Appl. Environ. Microbiol. 39 (1) : 41-47.
- Betty, C.R.; G.H. Zhu; C.H.F. Feng and A.L. Roger. 2004. Evaluation of vetiver oil and seven insect-active essential oils against the formaosan subterranean termite. J. Chem. Ecol. 27(8) : 1617-1625.
- Bhuiyan, N.I.; J.U. Chowdhury and J. Begum 2008. Essential oil in roots of *Vetiveria zizanoides* (L.) Nash ex small from Bangladesh. Bangladesh J. Bot. 37(2) : 213-215.
- Burt, S.A. and R.D. Reinders. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oil against *Escherichia coli* O157:H. 36 : 162-167.
- Canettier, E. V.; G. J. Moraes Rocha; J. A. Carvalho and J. B. Almeida Silva. 2006. Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of *Eucalyptus grandis* residue using response surface methodology. Biores. Technol. 98 : 422-428.
- Cara, C.; E. Ruiz; M. Ballesteros; P. Manzanares; M.J. Negro and E. Castro. 2008. Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. Fuel. 87 : 692-700.
- Carrasco, J.E.; M.C. Saiz; S.A. Navarro; P. Soriano; F. Saez and J.M. Martinez . 1994. Effects of diluted acid and steam explosion pretreatments on the cellulose lignocellulosic materials. Appl. Biochem. Biotechnol. 45-46 : 23-24.
- Champagnat, A; C. Pascal; F. Figueredo; H. Gill; J. Chalchat; J. Claude; A. Carnat ;

- A. Paul; D. Bessiere and J. Marie. 2006. A study on the composition of commercial *Vetiveria zizanioides* oils from different geographical origins. J. Essential Oil Res. 1-7.
- Chandel, A. K.; R.K. Kapoor and R. Rudravaram. 2006. Production of bioethanol from *Typha latifolia* enzymatic hydrolysis under batch and feed batch fermentation condition. Fuel. 10 : 1-11.
- Chiu, K.K.; Z.H. Ye and M.H. Wong. 2005. Enhanced uptake of As, Zn, and Cu by *Vetiveria zizanioides* and *Zea mays* using chelating agents. Chemoaphere 60 : 1365-1375.
- Desnoyers, M.; G.S Reverdin; G. Ertin; D.C. Ponter and D. Sauvant 2009. Meta- analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. J. Dairy Sci. 92 (4) : 1620-1632.
- Digman, M.F.; K.J. Shinnerw; M.D. Casler; B.S. Dien; R.D. Hatfield; J.C. Jung; R.E. Muck and P.J. Weimer. 2010 Optimizing on farm pretreatment of perennial grasses for fuel ethanol production. Biores. Technol. 101 (14) : 5305-5314.
- Durand, E.C.; N.D. Walkerab and A. Bached 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. Animal Feed Science and Technology. 145(1) : 5-26.
- Esteghlalian, A.; A.G. Hashimoto and M.H. Penner. 1997. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. Biores. Technol. 59 : 129-136.
- Giulia, B.; M. Nuzzi; A. A. Lava and A. Rizzolo. 2007. Development of a headspace-solid phase microextraction method to monitor changes in volatile profile of rose (*Rosa hybrida*, cv *David Austin*) petals during processing. Chromatography. 1150 : 190-197.
- Guedes, C.M.; D. Goncalves; M.A.M. Rodrigues and A.D. Silva. 2007. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* yeast on ruminal fermentation and fibre degradation of maize silage in cows. Animal Feed sci. Tech. 112 : 124-130.
- Hammmer, K.A.; C.F. Carson and T.V. Riley. 1999. Antimicrobial activity of essential

- oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol. 86(6) : 985-990.
- Hinman, N.D.; D.J. Schell; C.J. Riley; P.W. Bergeron and P.J. Walter. 1992. Preliminary estimate of the cost of ethanol production for SSF technology. Appl. Biochem. Biotechnol. 34/35 : 639-649.
- Howard, R.L.; E.Abotsi; E.L. Rensburg and S. Howard. 2003. Lignocellulose biotechnology: issue of bioconversion and enzyme production. African J. Biotechnol. 2(12) : 602-619.
- Inouye, S., T. Takizawa and H. Yamaguchi. 2001. Antibacterial activity of essential oil and their major constituents against respiratory tract pathogen by gaseous contact. J. Antimicrob. Chem. 47(5) : 565-573.
- Janssen, A.M.; N.L.J.C. Scheffer and B. Svensen. 1986. Screening for antimicrobial activity of some essential oils by the agar overlay technique. Pharmacy World Sci. 8(6) : 289-292.
- Jonewell, S. 1993. The use of yeast cultures in animal feeds. Feed Mix. 25 : 25-30.
- Kanimi, K.; G. Emtizi and M.J. Taherzaden. 2006. Ethanol production from dilute acid pretreatment rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae* and *Saccharomysis cerevisiae*. Enz. Microbiol. 40(1) : 138-144.
- Kim, H.J.; F. Chen; X. Wang; H.Y. Chung and Z. Jin. 2004. Evaluation of antioxidant activities of vetiver oil (*Vetiveria zizanioides*) and its components. Annual Meeting. July12-16. Las Vegas. 7691-7695.
- Kumar D. and G.S. Murthy. 2010. Effect of composition and pretreatment processes on hydrolysis yield from grass straws in pacific Northwest US. American Society of Agric. Biol. Eng. 20 : 20-23.
- Lavana, UC. 2003. Other uses, and utilization of vetiver: Vetiver oil. Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Lucknow. India. 226-015.
- Leupin, R. E. 2001. *Vetiveria zizanioides*: an approach to obtain essential oil variant via tissue culture. Doctor of Natural Science. 1-197 p.
- Linde, M.; E. Jakobsson; M. Galbe and G. Zacchi. 2007. Steam pretreatment of dilute H₂SO₄-impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme

- loadings for bioethanol production. Biomass Bioenergy. [ระบบออนไลน์].
แหล่งที่มา: [http://www.sciencedirect.com\(20/12/2007\)](http://www.sciencedirect.com(20/12/2007)).
- Li Peng and D.M. Gatlin, 2003. Evalution of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*).
- Lloyd, T.A. and C.E. Wyman. 2005. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. Biores. Technol. 96 : 1967-1977.
- Longuski, R.A., Y. Ying and M.S. Allen 2009. Yeast culture supplementation prevented milk fat depression by short-term dietary challenge with fermentable starch. J. Dairy Sci. 92(1) : 160-167.
- Martin, C.; M. Galbe; N. Nilvebrant and L. Jonnsson. 2002. Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. Appl. Biochem. Biotechnol. 98-100 : 699-716.
- Matinez, J.; P.T.V. Rosa; C. Menut, A. Leydet, P. Brat; D. Pallete and M.A.A. Meireles 2004. Volarilization of Brazillian Vetiver (*Vetiveria zizanioides*(L.) Nash ex small oil. J. Agric. Food Chem. 52(21) : 6578-6584.
- Nagle, N.J.; R.T. Elander; M.M. Newman; B.T. Rohrback; R.O. Ruiz and R.W. Torget. 2002. Efficiency of a hot washing process for pretreated yellow poplar to enhance bioethanol production. Biotechnol. Prog. 18(4) : 734-738.
- Nanthachit, K.; A. Bunchoo; B. Kantava and C. Khamwan. 1998. Antibacterial activity of *Vetiveria zizanioides*, Nash root. Chiang Mai University. 1-23.
- Narong, C. 2002. Other uses and utilization of vetiver. Thailand FAO Regional office for Asia and Pacific, Assumption University, Bangkok, 474-485.
- Nguyen, Q.A.; M.P. Tucker; F.A. Keller and F.P. Eddy. 2000. Two stage dilute-acid pretreatment of softwoods. Appl. Biochem. Biotechnol. 84-86 : 561-576.
- Obadina, A.O.; O.B. Oyewole; L.O. Sanni and S.S. Abiola. 2006. Fungal enrichment of cassava peels proteins. African J. Biotechnol. 5 (3) : 302-304.
- Oliveira, S.R.; F.M. Lopes and A.C. Metri. 2001. Use of diet containing (*Saccharomyces cerevisiae*) : Effects upon pregnancy, lactation and

- development in rats. Arch. Latinoam Nutr. 51 (1) : 72-80.
- Patcharee, P.; S. Wongpornchai and A. Promsiri. 2006. Highly volatile constituents of *Vetiveria zizanioides* roots grown under different cultivation conditions. Molecules. 817-826.
- Paturau, J.M. 1969. By-product of cane sugar industry. Elseviers publishing Co., Amsterdams. 16 : 251.
- Prabuseenivasan, S.; M. Joyakumar and S. Ignacimuthu. 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC complementary and alternative medicine. 6(39) : 1-8.
- Pribdeevech, P.; S. Wingpornchai and P.J. Marriott. 2010. Comprehensive two dimension gas chromatography-mass spectrometry analysis of volatile constituents in Thai Vetiver root oils obtained by using different extraction methods. Phytochem. Anal. 21(2) : 163-173.
- Punsuvon, V.; W. Anpanurak; P. Vaithanomsat and N. Tungkananuruk. 2005. Fractionation of chemical component of oil palm trunk by steam explosion. Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology. 31: 18-20.
- Putiyanan, S.; K. Nantachit; M. Bunchoo; B. Khantava and C. Khamwan. 2005. Pharmacognostic identification and antimicrobial activity of *Vetiveria zizanioides*(L.) Nash root. Chiang Mai. Med Bull. 44(3) : 85-90.
- Rameshwari, K. and Karthikeyan. 2005. Distillery yeast sludge (DYS) as alternative feed resource in poultry. Inter. J. Poult. Sci. 4(10) : 787-789.
- Reed, G. and H.J. Peppler. 1973. Yeast technology. Wesport Connecticut. U.S.A. 378 p.
- Roy, C.S.; P.K. Tandon and A.R. Chowdhury. 2009. Chemical analysis of essential of *Vetiveria zizanioides* (Linn) Nash roots. Indian J. Agric. Biochem. 22(1) : 20-28.
- Salts, H. 2003. Vetiver น้ำมันหอมระเหยแฝกหอม. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา www.buytropicalife.com. (19 พฤศจิกายน 2550).
- Sanchez, G.L.; C. Pilcher; T. Roslander; M. Modig and G. Liden. 2004. Dilute-acid

- hydrolysis for fermentation of the Bolivian straw material Paja Brava. *Biores. Technol.* 93(3) : 249–256.
- Sassner, P.; C. Martensson; M. Galbe and G. Zacchi. 2008. Steam pretreatment of H_2SO_4 – impregnated *Salix* for the production of bioethanol. *Biores. Technol.* 99 : 137-145.
- Seenivasan, P.; M. Jayakumar and S. Ignacimuthu. 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary Alter. Med.* 6 : 39-46.
- Sellier, N.; A. Cazaussus; H. Budzinski and M. Lebon. 1991. Structure determination of sesquiterpenes in Chinese vetiver oil by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatography.* 557 : 451-458.
- Shen, Y.; Y. Zhang; T. Ma; X. Bao; F. Du; G. Zhuang and Y. Qu. 2008. Simultaneous saccharification and fermentation of acid-pretreated corncobs with a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing β -glucosidase. *Biores. Technol.* 99 : 5099-5103.
- Shimazu, F. and C. Sterling. 2006. Effect of wet and dry heat on structure of cellulose. *J. Food Sci.* 31(4) : 548-551.
- Silverstein, R.; Y. Chen and R. Sharma-Shiuappa. 2007. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Biores. Technol.* 98 : 3000-3011.
- Singh A.; K.K. Aggarwal; M. Singh and A.P. Kahol. 1999. Parameter of vetiver oil distillation. *J. Herbs Spices Med. Plants.* 6(2) : 55-62.
- Sirinan, T.; K. Thisayakorn; U. Rerk-am; S. Tangstirapakdee and T. Suntornantasat. (พ.ป.ป.). Vetiver oil and its sedative effect. Thailand Institute of Scientific and Technological Research Bangkok, Thailand. 492-494.
- Soderstrom, J.; M. Galbe and G. Zacchi. 2004. Effect of washing on yield in one-and two-step steam pretreatment of softwood for production of ethanol. *Biotechnol. Prog.* 20(3) : 744-749.
- Somogyi, N. 1952. Note on sugar determinations. *J. Biol. Chem.* 195: 19-23.

- Somporn, P.; K. Nantachit; M. Bunchoo; B. Khantava and C. Khamwan. 2005. Pharmacognostic identification and antimicrobial activity *Vetiveria zizanioides* (L.) nash root. Chiang Mai Med. Bull. 44(3) : 85-90.
- Sun, Y. and J. Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Biores. Technol. 83 : 1-11.
- Sun, Y. and Cheng. 2005. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. Biores. Technol. 96 : 1599-1606.
- Viola, E.; M. Cardinale; R. Santarcangelo; A. Villone and F. Zimbardi. 2008. Ethanol From eel grass via steam explosion and enzymatic hydrolysis. Biomass and Bioenergy. 32(7) : 613-618.
- William, R.G.; O.C. Alvin and H.E. Grethlein. 1986. Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. Enz. Microb. Technol. 8(5) : 274-280.
- Wu, Z.W. and Y.Y. Lee. 1997. Ammonia recycled percolation as a complementary pretreatment to the dilute-acid process. Appl. Biochem. Biotechnol. 63(5) : 21-34.
- Yajing, S.; P. Marriott, R. Shellie and H. Hugel. 2002. Solid-phase Microextraction comprehensive two-dimensional gas chromatography of ginger (*Zingiber officinale*) volatiles. Intersci. 18 : 5-12.
- Yang, Y.; R.S. Shivappa; J. Burns and J.J. Cheng. 2009. Diluted acid pretreatment of oven dried switch grass germplasms for bioethanol production. Energy Fuel. 23(7) : 3759-3766.
- Zhisheng, Y. and H. Zhang. 2004. Ethanol fermentation of acid-hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae*. Biores. Technol. 93(2) : 199-204.
- <http://feedmeal.igetweb.com/index.pbhmo=3&art=368504> 6 สิงหาคม 2552.
- <http://feedmeal.igetweb.com/index.phpmo=3&art=368504> 6 สิงหาคม 2552.
- <http://www.thaicattle.org/board/index.php.topic> 6 สิงหาคม 2552.
- <http://www.greenspirit.org.uk/Resources/LifeChemistry.htm> 9 สิงหาคม 2552.



ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1

อาหารเลี้ยงเชื้อ

- อาหารดัดแปลงสูตร Yeast extracts peptone dextrose (YPD)

ยีสต์สกัด	10	กรัม
เปปโตน	20	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

- Nutrient agar (NA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่น 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

- Nutrient broth (NB)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) เหมือนกับ Nutrient Agar (NA) แต่ไม่ต้องเติมวุ้น

ภาคผนวกที่ 2

การเตรียมสารเคมี

- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.85 เปอร์เซ็นต์

Sodium chloride	0.85	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมสารสำหรับการวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธี Nelson Somogyi (1952)

- การเตรียมสารละลาย Somogyi I

Sodium sulfate	288	กรัม
Sodium potassium tartate	24	กรัม
Sodium carbonate	48	กรัม
Sodium hydrogen carbonate	32	กรัม

ละลายสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น 1,600 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

- สารละลาย Somogyi II

Sodium sulfate	72	กรัม
Copper sulfate	8	กรัม

ละลายสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

หมายเหตุ ผสมสารละลาย Somogyi I และ Somogyi II ในอัตราส่วน 4 : 1

- การเตรียมสารละลาย Nelson

Ammonium molybdate	100	กรัม
Sulfuric acid	84	มิลลิลิตร
Sodium hydrogen arsenate	12	กรัม

ละลาย Ammonium molybdate ในน้ำกลั่น 1,800 มิลลิลิตร เติมน้ำ sulfuric acid หลังจากนั้น เติมน้ำ Sodium hydrogen arsenate เก็บไว้ในขวดสีชา

ภาคผนวกที่ 3

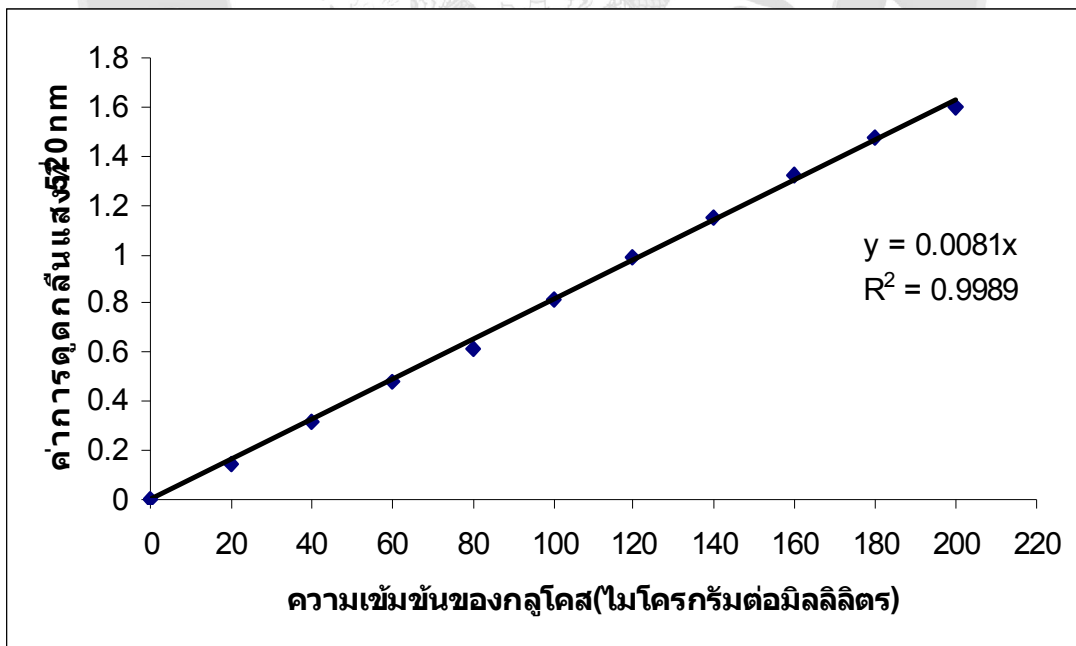
กราฟมาตรฐาน และวิธีการคำนวณ

การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

1. เตรียม stock solution ของกลูโคสความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกลูโคส 2.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายกลูโคสมา 1.0 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานในหลอดทดลอง โดยดูดสารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ เติมน้ำกลั่นให้ทุกหลอดมีปริมาตรเป็น 1.0 มิลลิลิตรเท่ากัน
3. เติมสารละลาย Somogyi 1.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นทันที แล้วจึงเติมสารละลาย Nelson 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที
4. เติมน้ำกลั่นลงไป 2.0 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากันนำแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เทียบกับหลอดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank ได้ผลดังตาราง

ตารางผนวก 3.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ของสารละลาย กลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ น้ำตาล(µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm			
	OD 1	OD 2	OD 3	OD เฉลี่ย
0	0.00	0.00	0.00	0.00
20	0.163	0.161	0.158	0.161
40	0.336	0.334	0.341	0.337
60	0.503	0.488	0.521	0.504
80	0.691	0.692	0.687	0.69
100	0.896	0.872	0.874	0.881
120	1.036	1.044	1.04	1.04
140	1.199	1.214	1.206	1.206
160	1.369	1.39	1.387	1.382
180	1.54	1.559	1.562	1.554
200	1.705	1.629	1.726	1.687



ภาพผนวก 3.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์

การคำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์

ความเข้มข้นของน้ำตาล ($\mu\text{g/ml}$) = ค่าการดูดกลืนแสง 520 นาโนเมตร X อัตราการเจือจาง

ความชันของกราฟมาตรฐาน

ตัวอย่างการคำนวณ

ค่าการดูดกลืนแสง 520 นาโนเมตร เท่ากับ 0.337

อัตราการเจือจาง เท่ากับ 500 เท่า

ความชันของกราฟ $Y = 0.0081X$

ดังนั้น ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ $0.337 \times 500 = 0.0081X$

$$168.5 = 0.0081X$$

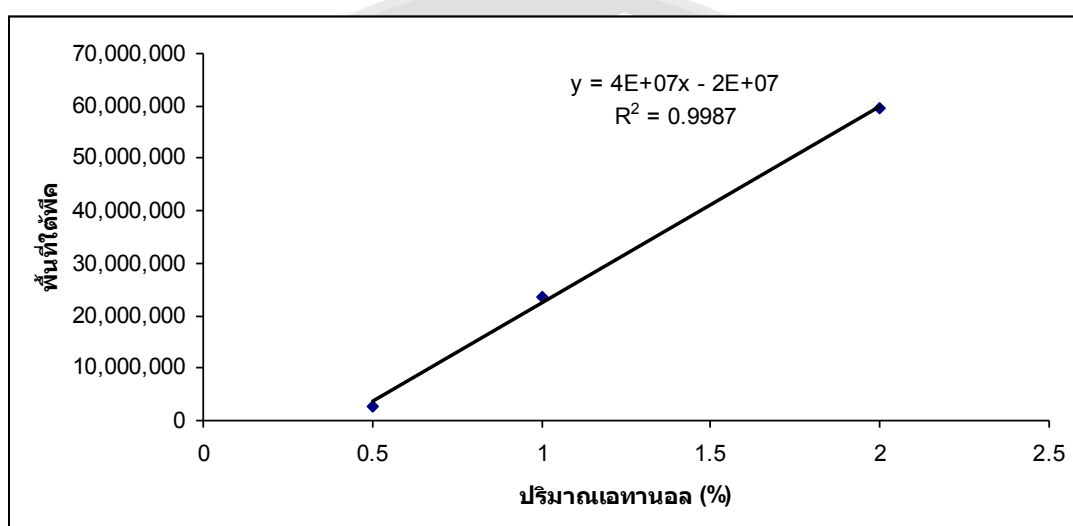
$$X = 20,802.47$$

การทำกราฟมาตรฐานเอทานอล

1. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในขวด vial เติม absolute ethanol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.5, 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร
2. นำชุดสกัดสารเพื่อวิเคราะห์ที่มีไฟเบอร์สกัดสารเพื่อวิเคราะห์ใส่ลงในขวด vial ที่มีตัวอย่างเอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิ จนอุณหภูมิถึง 70 องศาเซลเซียส จึงดันไฟเบอร์สกัดสารออกมาทิ้งไว้นาน 10 นาที
3. นำชุดสกัดสารเพื่อวิเคราะห์ไปเสียบเข้าที่ injection port ของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (Gas chromatography mass spectrometry, GC-MS)
4. นำค่าพื้นที่ใต้พีคที่ได้มาคำนวณหาปริมาณเอทานอล

ตารางผนวก 3.2 พื้นที่ได้ฟีดที่ได้จากเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS)

ความเข้มข้นของเอทานอล (%)	พื้นที่ได้ฟีด
0.5	2,801,677
1	23,571,473
2	59,575,765



ภาพผนวก 3.2 กราฟมาตรฐานเอทานอล

การคำนวณผลผลิตที่ได้ (Yield) ของน้ำมันหอมระเหย

$$\text{Yield} = \frac{\text{น้ำหนักน้ำมันที่กลั่นได้ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักรากที่ใช้สกัดน้ำมัน (กรัม)}} \times 100$$

ตัวอย่างการคำนวณ Yield = $\frac{0.1059 \times 100}{1} = 0.36$ เปอร์เซ็นต์

ภาคผนวกที่ 4
ภาพการทดลอง



ก)

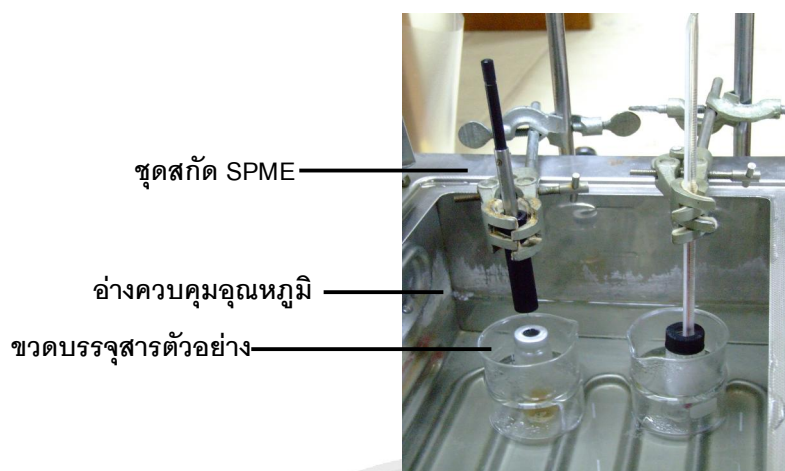
ข)



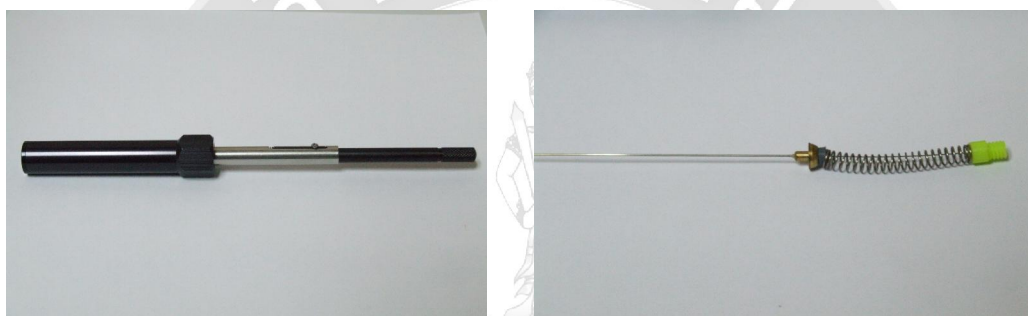
ค)

ง)

ภาพผนวก 4.1 ก) ลักษณะใบกล้วยแห้งก่อนการพรีทรีท
 ข) ลักษณะใบกล้วยแห้งที่หั่นให้มีขนาดเล็กลง
 ค) ลักษณะใบกล้วยแห้งหลังการพรีทรีท
 ง) ลักษณะเศษใบกล้วยแห้งหลังการไฮโดรไลซิสแล้ว



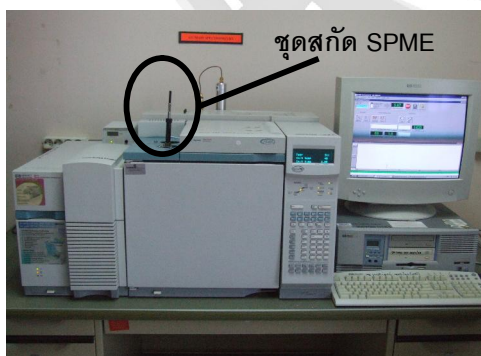
ภาพผนวก 4.2 วิธีการสกัดเอทานอลโดยวิธี Solid phase microextraction (SPME) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 นาที



ภาพผนวก 4.3 ส่วนประกอบของชุดสกัด Solid phase microextraction (SPME)

ก) SPME holder

ข) SPME Fiber (Carbowax™/DVB stable Flex™ for manual holder 70 µm)



ก)



ข)

ภาพผนวก 4.4 วิธีการฉีดตัวอย่างจากชุดสกัด SPME เข้าเครื่อง GC-MS

ก) เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) และชุดสกัด SPME

ข) การฉีดตัวอย่างจากชุดสกัด SPME เข้า injector port ของเครื่อง GC-MS



ภาพผนวก 4.5 ลักษณะการหมักเศษใบหญ้าแห้งกับเซลล์ยีสต์ในถุงพลาสติก

ป๋มที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 21 วัน



ก)



ข)



ค)

ภาพผนวก 4.6 ก) ลักษณะใบหญ้าแห้งหอมก่อนการพรีทรีท

ข) ลักษณะใบหญ้าแห้งหอมหลังการพรีทรีท อบแห้งที่อุณหภูมิ

55 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 ชั่วโมง

ค) ลักษณะเศษใบหญ้าแห้งหอมหลังการไฮโดรไลซิสแล้ว อบแห้งที่

อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 ชั่วโมง



ภาพผนวก 4.7 ลักษณะเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด

เลนส์ประกอบ กำลังขยาย 400 เท่า



ภาพผนวก 4.8 ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแห้งหอม

ภาคผนวกที่ 5
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางผนวก 5.1 การวิเคราะห์ความแตกต่างของโปรตีนในเศษใบหญ้าแฝกหอมหมักกับเซลล์ยีสต์ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ANOVA

PROTEIN

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.954	3	.985	8.785	.007
Within Groups	.897	8	.112		
Total	3.851	11			

ตารางผนวก 5.2 การเปรียบเทียบความแตกต่างของโปรตีนในเศษใบหญ้าแฝกหอมหมักกับเซลล์ยีสต์ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

PROTEIN

Duncan^a

TRETMENT	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
tret2	3	3.7733		
tret1	3	4.2467	4.2467	
control	3		4.6300	4.6300
tret3	3			5.1233
Sig.		.122	.198	.109

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางผนวก 5.3 การวิเคราะห์ความแตกต่างของเยื่อใยในใบหญ้าแฝกสดกับเศษใบหญ้าแฝกหอมที่ไม่ได้หมักกับเซลล์ยีสต์ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ANOVA

FIBER

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	241.300	1	241.300	596.294	.000
Within Groups	1.619	4	.405		
Total	242.919	5			

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์ข้อมูลการทดลอง
การทดลองที่ 3

ตารางผนวก 5.4 การวิเคราะห์ความแตกต่างการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* โดยน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ANOVA

TRET

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	82.172	4	20.543	28.625	.000
Within Groups	7.177	10	.718		
Total	89.348	14			

Homogeneous Subsets

TRET

Duncan^a

OIL	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1:10	3	8.2000	14.2667
1:5	3	8.2667	
1:1	3	8.3167	
nodilute	3	9.1167	
tetracycline	3		
Sig.		.245	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางผนวก 5.5 การวิเคราะห์ความแตกต่างการยับยั้งการเจริญของ *Proteus vulgaris*
โดยน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ANOVA

TRET

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.855	4	1.464	4.747	.021
Within Groups	3.083	10	.308		
Total	8.938	14			

Homogeneous Subsets

TRET

Duncan^a

OIL	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1:5	3	8.1167	
1:1	3	8.2333	
1:10	3	8.6833	
nodilute	3	8.9333	8.9333
tetracycline	3		9.8667
Sig.		.124	.067

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางผนวก 5.6 การวิเคราะห์ความแตกต่างการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus cereus*
โดยน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้าแฝกหอมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ANOVA

TRET

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	39.198	4	9.800	9.252	.002
Within Groups	10.592	10	1.059		
Total	49.790	14			

Homogeneous Subsets

TRET

Duncan^a

OIL	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
nodilute	3	13.8000	18.3333
1:1	3	14.3833	
1:5	3	14.5167	
1:10	3	15.7167	
tetracycline	3		
Sig.		.059	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางผนวก 5.7 การวิเคราะห์ความแตกต่างการยับยั้งการเจริญของ
Staphylococcus aureus โดยน้ำมันหอมระเหยจากรากหญ้า
 แฝกหอมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ANOVA

TRET

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	120.516	4	30.129	33.942	.000
Within Groups	8.877	10	.888		
Total	129.392	14			

Homogeneous Subsets

TRET

Duncan ^a

OIL	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1:10	3	9.7500		
1:5	3	10.1833	10.1833	
nodilute	3	10.5167	10.5167	
1:1	3		11.6333	
tetracycline	3			17.4333
Sig.		.364	.102	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.