การผลิตน้ำหมักชีวภาพจากน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์: อิทธิพลของชนิดน้ำตาล

ศศิธร กู้สุวรรณวิจิตร[1] สุดารัตน์ ตรีเพชรกุล[2] และ แสงชัย เอกประทุมชัย[3]
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน) แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของชนิดน้ำตาลต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ ในระหว่างกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพจากน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ร่วมกับเศษปลา น้ำตาลที่ใช้ในการศึกษาคือ น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง น้ำตาลกรวด น้ำตาลปี๊บ และ กากน้ำตาล วัสดุหมักประกอบด้วย น้ำตาล : เศษปลา : น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ ในอัตราส่วน 1 : 3 : 1 (โดยน้ำหนัก) หมักทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ผลการศึกษา พบว่าการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมีและชีวเคมี ในระหว่างกระบวนการทำน้ำหมักชีวภาพในทุกชุดทดลองเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 2 สัปดาห์แรกของการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 2 เดือน น้ำหมักชีวภาพที่ใช้น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง น้ำตาลกรวด หรือ น้ำตาลปี๊บ เป็นแหล่งคาร์บอน มีการเปลี่ยนแปลงของค่าการนำไฟฟ้า ความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณกรดอินทรีย์ ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ตลอดจนค่าดัชนีการงอกของเมล็ด (GI) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.01$) แต่จะแตกต่างจากชุดทดลองที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในแง่ของการย่อยอินทรียสารและคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพ พบว่าน้ำหมักชีวภาพที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนมีประสิทธิภาพการย่อยสลายอินทรียสารที่วัดในรูปการลดลงของปริมาณอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด (TOC reduction) สูงสุดคือ ร้อยละ 86 รองลงมาคือ ชุดทดลองที่ใช้น้ำตาลปี๊บ ร้อยละ 72 และ น้ำตาลทรายแดง น้ำตาลกรวด และ น้ำตาลทรายขาว (ร้อยละ 63-66) ตามลำดับ น้ำหมักชีวภาพที่ได้มีปริมาณกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดอะซิติก (459 mM) กรดบิวทริริค (27 mM) และกรดโพรพิโอนิก (29 mM) และปริมาณธาตุอาหารโดยเฉพาะโพแทสเซียม (ร้อยละ 3.7) ในปริมาณที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)

คำสำคัญ : น้ำหมักชีวภาพ / น้ำทิ้ง / กระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ / เศษปลา / ชนิดของน้ำตาล

---

* *Corresponding author. E-mail: sudarut.tri@kmutt.ac.th*

1 *ผู้ช่วยวิจัย สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ*

2 *อาจารย์ สายวิชาการจัดการทรัพยากรชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

3 *อาจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

Production of Bio-Extract from Wastewater Originated from Virgin Coconut Oil Manufacturing Process: Influence of Sugar Types

Sasithorn Kusuwanwichid[1], Sudarut Tripetchkul[2] and Saengchai Akeprathumchai[3]

King Mongkut's University of Technology Thonburi (Bang Khun Thian), Tha Kham,

Bang Khun thian, Bangkok 10150

Abstract

The objective of this study was to investigate the influences of the types of sugars on physical, chemical and microbiological changes taking place during the preparation of bio-extract using wastes derived from the virgin coconut oil manufacturing process. Sugars adopted included palm sugar, brown soft sugar, white sugar, crystalline sugar and molasses. Raw materials, sugars, fish waste and wastewater were combined at the 1:3:1 ratio. Results showed that physical, chemical and microbiological evolutions took place rapidly during the first 2 weeks of the bio-extract fermentation. Furthermore, for all carbon sources employed except for molasses, changes in terms of electrical conductivity, pH, organic acid content and total viable count as well as germination index (GI) were insignificantly different ($p>0.01$), whilst statistically different from those obtained from bio-extract prepared using molasses as the carbon source. Bio-extract prepared using molasses as carbon source yielded the highest organic matter degradation efficacy, in terms of the total organic carbon (TOC) reduction, of 86% in comparison with 72% for palm soft sugar and 63-66% for brown sugar, crystalline sugar and white sugar. Bio-extract prepared with molasses also contained several beneficial organic acids, e.g., acetic acid (459 mM) butyric acid (27 mM) and propionic acid (29 mM), as well as potassium (3.7%) at significantly higher concentrations than those obtained with bio-extract prepared with other sugars ($p<0.01$).

Keywords : Bio-extract / Wastewater / Virgin Coconut Oil Manufacturing Process / Fish wastes / Type of sugar

* *Corresponding author. E-mail: sudarut.tri@kmutt.ac.th*

1 *Assistant researcher, Pilot Plant Development and Training Institute.*

2 *Lecturer, Division of Natural Resource Management, School of Bioresources and Technology.*

3 *Lecturer, Division of Biotechnology, School of Bioresources and Technology.*

1. บทนำ

น้ำหมักชีวภาพเป็นของเหลวที่ได้จากการหมักเศษพืช ผัก ผลไม้ หรือสัตว์ โดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ในกระบวนการย่อยสลายในสภาพที่มีออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจน และใช้น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ [1] โดยปกติในน้ำหมักชีวภาพโดยทั่วไปนอกจากจะประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์แล้วยังประกอบด้วยกรดอินทรีย์ กรดอะมิโน และฮอร์โมนหรือสารเสริมการเจริญเติบโต [2, 3] การทำน้ำหมักชีวภาพถือได้ว่าเป็นภูมิปัญญาไทยที่สืบทอดการผลิตและการใช้ประโยชน์มาเป็นระยะเวลานาน ชาวบ้านและเกษตรกรไทยมีการผลิตน้ำหมักชีวภาพและใช้ประโยชน์ในการดำรงชีวิตหลายด้าน ทั้งในด้านการเกษตรกรรม ซึ่งมีการนำมาใช้เป็นปุ๋ยทดแทนหรือลดการใช้ปุ๋ยเคมี ใช้ทดแทนยาฆ่าแมลงในการปราบศัตรูพืชหรือโรคพืช ใช้เป็นหัวเชื้อในการทำปุ๋ยหมัก และ ใช้ผสมอาหารสัตว์เพื่อส่งเสริมสุขภาพสัตว์ นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ในการทำความสะอาดพื้นครัวเรือน และบริโภค เป็นต้น

การผลิตน้ำหมักชีวภาพในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นการผลิตในระดับครัวเรือนและชุมชน เทคโนโลยีที่ใช้เป็นเทคโนโลยีพื้นบ้านที่ใช้รูปแบบและสูตรการผลิตที่แตกต่างกันไป อาทิเช่น การใช้ผัก ผลไม้ เศษวัสดุเหลือทิ้งทั้งพืชและสัตว์ [1, 2, 3, 4] การใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์หรือจุลินทรีย์ท้องถิ่น [1, 3, 4] และการใช้น้ำตาลทราย กากน้ำตาล น้ำตาลทรายแดงร่วมในกระบวนการผลิต เป็นต้น คุณภาพของน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตได้มีความแตกต่างกันไป ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดและองค์ประกอบของวัสดุหมัก ความเป็นกรดด่าง ปริมาณอากาศ [3] และ ระยะเวลาการหมัก [5] เป็นต้น น้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญที่จุลินทรีย์นำไปใช้ในการสร้างพลังงานเพื่อนำไปใช้ในการดำเนินกิจกรรมต่างๆ ในระหว่างกระบวนการหมัก [4] นับได้ว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งที่มีผลต่อกระบวนการผลิตและคุณภาพน้ำหมักชีวภาพ น้ำตาลที่เกษตรกรไทยนิยมนำมาใช้ในการทำน้ำหมักชีวภาพมีหลายชนิด เช่น กากน้ำตาล น้ำตาลทรายแดง น้ำตาลทรายขาว น้ำอ้อย น้ำตาลสด น้ำตาลปึก น้ำตาลปี๊บ และน้ำตาลกรวด เป็นต้น [3] การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนหรือชนิดของน้ำตาลต่อการผลิตและคุณภาพน้ำหมักชีวภาพจากวัตถุดิบประเภทต่างๆ มีน้อยมาก เช่น Srithawirat [6] ศึกษาผลของชนิดน้ำตาลและปริมาณเศษอาหารต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และชีวภาพในกระบวนการทำปุ๋ยน้ำจากขยะเศษอาหาร พบว่า การใช้ปริมาณเศษอาหารร้อยละ 7 ร่วมกับการใช้น้ำตาลทรายแดงเป็นแหล่งคาร์บอนให้ปริมาณกรดอินทรีย์สูงสุด น้ำหมักชีวภาพที่ได้ช่วยส่งเสริมการงอกของเมล็ดผักบุ้งและการเจริญเติบโตของผักกาดหอม จากการศึกษาของ Godjonsdottir [7]; Kinnersley และคณะ [8]; Lynch [9] พบว่า กรดอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดอะซิติก และ กรดบิวทริริค และกรดแลคติค เป็นต้น ช่วยเร่งการงอกตลอดจนความยาวของรากพืชได้ อย่างไรก็ตามหากมีความเข้มข้นมากไปอาจไปยับยั้งการเจริญของรากพืชได้ [9, 10, 11, 12] ดังนั้นการนำน้ำหมักชีวภาพที่ไม่ได้คุณภาพไปใช้ในทางการเกษตรอาจส่งผลกระทบต่อการงอกของเมล็ดพืชและการเจริญเติบโตของพืชได้ [5, 6]

กระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์แบบหมักของกลุ่มผู้ผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ มีน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตเกิดขึ้นประมาณร้อยละ 80 ของปริมาณน้ำและน้ำกะทิทั้งหมดที่ใช้ในการผลิต [13] คิดเป็นปริมาณของเหลือทิ้งที่เกิดขึ้นในพื้นที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ประมาณ 840,000 ลิตรต่อปี [14] ชาวบ้านทำการกำจัดน้ำทิ้งที่ยังไม่ผ่านการบำบัดเหล่านี้โดยการปล่อยทิ้งลงสู่พื้นดินและแหล่งน้ำสาธารณะ ก่อให้เกิดความเสื่อมโทรมแหล่งน้ำธรรมชาติและคุณภาพดิน Tripetchkul และคณะ [5] ได้ศึกษาการนำน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มาใช้ในการทำน้ำหมักชีวภาพจากร่วมกับกากน้ำตาลและเศษปลา พบว่าระยะเวลาในการหมักเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่มีผลต่อคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพ การหมักในระยะเวลาที่ยาวขึ้นส่งผลให้คุณภาพน้ำหมักชีวภาพต่ำลง อย่างไรก็ตามชนิดน้ำตาลที่ใช้ในการผลิตอาจมีผลต่อคุณภาพน้ำหมักชีวภาพที่ได้ดังที่ Srithawirat [6] ได้รายงานไว้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงสนใจศึกษาผลของชนิดน้ำตาล ได้แก่ น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง น้ำตาลกรวด น้ำตาลปี๊บ และ กากน้ำตาล ต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ ในระหว่างกระบวนการผลิตน้ำหมักชีวภาพ ประสิทธิภาพการย่อยสลายอินทรียสาร รวมทั้ง

คุณภาพของน้ำหมักชีวภาพจากน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ร่วมกับเศษปลา องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาสามารถนำไปใช้ในการควบคุมการผลิตน้ำหมักชีวภาพให้ได้มาตรฐานและใช้ในการเสนอแนวทางการเลือกใช้น้ำตาลในการผลิตน้ำหมักชีวภาพจากน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ให้ได้มาตรฐานต่อไป

2. วิธีการศึกษา

2.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการศึกษา

วัสดุหมักประกอบด้วยน้ำตาล 5 ชนิด คือ น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง น้ำตาลกรวด น้ำตาลปี๊บ และกากน้ำตาล วัสดุหมักร่วมที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ เศษปลาทะเล (หัว ไส้ และ ก้าง) และ น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์แบบหมัก (VCO) สมบัติทางกายภาพ เคมี ของวัสดุหมักแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สมบัติทางกายภาพและเคมีของวัสดุหมักที่ใช้ในการศึกษา

สมบัติทางเคมี	วัตถุดิบ						
	น้ำตาลทรายขาว	น้ำตาลทรายแดง	น้ำตาลกรวด	น้ำตาลปี๊บ	กากน้ำตาล	เศษปลา	น้ำทิ้ง VCO
ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)	6.56 ± 0.03^{a}	6.59 ± 0.04^{a}	6.54 ± 0.02^{a}	5.56 ± 0.03^{b}	4.64 ± 0.01^{c}	5.84 ± 0.02^{d}	4.09 ± 0.02^{e}
ปริมาณของแข็งทั้งหมด (%TS)	73.33 ± 2.69^{a}	72.21 ± 2.30^{a}	72.06 ± 1.45^{a}	45.98 ± 1.11^{b}	46.81 ± 0.78^{b}	36.23 ± 2.62^{c}	6.57 ± 0.28^{d}
ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (%)	0	0	0	0.12 ± 0.01^{a}	0.45 ± 0.03^{b}	9.82 ± 0.80^{c}	0.23 ± 0.01^{d}
ปริมาณคาร์บอนทั้งหมด (%)	56.42 ± 1.29^{a}	56.05 ± 4.92^{ab}	51.81 ± 2.12^{b}	51.86 ± 1.38^{b}	53.74 ± 1.12^{b}	43.79 ± 1.90^{c}	5.93 ± 0.61^{d}
อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน	nd	nd	nd	425.45 ± 28.23^{a}	119.82 ± 5.78^{b}	4.49 ± 0.58^{c}	25.45 ± 1.54^{d}
ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (% ในรูปของน้ำตาลกลูโคส)	79.70 ± 0.64^{a}	78.80 ± 1.05^{a}	77.75 ± 1.48^{a}	73.32 ± 0.46^{b}	71.31 ± 0.25^{b}	nd	nd
ปริมาณโพแทสเซียม (%)	nd	nd	nd	0.61 ± 0.15^{a}	1.28 ± 0.17^{b}	0.15 ± 0.01^{c}	nd
ปริมาณฟอสฟอรัส (%)	nd	nd	nd	0.19 ± 0.04^{a}	0.13 ± 0.01^{b}	0.002 ± 0.00^{c}	nd

หมายเหตุ : nd = not determined, * ดรรชนีบน แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติในแนวแถว โดยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

2.2 กระบวนการผลิตน้ำหมักชีวภาพ

การศึกษาแบ่งเป็น 5 ชุดทดลอง ในแต่ละชุดทดลองประกอบด้วย 2 ซ้ำ ชุดทดลองที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ใช้น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง น้ำตาลกรวด น้ำตาลปี๊บ และ กากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ ในทุกชุดทดลองใช้ เศษปลา : น้ำทิ้งปนครีม : น้ำตาล ในอัตราส่วน 3 : 1 : 1 โดยน้ำหนัก [5]

การเตรียมน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์แบบหมัก (VCO) ใช้วิธีที่ Tripetchkul และคณะ [5] ได้รายงานไว้ การผลิตน้ำหมักชีวภาพเริ่มต้นจากการนำน้ำทิ้ง VCO ที่ปนชั้นครีมผสม เศษปลาทะเล และ กากน้ำตาลตามสัดส่วนที่กล่าวแล้วข้างต้น ใส่ในภาชนะที่มีฝาปิด หมักทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอย่างน้อย 2 เดือน Tripetchkul และคณะ [5] รายงานว่า น้ำหมักชีวภาพอายุไม่เกิน 2 เดือน มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ได้ ดังนั้นในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมีในระหว่างกระบวนการหมัก และคุณภาพน้ำหมักชีวภาพ จึงได้ทำการเก็บข้อมูลในช่วงระยะเวลาการหมักประมาณ 2 เดือน

2.3 การวิเคราะห์

ในช่วง 1 เดือนแรก ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 7 วัน หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 30 วัน เพื่อศึกษา (1) สมบัติทางกายภาพ ได้แก่ กลิ่น สี ลักษณะชิ้นเนื้อ (2) สมบัติทางเคมี ได้แก่ ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ปริมาณคาร์บอนทั้งหมด (Total carbon) [15] ปริมาณอินทรียคาร์บอนทั้งหมด (Total organic carbon, TOC) โดยประยุกต์จากวิธี Walkley-Black Wet Combustion [16] ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen) ด้วยวิธี Macro Kjeldahl [15] ปริมาณกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดอะซิติก กรดบิวทิริค กรดโพรพิโอนิก กรดแลคติก และปริมาณเอทานอล โดยใช้ FID Gas Chromatrography รุ่น GC-143 ยี่ห้อ SHIMAZU และ การเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพโดยการตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria) และ แลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria) ด้วยวิธี Plate count [17] ความเป็นพิษต่อพืช โดยเทคนิค Seed germination test [18] เมล็ดพืชที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ เมล็ดกะหล่ำปลี (*Brassica campestris* var. chinensis) ในการตรวจวัดต้องทำการเจือจางน้ำหมักชีวภาพที่ใช้กับน้ำที่ระดับ 1 : 100 เท่า โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุม วิธีการเริ่มจากทำการเรียงเมล็ดพืชในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิด จำนวน 25 เมล็ด จากนั้นบ่มในที่มืดเป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นทำการตรวจนับจำนวนเมล็ดที่งอกและวัดความยาวของรากพืชตามเกณฑ์ที่กำหนดโดย USEPA (1982) [19] เมล็ดพืชที่ทำการตรวจวัดต้องมีความยาวของรากไม่ต่ำกว่า 5 มิลลิเมตร คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การงอกสัมพัทธ์ของเมล็ด (Relative seed germination; %RSG), ค่าเปอร์เซ็นต์ความยาวรากสัมพัทธ์ (Relative root growth; %RRG) จากสมการที่ 1 และ 2 และทำการเปรียบเทียบความเป็นพิษโดยพิจารณาจากค่าดัชนีการงอกของเมล็ด (Germination index; GI) ดังสมการที่ 3 [20]

$$\%RSG = \frac{\text{No. of seeds germinated in litter extract} \times 100}{\text{No. of seeds germinated in control}} \quad \textbf{(1)}$$

$$\%RRG = \frac{\text{Mean root length in litter extract} \times 100}{\text{Mean root length in control}} \quad \textbf{(2)}$$

$$GI = \frac{(\%RSG) \times (\%RRG)}{100} \quad \textbf{(3)}$$

3. ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

3.1 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

3.1.1 ลักษณะทางกายภาพ

ตารางที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพในระหว่างกระบวนการทำน้ำหมักชีวภาพ จากน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ใช้น้ำตาลต่างชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน จากผลการศึกษา พบว่า ชนิดของน้ำตาลมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเนื้อ สี กลิ่น และการปรากฏของฟิลม์ยีสต์ ไขมันและฟองก๊าซที่ผิวหน้าของน้ำหมักชีวภาพ ชุดทดลองที่ 5 ที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเกิดการย่อยสลายได้เร็วกว่าชุดทดลองอื่นๆ ทั้งนี้สังเกตจากการเกิดกลิ่นแอลกอฮอล์และกลิ่นเปรี้ยว (กรด) รวมทั้งการปรากฏของฟิลม์ยีสต์และฟองก๊าซที่ผิวหน้าของน้ำหมักชีวภาพตั้งแต่สัปดาห์แรกของการหมัก ในสัปดาห์ที่ 3 (วันที่ 21) ของการหมักน้ำหมักชีวภาพมีกลิ่นหอม สีดำเข้ม ไม่ปรากฏไขมัน ฟิลม์ยีสต์และฟองก๊าซที่ผิวหน้า ลักษณะปรากฏดังกล่าวเป็นไปตามมาตรฐานน้ำหมักชีวภาพ [21] ชุดทดลองที่ 3 และ 4 ซึ่งใช้น้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลกรวดเป็นแหล่งคาร์บอนมีการย่อยสลายที่เกิดขึ้นช้ากว่าชุดทดลองอื่นๆ โดยยังคงตรวจพบฟิลม์ยีสต์ ไขมัน และฟองก๊าซที่ผิวหน้าน้ำหมักชีวภาพในช่วงสัปดาห์ที่ 4 ของการหมัก

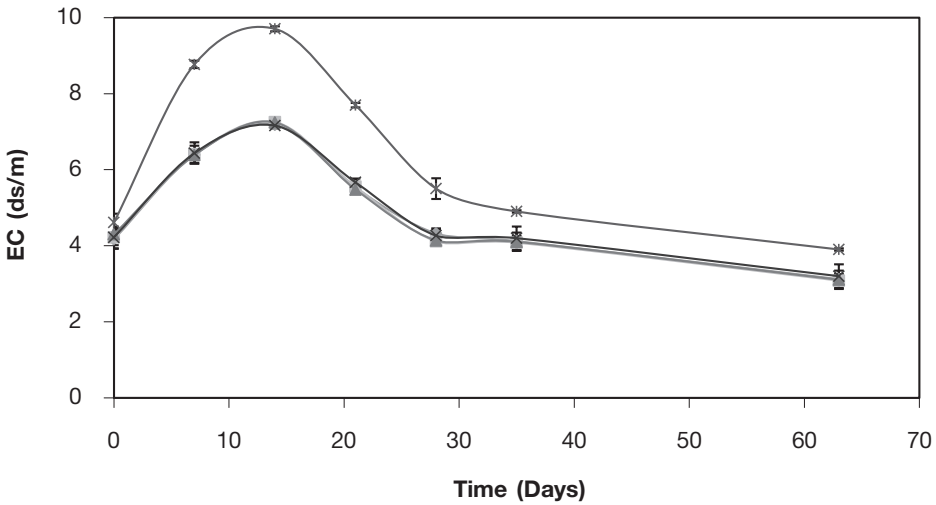
ตารางที่ 2 ลักษณะทางกายภาพของน้ำหมักชีวภาพจากเศษปลาที่ใช้แหล่งน้ำตาลชนิดต่างๆ

ชุดทดลอง / ระยะเวลาของการหมัก	ลักษณะทางกายภาพของน้ำหมักชีวภาพ														
	น้ำตาลปี๊บ			น้ำตาลทรายแดง			น้ำตาลทรายขาว			น้ำตาลกรวด			กากน้ำตาล		
	ลักษณะปรากฏ	สี	กลิ่น	ลักษณะปรากฏ	สี	กลิ่น	ลักษณะปรากฏ	สี	กลิ่น	ลักษณะปรากฏ	สี	กลิ่น	ลักษณะปรากฏ	สี	กลิ่น
วันเริ่มต้น (วันที่ 0)	×	ไม่มีสี	คาวปลา	×	ไม่มีสี	คาวปลา	×	ไม่มีสี	คาวปลา	×	ไม่มีสี	คาวปลา	×	น้ำตาล	คาวปลา
วันที่ 7	✓	น้ำตาลอ่อน	คาวปลา	✓	น้ำตาลอ่อน	คาวปลา	✓	น้ำตาลอ่อน	คาวปลา	✓	น้ำตาลอ่อน	คาวปลา	✓	น้ำตาลเข้ม	เปรี้ยว+แอลกอฮอล์
วันที่ 14	✓✓	สีเริ่มเข้มขึ้น	เปรี้ยว+แอลกอฮอล์	✓✓	สีเริ่มเข้มขึ้น	เปรี้ยว+แอลกอฮอล์	✓✓	สีเริ่มเข้มขึ้น	คาวปลาลดลง	✓✓	สีเริ่มเข้มขึ้น	คาวปลาลดลง	✓✓	สีเริ่มเข้มขึ้น	หอมเปรี้ยว
วันที่ 21	✓✓✓	น้ำตาล	หอมเปรี้ยว	✓✓✓	น้ำตาล	หอมเปรี้ยว	✓✓✓	น้ำตาล	เปรี้ยว+แอลกอฮอล์	✓✓✓	น้ำตาล	เปรี้ยว+แอลกอฮอล์	✓✓✓	น้ำตาลดำ	หอมเปรี้ยว
วันที่ 30	-	น้ำตาลแดง	หอมเปรี้ยว	-	น้ำตาลแดง	หอมเปรี้ยว	-	น้ำตาลเข้ม	หอมเปรี้ยว	-	น้ำตาลเข้ม	หอมเปรี้ยว	-	สีน้ำหมักชีวภาพทั่วไป	หอมเปรี้ยว
วันที่ 60	-	น้ำตาลแดง	หอมเปรี้ยว	-	น้ำตาลแดง	หอมเปรี้ยว	-	น้ำตาลเข้ม	หอมเปรี้ยว	-	น้ำตาลเข้ม	หอมเปรี้ยว	-	สีน้ำหมักชีวภาพทั่วไป	หอมเปรี้ยว

หมายเหตุ : การย่อยสลายเศษปลา × ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง, ✓ เกิดการย่อยสลาย, ✓✓ เกิดการย่อยสลายมากขึ้น, ✓✓✓ เกิดการย่อยสลายสูงสุด และ - การเปลี่ยนแปลงคงที่

3.1.2 ค่าการนำไฟฟ้า (EC)

ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical Conductivity, EC) โดยปกติสัมพันธ์กับความเข้มข้นของแร่ธาตุหรือสารประกอบต่างๆ หรือปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ดังนั้น ค่า EC สามารถใช้เป็นพารามิเตอร์บ่งบอกประสิทธิภาพการย่อยสลายอินทรียสารได้ เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายอินทรียสารโดยจุลินทรีย์ได้สารประกอบอนินทรีย์ที่ละลายน้ำแล้วให้อิออนซึ่งเป็นสื่อนำกระแสไฟฟ้า การเปลี่ยนแปลงค่าการนำไฟฟ้า (Electrical Conductivity, EC) ในน้ำหมักชีวภาพ (รูปที่ 1) พบว่า แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของค่า EC ในทุกชุดทดลองคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ มีค่าสูงขึ้นในช่วง 14 วันแรกของการหมัก การเพิ่มขึ้นของ EC อาจเป็นผลมาจากการย่อยสลายเศษปลาทะเลร่วมกับผลของเกลือที่ปนเปื้อนในเศษปลาถูกชะออกมา หลังจากนั้น EC ในทุกชุดทดลองมีแนวโน้มลดลง และมีการเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆ ตั้งแต่วันที่ 28 ของการหมักเป็นต้นไป การลดลงของค่า EC ในทุกชุดทดลอง อาจเนื่องจากในกระบวนการเมตาโบลิซึม ของจุลินทรีย์มีการใช้เกลือที่ละลายน้ำได้ในน้ำหมักบางตัว เช่น เกลือฟอตเฟต และเกลือโปแตสเซียม เป็นต้น นอกจากนี้ ในปฏิกิริยาการย่อยสลายของจุลินทรีย์ในน้ำหมักชีวภาพมีการปลดปล่อยสารที่มีสมบัติเป็นกรดอ่อน เช่น กรดอะซิติก (รูปที่ 4) หรือด่างอ่อน เช่น แอมโมเนียไฮดรอกไซด์เพิ่มขึ้น กรดอ่อนหรือด่างอ่อนนี้มีการแตกตัวเป็นอิออนลดลง ส่งผลให้ความเป็นอิเล็กโทรไลต์ของน้ำหมักชีวภาพลดลง



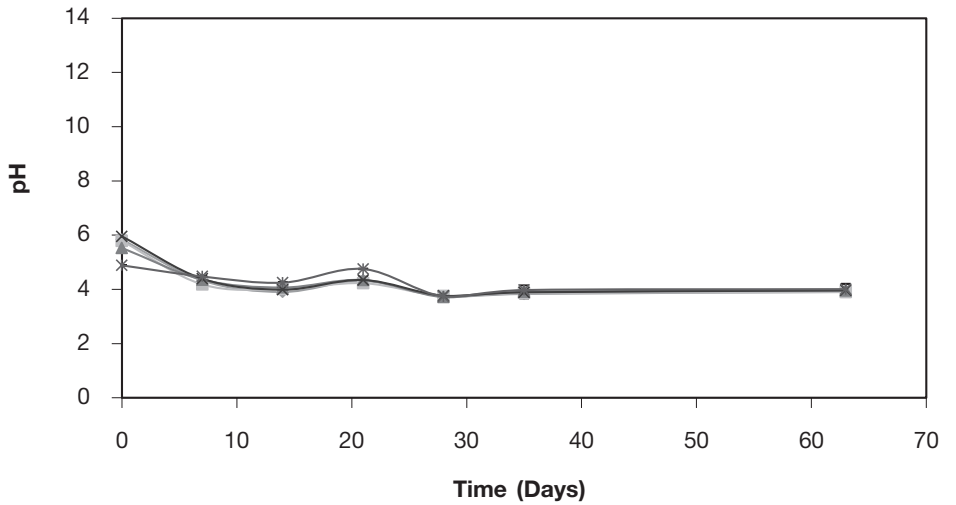
รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงค่าการนำไฟฟ้า (EC) ในระหว่างกระบวนการทำน้ำหมักชีวภาพจากเศษปลาทะเลที่ใช้แหล่งน้ำตาลชนิดต่างๆ โดยที่ ◆ น้ำตาลทรายขาว, ■ น้ำตาลทรายแดง, ▲ น้ำตาลกรวด, × น้ำตาลปี๊บ และ ✳ กากน้ำตาล

เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของ EC ในแต่ละชุดทดลองแต่ละช่วงเวลาของการหมัก พบว่า EC ในน้ำหมักทุกชุดทดลองยกเว้นชุดทดลองที่ใช้กากน้ำตาลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.01$) ในชุดทดลองที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่า EC ตลอดช่วงระยะเวลาของการหมัก 2 เดือนสูงกว่าชุดทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) ทั้งนี้อาจเนื่องจากธรรมชาติของกากน้ำตาลเองมีสารประกอบที่ละลายน้ำได้หลายชนิดเป็นส่วนประกอบด้วย เช่น ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม เหล็ก คลอรีน และแมกเนเซียม เป็นต้น [22] ที่ระยะเวลาของการหมัก 2 เดือน ชุดทดลองที่ใช้น้ำตาลปี๊บ น้ำตาลทรายแดง น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลกรวด มีค่า EC ประมาณ 3.20, 3.08, 3.12 และ 3.10 ds/m ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

(p>0.01) และมีค่าต่ำกว่าชุดทดลองที่ใช้กากน้ำตาลที่มีค่า EC ประมาณ 3.90 อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) อย่างไรก็ตาม EC หรือ ปริมาณเกลือที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดในน้ำหมักชีวภาพทุกชุดทดลอง มีค่าอยู่ในช่วงที่มาตรฐานปุ๋ยน้ำกำหนดไว้ [3] คือไม่เกิน 10 ds/m

3.1.3 ความเป็นกรดด่าง

การลดลงของความเป็นกรดด่างในระบบสะท้อนให้เห็นถึงผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการย่อยอินทรียสารในระบบ เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดบิวทิริค และ คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น [5] ดังนั้นการศึกษานี้จึงใช้ความเป็นกรดด่างเป็นพารามิเตอร์หนึ่งที่บ่งบอกปฏิกิริยาการย่อยสลายที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการทำน้ำหมักชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ในระหว่างกระบวนการทำน้ำหมักชีวภาพจากน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ร่วมกับเศษปลาทะเลที่ใช้แหล่งน้ำตาลต่างชนิดกัน (รูปที่ 2) พบว่า pH ในทุกชุดทดลองมีแนวโน้มลดลง จากค่าเริ่มต้นประมาณ 4.88-5.95 ในวันเริ่มต้น เป็น 3.71-3.76 ในวันที่ 28 ของการหมัก การลดลงของ pH เป็นผลมาจากกิจกรรมการย่อยสลายของจุลินทรีย์ในน้ำหมักชีวภาพที่มีการปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกมาทำให้ pH ในระบบลดลง [3, 5]



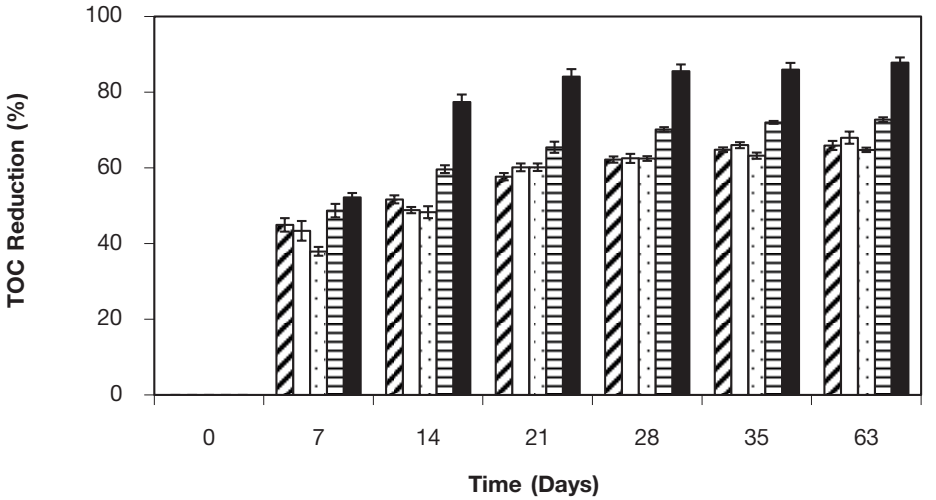
รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ในระหว่างกระบวนการทำน้ำหมักชีวภาพจากเศษปลาทะเลที่ใช้แหล่งน้ำตาลชนิดต่างๆ โดยที่ ◆ น้ำตาลทรายขาว, ■ น้ำตาลทรายแดง, ▲ น้ำตาลกรวด, × น้ำตาลปี๊บ และ ✳ กากน้ำตาล

เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของ pH ในทั้ง 5 ชุดทดลอง พบว่า ชุดทดลองที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนมีการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในช่วงเดือนแรกของการหมักที่แตกต่างจากชุดทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.01) เนื่องจากธรรมชาติของกากน้ำตาลเองมีความเป็นกรดด่างค่อนข้างต่ำ (ตารางที่ 1) ดังนั้นที่เวลาเริ่มต้นชุดทดลองที่ใช้กากน้ำตาลจึงมี pH เริ่มต้น (4.88) ต่ำกว่าชุดทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) อย่างไรก็ตามในช่วงสัปดาห์ที่ 2-3 ของการหมัก pH ในชุดทดลองที่ใช้กากน้ำตาลมีค่าอยู่ในช่วง 4.25-4.75 ซึ่งสูงกว่าชุดทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) การเพิ่มขึ้นของ pH ในช่วงนี้อาจเนื่องมาจากปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน ทำให้มีการปลดปล่อย NH_3 ออกมาส่งผลให้ความเป็นกรดด่างเพิ่มขึ้น [5] ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า การใช้กากน้ำตาลช่วยทำให้ปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนในเศษปลาเกิดได้มากกว่าการใช้น้ำตาลชนิดอื่นๆ

3.2 การเปลี่ยนแปลงทางเคมี

3.2.1 ปริมาณอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด (Total organic carbon, TOC)

การลดลงของอินทรียคาร์บอนทั้งหมด (TOC reduction) ในน้ำหมักชีวภาพ สามารถใช้เป็นค่าบ่งชี้ประสิทธิภาพการย่อยสลายอินทรียสารได้ รูปที่ 3 แสดงการลดลงของ TOC ในระหว่างกระบวนการผลิตน้ำหมักชีวภาพจากน้ำตาลต่างชนิดกันที่ระยะเวลาการหมัก 2 เดือน พบว่า TOC ในทุกชุดทดลองลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงสัปดาห์ที่ 1 (ร้อยละ 37.9-52.2) และสัปดาห์ที่ 2 (ร้อยละ 5.5-25.0) แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในน้ำหมักชีวภาพของทุกชุดทดลองเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วในช่วง 1-2 สัปดาห์แรกของการหมัก สอดคล้องกับผลการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เช่น EC (รูปที่ 1) และ ความเป็นกรดด่าง (รูปที่ 2) การลดลงของ TOC ในทุกชุดทดลองเกิดขึ้นช้าลงและค่อนข้างคงที่หลังจาก 1 เดือนของการหมัก (ร้อยละ 0.4-3.5)



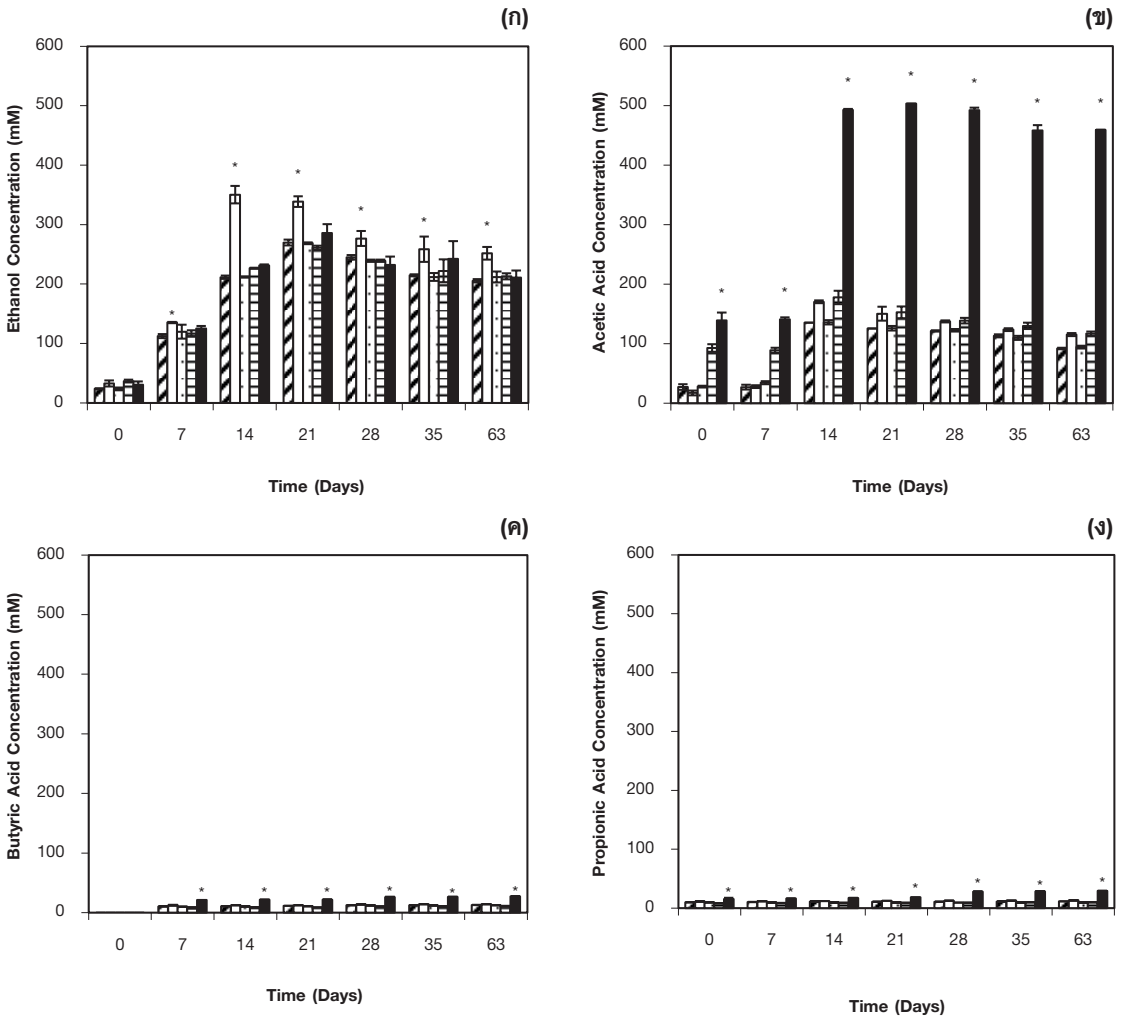
รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณการลดลงของอินทรีย์คาร์บอนสะสมในระหว่างกระบวนการทำน้ำหมักชีวภาพจากเศษปลาทะเลที่ใช้แหล่งน้ำตาลชนิดต่างๆ โดยที่ ◪ น้ำตาลทรายขาว, ☐ น้ำตาลทรายแดง, ⊡ น้ำตาลกรวด, ▤ น้ำตาลปี๊บ และ ■ กากน้ำตาล

ในการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายอินทรีย์คาร์บอนซึ่งวัดในรูปการลดลงของ TOC ตลอดระยะเวลาของการหมัก (2 เดือน) พบว่า ประสิทธิภาพการย่อยสลาย TOC ในชุดทดลองที่ใช้กากน้ำตาล (ร้อยละ 85.9) > น้ำตาลปี๊บ (ร้อยละ 72.0) > น้ำตาลทรายแดง (ร้อยละ 66.0) น้ำตาลทรายขาว (ร้อยละ 64.8) และ น้ำตาลกรวด (ร้อยละ 63.2) การใช้กากน้ำตาลและน้ำตาลปี๊บเป็นแหล่งคาร์บอนช่วยสนับสนุนให้เกิดการย่อยสลายอินทรีย์คาร์บอนในน้ำหมักชีวภาพได้ดีกว่า เนื่องจากกากน้ำตาลมีน้ำตาลและสารอาหารอื่นๆ เช่น ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม จุลธาตุต่างๆ และวิตามิน [22, 23] เป็นองค์ประกอบที่เป็นประโยชน์ต่อจุลินทรีย์ สำหรับน้ำตาลปี๊บ ซึ่งมีกระบวนการผลิตแบบธรรมชาติโดยไม่ผ่านกระบวนการฟอกสีด้วยสารเคมีเหมือนกับน้ำตาลชนิดอื่นๆ จึงทำให้ยังคงมีธาตุอาหารเช่น N, P และ K หลงเหลืออยู่เช่นกัน (ตารางที่ 1)

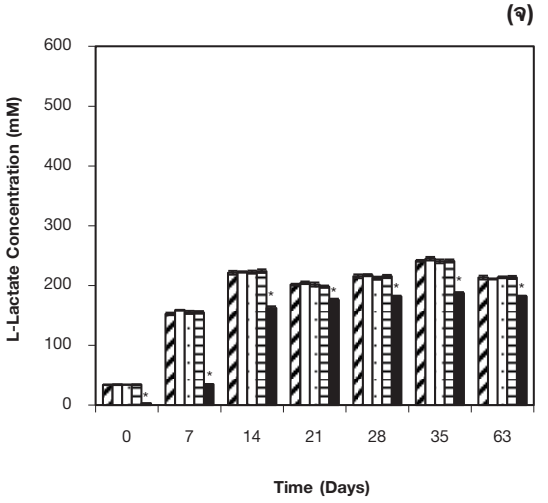
3.2.2 กรดอินทรีย์ และ เอทานอล

รูปที่ 4 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดอินทรีย์ และ เอทานอล ในระหว่างกระบวนการผลิตน้ำหมักชีวภาพจากเศษปลาทะเลที่ใช้แหล่งน้ำตาลต่างชนิดกันในช่วงระยะเวลาการหมัก 2 เดือน สามารถตรวจพบเอทานอลและกรดอินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ กรดอะซิติก

(รูปที่ 4 ข) กรดบิวทิริค (รูปที่ 4 ค) กรดโพรพิโอนิก (รูปที่ 4 ง) และ กรดแลคติก (รูปที่ 4 จ) ในทั้ง 5 ชุดทดลอง โดยผลิตภัณฑ์หลักที่ตรวจพบมากในทุกชุดทดลองได้แก่ กรดอะซิติก กรดแลคติก และ เอทานอล ส่วนกรดบิวทิริคและกรดโพรพิโอนิก ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักน้ำตาล C_6 ตรวจพบในปริมาณที่ต่ำ ในการศึกษาการผลิตน้ำหมักจากขยะเศษอาหารร่วมกับน้ำตาลทรายขาวหรือกากน้ำตาลโดย Srithawirat [6] พบว่า กรดอะซิติกและเอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ตรวจพบเช่นกัน Unden และ Zaunmüller [24] รายงานว่าการใช้ตัวรับอิเลคตรอนภายนอก เช่น ฟรุคโตส ไพรูเวท หรือ ซิเตรท ในปฏิกิริยาการการหมักแบบ Heterofermentation โดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียอาจทำให้เกิดผลิตภัณฑ์พลอยได้ เช่น อะซิเตรท หรือ เมทานอล เป็นต้น ในปริมาณเพิ่มขึ้น ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายในน้ำหมักชีวภาพ (รูปที่ 5) จัดอยู่ในกลุ่ม Heterofermentative lactic acid bacteria ที่นอกจากเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลคติก แล้วยังให้ผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทริริค และเอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์ร่วมด้วย [24]



รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดอินทรีย์ (Organic acids) ได้แก่ (ก) Ethanol, (ข) Acetic acid, (ค) Butyric acid, (ง) Propionic acid และ (จ) L-Lactate ในระหว่างกระบวนการทำน้ำหมักชีวภาพจากปลาทะเลที่ใช้แหล่งน้ำตาลชนิดต่างๆ โดยที่ ◪ น้ำตาลทรายขาว, □ น้ำตาลทรายแดง, ⊡ น้ำตาลกรวด, ▤ น้ำตาลปี๊บ และ ■ กากน้ำตาล (*, เปรียบเทียบในช่วงเวลาเดียวกันโดยมีความแตกต่างจากชุดทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$)

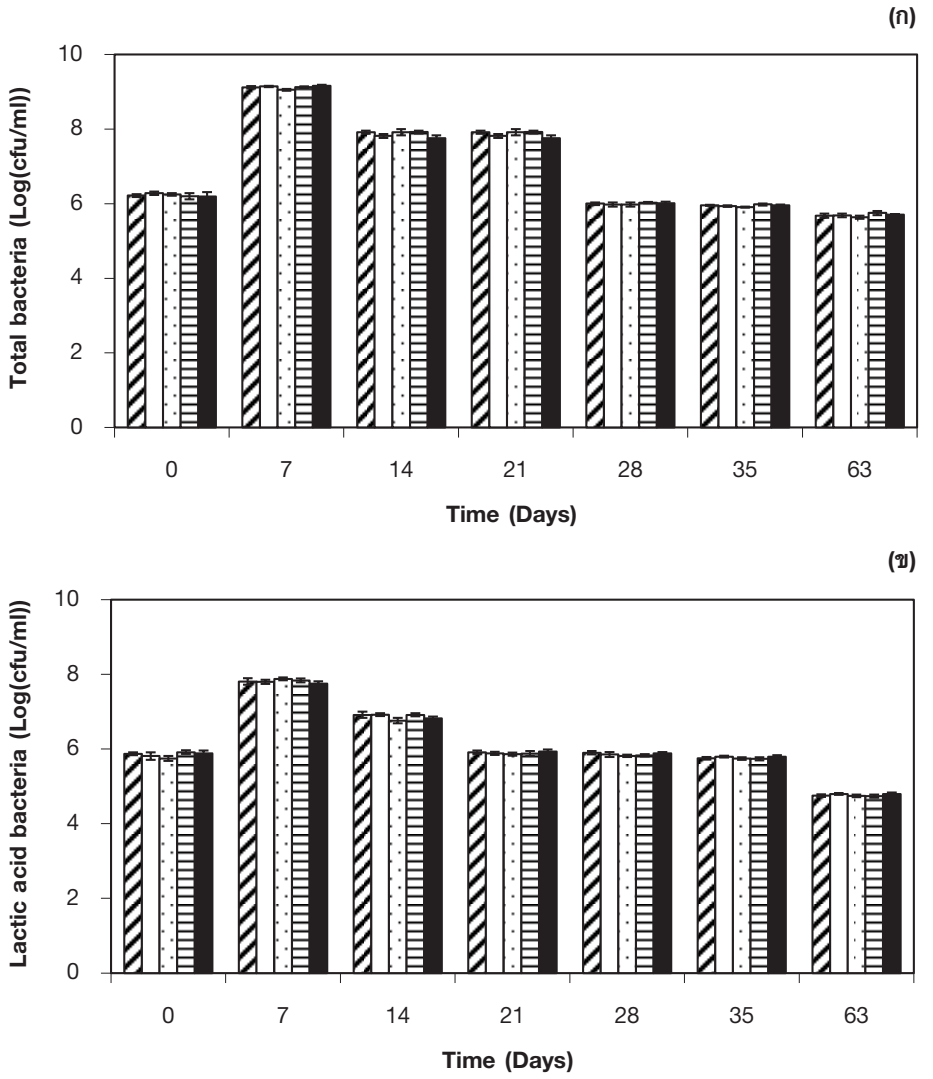


รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดอินทรีย์ (Organic acids) ได้แก่ (ก) Ethanol, (ข) Acetic acid, (ค) Butyric acid, (ง) Propionic acid และ (จ) L-Lactate ในระหว่างกระบวนการทำน้ำหมักชีวภาพจากปลาทะเลที่ใช้แหล่งน้ำตาลชนิดต่างๆ โดยที่ ◪ น้ำตาลทรายขาว, □ น้ำตาลทรายแดง, ▫ น้ำตาลกรวด, ▤ น้ำตาลปี๊บ และ ■ กากน้ำตาล (*, เปรียบเทียบในช่วงเวลาเดียวกันโดยมีความแตกต่างจากชุดทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01) (ต่อ)

การใช้น้ำตาลต่างชนิดกันแม้จะไม่มีผลต่อชนิดของผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้น แต่มีผลต่อปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ตลอดระยะเวลาการหมักชุดทดลองที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน มีปริมาณกรดอะซิติก กรดบิวทริริค และ กรดโพรพิโอนิก สูงกว่าชุดทดลองที่ใช้น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง น้ำตาลกรวด และน้ำตาลปี๊บ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) ขณะเดียวกันปริมาณกรดแลคติกต่ำกว่าในทั้ง 4 ชุดทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) อย่างไรก็ตามในการศึกษาการทำน้ำหมักชีวภาพจากขยะเศษอาหารโดย Srithawirat [6] พบว่าน้ำหมักชีวภาพที่ใช้น้ำตาลทรายแดงเป็นแหล่งคาร์บอนมีปริมาณกรดอินทรีย์โดยเฉพาะกรดอะซิติกและเอทานอลสูงกว่าการใช้กากน้ำตาลและน้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้อาจเนื่องจากความแตกต่างขององค์ประกอบของขยะเศษอาหารที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการทำน้ำหมักชีวภาพจึงอาจส่งผลต่อวิถีกระบวนการย่อยสลายอินทรียสารในน้ำหมักชีวภาพ

3.3 ปริมาณจุลินทรีย์

โดยปกติจุลินทรีย์มีการใช้สารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างพลังงานเพื่อการเจริญเติบโต ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์สามารถใช้เป็นพารามิเตอร์ในการบ่งบอกปฏิกิริยาการย่อยสลายที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักได้ จากรูปที่ 5 (ก และ ข) พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดและ แลคติกแอซิดแบคทีเรียในทุกชุดทดลองมีการเจริญและเพิ่มจำนวนสูงสุดใน 7 วันแรกของการหมัก และลดลงอย่างต่อเนื่องหลังจากนั้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากสภาวะในการหมักไม่เหมาะสมโดยเฉพาะปริมาณเอทานอลในระบบที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4 ก) นักวิจัยหลายท่าน [25, 26, 27] ได้รายงานว่า ความเข้มข้นของเอทานอลที่สูงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้



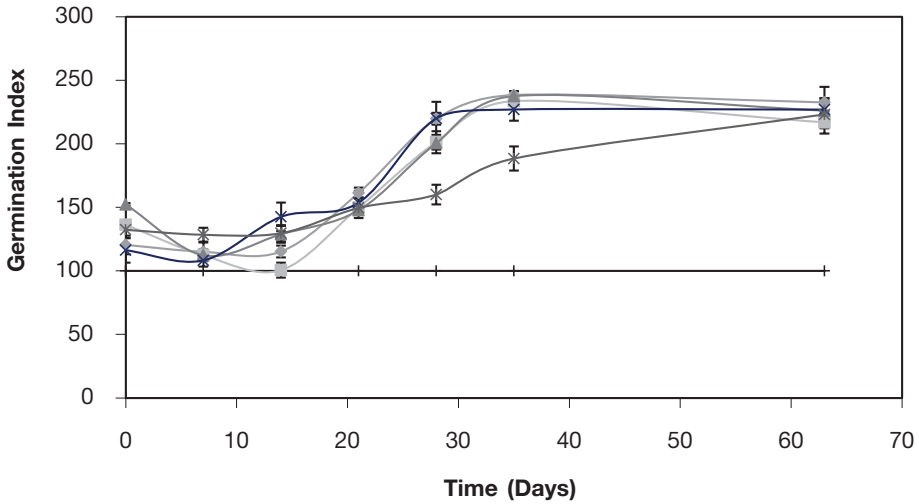
รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ (Total bacteria; ก) และ แลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria; ข) ในระหว่างกระบวนการทำน้ำหมักชีวภาพจากเศษปลาทะเลที่ใช้แหล่งน้ำตาลชนิดต่างๆ โดยที่ ◪ น้ำตาลทรายขาว, ☐ น้ำตาลทรายแดง, ▫ น้ำตาลกรวด, ▤ น้ำตาลปี๊บ และ ■ กากน้ำตาล

จากการเปรียบเทียบสัดส่วนของปริมาณแลคติก-แอซิดแบคทีเรียต่อแบคทีเรียทั้งหมดตลอดช่วงระยะเวลา 2 เดือน พบว่า มีค่าอยู่ในช่วงประมาณ 0.96-0.98 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ Tripetchkul และคณะ [5] รายงานไว้ ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า จุลินทรีย์ส่วนใหญ่น้ำหมักชีวภาพคือ กลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรีย สภาพแวดล้อมในน้ำหมักชีวภาพโดยเฉพาะ pH ที่ค่อนข้างเป็นกรดนั้น (รูปที่ 2) เหมาะสมต่อการเจริญของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามตั้งแต่วันที่ 28 ของการหมักเป็นต้นไป ความเป็นกรดด่างในทุกชุดทดลองมีความเป็นกรดมาก (pH = 3.7-4.0) ดังนั้นแลคติกแอซิดแบคทีเรียซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ชอบความเป็นกรดสูงกว่า จึงทนได้ดีกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่นในน้ำหมักชีวภาพ (รูปที่ 5 ข) (สัดส่วนของแลคติกแอซิดแบคทีเรียต่อแบคทีเรียทั้งหมด เท่ากับ 0.97-0.98)

เมื่อพิจารณาผลของชนิดน้ำตาลต่อปริมาณจุลินทรีย์ พบว่า ที่ช่วงระยะเวลาการหมักเดียวกันปริมาณแบคทีเรียและแลคติกแอซิดแบคทีเรียในแต่ละชุดทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.01$) แสดงให้เห็นว่า ชนิดของน้ำตาลที่ใช้ในการผลิตน้ำหมักชีวภาพไม่มีผลต่อความแตกต่างของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแลคติกแอซิดแบคทีเรียในแต่ละช่วงเวลาของการหมัก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Srithawirat [6] ที่รายงานว่าชนิดของน้ำตาลไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง ในระหว่างกระบวนการผลิตน้ำหมักชีวภาพจากเศษอาหาร

3.4 ความเป็นพิษต่อพืช (Phytotoxicity)

เพื่อตรวจสอบว่าน้ำหมักชีวภาพสามารถนำไปใช้กับพืชได้หรือไม่ ในการศึกษาจึงประยุกต์ใช้ดัชนีชี้วัดการงอกของเมล็ดพืช (Germination index, GI) เป็นพารามิเตอร์ในการบ่งบอกความเป็นพิษต่อพืชของน้ำหมักชีวภาพ โดยปกติค่าดัชนีชี้วัดการงอกได้มีการประยุกต์ใช้ในกรณีการทำปุ๋ยหมัก ค่า GI มากกว่า 80% ถือว่าไม่มีผลต่อการยับยั้งการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตในรูปความยาวรากของเมล็ด [19] จากรูปที่ 6 พบว่า ที่เวลาเริ่มต้นของการหมัก น้ำหมักชีวภาพของทุกชุดทดลองมีค่า GI มากกว่า 100 ซึ่งมีค่าสูงกว่าชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) แสดงให้เห็นว่าน้ำหมักชีวภาพแม้ยังไม่ผ่านการหมักก็ยังคงมีองค์ประกอบของสารที่เป็นประโยชน์ต่อการกระตุ้นการงอกของเมล็ดพืช เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของ GI พบว่า ค่า GI ในทุกชุดทดลองมีแนวโน้มลดลงในช่วงสัปดาห์แรกของการหมัก หลังจากนั้น GI ในทุกชุดทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นและเริ่มมีค่าคงที่หลังจาก 35 วันของการหมัก ที่ 60 วันของการหมัก GI ในทุกชุดทดลอง มีค่าอยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 213-232 ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.01$) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า น้ำหมักชีวภาพอายุประมาณ 7 วัน อาจมีองค์ประกอบของสารที่เกิดจากปฏิกิริยาการหมักที่มีความเป็นพิษต่อพืชอยู่ การเพิ่มขึ้นของค่า GI ของน้ำหมักชีวภาพในทุกชุดทดลองที่อายุการหมัก 2 สัปดาห์เป็นต้นไป อาจเป็นผลจากการลดลงของสารบางชนิดในน้ำหมักชีวภาพที่อาจเป็นพิษต่อการงอกของเมล็ดพืช เช่น สารประกอบอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ [28] และการเพิ่มขึ้นของกรดอินทรีย์โดยเฉพาะกรดบิวทิริคและกรดโพรพิโอนิคที่เกิดขึ้นในช่วงหลังของกระบวนการหมัก (รูปที่ 4 ค และ ง) ซึ่งมีประโยชน์ต่อพืชโดยช่วยเร่งการเจริญของรากพืชได้ เมื่อใช้ในความเข้มข้นที่เหมาะสม [7, 8]



รูปที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของดัชนีการงอกของพืช (Germination Index) ในระหว่างกระบวนการทำน้ำหมักชีวภาพจากเศษปลาทะเลที่ใช้แหล่งน้ำตาลชนิดต่างๆ โดยที่ + ชุดควบคุม (ไม่ใช้น้ำหมักชีวภาพ), ◆ น้ำตาลทรายขาว, ■ น้ำตาลทรายแดง, ▲ น้ำตาลกรวด, × น้ำตาลปี๊บ และ ✳ กากน้ำตาล

จากการเปรียบเทียบผลของชนิดน้ำตาลต่อค่า GI พบว่า ชุดทดลองที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่า GI โดยเฉพาะช่วงหลังวันที่ 20 ของการหมักต่ำกว่าชุดทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.01$) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากชุดทดลองที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนมีปริมาณเมตาโบไลท์ เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทิริค และกรดโพรพิโอนิก เป็นต้น ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักสูงมากกว่าชุดทดลองที่ใช้น้ำตาลชนิดอื่นๆ (รูปที่ 4 (ก) – (จ)) ในการศึกษาที่ผ่านมานักวิจัยหลายท่านได้รายงานว่า กรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทิริค กรด ไอโซบิวทิริค และ กรดโพรพิโอนิก ที่ความเข้มข้นต่ำจะช่วยกระตุ้นการเจริญของรากพืชได้ แต่ที่ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ที่สูงอาจส่งผลในการยับยั้งการงอกของเมล็ดพืช [9, 28, 29] จากการที่น้ำหมักชีวภาพโดยเฉพาะในชุดทดลองที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนมีปริมาณเอทานอลและกรดอินทรีย์ในปริมาณสูง แต่เมื่อเทียบกับชุดทดลองที่ใช้น้ำกลั่นก็ยังคงมีค่า GI ที่สูงกว่า ดังนั้นในการนำไปใช้ประโยชน์กับพืชจึงจำเป็นต้องมีการเจือจางให้เหมาะสมก่อนจึงจะสามารถนำไปใช้กับพืชได้โดยไม่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตหรือความเป็นพิษต่อพืช

3.5 คุณภาพของน้ำหมักชีวภาพจากเศษปลาทะเลที่ใช้แหล่งน้ำตาลชนิดต่างๆ

จากการเปรียบเทียบคุณภาพน้ำหมักชีวภาพจากน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ร่วมกับเศษปลาทะเลที่ใช้แหล่งน้ำตาลชนิดต่างที่อายุการหมัก 1 เดือน (ตารางที่ 3) พบว่า น้ำหมักชีวภาพทุกชุดทดลองมีค่าความเป็นกรดด่าง ค่าการนำไฟฟ้า รวมทั้งปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียม อยู่ในเกณฑ์ตามที่มาตรฐานปุ๋ยน้ำกำหนดไว้ [21] ยกเว้นปริมาณฟอสฟอรัสที่ต่ำกว่ามาตรฐาน เมื่อเปรียบเทียบคุณภาพน้ำหมักชีวภาพที่ใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ กัน พบว่า น้ำหมักชีวภาพที่ใช้น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง น้ำตาลปี๊บ และน้ำตาลกรวด ชนิดแหล่งคาร์บอนมีคุณภาพใกล้เคียงกัน ในขณะที่น้ำหมักชีวภาพที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน มีปริมาณโพแทสเซียมสูงกว่าชุดทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) ทั้งนี้อาจเนื่องจากในกากน้ำตาลมีโพแทสเซียมค่อนข้างสูงประมาณร้อยละ 1.28 (ตารางที่ 1) นอกจากนี้น้ำหมักชีวภาพที่ใช้กากน้ำตาลยังคงมีกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดบิวทิริค กรดโพรพิโอนิก กรดอะซิติก และ เอทานอล เป็นองค์ประกอบที่สูงเช่นกัน กรดอินทรีย์เหล่านี้นอกจากจะมีบทบาทสำคัญในด้านการเร่งการงอกของเมล็ดพืชและรากพืช [9, 28, 29] แล้ว กรดอินทรีย์บางตัวโดยเฉพาะกรดอะซิติกและกรดแลคติคยังช่วยในการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคพืชบางชนิด เช่น common bunt จากเชื้อ Tilletia tritici ในข้าวสาลี และ Leaf stripe ที่เกิดจากเชื้อ Pyrenophora graminea ในข้าวบาร์เลย์ เป็นต้น [30, 31]

ตารางที่ 3 สมบัติของน้ำหมักชีวภาพจากเศษปลาทะเลที่ใช้แหล่งน้ำตาลชนิดต่างๆ (อายุการหมัก 1 เดือน)

พารามิเตอร์	แหล่งน้ำตาลที่ใช้ทำน้ำหมักชีวภาพ					มาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์น้ำ*	มาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์**
	น้ำตาลทรายขาว	น้ำตาลทรายแดง	น้ำตาลทรายกรวด	น้ำตาลปี๊บ	กากน้ำตาล		
ความเป็นกรดเป็นด่าง	3.83 ± 0.03[a]	3.86 ± 0.01[a]	3.91 ± 0.01[a]	3.89 ± 0.02[a]	3.97 ± 0.01[a]	ไม่เกิน 5	5.5-8.5
ค่าการนำไฟฟ้า (ds/m)	4.12 ± 0.13[b]	4.08 ± 0.10[b]	4.10 ± 0.24[b]	4.20 ± 0.31[b]	4.90 ± 0.03[a]	ไม่เกิน 10 ds/m	ไม่เกิน 6 ds/m
ไนโตรเจน (%, w/v)	1.03 ± 0.08[b]	1.34 ± 0.02[a]	1.38 ± 0.07[a]	0.98 ± 0.04[b]	1.04 ± 0.02[b]	ไม่เกิน 3% (น้ำหมักชีวภาพจากสัตว์โดยน้ำหนัก ไม่เกิน 2% (น้ำหมักชีวภาพจากพืชโดยน้ำหนัก)	ไม่น้อยกว่า 1% โดยน้ำหนัก
ฟอสฟอรัส (%, w/v)	0.002 ± 0.00[a]	0.002 ± 0.00[a]	0.002 ± 0.00[a]	0.002 ± 0.00[a]	0.002 ± 0.00[a]	ไม่น้อยกว่า 1% โดยน้ำหนัก	ไม่น้อยกว่า 0.5% โดยน้ำหนัก
โพแทสเซียม (%, w/v)	0.04 ± 0.01[d]	0.75 ± 0.01[b]	0.52 ± 0.01[c]	0.03 ± 0.01[d]	3.70 ± 0.01[a]	ไม่น้อยกว่า 1% โดยน้ำหนัก	ไม่น้อยกว่า 0.5% โดยน้ำหนัก
สารหนู (%, w/v)	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	-	ไม่เกิน 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม
แคดเมียม (%, w/v)	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	-	ไม่เกิน 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม
โครเมียม (%, w/v)	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	-	ไม่เกิน 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม
ตะกั่ว (%, w/v)	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	-	ไม่เกิน 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม
ปรอท (%, w/v)	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	-	ไม่เกิน 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม
ทองแดง (%, w/v)	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	-	ไม่เกิน 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม
เอทานอล (mM)	214.60 ± 1.70[b]	258.60 ± 21.35[a]	211.85 ± 6.43[b]	222.25 ± 19.16[b]	242.15 ± 30.05[c]	-	-
กรดอะซิติก (mM)	113.30 ± 2.40[c]	123.80 ± 2.40[b]	109.85 ± 3.46[c]	130.00 ± 5.23[b]	458.15 ± 9.12[a]	-	-
กรดบิวทิริค (mM)	12.65 ± 0.21[b]	14.05 ± 0.21[b]	12.15 ± 0.35[b]	10.45 ± 0.21[b]	26.40 ± 0.14[a]	-	-
กรดโพรพิโอนิก (mM)	11.15 ± 0.21[b]	12.60 ± 0.14[b]	9.45 ± 0.21[b]	9.75 ± 0.21[b]	28.40 ± 0.14[a]	-	-
กรดแลคติก (mM)	241.33 ± 1.53[a]	245.00 ± 3.00[a]	240.33 ± 3.21[a]	241.00 ± 2.64[a]	187.33 ± 1.53[b]	-	-
แบคทีเรียทั้งหมด (cfu/ml)	$9.1x10^{5a}$	$8.6x10^{5a}$	$8.1x10^{5a}$	$9.5x10^{5a}$	$9.1x10^{5a}$	-	-
แลคติกแอซิดแบคทีเรีย (cfu/ml)	$5.6x10^{5a}$	$6.2x10^{5a}$	$5.6x10^{5a}$	$5.5x10^{5a}$	$6.2x10^{5a}$	-	-
ดัชนีการงอก (GI)	238 ± 3[a]	234 ± 3[a]	237 ± 4[a]	227 ± 9[a]	188 ± 9[b]	ไม่น้อยกว่า 80%	ไม่น้อยกว่า 80%

หมายเหตุ : การเปรียบเทียบค่าทางสถิติของพารามิเตอร์ในน้ำหมักชีวภาพทั้ง 5 ชุดทดลองในแนวแถวโดย n = 8 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% โดยตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ * มาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์น้ำ [21] ** มาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์ ปี พ.ศ. 2548 [32]

4. สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาชนิดของน้ำตาล ได้แก่ น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง น้ำตาลกรวด น้ำตาลปี๊บและ กากน้ำตาล ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการทำน้ำหมักชีวภาพจากน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ร่วมกับเศษปลาทะเล พบว่า กากน้ำตาลมีความเหมาะสมที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตน้ำหมักชีวภาพมากที่สุด เนื่องจากมีการย่อยสลายอินทรียสารที่วัดในรูปการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ (สี ลักษณะเนื้อ กลิ่น) และการลดลงของปริมาณอินทรีย์คาร์บอนเร็วที่สุด นอกจากนี้น้ำหมักชีวภาพที่ได้ยังมีปริมาณกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดอะซิติก กรดบิวทริริค และ กรดโพรพิโอนิก และ ปริมาณธาตุอาหาร ได้แก่ โพแทสเซียมในปริมาณที่สูงสุด เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ในระหว่างการทำน้ำหมักชีวภาพร่วมกับค่าความเป็นพิษต่อพืช พบว่า น้ำหมักชีวภาพที่อายุการหมัก 3-4 สัปดาห์ มีความเหมาะสมในการนำไปใช้กับพืชได้

5. ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาอิทธิพลของชนิดแหล่งคาร์บอน (น้ำตาล) ต่อการทำน้ำหมักชีวภาพจากน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ร่วมกับเศษปลา พบว่า การใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ส่งผลให้น้ำหมักชีวภาพมีประสิทธิภาพการย่อยสลาย ตลอดจนคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพดีกว่าน้ำตาลชนิดอื่น นอกจากนี้การใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบช่วยทำให้ต้นทุนการผลิตน้ำหมักชีวภาพต่ำลง เพื่อเกิดการพัฒนาและความชัดเจนมากยิ่งขึ้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากน้ำตาลต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ ตลอดจนคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพจากน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ร่วมกับเศษปลาทะเล

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีที่ได้สนับสนุนทุนในการดำเนินงานวิจัย

7. เอกสารอ้างอิง

1. Sassanarakij, S., 2005, *Technology for High Quality Oganic-fertilizer Production (Organic-fertilizer, High Quality Oganic-fertilizer and Bio-fertilizer)*, Thailand Institute of Science and Technology, 13th ed., 63 p. (in Thai).

2. Agricultural Chemistry Division, 2002, *Plant Hormones and Nutrients in Bio-extract, Department of Agriculture*, Ministry of Agriculture and Cooperatives, pp. 19–125 (in Thai).

3. Tancho, A., 2006*, Nature Applied Agriculture*, National Science and Technology Development Agency, 1st ed. NSTDA Cyberbookstore Publishing Company, Pathumthani, 299 p. (in Thai).

4. Tancho, A., 2004, *Nature Applied Agriculture*, National Science and Technology Development Agency, 1st ed. Trio Advertising & Media Co.Ltd, Chiangmai, 146 p. (in Thai).

5. Tripetchkul, S., Kusuwanwichid, S., Koonsrisuk, S. and Akeprathumchai, S., 2010. "Utilization of Wastewater Originated from Naturally Fermented Virgin Coconut Oil Manufacturing Process for Bioextract Production: Physico-chemical and Microbial Evolution", *Journal of Bioresource Technology*, Vol. 101, pp. 6345-6353.

6. Srithawirat, T., 2000, Study on Physical and Biological Changes of Food Waste Fermentation Process, Thesis of Science Master Degree, Division of Environmental Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, pp. 57-106.

7. Gudjonsdottir, S., 1966, "Growth-promoting Effects of Fatty Acids on Excised Wheat Roots and Oat Coleoptiles", *Physiologia Plantarum*, Vol. 19, pp. 523-540.

8. Kinnersley, A.M., Taylor, S., John, H. and George, H., 1989, *Method of Regulating Plant Growth*, CPC International Inc., U.S. Patent 5, 238,841 (5 Dec 1988).

9. Lynch, J.M., 1977, "Phytotoxicity of Acetic Acid Produced in the Anaerobic Decomposition of Wheat Straw", *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 42, pp. 81-87.

10. Morales-Payan, J.P., Santos, B.M., 1997, "Effects of Different Ethanol Concentrations on the Initial Growth of Lettuce", *Proceedings of the Carribbean Food Crops Society*, Vol. 33, pp. 442–447.

11. Kato-Noguchi, H., Kugimiya, T., 2001, "Effects of Ethanol on Growth of Rice Seedlings", *Plant Growth Regulation*, Vol. 35, pp. 93–96.

12. Salehi, M.R., Ashiri, F., Salehi, H., 2008, "Effect of Different Ethanol Concentrations on Seed Germination of Three Turfgrass Genera", *Advances in Natural and Applied Sciences*, Vol. 2, No. 1, pp. 6–9.

13. Jeyashoke, N., Koonsrisuk, S., Suchaitanawanich, S., 2007, "Quality Improvement of Virgin Coconut Oil Produced by Reun Samunphai Auw Noi", *Pamphlet of the Lower Central Region Research Network*, Vol. 3, No. 1, pp. 9–12. (in Thai)

14. Fuangworawong, P., Tripetchkul, S., Koonsrisuk, S. and Akeprathumchai, S., 2008, "Study on Availability and Utilization of Wastes from Coconut Processing in Prachuapkhirikhan Province", *Silpakorn University Journal*, Vol. 28, No. 3, pp. 13-31.

15. The Association Office Analytical Chemists International (AOAC), 1995, Official Methods of Analysis, 16th ed., The Association Office Agricultural Chemists, Verginia, pp. 5-24.

16. Burns, E. R. and Marshall, C., 1965, "Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes", *Journal WPCF*, Vol. 37, pp. 1716-1721.

17. Johnson, T.R. and Case, C.L., 1989, *Laboratory Experiments in Microbiology*, 2nd ed., The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc, California, pp. 56-62.

18. The International Seed Testing Association (ISTA), 1993, *Seed Science and Technology*, Vol. 21, Supplement, International Rules for Seed Testing Rules 1993, Adopted at the Twenty-third International Seed Testing Congress Argentina 1992 to become effective 1 July 1993, Zürich, Switzerland, pp. 141-186.

19. US Environmental Protection Agency (USEPA), 1982, *Seed Germination / Root Elongation Toxicity Test*, EG-12, Office of Toxic Substances, Washington D.C., USA.

20. Tiquia, S.M., Tam, N.F.Y. and Hodgkiss, I.J., 1996, "Effect of Composting on Phytotoxicity of Spent Pig-Manure Sawdust Litter", *Environment Pollution*, Vol. 93, No. 3, pp. 249-256.

21. Ministry of Agriculture and Cooperatives, 2001, *Organic-fertilizer* [cited 2007 Oct 2] http://pirun.kps.ku.ac.th/~b5116253/Untitled-4.html (in Thai).

22. Curtin, L.V., 2013, *Molasses-General Consideration* [cited 2013 Oct 23] http://rcrec-ona.ifas.ufl.edu/pdf/publications/molasses-general-considerations..pdf

23. Adikane H.V., Dange, M.N. and Selvakumari, K., 2005, "Optimization of Anaerobically Digested Distillery Molasses Spent Wash Decolorization Using Soil as Inoculum in the Absence of Additional Carbon Nitrogen Source", Bioresource Technology, Vol. 97, No. 16, pp. 2131-2135.

24. Unden, G. and Zaunmüller, T., 2009, "Metabolism of Sugars and Organic acids by Lactic Acid Bacteria from Wine and Must", *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and Wine*, H. König et al. (eds), Springer-Vertag Berlin Heidelbery, pp. 135-147.

25. Moulin, G., Boze, H. and Galzy, P., 1984, "Inhibition of Alcoholic Fermentation", *Biotechnology*

and Genetic Engineering Reviews, Vol. 2, pp. 365-381.

26. Wang, Y., Zhang, Y., Wang, J. and Meng, L, 2009, "Effects of Volatile Fatty Acid Concentrations on Methane Yield and Methanogenic Bacteria", *Biomass and Bioenergy*, Vol. 33, pp. 848-853.

27. Guatooi, B. and Lankford, K.R., 2009, "Strategy for Adapting Wine Yeasts for Bioethanol Production", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 10, pp. 385-394.

28. Manios, V.I., Tsikalas, P.E., Siminis, H.I., 1989, "Phytotoxicity of Olive Tree Leaf Compost in Relation to the Organic Acid Concentration", *Biology Wastes*, Vol. 27, pp. 307-317.

29. Lee, R.B, 1977, "Effects of Organic Acids on the Loss of Ions from Barley Roots", *Journal of Experimental Botany*, Vol. 28, pp. 578-587.

30. Borgen, A. and Nielsen, B., 2001, *Effect of Seed Treatment with Acetic Acid in Control of Seed Borne Diseases*, [cited 2013 Oct 24] http://orgprints.org/1116/

31. Saidi, B.; Azmeh, F.; Mamluk, O.F. and Sikora, R.A., 2001, *Effect of Seed Treatment with Organic acids on the Control of Common Bunt (Tilletia tritici and T. laevis) in wheat*, [cited 2013 Oct 24] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12425040

32. Department of Agriculture of Thailand, 2005, *Organic Fertilizer Standard*, [cited 2009 Apr 16] http://www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2548/00172707.PDF (in Thai).