บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1 องค์ประกอบของกากเมล็ดสบู่ดำ

องค์ประกอบของกากเมล็ดสบู่ดำซึ่งถูกสกัดน้ำมันออกแล้ว แสดงในตารางที่ 4.1 จะเห็นว่า
ค์ประกอบของกากเมล็ดสบู่ดำมีโปรตีน 18.2% ไขมัน 25.1% เถ้า 10.5% เยื่อใย 13.5% และ
ร์โบไฮเดรต 32.6% ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Belewu และ Sam (2010) พบโปรตีน 37.82% เยื่อ
6.50% และเถ้า 4.68% อาจเป็นเพราะกากเมล็ดสบู่ดำใช้ในการทดลองเป็นกากเมล็ดสบู่ดำทั้งเมล็ด
และที่รายงานอ้างอิงแยกเอาเปลือกออก สำหรับสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการที่พบใน
กเมล็ดสบู่ดำแสดงในตารางที่ 4.2 จากรายงานของวิทยาและคณะ (2549) ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณ
orbol ester ที่ประกอบอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของต้นสบู่ดำ พบว่า phorbol ester เป็นสารพิษที่ใช้บ่งบอก
เสายพันธุ์ของสบู่ดำว่าเป็นพันธุ์ที่มีพิษหรือไม่ โดยพันธุ์ที่ไม่มีพิษมีปริมาณสาร phorbol ester น้อย
ว่า 0.011% หรือ 110 μg/g จากการศึกษานี้พบว่ากากเมล็ดสบู่ดำมีปริมาณสาร phorbol ester 119.93
g/g ซึ่งอาจกล่าวได้ว่ากากเมล็ดสบู่ดำที่ใช้มาจากสายพันธุ์ที่เป็นพิษ ในขณะที่ Makkar et al. (1997)
เยงานปริมาณสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการที่พบในกากเมล็ดสบู่ดำมีดังนี้ phorbol ester
0 μg/g, phytic acid 0.89 mg/g, trypsin inhibitor 26.5 TIU/g, lectin 51.0 mg/ml และ saponin 0.34
g/g ซึ่งแตกต่างจากผลการทดลองนี้ อาจเนื่องมาจากวิธีการเตรียมกากเมล็ดสบู่ดำที่แตกต่างกัน โดย
ากเมล็ดสบู่ดำที่ใช้ในการศึกษานี้ได้จากวิธี screw press ขณะที่รายงานดังกล่าวได้จากวิธี hydraulic
ess นอกจากนี้สายพันธุ์และพื้นที่ปลูกต้นสบู่ดำทำให้องค์ประกอบของเมล็ดสบู่ดำแตกต่างกัน
Makkar et al., 1997 และ Ahmed and Salimon, 2009)

จากผลการทดลองข้างต้น ทำให้ทราบว่ากากเมล็ดสบู่ดำมีองค์ประกอบที่น่าจะใช้เป็นแหล่ง
าหารของจุลินทรีย์ได้

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของกากเมล็ดสบู่ดำ

องค์ประกอบ	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	เยื่อใย	คาร์โบไฮเดรต
ปริมาณ (% โดยน้ำหนักแห้ง)	18.2±0.1	25.1±0.1	10.5±0.6	13.5±0.1	32.6±0.4

ตารางที่ 4.2 องค์ประกอบสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการของกากเมล็ดสบู่ดำ

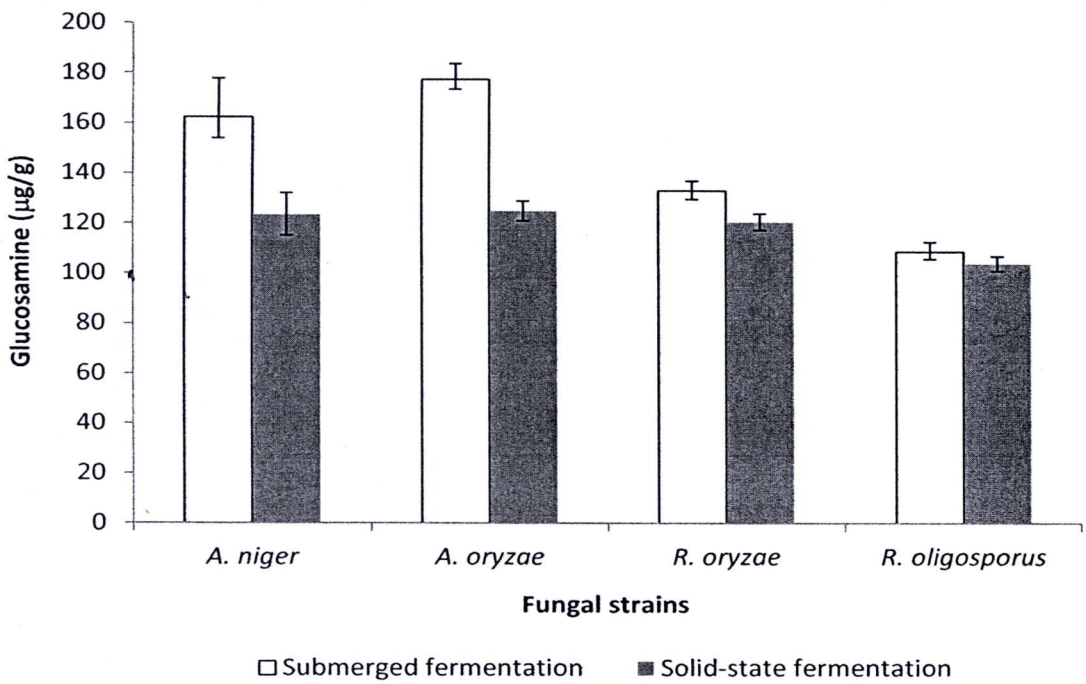
องค์ประกอบ	Phorbol ester (μg/g)	Phytic acid (mg/g)	Trypsin Inhibitor (TIU/g)	Lectin (mg/ml)	Saponin (mg/g)
ปริมาณ	119.93±17.85	16.07±1.19	36.53±1.59	6.25±0.00	0.13±0.01

2 การเจริญเติบโตของเชื้อราในกากเมล็ดสบู่ดำ

โดยทั่วไปการเจริญเติบโตของเชื้อราวิเคราะห์ได้จากชีวมวล (biomass) ของเชื้อรา แต่องจากองค์ประกอบของอาหารเป็นกากเมล็ดสบู่ดำซึ่งเส้นใยของเชื้อราเจริญแทรกและล้อมรอบ ุภาคของกากเมล็ดสบู่ดำ ทำให้ไม่สามารถแยกเส้นใย (ชีวมวล) จากซับเสตรทได้ การศึกษาการ ริญเติบโตของเชื้อราจึงอาจวิเคราะห์จากองค์ประกอบของเส้นใยเชื้อรา อาทิ glucosamine, gosterol และกรดนิวคลีอิค หรืออาจวัดกิจกรรมทางชีวภาพ เช่น กิจกรรมของเอนไซม์ อัตราการ ายใจ ปริมาณ ATP และอัตราการใช้สารอาหาร เป็นต้น จากวิธีการต่างๆ เหล่านี้ การวัดปริมาณ ucosamine เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก (Sparringa and Owens, 1999) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงวิเคราะห์ ริมาณ glucosamine เพื่อแสดงถึงการเจริญของเชื้อราบนกากเมล็ดสบู่ดำ

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้งสี่สายพันธุ์หลังการหมักกากเมล็ดสบู่ดำ แสดงใน ปที่ 4.1 พบว่าเชื้อราทั้งสี่สามารถเจริญบนกากเมล็ดสบู่ดำ โดยสายพันธุ์ที่เจริญดีที่สุดในสภาวะการ มักแบบอาหารเหลว ได้แก่ *A. oryzae* ซึ่งพบปริมาณ glucosamine เท่ากับ 177.30 μg/g ในขณะที่ *niger, R. oryzae* และ *R. oligosporus* มีปริมาณ glucosamine เท่ากับ 162.36, 132.88 และ 108.67 g/g ตามลำดับ สำหรับในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งพบว่าเชื้อรา 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. niger, A. yzae* และ *R. oryzae* เจริญได้ใกล้เคียงกันโดยมีปริมาณ glucosamine เท่ากับ 123.59, 124.84 และ 20.49 μg/g ตามลำดับ สำหรับ *R. oligosporus* เจริญน้อยที่สุด โดยมีปริมาณ glucosamine เพียง 03.97 μg/g จากผลการศึกษาจะเห็นว่าเชื้อราทุกสายพันธุ์เจริญในสภาวะการหมักแบบอาหารเหลว กว่าในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง ทั้งนี้เนื่องจากการหมักแบบอาหารเหลวเกิดการส่งถ่ายมวล ละความร้อนได้ดีกว่า ดังนั้นเชื้อราสามารถดูดซึมสารอาหารและอากาศเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการ เตาบอลิซึมของเซลล์ได้ดี El-Batal และ Karem (2001) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *A. niger* ในกาก rapeseed

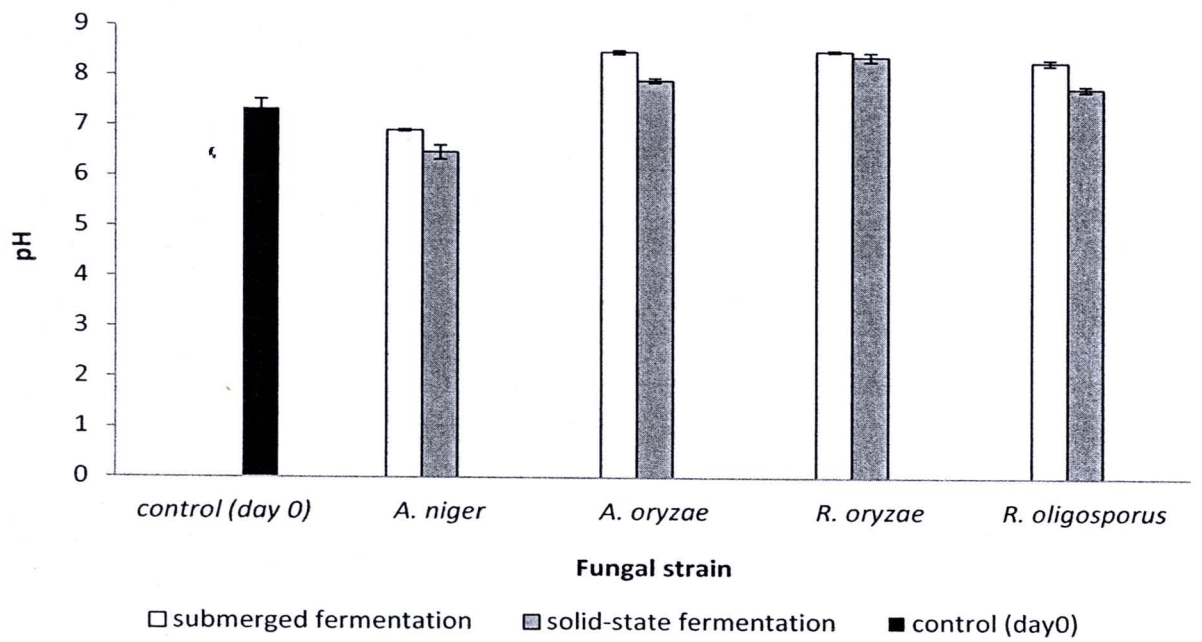
แบบอาหารแข็งวัดปริมาณกลูโคซามีนได้ 3.3 mg/g และ Ramachandran et al. (2005) รายงานว่าเมื่อ *R. oryzae* เลี้ยงในกากเนื้อมะพร้าวและผสมกับกากงาแบบอาหารแข็งวัดปริมาณกลูโคซามีนได้ประมาณ 60 mg/g จากรายงานอ้างอิงดังกล่าวจะเห็นได้ว่าเชื้อราเจริญได้แตกต่างกันในซับเสตรทที่แตกต่างกัน



รูปที่ 4.1 ปริมาณ glucosamine ของเชื้อราในวันที่ 7 ของการหมักบนกากเมล็ดสบู่ดำในสภาวะการหมักแบบอาหารเหลวและอาหารแข็ง

การหมักกากเมล็ดสบู่ดำส่งผลให้ pH ของกากเมล็ดสบู่ดำเปลี่ยนแปลงไปขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อรา รูปที่ 4.2 แสดง pH ของกากเมล็ดสบู่ดำเริ่มต้นก่อนหมักมีค่า 7.34 และ pH ของกากเมล็ดสบู่ดำหลังการหมักด้วยเชื้อราทั้งสี่ เป็นเวลา 7 วันในสภาวะการหมักแบบอาหารเหลวและอาหารแข็ง หลังการกากเมล็ดสบู่ดำในสภาวะการหมักแบบอาหารเหลวด้วย *A. niger* พบว่าค่า pH ลดลงเหลือ 6.91 ทั้งนี้เนื่องจาก *A. niger* เป็นเชื้อราที่ใช้ผลิตกรดซิตริกและนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม ในขณะที่เชื้อรา 3 สายพันธุ์ได้แก่ *A. oryzae, R. oryzae* และ *R. oligosporus* ให้ค่า pH เพิ่มขึ้นหลังการหมัก เป็น 8.47, 8.49 และ 8.28 ตามลำดับ อาจเป็นเพราะในระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อราเหล่านี้ เชื้อราสามารถย่อยโปรตีนในกากเมล็ดสบู่ดำ เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบไนโตรเจน เช่น แอมโมเนีย และกรดอะมิโน สำหรับค่า pH ของกากเมล็ดสบู่ดำหลัง

การหมักแบบอาหารแข็งมีลักษณะเช่นเดียวกับการหมักแบบอาหารเหลว (รูปที่ 4.2) โดย *A. niger* ให้ค่า pH ลดลงเหลือ 6.47 ในขณะที่ *A. oryzae, R. oryzae* และ *R. oligosporus* ให้ค่า pH เพิ่มขึ้นเป็น 7.90, 8.38 และ7.76 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Donnell et al. (2001) รายงานค่า pH ลดลงจาก 6 เป็น 3 เมื่อเลี้ยง *A. niger* ในอาหาร YM เป็นเวลา 120 ชั่วโมง และ Liang et al. (2009) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *A. oryzae* ใน soy sauce koji เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าค่า pH เพิ่มขึ้นจาก 6.5 เป็น 7.25



รูปที่ 4.2 ค่า pH ของกากเมล็ดสบู่ดำก่อนและหลังการหมักด้วยเชื้อราเป็นเวลา 7 วันในสภาวะการหมักแบบอาหารเหลวและอาหารแข็ง

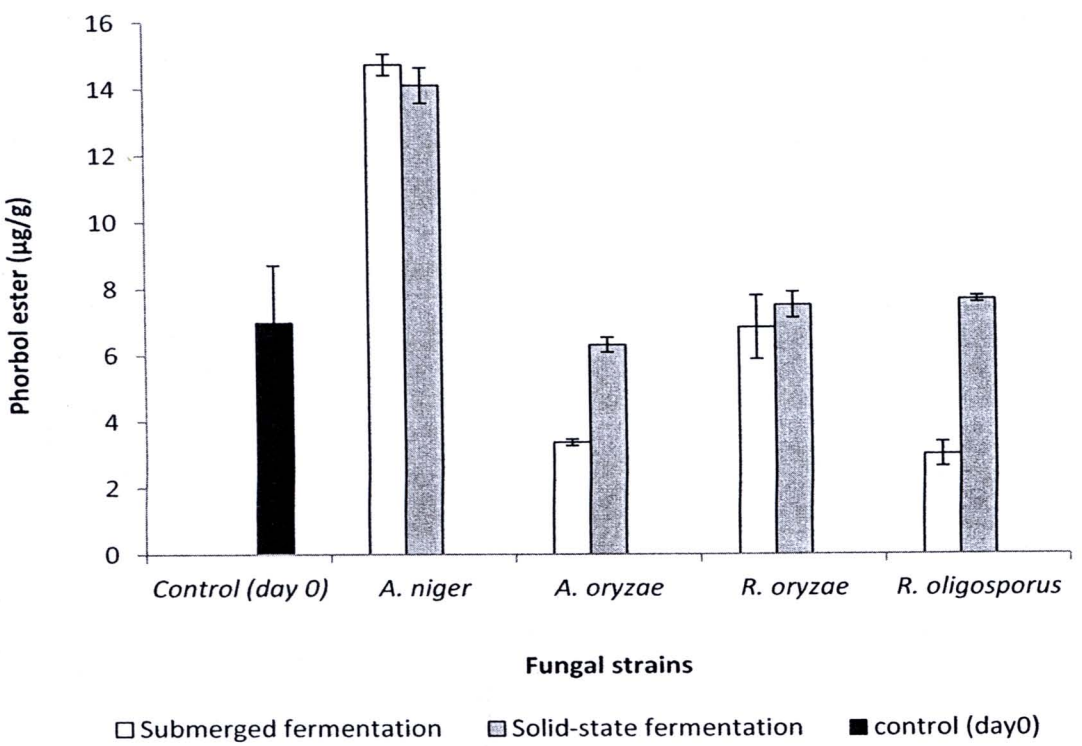
4.3 การลดสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการในกากเมล็ดสบู่ดำ

4.3.1 ปริมาณ phorbol ester

รูปที่ 4.3 แสดงปริมาณสาร phorbol ester หลังการหมักกากเมล็ดสบู่ดำแบบอาหารเหลวโดยเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์ จะเห็นว่า เชื้อรา 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. oryzae* และ *R. oligosporus* ลดสาร phorbol ester ในกากเมล็ดสบู่ดำ 52 และ 57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (เทียบกับ control กากเมล็ดสบู่ดำที่ผ่านการเติมน้ำ ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนและไม่มีการเติมเชื้อรา) ในขณะที่ *A. niger* และ *R. oryzae* กลับมีปริมาณ phorbol ester ในกากเมล็ดสบู่ดำหลังการหมักเพิ่มขึ้น อาจเนื่องจากเชื้อราเปลี่ยนแปลงสารหรือสังเคราะห์สารที่มีโครงสร้างคล้าย phorbol ester ทำให้ปริมาณเพิ่มขึ้น สำหรับปริมาณสาร

orbol ester หลังการหมักกากเมล็ดสบู่ดำแบบอาหารแข็งโดยเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อราเพียง ยพันธุ์เดียว คือ *A. oryzae* ที่ลดสาร phorbol ester ในกากเมล็ดสบู่ดำ 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับ ntrol

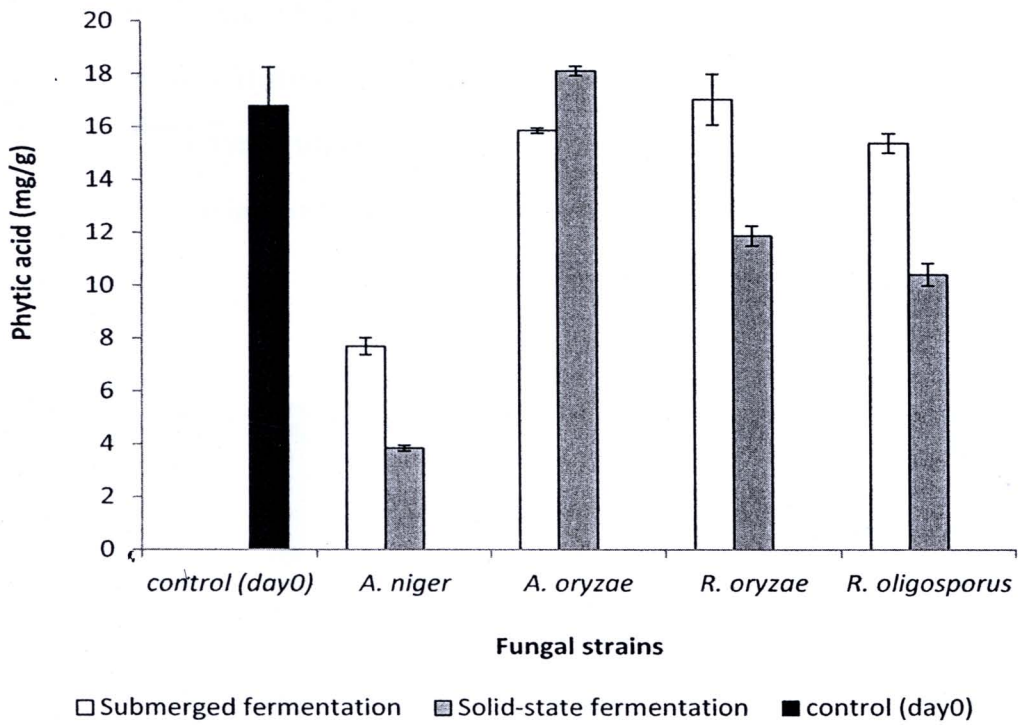
โครงสร้างของสาร phorbol ester เกิดจาก tigliane (สารประเภท alcohol) เกิดปฏิกิริยา droxylation คือมีหมู่ hydroxyl เข้าจับกับ tigliane ที่ตำแหน่งต่างๆ แล้วทำปฏิกิริยากับกรด เกิดเป็น รประเภท ester (รยากรและคณะ, 2550) ดังนั้นการย่อยสลายสาร phorbol ester จึงน่าจะเกี่ยวข้อง บการดึงหมู่ hydroxyl หรือมีเอนไซม์ย่อยสลายสารประเภทเอสเทอร์เกี่ยวข้อง เช่น เอนไซม์ สเทอเรส หรือเอนไซม์ไลเปส (Joshi et al., 2011)



รูปที่ 4.3 ปริมาณสาร phorbol ester ในกากเมล็ดสบู่ดำก่อนและหลังการหมักแบบอาหาร หลวและอาหารแข็งเป็นเวลา 7 วัน

4.3.2 ปริมาณ phytic acid

ปริมาณ phytic acid ในกากเมล็ดสบู่ดำหลังการหมักในสภาวะอาหารเหลวด้วย . *niger, A. oryzae, R. oryzae* และ *R. oligosporus* มีค่า 7.70, 15.86, 17.04 และ 15.39 mg/g ามลำดับ (รูปที่ 4.4) สำหรับปริมาณ phytic acid หลังการหมักแบบอาหารแข็งด้วย *A. niger, A. yzae, R. oryzae* และ *R. oligosporus* มีค่า 3.84, 18.12, 11.88 และ 10.42 mg/g ตามลำดับ จะเห็นว่า . *niger* สามารถลดปริมาณ phytic acid ในกากเมล็ดสบู่ดำในสภาวะการหมักแบบอาหารเหลวและ าหารแข็งสูงสุดที่ 54 และ 77 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับจากปริมาณ phytic acid เริ่มต้นที่ 16.81 mg/g อดคล้องกับรายงานของ Vats et al. (2009) ซึ่งพบว่า *A. niger* เป็นเชื้อราที่สร้างเอนไซม์ phytase ่อย่อย phytic acid เป็นแหล่งแร่ธาตุ เช่น ฟอสเฟต และ dicovalent metals นอกจากนี้ *R. oligosporus* ามารถลด phytic acid ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sabu et al. (2002) ที่พบ *R. oligosporus* สามารถ ร้างเอนไซม์ phytase เพื่อย่อยสลาย phytic acid ในกากเนื้อมะพร้าว สำหรับการหมักด้วย *R. oryzae* ามารถลดปริมาณ phytic acid ได้ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง อย่างไรก็ตามสำหรับการหมัก วย *A. oryzae* พบว่าปริมาณ phytic acid ในกากเมล็ดสบู่ดำเพิ่มขึ้นทั้งสองสภาวะ ซึ่งสอดคล้องกับ เยงานของ Akindahunsi et al. (1999) พบว่าปริมาณ phytic acid ในแป้งการิ (gari) ภายหลังการหมัก วย *R. oryzae* สูงกว่าปริมาณ phytic acid ในวัตถุดิบที่ไม่ได้ผ่านการหมัก เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลง ารประกอบในวัตถุดิบไปเป็น phytic acid Stiles และ Grabau (2005) รายงานถึงเอนไซม์ inositol olyphosphate kinase จะทำหน้าที่สังเคราะห์ phytic acid จากหมู่ฟอตเฟตที่มีในซับเสตรท เอนไซม์ นิดนี้พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด รวมทั้งยีสต์และเชื้อรา เช่น *Saccharomyces cerevisiae, spergillus* sp. และ *Sclerotinia sclerotiorum*

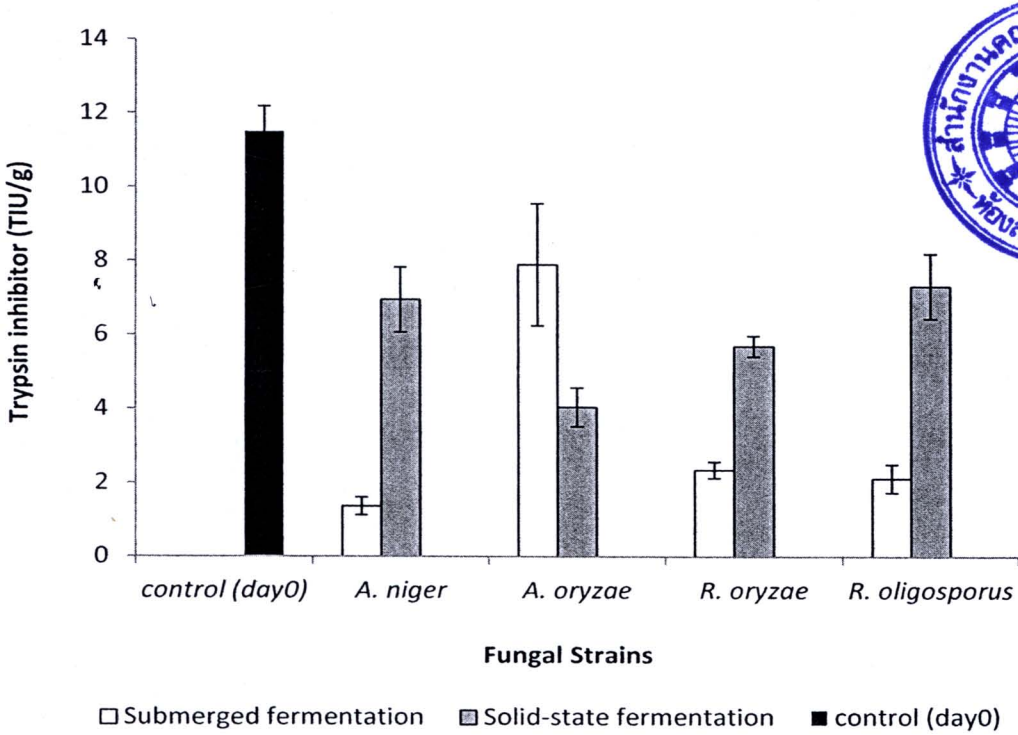


รูปที่ 4.4 ปริมาณ phytic acid ในกากเมล็ดสบู่ดำก่อนและหลังการหมักแบบอาหารเหลว และอาหารแข็งเป็นเวลา 7 วัน

4.3.3 ปริมาณ trypsin inhibitor

ปริมาณ trypsin inhibitor ในกากเมล็ดสบู่ดำก่อนและหลังการหมักด้วยเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์ ในสภาวะการหมักแบบอาหารเหลวและอาหารแข็งแสดงในรูปที่ 4.5 ผลการทดลองพบว่า เชื้อราทุกสายพันธุ์ลดปริมาณ trypsin inhibitor เนื่องจากสารชนิดนี้เป็นสารประเภทโปรตีน ซึ่งเชื้อรา บางจผลิตเอนไซม์ protease ย่อยสารนี้เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน การหมักใน สภาวะแบบอาหารเหลวด้วยเชื้อรา *A. niger, A. oryzae, R. oryzae* และ *R. oligosporus* ปริมาณ trypsin inhibitor ลดลงเหลือ 1.37, 7.90, 2.35 และ 2.12 TIU/g ตามลำดับ หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่ ลดลง 88, 31, 80 และ 82 ตามลำดับ สำหรับการหมักแบบอาหารแข็งด้วยเชื้อรา *A. niger, A. oryzae, R. oryzae* และ *R. oligosporus* ปริมาณ trypsin inhibitor ลดลงเหลือ 6.95, 4.05, 5.70 และ 7.32 TIU/g ตามลำดับ หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่ลดลง 40, 65, 50 และ 36 ตามลำดับ

ทั้งนี้เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การลดลงของปริมาณ trypsin inhibitor พบว่า *A. niger* ลด trypsin inhibitor มากที่สุดในสภาวะแบบอาหารเหลว อย่างไรก็ตาม *A. oryzae* สามารถลด trypsin inhibitor มากที่สุดในสภาวะแบบอาหารแข็ง สอดคล้องกับรายงานของ Wang et al. (1972) ซึ่งพบว่า *R. oligosporus* ลด trypsin inhibitor ในถั่วเหลืองได้ดีในสภาวะการหมักแบบอาหารเหลว



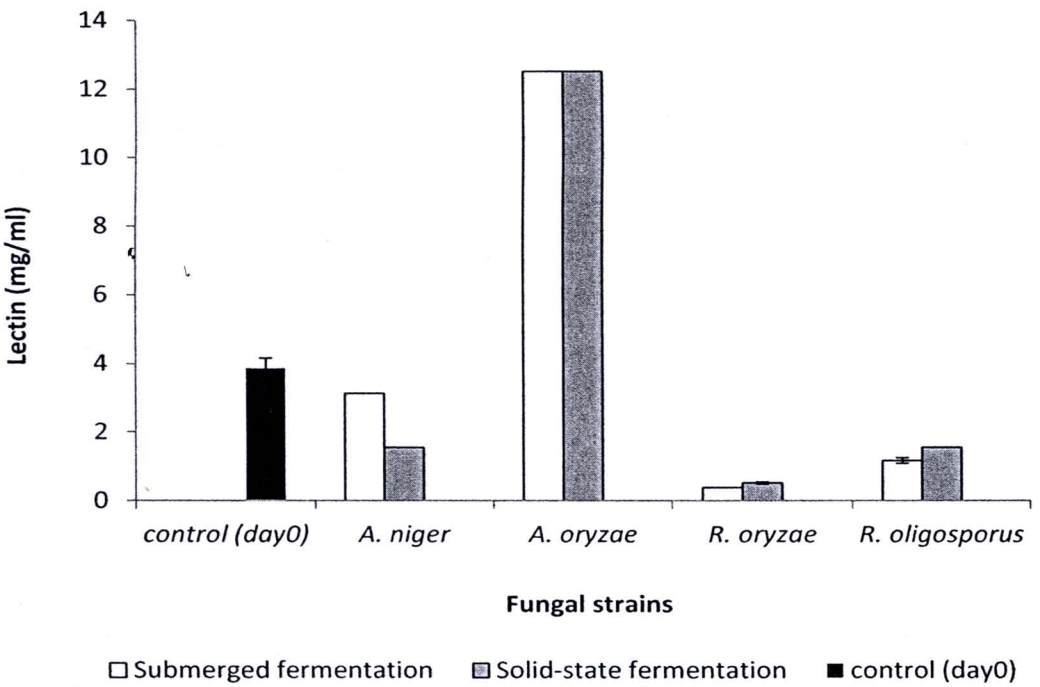
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

รูปที่ 4.5 ปริมาณ trypsin inhibitor ที่พบในกากเมล็ดสบู่ดำก่อนและหลังหมักแบบอาหารเหลวและอาหารแข็งเป็นเวลา 7 วัน

4.3.4 ปริมาณ lectin

ปริมาณ lectin ในกากเมล็ดสบู่ดำก่อนและหลังการหมักด้วยเชื้อราทั้งสี่ในสภาวะการหมักแบบอาหารเหลวและอาหารแข็งแสดงในรูปที่ 4.6 ปริมาณ lectin ในกากเมล็ดสบู่ดำเปลี่ยนแปลงไปแตกต่างกันหลังการหมักทั้งสองสภาวะ โดย *A. oryzae* ให้ค่าสูงสุดทั้ง 2 สภาวะซึ่งหมายถึงลดความเป็นพิษของ lectin ในกากเมล็ดสบู่ดำได้ดีที่สุด อาจเนื่องจากเชื้อราผลิตเอนไซม์ α-galactosidase ย่อย glycoprotein และ glycolipid หลายชนิด (Shankar and Mulimani, 2007)

การหมักด้วยเชื้อราส่วนใหญ่ให้ความเป็นพิษของ lectin เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับในรายงานของ ingh et al. (2010) ซึ่งพบว่าเชื้อราหลายสายพันธุ์มีการสร้าง lectin ในเส้นใย เนื่องจาก lectins เป็น arbohydrate-binding proteins มีลักษณะโครงสร้างหลากหลายและเป็นตัวกลางในกระบวนการทาง วภาพ เช่น cell–cell และ host–pathogen interactions, serum–glycoprotein turnover และการ อบสนองต่อภูมิคุ้นกันโดยกำเนิด (innate immune responses)

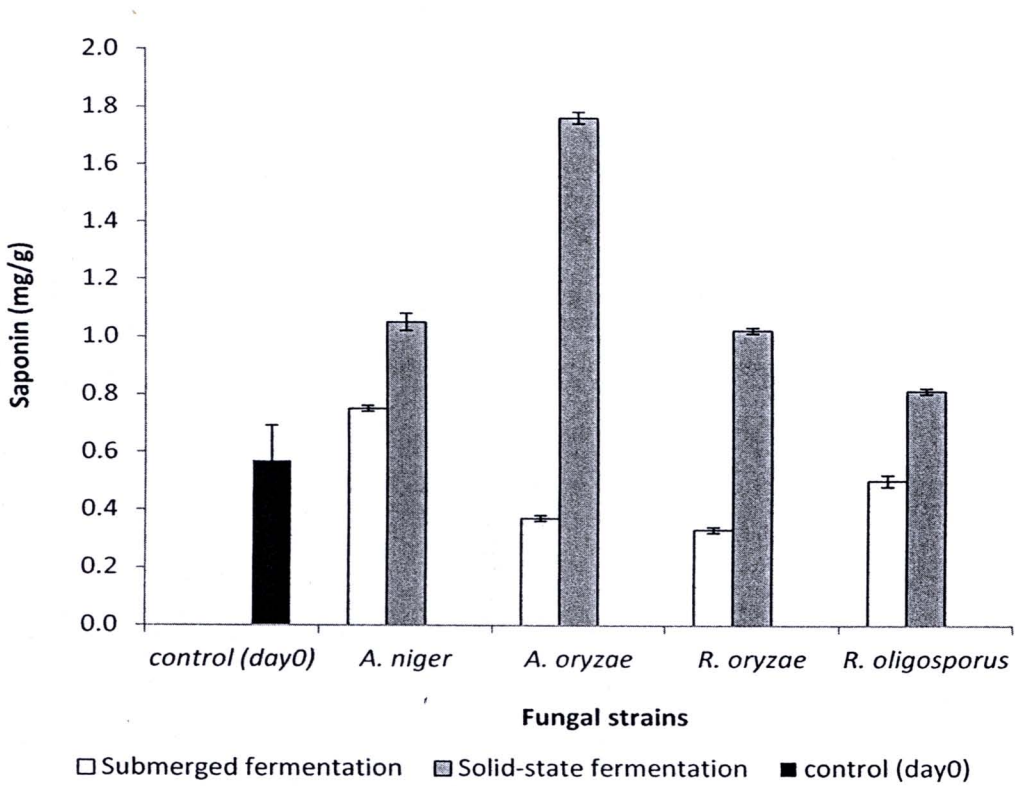


รูปที่ 4.6 ปริมาณ lectin ที่พบในกากเมล็ดสบู่ดำก่อนและหลังหมักแบบอาหารเหลวและ าหารแข็งเป็นเวลา 7 วัน

4.3.5 ปริมาณ saponin

ปริมาณ saponin ในกากเมล็ดสบู่ดำหลังการหมักด้วยเชื้อราทั้งสี่ในสภาวะการหมักแบบ าหารเหลวและอาหารแข็งแสดงในรูปที่ 4.7 ปริมาณ saponin หลังการหมักในสภาวะแบบอาหาร หลวด้วยเชื้อรา *A. niger, A. oryzae, R. oryzae* และ *R. oligosporus* มีค่า 0.75, 0.37, 0.33 และ 0.50 ng/g ตามลำดับ สำหรับหลังการหมักแบบอาหารแข็ง มีปริมาณ saponin เท่ากับ 1.05, 1.76, 1.02และ 0.81 mg/ml ตามลำดับ

สภาวะที่สามารถลดปริมาณ saponin คือการหมักด้วย *A. oryzae, R. oryzae* และ *R. oligosporus* ในการหมักแบบอาหารเหลว ขณะที่การหมักแบบอาหารแข็งมีปริมาณ saponin เพิ่มขึ้น สาร saponin เป็นสารประเภท glycoside คือ มีองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นส่วนที่ละลายน้ำและส่วนที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต (aglycone) ซึ่งไม่ละลายน้ำ เชื่อมต่อกันด้วย glycosidic bond ในสภาวะที่เป็นกรด saponin มีโครงสร้างเป็นแบบ triterpenoid ซึ่งจุลินทรีย์โรคพืชบางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ glycosyl hydrolase ดึงน้ำตาลที่ตำแหน่ง C-3 ในโครงสร้างหลักของ saponin ได้ เช่น *Neocosmospora vasinfecta*, *Pythium* sp. และ *Phytophthora* sp. (Osbourn, 1996 และ Watanabe et al, 2005) กรณีที่ปริมาณ saponin เพิ่มขึ้นอาจเกิดจากเชื้อราสร้างเอนไซม์ glycosyltransferases ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการสังเคราะห์ saponin (Achnine et al., 2005 และ Rhee et al., 2010) หรืออาจเกิดจากการรบกวนของสารประเภท phenolic compounds เช่น tannin และ flavonoid ในกากเมล็ดสบู่ดำ (Herrera et al., 2006) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับ saponin ดูดซับที่ความยาวคลื่นเดียวกัน (Tsai et al., 2010)



รูปที่ 4.7 ปริมาณ saponin ที่พบในกากเมล็ดสบู่ดำก่อนและหลังหมักแบบอาหารเหลวและอาหารแข็งเป็นเวลา 7 วัน

4.4 องค์ประกอบของกากเมล็ดสบู่ดำหลังการหมัก

หลังจากการหมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเชื้อราทั้งสี่สายพันธุ์พบว่า ปริมาณโปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรตหลังการหมักลดลงทั้งการหมักแบบอาหารแข็งและอาหารเหลว ทั้งนี้การลดลงบางส่วนเกิดจากเชื้อราสามารถใช้สารอาหารในกากเมล็ดสบู่ดำเพื่อการเจริญเติบโต และมีโปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรตบางส่วนลดลง ปริมาณเถ้าและเยื่อใยหลังการหมักเพิ่มขึ้น อาจเป็นเพราะเชื้อราสามารถย่อยสลายสารเชิงซ้อนจนกลายเป็นแร่ธาตุได้ หรือปริมาณเถ้าจากชีวมวลของเชื้อราในกากเมล็ดสบู่ดำ ทั้งนี้การเจริญเติบโตของเชื้อราในการหมักแบบอาหารเหลวมากกว่าในการหมักแบบอาหารแข็งสอดคล้องกับปริมาณเยื่อใยที่เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.3 องค์ประกอบทางเคมีของกากเมล็ดสบู่ดำหลังการหมักในสภาวะอาหารแข็งและอาหารเหลว

Conditions	Fungal Strain	Parameters (% dry weight basis)				
		Fat	Ash	Protein	Fiber	Carbohydrate
Solid-state Fermentation	*A.niger*	12.77±0.11	7.78±0.04	18.80±0.74	44.65±0.01	16.00±0.98
	A.oryzae	4.89±0.13	6.67±0.01	19.46±1.10	58.04±0.63	10.94±0.01
	R.oryzae	9.04±0.14	9.75±0.64	17.74±0.78	57.38±0.23	6.09±0.06
	R.oligosporus	6.76±0.13	8.14±0.08	17.54±0.25	53.64±0.03	13.88±0.46
Submerged Fermentation	*A.niger*	7.80±0.07	5.35±0.01	16.39±0.12	56.42±0.01	14.04±0.04
	A.oryzae	3.14±0.04	7.92±0.64	16.66±0.03	68.32±0.98	3.96±0.55
	R.oryzae	1.97±0.06	8.39±0.11	11.95±0.47	72.62±0.21	5.07±0.50
	R.oligosporus	14.82±0.64	0.58±0.06	4.81±0.08	67.85±0.04	11.93±0.16

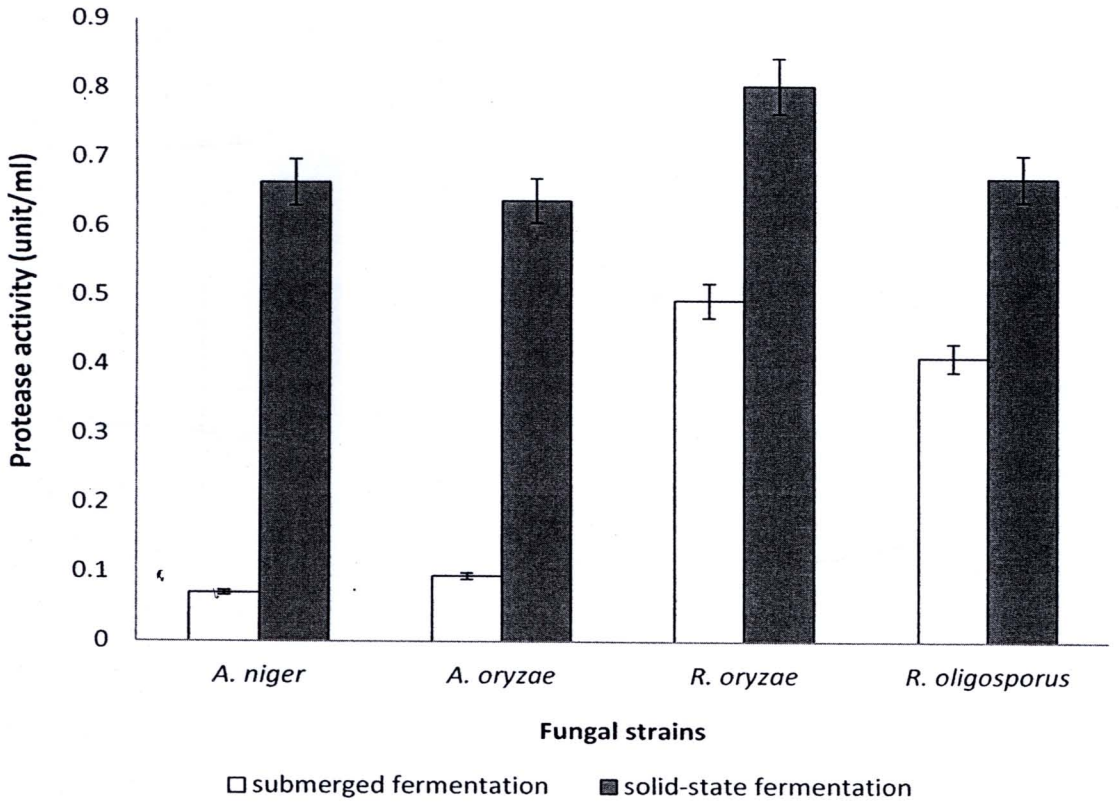
.5 กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการหมักกากเมล็ดสบู่ดำ

การศึกษากิจกรรมเอนไซม์ในน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำทำเพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างริมาณสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการในกากเมล็ดสบู่ดำที่เปลี่ยนแปลงหลังจากการหมักากเมล็ดสบู่ดำด้วยเชื้อรา โดยกิจกรรมของเอนไซม์ที่เชื้อราสร้างขึ้น ได้แก่ เอนไซม์โปรติเอส อาจมีวามสัมพันธ์กับปริมาณสารต้านคุณค่าทางโภชนาการที่มีคุณสมบัติเป็นโปรตีน อาทิ trypsin hibitors และ lectin หรือเอนไซม์ไฟเตส อาจมีความสัมพันธ์กับปริมาณ phytic acid หรือเอนไซม์สเทอเรสอาจมีความสัมพันธ์กับปริมาณ phorbol ester

4.5.1 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในการหมักกากเมล็ดสบู่ดำ

กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำ หลังการหมักด้วยเชื้อราทั้งสี่แสดงนรูปที่ 4.8 พบว่าเชื้อรา *R. oryzae* มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดทั้งสภาวะการหมักแบบอาหารข็งและอาหารเหลวคือ 0.80 และ 0.48 unit/ml ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อรา *A. niger* ในสภาวะการมักแบบอาหารเหลวให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสต่ำที่สุดคือ 0.06 unit/ml และเชื้อรา *A. oryzae* ให้จกรรมเอนไซม์ต่ำที่สุดคือ 0.64 unit/ml ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง

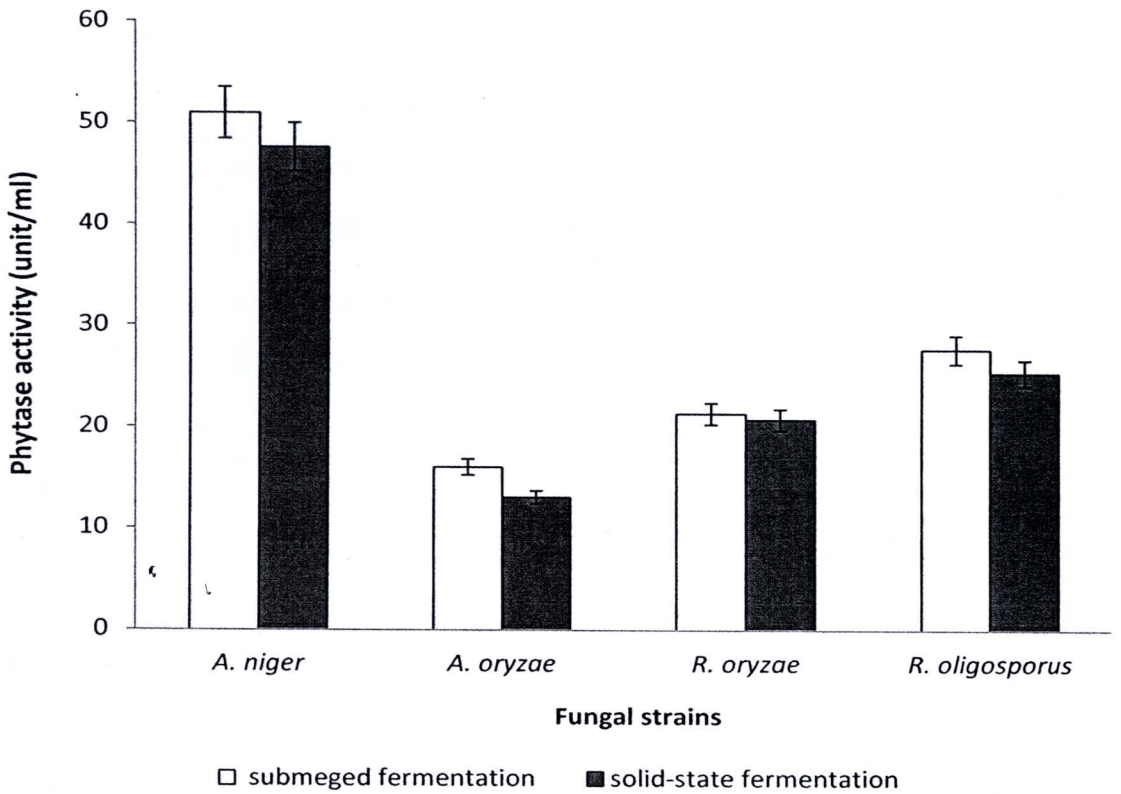
เมื่อพิจาณาปริมาณ trypsin inhibitor (รูปที่ 4.5) พบว่าการหมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเชื้อราุกสายพันธุ์สามารถลดปริมาณ trypsin inhibitor สอดคล้องกับกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส ดังนั้นจกรรมเอนไซม์โปรติเอสน่าจะมีผลโดยตรงต่อการลดลงของปริมาณ trypsin inhibitor ของกากเมล็ดบู่ดำ และเมื่อพิจารณาปริมาณ lectin (รูปที่ 4.6) พบว่าเชื้อราไม่สามารถลดพิษของ lectin ดังนั้นจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจึงอาจไม่มีผลต่อปริมาณ lectin



รูปที่ 4.8 เอนไซม์โปรติเอสในตัวอย่างน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำวันที่ 7

4.5.2 กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตสในการหมักกากเมล็ดสบู่ดำ

กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตสในน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำ หลังการหมักด้วยเชื้อราทั้งสี่แสดงในรูปที่ 4.9 การหมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วย *A. niger* ให้กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตสสูงที่สุดทั้งในการหมักแบบอาหารเหลวและอาหารแข็งคือ 50.98 และ 47.60 unit/ml ตามลำดับ การหมักด้วย *A. oryzae* ให้กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตสต่ำที่สุดในการหมักแบบอาหารเหลวและอาหารแข็งคือ 16.04 และ 13.05 unit/ml ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ phytic acid ที่ลดลง (รูปที่ 4.4) อย่างไรก็ตาม ในกรณีที่หมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเชื้อรา *A. oryzae* ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง และการหมักด้วยเชื้อรา *R. oryzae* ในสภาวะการหมักแบบอาหารเหลว พบปริมาณ phytic acid สูงขึ้นหลังการหมักอาจเป็นเพราะปริมาณฟอสฟอรัสในกากเมล็ดสบู่ดำที่วัดได้ ไม่ได้มาจากฟอสฟอรัสในโครงสร้าง phytic acid แต่มาจากสารประกอบอื่นจากซับเสตรทหรือเชื้อรา (Dao and Hoang, 2008 และ Numaira et al., 2009)

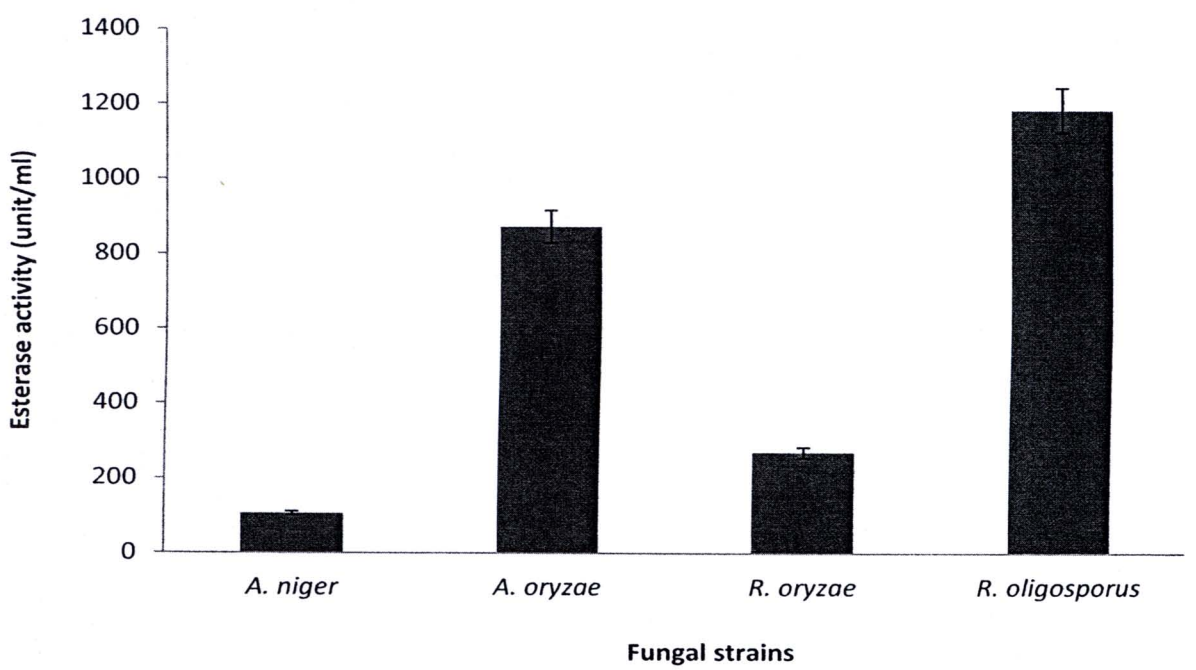


รูปที่ 4.9 เอนไซม์ไฟเตสในตัวอย่างน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำวันที่ 7

4.5.3 กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรสในการหมักกากเมล็ดสบู่ดำ

กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรสหลังการหมักกากเมล็ดสบู่ดำในสภาวะการหมักแบบอาหารเหลวด้วยเชื้อรา *A. niger, A. oryzae, R. oryzae* และ *R. oligosporus* (รูปที่ 4.10) มีค่า 106.67, 871.62, 268.55 และ 1,181.48 unit/ml ตามลำดับ จะเห็นว่ากิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรสของ *A. oryzae* และ *R. oligosporus* ให้ผลสอดคล้องกับการลดลงของสารพิษ phorbol ester (รูปที่ 4.3) อย่างไรก็ตามกิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรสจากเชื้อรา *A. niger* และ *R. oryzae* อาจไม่สูงเพียงพอในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ phorbol ester หรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ phorbol ester เพียงเล็กน้อย หรือเชื้อราทั้งสองอาจสังเคราะห์สารที่มีโครงสร้างคล้าย phorbol ester ทำให้ปริมาณเพิ่มขึ้นหลังการหมัก

โดยทั่วไปเอนไซม์เอสเทอเรสเป็นเอนไซม์ที่สลายพันธะเอสเทอร์ ซึ่งพบในจุลินทรีย์ พืช และสัตว์บางชนิด เอนไซม์ถูกสร้างขึ้นมาเพื่อย่อยสลายซับเสตรทหลายชนิดเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน จากรายงานวิจัยพบว่าจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ชนิดนี้มี ได้แก่ *Pseudomonas* sp., *B. subtilis*, *Lactococcus lactis*, *Aspergillus* sp. เป็นต้น (Bornscheuer, 2002) ทั้งนี้พบว่าในการผลิตเทมเป้โดย *R. oligosporus* ซึ่งเชื้อรานี้สามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิด รวมถึงเอนไซม์เอสเทอเรสด้วย (Varzakas, 1998)



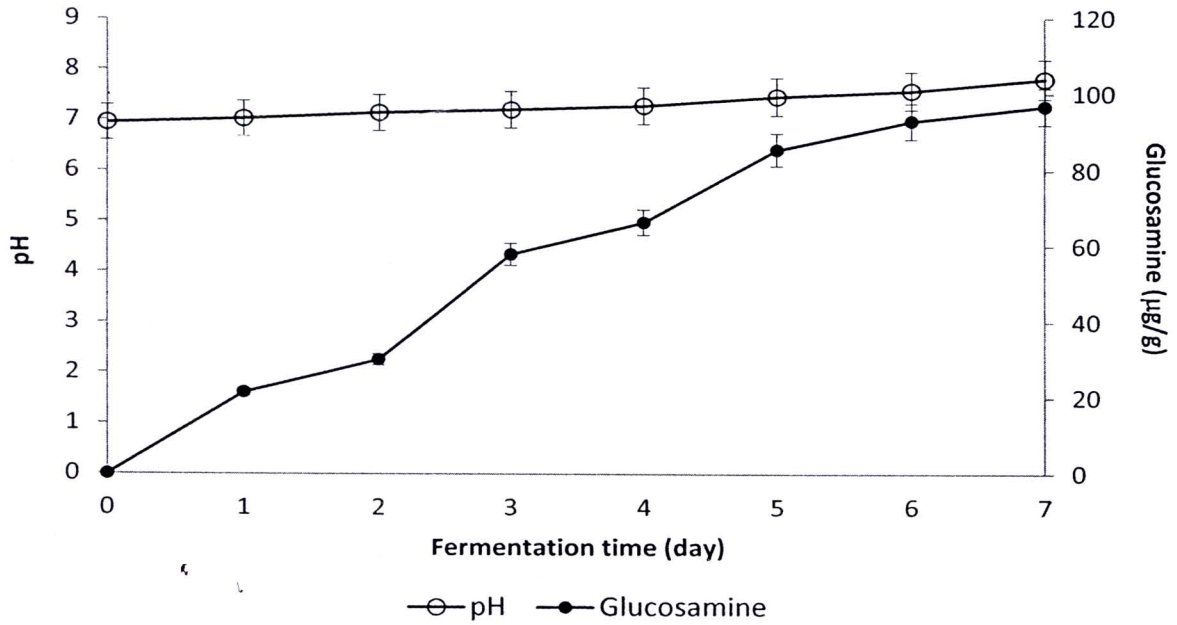
รูปที่ 4.10 เอนไซม์เอสเทอเรสในน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำหลังการหมักด้วยเชื้อรา 4 สายพันธุ์แบบอาหารเหลวในวันที่ 7

4.6 การหมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วย *R. oligosporus* แบบอาหารเหลว

ภายหลังการหมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเชื้อราทั้งสี่สายพันธุ์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการลดสารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการ อีกทั้งยังเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราคือ การหมักแบบอาหารเหลว และเมื่อพิจารณาสายพันธุ์ของเชื้อราที่มีความสามารถในการลดสารพิษในสภาวะการหมักแบบอาหารเหลวพบว่า เชื้อรา *R. oligosporus* สามารถลดปริมาณ phorbol ester ซึ่งเป็นสารพิษหลักในกากเมล็ดสบู่ดำได้สูงประมาณ 72 เปอร์เซ็นต์ และยังลดสารต้านคุณค่าทางโภชนาการบางชนิด ได้แก่ phytic acid และ trypsin inhibitor ศึกษาผลของการหมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเชื้อราสายพันธุ์นี้ในสภาวะอาหารเหลวโดยเก็บผลทุกวันเป็นเวลา 7 วัน

4.6.1 การเจริญเติบโต

การเจริญเติบโตของ *R. oligosporus* โดยการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน ระหว่างการหมักากเมล็ดสบู่แบบอาหารเหลวเป็นเวลา 7 วัน แสดงในรูปที่ 4.11 *R. oligosporus* ใช้สารอาหารในกากมล็ดสบู่ดำได้ดี มีการเจริญเติบโตจนมีปริมาณกลูโคซามีนประมาณ 97 μg/g ในวันที่ 7 และค่า pH ของน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำเพิ่มขึ้นจาก 6.88 เป็น 7.79 หลังการหมัก 7 วัน โดยเชื้อราผลิตเอนไซม์โปรติเอส (รูปที่ 4.13) ย่อยโปรตีนในกากเมล็ดสบู่ดำเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนีย และเกิดค่า pH สูงขึ้น ทั้งนี้ Sparringa และ Owens (1999) รายงานการหมักถั่วเหลืองเพื่อผลิตเทมเป้โดย *R. oligosporus* เชื้อราสร้างแอมโมเนียและใช้กรดแลคติคทำให้ pH ของเทมเป้าอาจสูงได้ถึง 8.0 หรือมากกว่าขึ้นกับระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก



รูปที่ 4.11 การเจริญเติบโตและค่า pH ระหว่างการหมักกากเมล็ดสบู่ดำแบบอาหารเหลวด้วย *R. oligosporus* เป็นเวลา 7 วัน

4.6.2 สารพิษและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการในกากเมล็ดสบู่ดำ

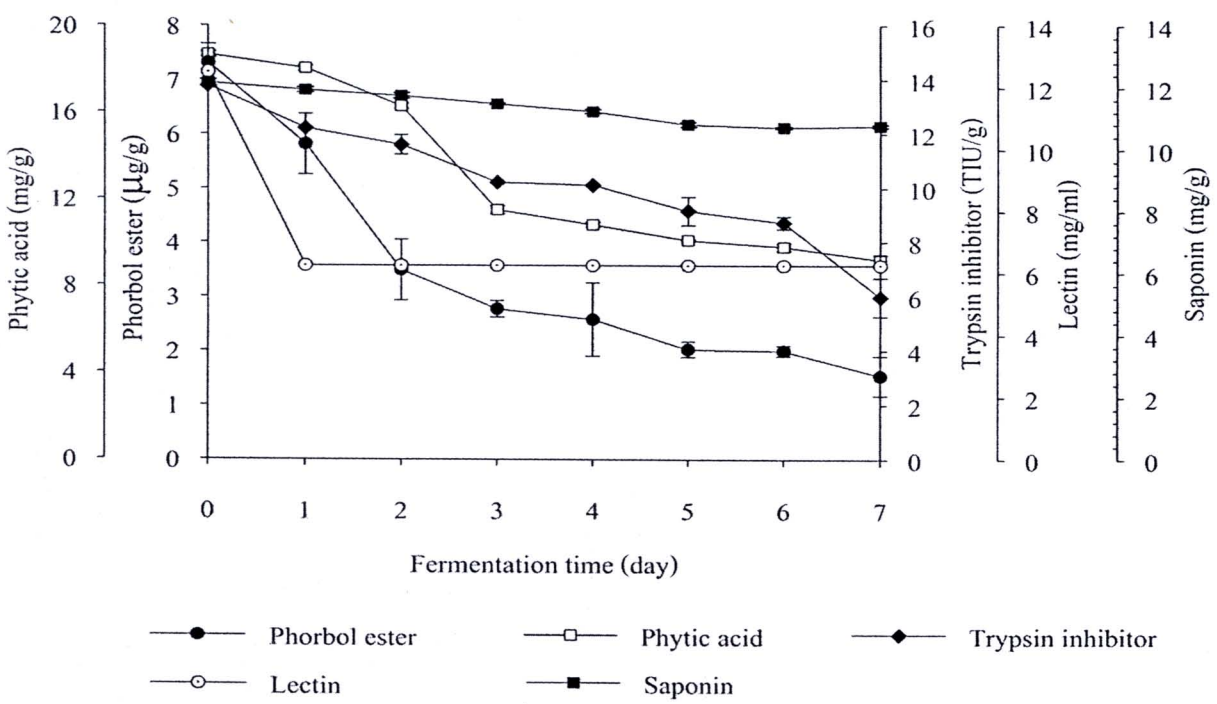
เชื้อรา *R. oligosporus* สามารถลดสารพิษ phorbol ester ในระหว่างการหมักกากเมล็ดสบู่ดำแบบอาหารเหลวดังแสดงในรูปที่ 4.12 โดยหลังจากการหมัก 7 วัน ปริมาณ phorbol ester ลดลงประมาณ 74% หรือเหลือประมาณ 1.54 µg/g ซึ่งน้อยกว่าปริมาณ phorbol ester ที่บ่งบอกความเป็นพิษ (110 µg/g) แสดงให้เห็นว่ากากเมล็ดสบู่ดำหลังการหมักด้วย *R. oligosporus* มีปริมาณสาร phorbol ester อยู่ในระดับที่ไม่เป็นพิษ

ปริมาณ phytic acid ระหว่างการหมักกากเมล็ดสบู่ดำแบบอาหารเหลวด้วย *R. oligosporus* เป็นระยะเวลา 7 วัน แสดงในรูปที่ 4.12 โดยปริมาณ phytic acid ลดลงจาก 18.67 mg/g เหลือ 9.19 mg/g หรือคิดเป็น 51% สอดคล้องกับรายงานของ Sabu et al. (2002) และ Vig and Walia (2001) ซึ่งพบว่าการหมักกากเนื้อมะพร้าวและเมล็ดองุ่นด้วย *R. oligosporus* สามารถลดปริมาณ phytic acid ซึ่งเป็นผลจากเอนไซม์ phytase ที่ *R. oligosporus* สร้างขึ้น (รูปที่ 4.13)

ปริมาณ trypsin inhibitor ระหว่างการหมักเป็นเวลา 7 วันแสดงในรูปที่ 4.12 พบว่าเชื้อรา *R. oligosporus* สามารถลดปริมาณ trypsin inhibitor ในกากเมล็ดสบู่ดำจาก 13.79 TIU/g เหลือ 5.98 TIU/g คิดเป็น 57% เนื่องจากสารชนิดนี้เป็นสารประเภทโปรตีน ดังนั้นเชื้อราจึงนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในการเจริญเติบโตได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wang et al. (1972) โดย *R. oligosporus* สามารถลดกิจกรรมของ trypsin inhibitor ในถั่วเหลือง

สำหรับปริมาณ lectin ในกากเมล็ดสบู่ดำที่ใช้ในการทำให้เลือดตกตะกอนก่อนการหมักมีค่า 12.50 mg/ml หลังการหมักในสภาวะแบบอาหารเหลวด้วย *R. oligosporus* พบว่าปริมาณ lectin ปริมาณที่ใช้ในการทำให้เลือดตกตะกอนลดลงเหลือ 6.25 mg/ml ซึ่งแสดงถึงความเป็นพิษเพิ่มขึ้น 50% (รูปที่ 4.12)

เชื้อรา *R. oligosporus* ลดปริมาณ saponins ในกากเมล็ดสบู่ดำจาก 12.16 µg/g เหลือ 10.76 µg/g หลังการหมักในสภาวะแบบอาหารเหลว เป็นเวลา 7 วัน หรือคิดเป็นลดลง 12.15%

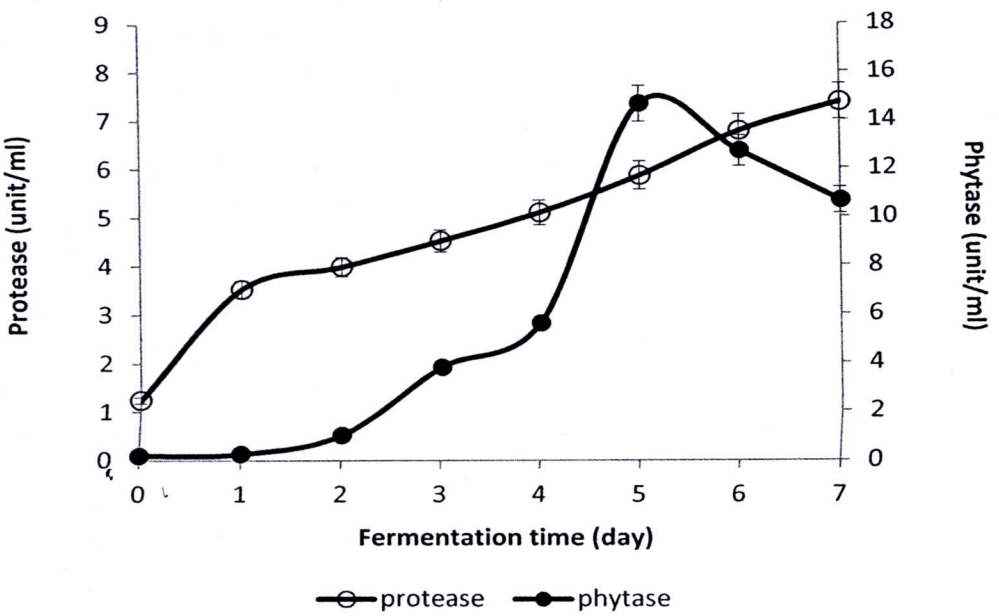


รูปที่ 4. 12 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณ phorbol ester, phytic acid, trypsin inhibitor, saponin และ lectin ในกากเมล็ดสบู่ดำระหว่างการหมักแบบอาหารเหลวด้วย *R. oligosporus* เป็นเวลา 7 วัน

4.6.3 กิจกรรมของเอนไซม์

เชื้อรา *R. oligosporus* ผลิตเอนไซม์ protease เพิ่มขึ้นระหว่างการหมักกากเมล็ดสบู่ดำ (รูปที่ 4.13) ซึ่งแตกต่างจาก Haq และ Mukhtar (2004) รายงานกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากการหมักกากเมล็ดทานตะวันกับรำข้าวสาลีด้วย *R. oligosporus* แบบอาหารแข็งสูงขึ้นและลดลงหลังจากวันที่ 3 ของการหมัก และแตกต่างจาก Ikasari และ Mitchell (1994) รายงาน *R. oligosporus* กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากการหมักรำข้าวและรำข้าวสาลีสูงขึ้นและลดลงหลังจาก 72 และ 58 ชั่วโมงตามลำดับ ทั้งนี้มีรายงานการสร้างเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. และ *Rhizopus* sp. (Sandhya et al., 2005 และ Farley and Ikasari, 1992)

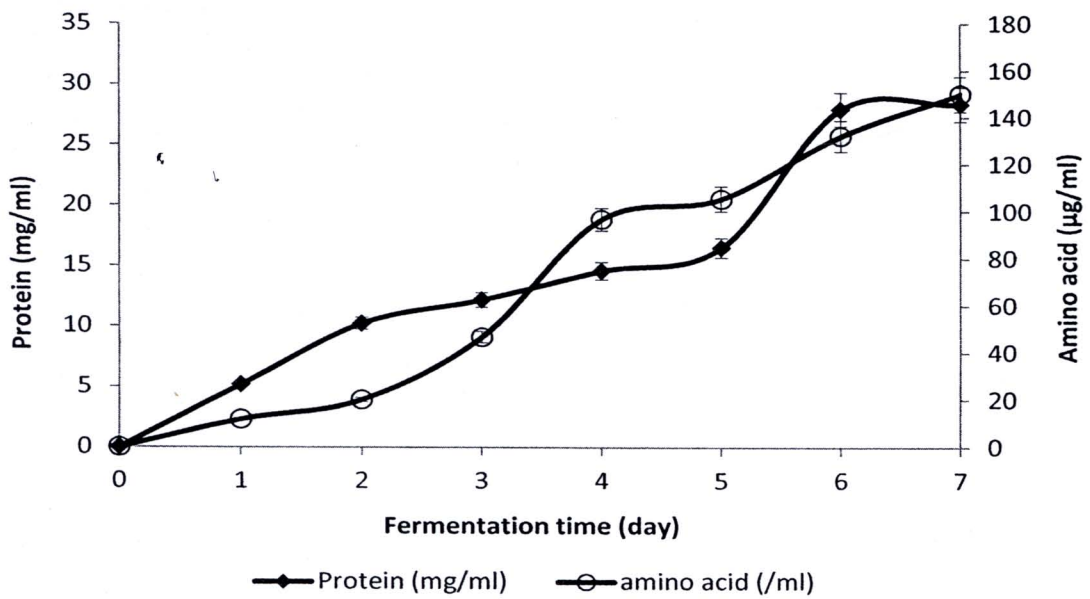
สำหรับกิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (phytase) ในระหว่างการหมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วย *R. oligosporus* พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ไฟเตสสูงขึ้นจากเดิมและลดลงหลังจากวันที่ 5 ของการหมัก ซึ่งแตกต่างจาก Casey และ Walsh (2004) รายงานกิจกรรมเอนไซม์ไฟเตสสูงขึ้นและลดลงหลังจากวันที่ 3 ของการหมักด้วย *R. oligosporus* ในอาหาร corn starch media แบบอาหารเหลว และ Ramachandran et al. (2005) รายงาน *R. oligosporus* และ *R. oryzae* สามารถสร้างเอนไซม์ phytase (phosphomonoesterase) โดยกิจกรรมเอนไซม์ไฟเตสสูงขึ้นและลดลงหลังจากวันที่ 3 ซึ่งย่อย phytic acid ให้เป็น inorganic orthophophate (Pi) และกลุ่ม myo-inositol สำหรับเอนไซม์ phytase พบในเชื้อหลายชนิด ได้แก่ *A. ficcum, A. oryzae, A. niger, A. fumigatus, A. carbonarius, R. oryzae, R. tolonifer* และ *R. oligosporus*



รูปที่ 4. 13 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสและเอนไซม์ไฟเตสในระหว่างการหมักกากเมล็ดสบู่ดำแบบอาหารเหลวด้วย *R. oligosporus* เป็นเวลา 7 วัน

4.6.4 ปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโน

เชื้อรา *R. oligosporus* สามารถย่อยโปรตีนในกากเมล็ดสบู่ดำทำให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำและกรดอะมิโนสูงขึ้นระหว่างการหมักดังแสดงในรูปที่ 4.14 ซึ่งผลของปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (รูปที่ 4.13)



รูปที่ 4. 14 ปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนในน้ำหมักระหว่างการหมักกากเมล็ดสบู่ดำแบบอาหารเหลวด้วย *R. oligosporus* เป็นเวลา 7 วัน

4.7 การศึกษาการเจริญเติบโตของพืชด้วยน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำ

4.7.1 คุณสมบัติของน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำ

4.7.1.1 ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำ

ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำหลังจากการหมักด้วยเชื้อราทั้งสี่ทั้งแบบอาหารเหลวและอาหารแข็ง และตัวอย่างที่ปราศจากเชื้อรา (control) ของวันที่ 7 แสดงในตารางที่ 4.4 ในสภาวะการหมักแบบอาหารเหลวน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเชื้อรา *A. oryzae* มีปริมาณโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 191.50 mg/ml ขณะที่น้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเชื้อรา *R. oryzae* มีปริมาณโปรตีนต่ำที่สุดเท่ากับ 38.81 mg/ml จากข้อมูลจะเห็นว่าการหมักแบบอาหารเหลวทำให้โปรตีนละลายออกมาจากกากเมล็ดสบู่ดำ (50.73 mg/ml) ซึ่งอาจเป็นผลจากการเขย่าอย่างต่อเนื่อง ขณะที่เชื้อราบางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์โปรติเอสย่อยโปรตีนในกากเมล็ดสบู่ดำ ทำให้เกิดปริมาณโปรตีนละลายน้ำสูงกว่าการนำโปรตีนไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต ขณะที่เชื้อราบางสายพันธุ์มีการใช้โปรตีนสำหรับการเจริญเติบโตมากกว่าโปรตีนที่เกิดขึ้น สำหรับสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งโปรตีนที่พบในน้ำหมักมีปริมาณน้อยเนื่องจากไม่มีการเขย่า อย่างไรก็ตามโปรตีนในน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำที่หมักด้วยเชื้อราทั้ง 4 มีค่าสูงกว่า control และเชื้อรา *R. oryzae* ให้ปริมาณโปรตีนสูงสุด ขณะที่เชื้อรา *A. oryzae* ให้ปริมาณโปรตีนต่ำสุด

ตารางที่ 4.4 ปริมาณโปรตีนในน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำหลังจากการหมัก 7 วัน

เชื้อรา	protein (mg/ml)	
	submerged fermentation	solid-state fermentation
Control วันที่ 7	50.73±10.56	0.77±0.80
A. niger	43.44±6.23	6.26±6.52
A. oryzae	191.50±15.08	3.51±3.68
R. oryzae	38.81±13.89	38.82±5.98
R. oligosporus	40.81±8.95	24.26±6.01

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

4.7.1.2 ปริมาณกรดอะมิโน

ปริมาณกรดอะมิโนในตัวอย่างน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำหลังจากการหมักด้วยเชื้อราทั้งสี่ ทั้งการหมักแบบอาหารแข็งและอาหารเหลว และตัวอย่างที่ปราศจากเชื้อรา (control) ของวันที่ 7 แสดงในตารางที่ 4.5 ปริมาณกรดอะมิโนในน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำแบบอาหารเหลวเกิดจากทั้งผลของการเขย่าและกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่เชื้อราสร้างขึ้นเพื่อย่อยโปรตีนในกากเมล็ดสบู่ดำ โดยพบว่าการหมักด้วยเชื้อรา *R. oryzae* ให้ปริมาณกรดอะมิโนสูงสุด ขณะที่การหมักด้วยเชื้อรา *A. niger* ให้ปริมาณกรดอะมิโนต่ำสุดสุด นอกจากนี้ปริมาณกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นกับกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อราค่อนข้างสอดคล้องกัน (รูปที่ 4.8) กล่าวคือตัวอย่างน้ำหมักที่มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงจะมีปริมาณกรดอะมิโนสูง เช่นตัวอย่างของ *R. oryzae* และ *R. oligosporus* ในการหมักแบบอาหารเหลว หรือตัวอย่างที่มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสต่ำจะมีปริมาณกรดอะมิโนต่ำ เช่นเชื้อรา *A. niger* ในการหมักแบบอาหารเหลว ผลของปริมาณกรดอะมิโนในตัวอย่างหลังการหมักแบบอาหารแข็งมีค่าสอดคล้องกับในอาหารเหลว (ตารางที่ 4.5) อย่างไรก็ตามผลไม่สอดคล้องกับการหมักแบบอาหารแข็งซึ่งมีปริมาณโปรตีนสูงทั้งสี่สายพันธุ์ (รูปที่ 4.8) อาจเป็นเพราะเชื้อราใช้กรดอะมิโนในการเจริญเติบโตด้วย

จากผลการศึกษาข้างต้นจะเห็นว่าน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำหลังการหมักแบบอาหารเหลวให้ค่าโปรตีนและกรดอะมิโนสูงจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช

ตารางที่ 4.5 ปริมาณกรดอะมิโนในตัวอย่างน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำ

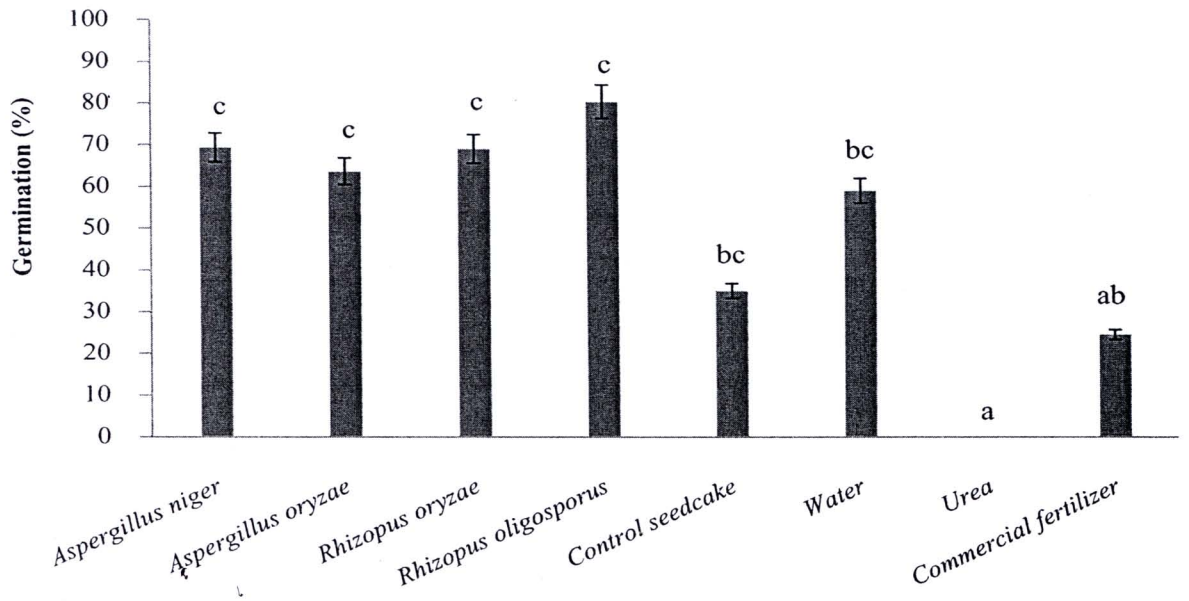
sample	amino acid (μg/ml)	
	submerged fermentation	solid-state fermentation
Control วันที่ 7	32.12±7.04	1.39±0.00
A. niger	69.36±13.07	38.20±4.18
A. oryzae	120.52±2.64	75.30±15.44
R. oryzae	103.42±11.59	91.25±11.52
R. oligosporus	174.87±15.22	107.04±8.40

4.7.2 การเจริญเติบโตของต้นพริก

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของต้นพริกยักษ์ สายพันธุ์แคลิฟอร์เนียวันเดอร์ ด้วยน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเชื้อราทั้งสี่แบบอาหารเหลวที่ความเข้มข้นของกรดอะมิโน 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมได้แก่ น้ำกลั่น ปุ๋ยยูเรีย (30 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อมิลลิลิตร) โปรตีนสกัดทางการค้า (30 ไมโครกรัมของกรดอะมิโนต่อมิลลิลิตร) และน้ำแช่กากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่ผ่านการหมักด้วยเชื้อรา (30 ไมโครกรัมอะมิโนต่อมิลลิลิตร) รดเมล็ดพริกเฉพาะในวันแรก ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นรดเมล็ดพริกด้วยน้ำกลั่นวันละ 1 ครั้ง ครั้งละ 5 มิลลิลิตร ทุกวันจนครบ 14 วัน แล้ววัดผลเป็นค่าดัชนีการเจริญเติบโตของพืช 4 ค่า ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด (Germination percentage) เปอร์เซ็นต์การแทงราก (Radicle emergence percentage) อัตราการเจริญของต้นกล้า (Seedling growth rate: SGR) และดัชนีการงอก (Germination index: GI) พบว่าน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำช่วยให้ค่าดัชนีทั้งสี่สูงกว่าชุดควบคุม

4.7.2.1 เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด (Germination percentage)

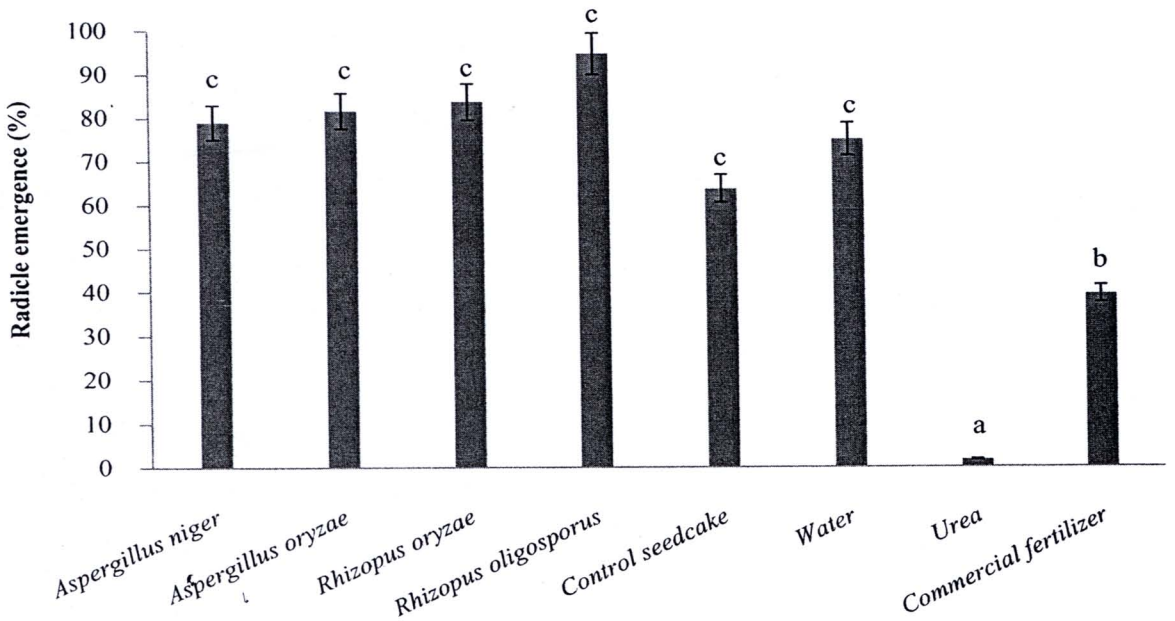
เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพริกยักษ์สายพันธุ์แคลิฟอร์เนียวันเดอร์แสดงในรูปที่ 4.15 ผลการตรวจนับจำนวนต้นกล้าปกติ ในวันที่ 14 หลังการเพาะเมล็ดและเปรียบเทียบกับจำนวนเมล็ดทั้งหมด 100 เมล็ด พบว่าพริกยักษ์สายพันธุ์แคลิฟอร์เนียวันเดอร์ ไม่สามารถเจริญเป็นต้นกล้าได้เมื่อใช้ปุ๋ยยูเรีย โปรตีนสกัดทางการค้าให้เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเพียง 25% สำหรับน้ำและน้ำแช่กากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่ผ่านการหมักด้วยเชื้อราให้เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด 59% และ 35% ตามลำดับ ตัวอย่างน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำของ *R. oligosporus* ให้เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดสูงสุดเท่ากับ 80% รองลงมาคือน้ำหมักของ *A. niger* และ *R. oryzae* ให้เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด69% เท่ากัน สำหรับน้ำหมักของ *A. oryzae* ให้เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดต่ำสุดที่ 64%



รูปที่ 4.15 เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพริกยักษ์สายพันธุ์แคลิฟอร์เนียวันเดอร์ที่ระยะเวลา 14 วัน หลังทดสอบด้วยน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเชื้อรา 4 สายพันธุ์ (*A. niger, A. oryzae, R. oryzae* และ *R. oligosporus*) และชุดควบคุม (น้ำกลั่น ปุ๋ยยูเรีย โปรตีนสกัดทางการค้า และน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่มีจุลินทรีย์) ตัวอักษร a, b และ c แสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.7.2.2 เปอร์เซ็นต์การแทงราก (Radicle emergence percentage)

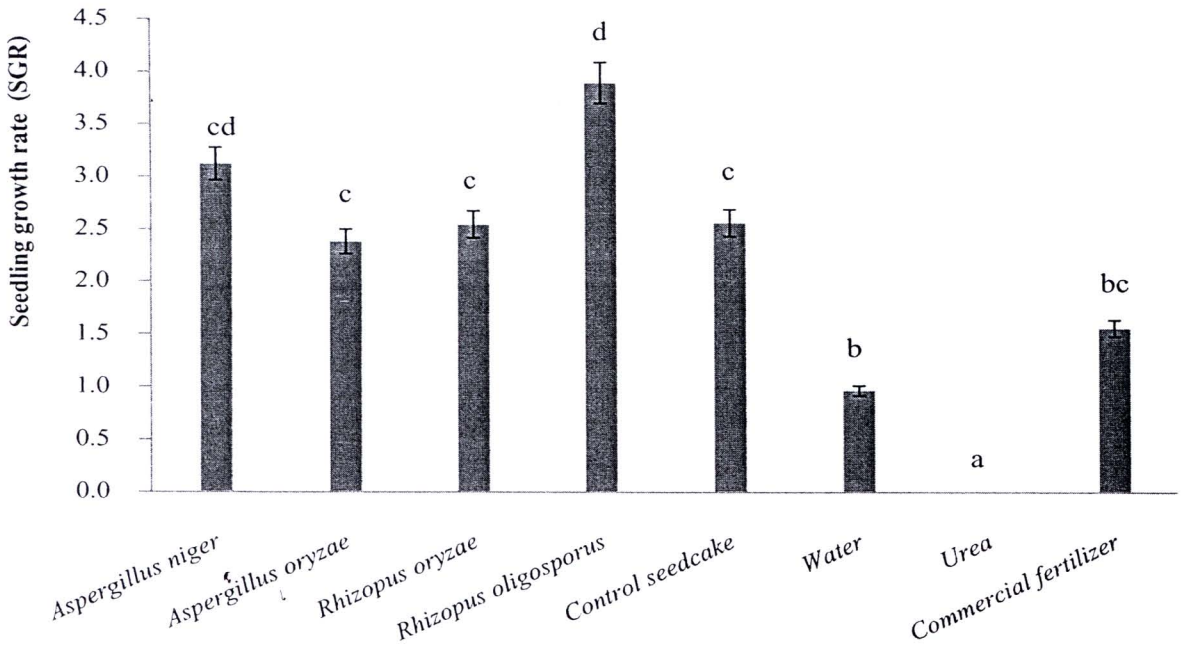
เปอร์เซ็นต์การแทงรากของต้นพริกยักษ์สายพันธุ์แคลิฟอร์เนียวันเดอร์แสดงในรูปที่ 4.16 ผลการตรวจนับจำนวนเมล็ดพริกยักษ์สายพันธุ์แคลิฟอร์เนียวันเดอร์ ที่แทงรากหลังการเพาะเมล็ดเป็นเวลา 14 วันและเปรียบเทียบกับจำนวนเมล็ดทั้งหมด 100 เมล็ด พบว่าชุดควบคุมด้วยปุ๋ยยูเรียให้เปอร์เซ็นต์การแทงรากเพียง 1.8% สำหรับโปรตีนสกัดทางการค้า น้ำและน้ำแช่กากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่ผ่านการหมักด้วยเชื้อราให้เปอร์เซ็นต์การแทงราก 39.5%, 75% และ 63.8% ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเชื้อราของ *R. oligosporus* ให้เปอร์เซ็นต์การแทงรากสูงสุดเท่ากับ 94.7% รองลงมาคือน้ำหมักของ *R. oryzae* และ *A. oryzae* ให้เปอร์เซ็นต์การแทงรากเท่ากับ 83.7% และ 81.7% ตามลำดับ สำหรับน้ำหมักของ *A. niger* ให้เปอร์เซ็นต์การแทงรากต่ำสุดเพียง 79%



รูปที่ 4.16 เปอร์เซ็นต์การแทงรากของต้นพริกยักษ์สายพันธุ์แคลิฟอร์เนียวันเดอร์ที่ระยะเวลา 14 วัน หลังทดสอบด้วยน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเชื้อรา 4 สายพันธุ์ (*A. niger, A. oryzae, R. oryzae* และ *R. oligosporus*) และชุดควบคุม (น้ำกลั่น ปุ๋ยยูเรีย โปรตีนสกัดทางการค้า และน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่มีจุลินทรีย์) ตัวอักษร a, b และ c แสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.7.2.3 อัตราการเจริญของต้นกล้า (Seedling growth rate: SGR)

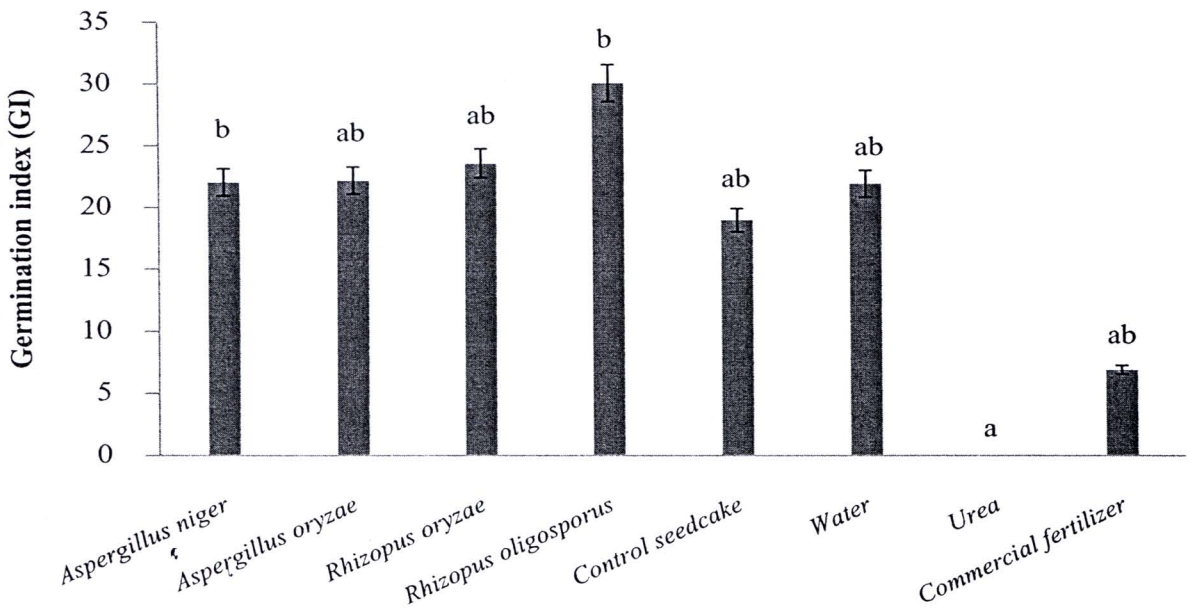
อัตราการเจริญของต้นกล้าของต้นพริกยักษ์สายพันธุ์แคลิฟอร์เนียวันเดอร์แสดงในรูปที่ 4.17 ผลของอัตราการเจริญของต้นกล้าซึ่งได้จากการอบหาน้ำหนักแห้งของต้นกล้าพริกยักษ์สายพันธุ์แคลิฟอร์เนียวันเดอร์ลักษณะปกติตัดใบเลี้ยงออกหลังการเพาะโดยไม่มีการให้แสงเป็นเวลา 7 วันแรก และให้แสงใน 7 วันหลัง พบว่าไม่มีอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้าเมื่อทดสอบด้วยปุ๋ยยูเรีย สำหรับชุดควบคุมด้วยโปรตีนสกัดทางการค้า น้ำและน้ำแช่กากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่ผ่านการหมักด้วยเชื้อราพบอัตราการเจริญของต้นกล้า 1.56, 0.96 และ 2.56 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเชื้อราของ *R. oligosporus* ให้อัตราการเจริญของต้นกล้าสูงสุดเท่ากับ 3.89 รองลงมาคือน้ำหมักของ *A. niger* ให้อัตราการเจริญของต้นกล้าเท่ากับ 3.12 น้ำหมักของ *A. oryzae* และ *R. oryzae* มีอัตราการเจริญของต้นกล้าใกล้เคียงกัน มีอัตราการเจริญเท่ากับ 2.38 และ 2.54 ตามลำดับ



รูปที่ 4.17 อัตราการเจริญของต้นกล้าของพริกยักษ์สายพันธุ์แคลิฟอร์เนียวันเดอร์ ที่ระยะเวลา วัน หลังทดสอบด้วยน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเชื้อรา 4 สายพันธุ์ (*A. niger, A. oryzae, R. oryzae* : *R. oligosporus*) และชุดควบคุม (น้ำกลั่น ปุ๋ยยูเรีย โปรตีนสกัดทางการค้า และน้ำหมักกากเมล็ดดำที่ไม่มีจุลินทรีย์) ตัวอักษร a, b, c และ d แสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 0.05)

4.7.2.4 ดัชนีการงอก (Germination index: GI)

ดัชนีการงอกของเมล็ดพริกยักษ์สายพันธุ์แคลิฟอร์เนียวันเดอร์แสดงในรูปที่ 4.18 ผลของดัชนีการงอกซึ่งคำนวณจากจำนวนต้นกล้าเมล็ดพริกยักษ์สายพันธุ์แคลิฟอร์เนียวันเดอร์ลักษณะปกติเป็นเวลา 14 วัน ไม่มีดัชนีการงอกเมื่อทดสอบด้วยปุ๋ยยูเรีย สำหรับชุดควบคุมด้วยโปรตีนสกัดทางการค้า น้ำและน้ำแช่กากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่ผ่านการหมักด้วยเชื้อราให้ดัชนีการงอก 6.9, 21.9 และ 19.0 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเชื้อราของ *R. oligosporus* ให้ดัชนีการงอก สูงสุดเท่ากับ 30.1 น้ำหมักของเชื้อราสายพันธุ์อื่นมีค่าดัชนีการงอกใกล้เคียงกันโดย *A. niger, A. oryzae* และ *R. oryzae* ให้ดัชนีการงอกเท่ากับ 22.0, 22.2 และ 23.6 ตามลำดับ



รูปที่ 4.18 ดัชนีการงอกของพริกยักษ์สายพันธุ์แคลิฟอร์เนียวันเดอร์ที่ระยะเวลา 14 วัน หลังทดสอบด้วยน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเชื้อรา 4 สายพันธุ์ (*A. niger, A. oryzae, R. oryzae* และ *R. oligosporus*) และชุดควบคุม (น้ำกลั่น ปุ๋ยยูเรีย โปรตีนสกัดทางการค้า และน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่มีจุลินทรีย์) ตัวอักษร a และ b แสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ลักษณะการงอกของเมล็ดพริกยักษ์สายพันธุ์แคลิฟอร์เนียวันเดอร์แสดงในรูปที่ 4.19 จะเห็นว่าภาพรวมน้ำหมักของ *R. oligosporus* ให้การงอกที่ดี ต้นอ่อนและใบเลี้ยงมีความสมบูณ์ ทั้งนี้ในการทดลองมีการควบคุมปริมาณกรดอะมิโน (30 μg/ml) การที่เมล็ดพริกงอกได้ดีอาจเนื่องจากชนิดของกรดอะมิโนที่เกิดจากการย่อยสลายโปรตีนของเชื้อรามีผลต่อการงอก ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืชที่มีสารเริ่มต้น (precursor) เป็นกรดอะมิโน ได้แก่ ออกซิน (auxin) มีกรดอะมิโนที่เป็นสารเริ่มต้นคือ tryptophan และเอธิลีน (ethylene) มีกรดอะมิโนที่เป็นสารเริ่มต้นคือ methionine (ดนัย, 2546) จึงอาจเป็นไปได้ว่าน้ำหมักของ *R. oligosporus* มีปริมาณกรดอะมิโน tryptophan และ methionine เป็นส่วนใหญ่จึงมีผลทำให้เมล็ดพริกยักษ์สายพันธุ์แคลิฟอร์เนียวันเดอร์มีการงอกและการเจริญเติบโตที่ดี

รูปที่ 4.19 ลักษณะการงอกของเมล็ดพริกยักษ์สายพันธุ์แคลิฟอร์เนียวันเดอร์ที่ระยะเวลา 14 วัน หลังทดสอบ a) ปุ๋ยยูเรีย b) โปรตีนสกัดทางการค้า c) น้ำกลั่น d) น้ำแช่กากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่ผ่านการหมักและน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำที่หมักด้วย e) *R. oligosporus* f) *R. oryzae* g) *A. niger* และ h) *A. oryzae*

4.7.3 การเจริญเติบโตของต้นคะน้า

การศึกษาการเจริญเติบโตของต้นคะน้า (Chinese kale; *Brassica oleracea* L. var. alboglabra Bailey) ด้วยน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำหมักแบบอาหารเหลวทำเช่นเดียวกับการทดลองกับเมล็ดพริก โดยปรียบเทียบกับชุดควบคุมได้แก่ น้ำกลั่น ปุ๋ยยูเรีย (30 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อมิลลิลิตร) โปรตีนสกัดทางการค้า (30 ไมโครกรัมของกรดอะมิโนต่อมิลลิลิตร) และน้ำหมักแช่กากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่ผ่านการหมักด้วยเชื้อรา (30 ไมโครกรัมของกรดอะมิโนต่อมิลลิลิตร) โดยเตรียมกล้าคะน้าด้วยการเพาะเมล็ดคะน้าในกระบะเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นแยกกล้าคะน้าและปลูกลงในกระถาง กระถางละ 3 ต้น แต่ละชุดการทดลองทำการทดลอง 5 ซ้ำ รดน้ำทุกวัน วันละ 2 ครั้ง ครั้งละ 100 มิลลิลิตร ในวันที่ 0 ถึงวันที่ 15 และรดวันละครั้งในช่วงเช้า ตั้งแต่วันที่ 16 จนครบ 55 วัน ทั้งนี้รดด้วยตัวอย่างน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำกับชุดควบคุมทุกๆ 7 วัน ได้แก่ วันที่ 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 และวันที่ 49 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เมื่อครบระยะเวลา 55 วันทำการตัดผลผลิต วัดและบันทึกผลการเจริญด้วยการวัดความสูงลำต้น (Height) ขนาดลำต้น (diameter) น้ำหนักสด (WW) น้ำหนักแห้ง (DW) และวัดสีของใบ

ผลการทดสอบพบว่าน้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเชื้อราทุกสายพันธุ์ ให้ผลผลิตคะน้าสูงกว่าชุดควบคุม เมื่อพิจารณาจากความสูงลำต้น ขนาดลำต้น น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 4.6) โดยน้ำหมักของ *R. oligosporus* ให้ผลผลิตคะน้าสูงสุดทั้ง 4 ค่าคือ ความสูงต้น 19.01 เซนติเมตรต่อต้น ขนาดลำต้น 2.84 มิลลิเมตรต่อต้น น้ำหนักสด 6.03 กรัมต่อต้น และน้ำหนักแห้ง 0.59 กรัมต่อต้น สำหรับสีของใบของทุกตัวอย่างและชุดควบคุมมีค่าใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4.7) โดยค่าความสว่างของใบคะน้า (L*) สูงสุดด้วยน้ำหมักของ *R. oligosporus* ในขณะที่ใบคะน้าที่ทดสอบด้วยน้ำเปล่าจะให้ค่าสีเขียว (a*) และค่าสีเหลือง (b*) สูงสุด เป็น -6.80 และ 11.47 ตามลำดับ ลักษณะของต้นคะน้าในกระถางของวันที่ 55 และลักษณะของลำต้นและใบของต้นคะน้าแสดงในรูปที่ 4.20 และ 4.21 จะเห็นว่าต้นคะน้าที่รดด้วยน้ำหมักของ *R. oligosporus* ให้ผลดีที่สุด สำหรับต้นคะน้าที่ทำการทดลองมีขนาดเล็กกว่าต้นคะน้าที่ขายตามท้องตลาดทั้งนี้เนื่องจากการทดลองทำในกระถางที่มีขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์ขนาด 6 นิ้ว) ซึ่งต่างจากเกษตรกรทั่วไปที่เพาะปลูกลงดินปริมาณสารอาหารที่ได้รับจากดินแตกต่างกัน ผลผลิตคะน้าที่ทดสอบด้วยน้ำหมักของ *R. oligosporus* ดีที่สุดนั้น อาจเป็นสาเหตุเดียวกับกรณีที่ทดสอบกับเมล็ดพริกยักษ์สายพันธุ์แคลิฟอร์เนียวันเดอร์ คือมีปริมาณกรดอะมิโน tryptophan และ methionine เป็นส่วนใหญ่จึงทำให้คะน้ามีการเจริญเติบโตดี

ตารางที่ 4.6 ผลการเจริญของต้นคะน้าหลังจากทดสอบด้วยตัวอย่างต่างๆ

ตัวอย่าง	WW/plant (g)	DW/plant (g)	diameter/plant (mm)	Height /plant (cm)
น้ำ	1.97±0.69^{a}	0.13±0.07^{a}	1.78±0.41^{ab}	10.59±2.21^{a}
ปุ๋ยยูเรีย	2.03±0.78^{a}	0.12±0.06^{a}	1.70±0.36^{a}	11.33±2.02^{ab}
โปรตีนสกัดทางการค้า	2.85±0.91^{ab}	0.21±0.08^{a}	2.09±0.44^{abc}	13.67±1.85^{bc}
แช่กากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่ผ่านการหมัก	3.12±1.08^{ab}	0.22±0.08^{a}	2.18±0.45^{abc}	14.23±2.59^{c}
น้ำหมักของ *A. niger*	3.79±1.90^{b}	0.29±0.16^{a}	2.30±0.65^{c}	15.81±3.36^{c}
น้ำหมักของ *A. oryzae*	3.73±2.02^{b}	0.28±0.16^{a}	2.23±0.54^{bc}	15.91±3.18^{c}
น้ำหมักของ *R. oryzae*	3.53±1.72^{ab}	0.25±0.12^{a}	2.27±0.46^{bc}	15.45±2.40^{c}
น้ำหมักของ *R. oligosporus*	6.03±2.32^{c}	0.59±0.29^{b}	2.84±0.46^{d}	19.01±2.82^{d}

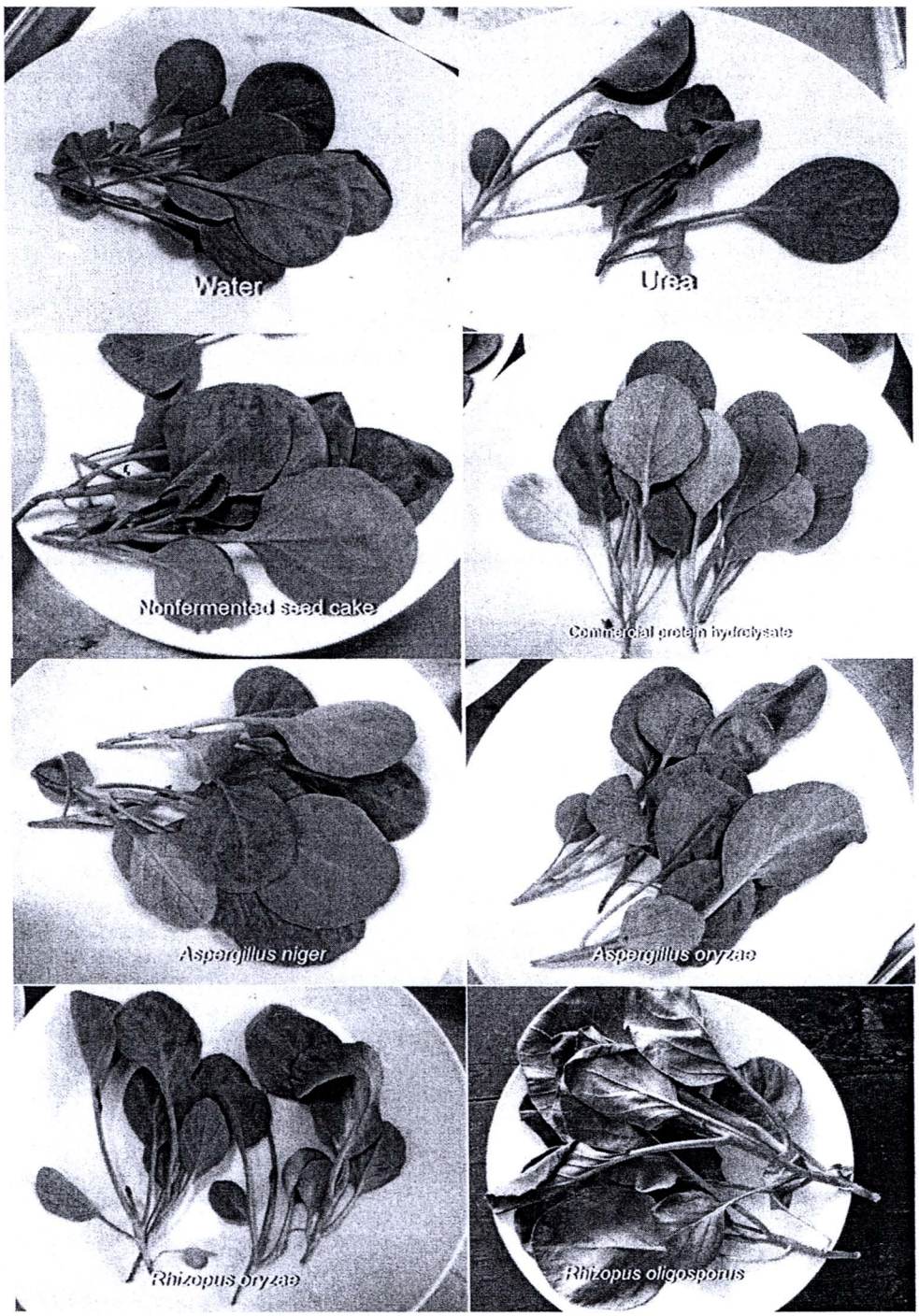
ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง (a, b, c และ d) แสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.7 สีของใบคะน้าหลังจากการทดสอบด้วยตัวอย่างต่างๆ

ตัวอย่าง	Colour		
	L*	a*	b*
น้ำ	46.84±1.70^{abc}	-6.80±1.29^{a}	11.47±3.92^{b}
ปุ๋ยยูเรีย	45.59±1.31^{ab}	-6.51±0.72^{a}	9.87±2.06^{ab}
โปรตีนสกัดทางการค้า	44.38±3.35^{a}	-6.39±0.51^{a}	9.28±2.11^{ab}
น้ำแช่กากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่ผ่านการหมัก	48.97±3.44^{bc}	-5.97±0.49^{a}	7.51±1.73^{ab}
น้ำหมักของ *A. niger*	48.70±2.62^{bc}	-6.36±0.79^{a}	10.18±3.55^{ab}
น้ำหมักของ *A. oryzae*	47.59±2.06^{abc}	-6.14±0.57^{a}	7.95±1.88^{ab}
น้ำหมักของ *R. oryzae*	45.25±3.34^{ab}	-6.54±0.52^{a}	8.91±2.41^{ab}
น้ำหมักของ *R. oligosporus*	49.56±2.76^{c}	-5.80±0.41^{a}	7.30±2.33^{a}

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง (a, b และ c) แสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

รูปที่ 4.20 การเจริญของต้นคะน้าในวันที่ 55 ของชุดควบคุม ได้แก่ น้ำ (water) ปุ๋ยยูเรีย (urea) โปรตีนสกัดทางการค้า (com-protein) และน้ำแช่กากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่ผ่านหมัก (non-fermented SC) และชุดตัวอย่างได้แก่ น้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำของเชื้อรา *R. oligosporus, R. oryzae, A. oryzae* และ *A. niger*



รูปที่ 4.21 ลักษณะของต้นคะน้าในวันที่ 55 ของชุดควบคุม ได้แก่ น้ำ (water) ปุ๋ยยูเรีย (urea) โปรตีนสกัดทางการค้า (com-protein) และน้ำแช่กากเมล็ดสบู่ดำที่ไม่ผ่านการหมัก (non-fermented SC) ชุดตัวอย่างได้แก่ น้ำหมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วยเชื้อรา *R. oligosporus, R. oryzae, A. oryzae* และ *A. niger*