เอนไซม์ เซลลูโลสที่อยู่ในช่วง 440.20-579.40, 470.50-592.80 และ 263.70-291.40 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาณเอนไซม์ฟอสฟาเทสอยู่ในช่วง 57.30-69, 39.50-45.60 และ 34.70-39.50 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 103.60 - 145.70, 114.60-128.90 และ 83.10-95.60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำหมักชีวภาพนั้น สุริยา สาสนรักกิจ (2542) ได้พบว่า จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน อยู่ในช่วง 2.7×10^5 ถึง 9.0×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียได้แก่ *Baccilluscirculans, B.firmus, B.cereous, Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp.และยีสต์ ส่วนจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนพบอยู่ในช่วง 1.10×10^6 ถึง 2.10×10^7เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ที่สร้างจากกรดแลคติกได้แก่ *Lactobacillus sp.* และ *Staphylococcus sp.*, และแบคทีเรียที่สร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างแบบท่อนสั้นและจากที่กรมพัฒนาที่ดิน (2543 อ้างถึงใน สมพร แซ่ลี้, 2547) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์บางชนิดในน้ำหมักชีวภาพ พบว่า จุลินทรีย์ที่ตรวจพบเป็นพวกแบคทีเรียที่ย่อยสลายฟอสเฟต ราย่อยสลายฟอสเฟสและยีสต์

เมื่อศึกษาถึงระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำหมักชีวภาพที่มีผลต่อชนิดและปริมาณแล้ว จุลินทรีย์ในน้ำหมักชีวภาพที่เก็บรักษาในระยะเวลาต่างๆ กันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า ที่ระยะเก็บรักษา 20 วัน พบเฉพาะแบคทีเรียในปริมาณ $2.10\text{x}10^9$ เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณลดลงเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษามากขึ้น ที่ระยะเวลาเก็บรักษา 30 วัน ไม่พบจุลินทรีย์ชนิดใดเลย ส่วนแลกติโนมัยซีสพบที่ระยะเก็บรักษา 40 วัน ในปริมาณ $4.28\text{x}10^3$ ถึง $4.56\text{x}10^3$ เซลล์/มิลลิลิตร (นิรนาม, 2543 อ้างถึงใน สมพร แซ่ลี้, 2547) และชัยทัศน์ ไพรินทร์ (2546) ได้พบว่าการหมักน้ำหมักชีวภาพโดยใช้โอ่งและถังปฏิกรณ์หมักมีผลต่อระยะเวลาหมัก แต่ไม่มีความแตกต่างในด้านปริมาณของจุลินทรีย์ โดยระยะเวลาหมักที่เหมาะสมที่สุดคือ 2 สัปดาห์ วัดปริมาณจุลินทรีย์ได้ $3.3\text{x}10^9$ เซลล์/มิลลิลิตร ถึงมากกว่า 10^{10} เซลล์/มิลลิลิตร และยังพบว่าจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตน้ำหมักชีวภาพทั้ง 18 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย 9 สายพันธ์เชื้อรา 6 สายพันธ์ และยีสต์ 3 สายพันธ์ ซึ่งมีความต้องการอากาศและอาหารต่างกัน สามารถอยู่ร่วมกันในลักษณะปฏิสัมพันธ์ก่อประโยชน์กันได้

3. วิธีการดำเนินการวิจัย (Method)

3.1 วัสดุ และอุปกรณ์

ผลไม้ชนิดต่างๆที่ใช้ในการทดลองนี้ได้แก่ มะพร้าวอ่อน สับปะรด เปลือกสับปะรด กล้วย เปลือกกล้วย และกากน้ำตาล ซื้อจากตลาดสดและร้านขายวัสดุการเกษตร ในอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาวิจัยได้แก่ เมทานอล (AR grade, Lab Scan, Ireland) เฮกเซน (AR grade, Merck, Germany) กรดไนตริก (AR Grade, Lab Scan, Ireland) กรดไฮโดรคลอริก (AR grade, Carlo Erba, Italy) กรดซัลฟูริก (AR grade, Carlo Erba, Italy) กรดบอริก (AR grade, Merck, Germany) กรดแอสคอร์บิก (AR

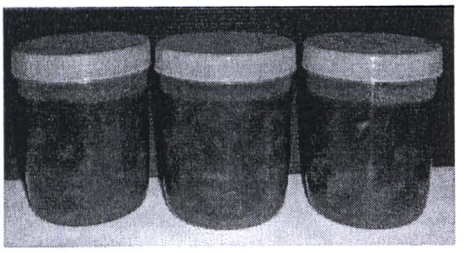
grade, Merck, Germany) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (AR grade, Ajax Chemicals, Australia) และเอทิลอะซีเตท (AR grade, Carlo Erba, Italy) สำหรับสารมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ เหล็ก แมงกานีส สังกะสี แคลเซียม และโพแทสเซียม (AR grade, Carlo Erba, Italy) ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4, AR grade, Ajax Chemicals, Australia) น้ำที่ใช้ในการศึกษานั้น จะเป็นน้ำปราศจากไอออน (Model Simplicity 185, Millipore Corporation, USA.)

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

เครื่องอัลตราไวโอเล็ต-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Jenway 6400, England) เครื่องกลั่นเจลดาลล์ (Gerhard Vapodest 30, Germany) เครื่องเฟลมอะตอมมิกแอพซอร์พชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (AAnalyst 100, Perkin Elmer, Germany) และเครื่อง Inductively Couple Plasma (ICP) spectrometer (Optima 2100 DV, Perkin Elmer, Germany)

3.3 ขั้นตอนการเตรียมน้ำหมักชีวภาพ

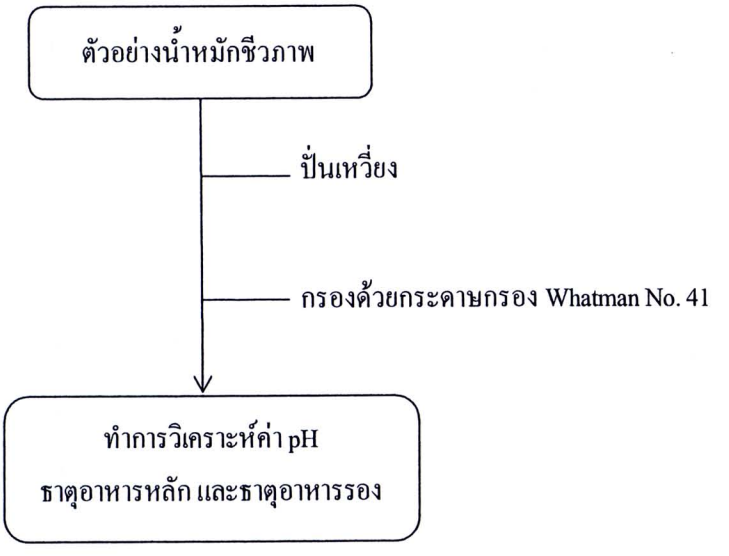
1. นำผลไม้สดที่คัดเลือก เช่น มะเฟือง มะม่วง มะละกอ กล้วย มะพร้าวอ่อน เป็นต้น มาปอกเปลือกแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งน้ำหนักตามต้องการที่เหมาะสมด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง โดยผสมกับกากน้ำตาลในภาชนะพลาสติกที่เตรียมไว้ ในอัตราส่วนระหว่างผลไม้ 3 ส่วนต่อกากน้ำตาล 1 ส่วน จากนั้นนำมาผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันอย่างดี
2. วางของหนักทับบนผลไม้ที่หมัก เพื่อกดไล่ฟองอากาศที่อยู่ข้างในออกให้หมด โดยของหนักที่ใช้ทับนั้น ควรมีน้ำหนักประมาณ 1 ใน 3 ของน้ำหนักผลไม้ที่ชั่ง
3. ปิดฝาภาชนะที่หมักให้สนิท ถ้าเป็นถุงพลาสติกก็มัดปากถุงพลาสติกให้แน่น เพื่อป้องกันไม่ให้อากาศเข้าไปได้เป็นการสร้างสภาพที่เหมาะสมให้แก่จุลินทรีย์ลงไปทำงาน และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องไม่โดนแสง
4. เวลาที่ใช้ในการหมัก เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงธาตุอาหารที่เกิดขึ้น เช่น หมักเป็นเวลา 15, 30, 45 วัน เป็นต้น



รูปที่ 1 น้ำหมักชีวภาพที่ได้จากการหมักผลไม้ชนิดต่างๆ

3.4 การเตรียมตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพก่อนการวิเคราะห์

นำตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพที่ได้จากผลไม้แต่ละชนิด มา 20 มิลลิลิตรปั่นเหวี่ยง ที่อัตราเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 41 อีกครั้ง นำส่วนที่กรองได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคและเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ต่อไป



รูปที่ 2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ก่อนการวิเคราะห์

3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณของธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองบางชนิด

3.5.1 การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน

ได้วิเคราะห์ไนโตรเจนด้วยวิธีเจลดาลล์ มีขั้นตอนการศึกษาดังนี้ ดำเนินการย่อยตัวอย่าง (ผลไม้สด และน้ำหมักชีวภาพจากผลไม้) ด้วยสารรีเอเจนต์สำหรับใช้ในการย่อยที่มีทองแดงและโพแทสเซียมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 90°C จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์42 แล้วเติมสารผสมของโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 12.50 โมลาร์ กับโซเดียมไธโอซัลเฟต เข้มข้น 0.10 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลาย นำสารละลายที่ได้ต่อ

เข้ากับเครื่องเจลดาลล์ เก็บส่วนที่กลั่นได้ลงในของ Boric acid indicator ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้จากการกลั่นมาไทเทรตด้วยสารมาตรฐานกรดซัลฟิวริกที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนแล้ว เพื่อหาปริมาณแอมโมเนียและไนโตรเจน ตามลำดับ ได้ผลการทดลอง ดังตารางที่ 4 และเมื่อทำการหมักผลไม้ต่างๆ เป็นเวลา 15, 30 และ45 วัน

3.5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัส

ได้วิเคราะห์หาด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเล็ต-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมทรี โดยนำตัวอย่างผลไม้สดที่หั่นแล้ว มาชั่งหนัก 10 กรัม หรือน้ำหมักชีวภาพที่ผ่านการกรองแล้ว มา 10 มิลลิลิตร แล้วย่อยตัวอย่างด้วยกรดไนตริกเข้มข้น (Conc.HNO_3) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรในบีกเกอร์ ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนกระทั่งได้สารละลายใส แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 จากนั้น ปิเปตสารอาร์มสตรอง รีเอเจนต์ (Armstrong reagent) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน เขย่าให้สารละลายผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที จะได้สารละลายสีน้ำเงิน แล้ววัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุดด้วยเครื่องอัลตราไวโอเล็ต-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 880 นาโนเมตร ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 4 และมื่อทำการหมักผลไม้ต่างๆ เป็นเวลา 15, 30 และ45 วัน ตามลำดับ

3.5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ โบรอน เหล็ก สังกะสี แมงกานีส ทองแดง แมกนีเซียม แคลเซียม และโพแทสเซียม

นำตัวอย่างผลไม้สดที่หั่นแล้วมาชั่งหนัก 10 กรัม หรือน้ำหมักชีวภาพที่ผ่านการกรองแล้วมา 10 มิลลิลิตรแล้วย่อยตัวอย่างด้วยกรดไนตริกเข้มข้น (Conc.HNO_3) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรในบีกเกอร์ ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนกระทั่งได้สารละลายใส แล้วตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 (Whatman, U.K.) แล้วปรับปริมาตรด้วย 15% กรดไฮโดรคลอริก จากนั้นนำไปหาปริมาณด้วยวิเคราะห์ด้วยวิธีอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรโฟโตเมทรี (Acetoet al, 2002) (Model Analyst 100; Perkin Elmer, USA.) ด้วยสภาวะของเครื่อง แสดงในตารางที่ 1 ในส่วนของโบรอนนั้น จำเป็นที่ต้องวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ICP-OES โดยมีสภาวะที่ใช้แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 สภาวะของเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ธาตุอาหาร

ธาตุ	สภาวะที่ใช้ทดลอง				
	ความยาวคลื่น (λ) nm	พลังงานของ Lamp (Watt)	Slit width (mm)	อัตราการไหลของ air/acetylene (มิลลิลิตรต่อนาที)	ชนิดสัญญาณ
K	766.5	76	0.70	6/4	คายคลื่นแสง
Ca	422.7	72	0.70	5/3	ดูดกลืนคลื่นแสง
Cu	324.8	74	0.70	8/3	ดูดกลืนคลื่นแสง
Mn	279.5	73	0.20	10/3	ดูดกลืนคลื่นแสง
Mg	285.2	64	0.70	7/3	ดูดกลืนคลื่นแสง
Fe	248.3	60	0.20	10/3	ดูดกลืนคลื่นแสง
Zn	213.9	73	0.70	10/3	ดูดกลืนคลื่นแสง

ตารางที่ 2 สภาวะของเครื่อง ICP-OES ที่ใช้ในการวิเคราะห์ธาตุโบรอน

ตัวแปร	สภาวะที่ใช้ทดลอง
พลังงานคลื่นวิทยุ (W)	1300
อัตราการไหลของ plasma gas (ลิตรต่อนาที)	15
อัตราการไหลของ nebulizer (ลิตรต่อนาที)	0.8
อัตราการไหลของ auxiliary (ลิตรต่อนาที)	0.2
อัตราการไหลของ pump (ลิตรต่อนาที)	1.5
ความยาคลื่น (λ) nm	249.677