

การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพจากกากเมล็ดสบู่ดำ โดยวิธีการหมักแบบแห้งด้วย *Trichoderma harzianum* The Study of Potential of Biofertilizer Production from *Jatropha curcas* Seed Cake using Solid-State Fermentation by *Trichoderma harzianum*

คันสนีย์ นุชบุญช่วย อนุสิษฐ์ ธนะพิมพ์เมธา* เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และ เมธิ สายศรีหยุด

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

*corresponding author. E-mail: fengjrc@gmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพของการใช้ประโยชน์จากกากเมล็ดสบู่ดำ โดยทำการศึกษาลักษณะที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา (ปริมาณกลูโคซามีน) ด้วยรา *Trichoderma harzianum* โดยใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อปริมาณกลูโคซามีน คือ ที่ปริมาณความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณต้นเชื้อ 7.5 เปอร์เซ็นต์ และอุณหภูมิในการหมัก 33 องศาเซลเซียส ซึ่งจะได้ปริมาณกลูโคซามีนสูงสุดเท่ากับ 84 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง และจากการวิเคราะห์สมบัติและธาตุอาหารในปุ๋ยชีวภาพพบว่า มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.33 ค่าการนำไฟฟ้าเท่ากับ 3.78 เดซิซีเมนต่อเมตร อินทรีย์วัตถุเท่ากับ 47.48 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 8 ไนโตรเจนเท่ากับ 3.61 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัสเท่ากับ 1.93 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมเท่ากับ 2.29 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณสารฟอรับอล เอสเทอร์ที่หลงเหลืออยู่เท่ากับ 0.093 มิลลิกรัมต่อกรัม จากสภาวะที่เหมาะสมในการหมักกากเมล็ดสบู่ดำ พบว่าปริมาณสารฟอรับอล เอสเทอร์ที่หลงเหลืออยู่ในกากเมล็ดสบู่ดำมีค่าลดลง (น้อยกว่า 0.11 มิลลิกรัมต่อกรัม) เพราะสารฟอรับอล เอสเทอร์ในกากเมล็ดสบู่ดำจะถูกกำจัดโดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในกระบวนการหมัก ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากกากเมล็ดสบู่ดำเป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับพืชอาหารจะมีความปลอดภัยทั้งกับการบริโภคของผู้บริโภค และเป็นผลดีกับสิ่งแวดล้อมในดิน ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถเป็นทางเลือกในการแก้ปัญหาราคาปุ๋ยที่เพิ่มขึ้นได้อีกด้วย

คำสำคัญ :

กากเมล็ดสบู่ดำ ปุ๋ยชีวภาพ รา *Trichoderma harzianum* สารฟอรับอล เอสเทอร์

Abstract

The objective of this work was to study the efficient utilization of *Jatropha curcas* seed cake. The optimized conditions of *Trichoderma harzianum* growth (based on glucosamine content) using Box-behnken experimental design. The result showed that the optimum conditions for the biofertilizer production by *T. harzianum* obtained from this experiment were 60% moisture

content of substrate, 7.5% inoculums and 33°C incubation temperature which obtained the highest glucosamine content of 84 mg/gds. Then, the physiochemical parameters and elemental composition were analyzed and it indicated the potential of fertilizer from *Jatropha curcas* seed cake. From the results, pH (6.33), electrical conductivity (3.78ds/m), organic matter (47.48%), C/N ratio (8), nitrogen (3.61%), phosphorus (1.93%), potassium (2.29%) and phorbol ester content (0.093mg/g). From the optimized condition, the amount of phorbol ester residue in the *Jatropha curcas* seed cake was partly reduced (< 0.11 mg/g) due to toxins in the seed cake were removed by microbial fermentation. Therefore, utilization of *Jatropha curcas* seed cake as bio-fertilizer for vegetable crops was marked as a safe practice, both for the consumer consumption and soil environment. This outcome can be a choice to solve the problem of the increase in fertilizer prices.

Keywords : 

Jatropha curcas Seed Cake, biofertilizer, *Trichoderma harzianum*, phorbol ester

1. บทนำ

สบู่ดำเป็นพืชน้ำมันที่เป็นทางเลือกสำคัญในการพัฒนาทางด้านอุตสาหกรรมเชื้อเพลิง เนื่องจากน้ำมันที่สกัดได้จากเมล็ดสบู่ดำสามารถนำมาใช้กับเครื่องยนต์การเกษตรที่มีรอบต่ำได้ อีกทั้งน้ำมันที่ได้จากเมล็ดสบู่ดำยังให้เขม่าควันน้อยกว่าน้ำมันเชื้อเพลิงดีเซล ซึ่งไม่มีผลกระทบต่อเครื่องยนต์ นอกจากนี้ราคาน้ำมันสบู่ดำยังมีราคาถูกกว่าน้ำมันเชื้อเพลิงชนิดอื่นๆ อีกด้วย [1]

จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากสบู่ดำ จะมีส่วนที่เหลือจากการสกัดน้ำมันออกจากวัตถุดิบเรียกว่า “กากเมล็ดสบู่ดำ” เมื่อนำกากเมล็ดสบู่ดำไปวิเคราะห์พบว่ากากเมล็ดสบู่ดำมีธาตุอาหารที่สำคัญ ได้แก่ ธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ในปริมาณสูง [2] โดยสมบัติดังกล่าวทำให้กากเมล็ดสบู่ดำเหมาะที่จะนำมาทำเป็นปุ๋ย [3] ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบ อีกทั้งยังช่วยในการรักษาสังแวดล้อมอีกด้วย [4]

แต่อย่างไรก็ตามกากเมล็ดสบู่ดำที่ได้หลังจากการสกัดน้ำมันจะพบสารฟอรับอล เอสเทอร์ (phorbol ester) [5] ซึ่งเป็นสารพิษที่พบได้ในเมล็ดของพืชวงศ์

Euphorbiaceae ฟอรับอล เอสเทอร์ จัดเป็นสารซึ่งเมื่อได้รับพิษจะส่งผลโดยตรงกับคนและสัตว์ ซึ่งจะส่งเสริมให้เกิดเนื้องอก [6] ดังนั้นก่อนการนำกากเมล็ดสบู่ดำไปใช้เป็นปุ๋ยควรกำจัดสารฟอรับอล เอสเทอร์เสียก่อนด้วยกระบวนการหมัก ถึงแม้จะมีธาตุอาหารที่เหมาะสมในการนำไปใช้ทำปุ๋ย ก็ไม่สามารถนำไปใช้ทำปุ๋ยได้จริงเพราะสารฟอรับอล เอสเทอร์ การหมักเป็นหนึ่งในวิธีในการกำจัดสารฟอรับอล เอสเทอร์ [7] ดังนั้นหลังการหมักก็จะได้ปุ๋ยชีวภาพจากกากเมล็ดสบู่ดำที่มีสารฟอรับอล เอสเทอร์ลดลง

กระบวนการหมักแบบแห้ง (solid-state fermentation) เป็นกระบวนการที่ถูกเลือกใช้ในงานวิจัยนี้ ซึ่งกระบวนการหมักแบบแห้ง คือ กระบวนการหมักบนวัสดุที่เป็นของแข็ง ซึ่งไม่มีน้ำอิสระ (free water) ที่ใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ เพราะฉะนั้นน้ำที่อยู่ในกระบวนการหมักนี้จึงอยู่ในสภาพของความชื้น (moisture content) ในวัสดุหมักที่ถูกดูดซับอยู่ในวัสดุหมักเท่านั้น จึงเหมาะต่อการหมักด้วยจุลินทรีย์ที่เป็นราเป็นส่วนใหญ่ [8]

โดยงานวิจัยนี้ใช้รา *Trichoderma harzianum* มาเป็นจุลินทรีย์ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ ราชนิดนี้เป็นราที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารฟอรับอล เอสเทอร์ [9] และยังเป็นราปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมเชื้อราซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพืช อีกทั้งยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้เป็นอย่างดี [10] โดยในหลักวิชาการปุ๋ยทั่วไปสามารถจำแนกปุ๋ยได้ 3 ประเภท คือ ปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์ และปุ๋ยชีวภาพ ซึ่งมีนิยามต่างกันดังนี้ คือ ปุ๋ยเคมี หมายถึง ปุ๋ยที่ได้จากสารอนินทรีย์หรืออินทรีย์สังเคราะห์ และยังหมายความถึงปุ๋ยอินทรีย์ที่มีปุ๋ยเคมีผสมอยู่ด้วย แต่ไม่รวมถึงปุ๋ยชีวภาพ ดินมาร์ล ปุ๋ยพลาสติก หรือปุ๋ยผสมปุ๋ยอินทรีย์ หมายถึง ปุ๋ยที่ได้จากอินทรีย์วัตถุ ซึ่งผลิตด้วยกรรมวิธีทำให้ขึ้น ลับ บด หมัก ร่อน หรือวิธีการอื่นๆ แต่ไม่ใช่ปุ๋ยเคมี และปุ๋ยชีวภาพ หมายถึง ปุ๋ยที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ที่สามารถสร้างธาตุอาหาร หรือช่วยให้ธาตุอาหารเป็นประโยชน์กับพืช [4] จากคุณสมบัติของรา *T. harzianum* และจากนิยามของปุ๋ยชีวภาพดังกล่าวมาแล้วในข้างต้น ผู้วิจัยจึงได้ใช้การออกแบบการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณจุลินทรีย์สูงสุด โดยทั่วไปหนึ่งในวิธีที่นิยมใช้ในการวัดปริมาณของจุลินทรีย์ประเภทรา ได้แก่ การวัดปริมาณของกลูโคซามีน ซึ่งกลูโคซามีนเป็นสารที่อยู่ในผนังเซลล์ สามารถแสดงถึงจำนวนชีวมวลของราได้ [11] ดังนั้นถ้าปริมาณกลูโคซามีนมาก นั่นแสดงว่าราจะเจริญดี

ผู้วิจัยออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการเจริญของรา (กลูโคซามีน) ตัวแปรที่ศึกษาได้แก่ ความชื้นของวัสดุหมัก ปริมาณต้นเชื้อ และอุณหภูมิ ในการหมัก จากนั้นนำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการออกแบบนี้มาทดลองจริงเพื่อหาปริมาณกลูโคซามีนเปรียบเทียบกับผลจากการออกแบบด้วย Box-Behnken ว่าถูกต้องหรือไม่ และนำกากเมล็ดสับดูดำหลังการหมักนี้ไปวิเคราะห์สมบัติของปุ๋ยชีวภาพ รวมทั้งหาปริมาณฟอรับอล เอสเทอร์ ที่หลงเหลืออยู่

2. จุลินทรีย์ วัสดุและวิธีการทดลอง

2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

รา *T. harzianum* เป็นสปอร์ต้นเชื้อที่มีความเข้มข้นสปอร์เท่ากับ 1×10^8 สปอร์ต่อกรัมผงต้นเชื้อ โดยมีชื่อทางการค้าว่า ยูนิเซฟ

2.2 การเตรียมวัสดุหมัก

นำกากเมล็ดสับดูดำที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกแล้วไปตากแดด เพื่อไล่ความชื้นที่อยู่ในกากเมล็ดสับดูดำ และเพื่อเป็นการป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆ

2.3 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา (ปริมาณกลูโคซามีน) ด้วยรา *T. harzianum* โดยใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken และหาปริมาณสารฟอรับอล เอสเทอร์ที่หลงเหลืออยู่

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา (ปริมาณกลูโคซามีน) จากวัสดุหมักกากเมล็ดสับดูดำด้วยรา *T. harzianum* ภายใต้กระบวนการหมักแบบแห้งนั้น อาศัยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken โดยอาศัยปัจจัยดังต่อไปนี้ ความชื้นวัสดุหมักเริ่มต้น (50-70 เปอร์เซ็นต์) ปริมาณต้นเชื้อ (0-10 เปอร์เซ็นต์) และอุณหภูมิในการหมัก (20-40 องศาเซลเซียส) จากการออกแบบจะได้การทดลอง 15 การทดลอง ดังตารางที่ 1 เพื่อความน่าเชื่อถือของข้อมูลจึงทำการทดลอง 3 ซ้ำ

หลังจากนั้นจะวิเคราะห์สมบัติธาตุอาหาร และปริมาณสารฟอรับอล เอสเทอร์ ที่หลงเหลืออยู่ในปุ๋ยชีวภาพ ในกรณีที่วิเคราะห์แล้วพบว่าสารฟอรับอล เอสเทอร์ มีค่าเกินมาตรฐานจะเพิ่มระยะเวลาการหมักตามงานวิจัยของปาริชาติ (2552) [12] ที่พบว่าปริมาณสารฟอรับอล เอสเทอร์ จะลดลงตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น

2.4 การวิเคราะห์สมบัติและธาตุอาหารในปุ๋ยชีวภาพ

การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่อง pH meter การวิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์วัตถุ ค่าการนำไฟฟ้า อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมตามวิธีที่ระบุในคู่มือวิเคราะห์ปุ๋ยอินทรีย์ กรมวิชาการ-เกษตร ปี พ.ศ. 2548 [4]

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนตามวิธี Cochran และ Vercellotti (1978) [13] ทำโดยใส่สารละลายที่ได้จากการสกัดของแข็งที่ได้จากการหมักกากเมล็ดสับดำ จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเติมสารละลาย Acetyl acetone reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอดทดลอง แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 20 นาที เติมสารละลาย Ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์จำนวน 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Ehrlich reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ได้

2.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟอร์บออล เอสเทอร์

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟอร์บออล เอสเทอร์วิธีการวิเคราะห์จะใช้เครื่อง HPLC ตามวิธีของ Wilhelm Hass (2000) [15] โดยใช้ปริมาตรของสารที่วิเคราะห์ 20 ไมโครลิตร นำมากรองด้วยเมมเบรนชนิดไนลอนขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใช้ photodiode array เป็น detector ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และใช้ reversed phase column ขนาด 3.9x150 มิลลิเมตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เฟสเคลื่อนที่เป็นอะซิโตน-ไตรคลอโรเอทิลในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 โดยปริมาตร อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนการทดลองที่ได้จากการออกแบบการทดลองด้วย Box-Behnken

การทดลองที่	ปัจจัยการทดลอง		
	อุณหภูมิในการหมัก (X_1)	ปริมาณต้นเชื้อ <i>T.harzianum</i> (X_2)	ความเข้มข้นหมักเริ่มต้น (X_3)
1	20	0	60
2	30	0	70
3	40	5	50
4	40	10	60
5	20	5	70
6	30	10	70
7	30	5	60
8	40	0	60
9	20	5	50
10	40	5	70
11	20	10	60
12	30	5	60
13	30	10	50
14	30	0	50
15	30	5	60

3. ผลการทดลอง

การศึกษาลักษณะที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา (ปริมาณกลูโคซามีน) ด้วยรา *T. harzianum* โดยใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken และหาปริมาณสารฟอร์บออล เอสเทอร์ที่หลงเหลืออยู่

ผลจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อปริมาณกลูโคซามีน ซึ่งผลจากการทดลองสามารถหาสมการแบบจำลองทำนายปริมาณกลูโคซามีนได้ดังนี้

$$\text{Glucosamine} = -503.4 + 8.58 X_1 + 19.13 X_2 + 12.63 X_3 - 0.1476 X_1^2 - 1.2146 X_2^2 - 0.1078 X_3^2 + 0.0385 X_1 X_2 + 0.0123 X_1 X_3 - 0.0368 X_2 X_3$$

โดยที่

X_1 คือ อุณหภูมิในการหมัก (องศาเซลเซียส)

X_2 คือ ปริมาณต้นเชื้อ *T. harzianum* (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)

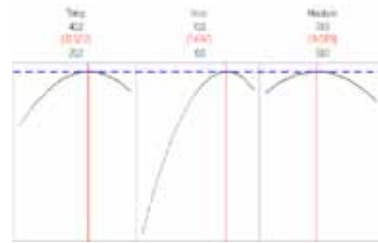
X_3 คือ ความเข้มข้นหมักเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)

ตารางที่ 2 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R²)

Source	DF	SS	MS	F	p-value
Regression (model)	9	34843.0	3871.4	118.59	0.000
Residual Error	35	1142.6	32.6		
Total	44	35985.6			
R ² = 96.82% R ² (adj) = 96.01% F _{table} = 2.165					

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ดังตารางที่ 2 แสดงค่า p-value ของสมการแบบจำลองปริมาณกลูโคซามีน ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าสมการแบบจำลองมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ในการทำนายปริมาณกลูโคซามีนอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาค่าวิกฤติการแจกแจง ซึ่งเป็นตัวพิจารณาว่าสมการที่ได้นั้นมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้หรือเชื่อถือได้หรือไม่ โดยพิจารณาเทียบกับค่าวิกฤติการแจกแจง ที่ได้จากตาราง [14] ซึ่ง $F_{table} = 2.165$ เมื่อเทียบกับ F ที่ได้จากการออกแบบการทดลอง พบว่ามีค่ามากกว่า F_{table} แสดงว่าสมการแบบจำลองปริมาณกลูโคซามีน ที่ได้จากการทำนายมีความเหมาะสมและน่าเชื่อถือได้ ส่วนค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ สำหรับปริมาณกลูโคซามีนมีค่าเท่ากับ 96.82 เปอร์เซ็นต์

จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box-Behnken พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่มีค่าปริมาณกลูโคซามีนสูงสุดคือที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ปริมาณต้นเชื้อ 7.5 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณความชื้น 60 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงสภาวะที่เหมาะสมต่อปริมาณกลูโคซามีน จากวัสดุหมักกากเมล็ดสับดำด้วยรา *T. harzianum*

ผลของสภาวะที่ได้จากการออกแบบการทดลองนั้น นำมายืนยันผลความถูกต้องด้วยการนำมาทำการทดลองจริงในสภาวะเดียวกันนี้ คือ ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ปริมาณต้นเชื้อ 7.5 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณความชื้น 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าจะมีค่ากลูโคซามีน 83.89 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง และค่าที่ได้จากการทำนายมีค่ากลูโคซามีน 81.20 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง ซึ่งให้ความแตกต่างเพียง 3.21 เปอร์เซ็นต์ จึงแสดงว่าค่าสมการมีความถูกต้องในการหาปริมาณกลูโคซามีน

โดยหลังจากทำการทดลองเพื่อยืนยันผลจากสภาวะที่เหมาะสมแล้ว ผู้วิจัยได้วิเคราะห์สมบัติธาตุอาหาร และปริมาณสารฟอรับอล เอสเทอร์ ที่หลงเหลืออยู่ในปุ๋ยชีวภาพ พบว่าการหมักกากเมล็ดสับดำมีความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น โดยสภาวะเริ่มต้นกากเมล็ดสับดำมีค่าเป็นกรดอยู่ที่ 5.92 ภายหลังจากการหมักมีความเป็นกรดลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์ดำเนินกิจกรรมย่อยสลายแร่ธาตุไนโตรเจนกลายเป็นแอมโมเนีย [16] ส่วนค่าการนำไฟฟ้าซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงปริมาณเกลือที่ละลายน้ำได้ โดยปกติเกณฑ์มาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์ต้องมีการนำไฟฟ้าไม่เกิน 10 เดซิซีเมนต่อเมตร [4] ซึ่งจากการทดลองพบว่าค่าการนำไฟฟ้ามีแนวโน้มลดลง อาจเนื่องมาจากการตกตะกอนของแร่ธาตุชนิดต่างๆ [17] โดยค่าอินทรีย์วัตถุและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของกากเมล็ดสับดำมีค่าลดลง ซึ่งก่อนการหมัก

มีค่าค่อนข้างสูง คือ 80.66 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากการหมักปริมาณอินทรีย์วัตถุมีปริมาณเหลืออยู่เพียง 60.89 เปอร์เซ็นต์ สาเหตุที่อินทรีย์วัตถุและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนลดลง เนื่องมาจากอินทรีย์สารถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ คาร์บอนอินทรีย์ส่วนหนึ่งจะถูกใช้ในการเจริญเติบโต ส่วนที่เหลือจะเปลี่ยนเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้คาร์บอนอินทรีย์ลดลงตามระยะเวลาการหมัก [18]

การเปลี่ยนแปลงปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนพบว่า มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มขึ้นของธาตุอาหารไนโตรเจนอาจเนื่องมาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่มีการใช้ไนเตรทในการเจริญเติบโต และสร้างเซลล์ในรูปที่มีอินทรีย์ไนโตรเจน เช่นเดียวกับปริมาณโพแทสเซียมที่มีค่าเพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากธาตุอาหารโพแทสเซียมมีการตกตะกอนเป็นของแข็งที่ละลายน้ำได้ยาก ทำให้โพแทสเซียมทั้งหมดต่อหน่วยน้ำหนักแห้งมีค่าเพิ่มขึ้น [17]

ตารางที่ 3 แสดงสมบัติและธาตุอาหารของกากเมล็ดสับดำที่ผ่านการหมักในสภาวะที่เหมาะสมที่ระยะเวลา 30 วัน และหมักต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 45 วัน เพื่อลดสารฟอรับอล เอสเทอร์

คุณลักษณะ	ปริมาณค่าที่วัด			มาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์ตามประกาศกรมวิชาการเกษตร พ.ศ. 2555 ²³
	กากเมล็ดสับดำก่อนการหมัก	กากเมล็ดสับดำหลังการหมักที่ 30 วัน	กากเมล็ดสับดำหลังการหมักที่ 45 วัน	
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	5.92	6.35	6.33	5.5 – 8.5
ค่าการนำไฟฟ้า (EC) (เดซิเมนต่อเมตร)	4.56	4.39	3.78	≤ 10
อินทรีย์วัตถุ (OM) (เปอร์เซ็นต์)	80.66	60.89	47.48	≥ 20
อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio)	12.41	8.00	8.00	≤ 20 : 1
ไนโตรเจน (total N) (เปอร์เซ็นต์)	3.77	4.17	3.61	≥ 1.0
ฟอสฟอรัส (total P ₂ O ₅) (เปอร์เซ็นต์)	2.47	2.41	1.93	≥ 0.5
โพแทสเซียม (total K ₂ O) (เปอร์เซ็นต์)	2.01	2.23	2.29	≥ 0.5
สารฟอรับอล เอสเทอร์ (มิลลิกรัมต่อกรัม)	0.744	0.156	0.093	0.11

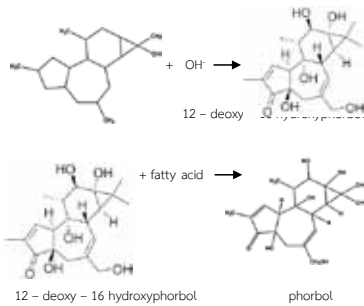
การลดลงของสารฟอรับอล เอสเทอร์ที่เกิดจากกระบวนการหมัก เกิดได้เนื่องจากสารทิกเลียน (tiglane) ในกากเมล็ดสับดำทำปฏิกิริยาไฮดรอกซิเดชัน (hydroxylation) จะมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) จับที่คาร์บอนตำแหน่งต่างๆ ของสารทิกเลียน เกิดเป็นสารประกอบ

และจากการวิเคราะห์ปริมาณสารฟอรับอล เอสเทอร์ หลังจากหมักที่ระยะเวลา 30 วัน พบว่ามีปริมาณสารฟอรับอล เอสเทอร์ที่หลงเหลืออยู่ 0.156 มิลลิกรัมต่อกรัม ซึ่งมีค่ามากกว่าเกณฑ์มาตรฐาน จึงต้องเพิ่มระยะเวลาการหมัก [12] เพื่อลดปริมาณสารฟอรับอล เอสเทอร์ให้มีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน

หลังจากเพิ่มระยะเวลาในการหมักเป็น 45 วัน พบว่าสมบัติความเป็นปฏิกิริยาอยู่ในมาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 3 ส่วนปริมาณกลูโคซามีน พบว่ามีค่าเท่ากับ 90.89 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักวัสดุหมักแห้ง

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟอรับอล เอสเทอร์ หลังจากเพิ่มระยะเวลาการหมัก พบว่ามีค่าน้อยกว่า 0.11 มิลลิกรัมต่อกรัม (ตารางที่ 3) ซึ่งการลดลงของฟอรับอล เอสเทอร์ในปุ๋ยชีวภาพจากงานวิจัยนี้มีค่าเทียบเคียงกับปริมาณสารฟอรับอล เอสเทอร์ที่พบในสับดำพันธุ์ไม่มีพิษ [19]

แอลกอฮอล์ (alcohol) เมื่อสารประกอบแอลกอฮอล์ทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) กับกรดไขมัน (fatty acid) ก็เกิดสารที่เรียกว่า “ฟอรับอล เอสเทอร์” [20] ดังแสดงใน ภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารทิกเลียน และสารฟอรับอล เอสเทอร์

ดังนั้นในการหมักที่สามารถลดสารฟอรับอล เอสเทอร์ได้นั้นเป็นเพราะจะผลิตเอนไซม์ไลเปส (lipase) [21] เพื่อย่อยสลายพันธะของสารฟอรับอล เอสเทอร์ในตำแหน่งที่ติดกับกรดไขมัน (triacylglycerols) [22] ดังแสดงในภาพที่ 2 ทำให้สารประกอบฟอรับอล เอสเทอร์มีค่าลดลงจากกลไก ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ซึ่งการลดลงของสารฟอรับอล เอสเทอร์ของงานวิจัยนี้มีแนวโน้มลดลงจากการหมักด้วยรา *T. harzianum* เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Chetna (2011) ที่ใช้การหมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่สูง และเอนไซม์ชนิดนี้ยังมีผลต่อสารทิกเลียนอีกด้วย

4. สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพโดยการหมักแบบแห้งในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้กากเมล็ดสบู่ดำเป็นวัสดุหมัก ร่วมกับรา *T. harzianum* พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพ คือ ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ปริมาณต้นเชื้อ 7.5 เปอร์เซ็นต์ และความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาหมัก 30 วัน และเมื่อเพิ่มระยะเวลาการหมักเป็น 45 วัน สามารถลดปริมาณสารฟอรับอล เอสเทอร์ให้มีค่าเทียบเคียงกับปริมาณสารฟอรับอล เอสเทอร์ที่พบในสบู่ดำพันธุ์ไม่มีพิษ

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จด้วยดี

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] ศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร. 2556. ความรู้เกี่ยวกับสบู่ดำ. แหล่งที่มา : <http://www.crma.ac.th/medept/fuel/blacksoap.htm>, 25 เมษายน 2558.
- [2] แอนนา สายมณีรัตน์. 2553. ผลการใช้กากเมล็ดสบู่ดำเป็นปุ๋ยอินทรีย์ที่มีต่อผลผลิตข้าวโพดหวาน, การประชุมเชิงปฏิบัติการโครงการวิจัยแม่บทข้าวโพดและข้าวฟ่าง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 4, 17 - 19 มิถุนายน 2553, 156 - 167 น.
- [3] Shivani C., Singh B. and Khare S. K.. 2010. Evaluation of hydrolytic enzymes in bioaugmented compost of *Jatropha cake* under aerobic and partial anaerobic conditions. *Bioresource Technology* 92 : 307 - 310.
- [4] กรมวิชาการเกษตร. 2548. ความรู้เกี่ยวกับปุ๋ยอินทรีย์. แหล่งที่มา: <http://aglib.doa.go.th>, 5 เมษายน 2558.
- [5] วิทยา บันสุวรรณ. 2550. การศึกษาฟอรับอล เอสเทอร์ในส่วนต่างๆ ของสบู่ดำและการหาตัวดูดซับฟอรับอล เอสเทอร์ในน้ำมันสบู่ดำ. ในโครงการสัมมนาวิชาการ เรื่อง “การประชุมวิชาการสบู่ดำแห่งชาติ” ครั้งที่ 1, 29 - 30 พฤษภาคม 2550, 252 - 257 น.
- [6] Adolf, W., Opferkuch, J. and Hecker, E. 1984. Irritant phorbol derivatives from four *Jatropha* sp. *Phytochemistry*. 23 (1), 129 - 132.
- [7] Chetna J., Priyanka M, and Khare S.K.. 2011. Degradation of phorbol ester by *Pseudomonas aeruginosa* Psea during solid-

state fermentation of deoiled *Jatropha curcas* seed cake. *Bioresource Technology* 102 (2011) 4815 - 4819.

[8] Mitchell D.A., Berovic M and Krieger N.. 2002. Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnology Annual Review.* 8 : 183 - 225.

[9] Azhar N.. 2014. Detoxification of Toxic Phorbol Esters from Malaysian *Jatropha curcas* Linn. Kernel by *Trichoderma* spp. and *Endophytic Fungi*. *Molecular Sciences* : 1422 - 0067.

[10] สายทอง แก้วฉาย. 2555. การใช้ไตรโคโรเดอร์มาในการควบคุมโรคพืช. วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์, 4 (3), 108 - 123 น.

[11] Sakurai Y., Lee T.H. and Shiota H. 1977. On the convenient method of the glucosamine estimation in koji. *Agric. Biol. Chem.* 41 : 619 - 624.

[12] ปาริชาติ มั่นอัน. 2552. การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารฟอรับอล เอสเทอร์ในระหว่างการทำหมักปุ๋ยจากกากเมล็ดสบู่ดำ. ในการประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47, 17 - 20 มีนาคม 2552 สาขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ, 62 - 70 น.

[13] Cochran T.W. and Vercellotti J.R. 1987. Hexosamine biosynthesis of fungi as a reliable index of fungal biomass accumulation in liquid and solid media. *Carbohydrate Res.* 61 : 529 - 533.

[14] Montgomery C. D. 2005. Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc., United States of America.

[15] Haas W., Sterk H. and Mittelbach M. 2002. Novel 12-Deoxy-16-hydroxy phorbol esters isolated from the seed oil of *Jatropha curcas* J. *Nat. Prod.* 65, 1434 - 1440.

[16] Das M, Uppal HS, Singh R, Beri S, Mohan KS, Gupta VC and Adholeya A 2011. Co-composting of physic nut (*Jatropha curcas*) deoiled cake with rice straw and different animal dung. *Bioresource. Technol.*, 102, 6541 - 6546.

[17] ประกาศิต อินทรสำอางค์. 2549. การแปรสภาพและคุณภาพของปุ๋ยหมักจากฟางข้าว ชานอ้อย ชี้เลี้ยงเป็ดลูกยาคาลิปดัส และตะกอนน้ำเสียโรงงานเยื่อกระดาษ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

[18] Crawford J. H. 1983. Composting of agricultural wastes - a review. *Process Biochem.* 18 : 14 - 18.

[19] จิระเดช แจ่มสว่าง. 2546. บทความเรื่องเชื้อราไตรโคโรเดอร์มา. แหล่งที่มา : <http://www.ku.ac.th/emagazine/april45/agri/trichoderma.html>, 5 กรกฎาคม 2557.

[20] Goel, G., Makkar H.P.S., Francis G. and Becker K.. 2007. Phorbol ester: structure, biological activity, and toxicity in animals. *International Journal of Toxicology* 26: 279 - 288.

[21] Haddadin M.S.Y.; Haddadin J.; Arabiyat O.I. and Hattar B. Biological conversion of olive pomace into compost by using *Trichoderma harzianum* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource. Technol.* 2009, 100, 4773 - 4782.

[22] Chul-Hyung K., Ki-Hoon O., Mi-Hwa L, Tae-Kwang O. and Bong K., 2011. A novel family VII esterase with industrial potential from compost metagenomics library. *Microb. Cell Fact.*, 10 : 22 - 30

[23] กรมวิชาการเกษตร. 2555. ประกาศกรมวิชาการเกษตร. แหล่งที่มา: http://aglib.doa.go.th/ard/FileUpload/Fertilizer/fertilizer_law/fertact14.pdf, 5 เมษายน 2557.