บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและกายภาพของหมักน้ำหมักผักผลไม้

จากการนำผักและผลไม้ทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ สับปะรด มะละกอ แตงโม กล้วย ฟักทอง มะเขือเทศ ผักกาดขาว และแตงกวา มาหมักจนครบ 50 วัน ทุก 10 วันจะมีการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมีและกายภาพของน้ำหมัก โดยผลการศึกษาแสดงดังตารางด้านล่าง

ตารางที่ 8 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางเคมี กายภาพเบื้องต้นของน้ำหมักผักผลไม้ในระยะต่างๆ

ระยะเวลาหมัก (วัน)	pH	กลิ่น	สี	ก๊าซ	อื่นๆ
1	-	กลิ่นผักและผลไม้	-	+2	ยังไม่เกิดน้ำหมัก
10	4	กลิ่นเหม็นเปรี้ยว	น้ำมีสีน้ำตาลแดง	+6	มีราสีเขียวและสีขาวขึ้น
20	4	กลิ่นเหม็นเปรี้ยวและกลิ่นแอลกอฮอล์	น้ำมีสีน้ำตาลแดงเข้ม	+12	มีราสีเขียวและขาวเล็กน้อย มีหนอน
30	4	กลิ่นเหม็นเปรี้ยวและกลิ่นฉุนของแอลกอฮอล์มากขึ้น	น้ำมีสีน้ำตาลแดงเข้ม	+6	มีหนอน ผักผลไม้ย่อยสลายเป็นสีดำ
40	4	มีเหม็นเปรี้ยวและกลิ่นแอลกอฮอล์ลดลง	น้ำมีสีน้ำตาลแดงเข้ม	+4	มีหนอน แมลงหวี่ ผักผลไม้เน่าสลายเป็นสีดำทั้งหมด
50	4	ไม่ค่อยมีกลิ่นเหม็นและกลิ่นแอลกอฮอล์	น้ำมีสีน้ำตาลแดงเข้ม	+2	มีหนอน ผักผลไม้ย่อยสลายกลายเป็นเนื้อยุ่ยๆทั้งหมด

(+) แสดงระดับปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้น (จากการสังเกต)

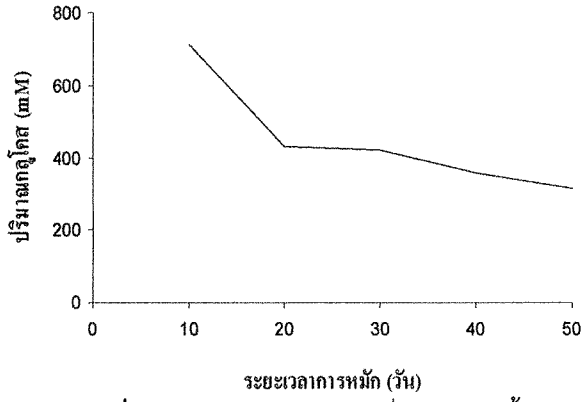
พบว่าทุกระยะการหมักความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำหมักมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในค่าประมาณ 4 น้ำหมักที่ได้มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว มีกลิ่นของแอลกอฮอล์และมีแก๊ซเกิดขึ้นอย่างมากในระยะการหมักในช่วง 20 วัน สีของน้ำหมักมีสีน้ำตาลแดงเข้ม และข้น นอกจากนี้ยังพบมีราสีเขียว ราสีขาว และมีหนอนเกิดขึ้น

2. การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส

ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลในกระบวนการหมัก จะใช้วิธีตรวจสอบปริมาณ reducing sugar ด้วยวิธี DNS solution (3,5-Dinitrosalicylic Acid in 2N NaOH) โดยมีกลูโคสเป็นสารมาตรฐาน เมื่อนำหมักผักผลไม้ที่หมักครบ 10,20,30,40 และ 50วันมาตรวจสอบพบว่า ปริมาณน้ำตาลในน้ำหมักมีปริมาณลดลงเรื่อยๆ โดยพบว่ามีการลดลงของปริมาณกลูโคสอย่างรวดเร็วในช่วงระยะการหมักตั้งแต่เริ่มหมักจนถึงระยะการหมักครบ 20 วัน หลังจากระยะการหมักครบ 20 วันปริมาณกลูโคสมีการลดลงอย่างช้าๆ ดังแสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 13

ตารางที่ 9 ปริมาณกลูโคสในน้ำหมักผักผลไม้

Sample (sup.น้ำหมัก)	ปริมาณกลูโคส(mM)
10 วัน	714.07
20 วัน	430.85
30 วัน	421.26
40 วัน	357.28
50 วัน	314.25



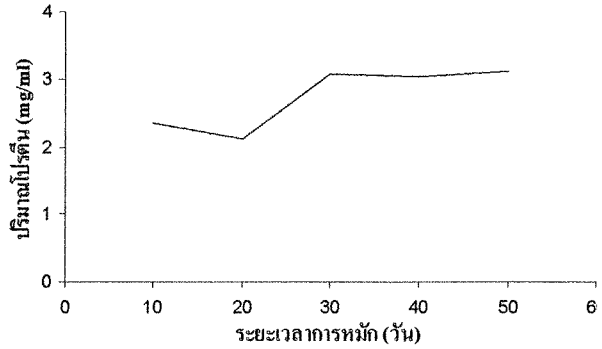
รูปที่ 13 กราฟแสดงปริมาณเฉลี่ยกลูโคสในน้ำหมัก

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การตรวจสอบปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก จะใช้วิธี Bradford ในน้ำหมักผักผลไม้ที่เก็บทุกๆ 10 วัน จนครบ 50วันพบว่ามีปริมาณโปรตีน มีการเปลี่ยนแปลงดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 10 แสดงปริมาณโปรตีนในน้ำหมักผักผลไม้

Sample (supernatant น้ำหมัก)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
น้ำหมัก 10 วัน	2.35
น้ำหมัก 20 วัน	2.11
น้ำหมัก 30 วัน	3.08
น้ำหมัก 40 วัน	3.04
น้ำหมัก 50 วัน	3.11



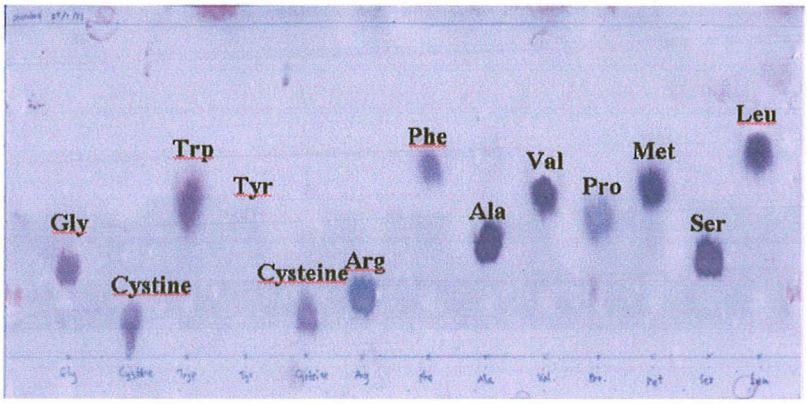
รูปที่ 14 กราฟแสดงปริมาณเฉลี่ยโปรตีนในน้ำหมักผักผลไม้

ในช่วงแรกของการหมักจนถึงระยะการหมักครบ 20 วัน ปริมาณโปรตีนไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลง แต่หลังจากวันที่ 20 จนถึงวันที่ 30 ปริมาณโปรตีนมีการเพิ่มขึ้นและเริ่มคงที่จนถึงระยะการหมักครบ 50 วัน

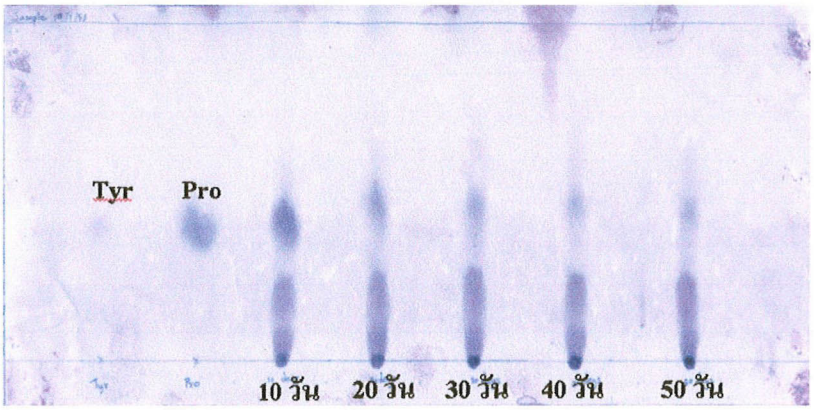
4. การวิเคราะห์กรดอะมิโนในน้ำหมักผักผลไม้ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (Paper chromatography)

จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนและเพปไทด์ขนาดเล็กในน้ำหมักผักผลไม้ที่ระยะการหมัก10,20,30,40 และ 50วัน จะใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (Paper chromatography) โดยใช้ mobile phase เป็น Propanol : 30%Ammonium hydroxide : water เป็น 15:3:2 และทำให้เกิดสีโดยการฉีดพ่นด้วยสารละลาย Ninhydrin ที่มีความสามารถในการทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนอิสระ หรือหมู่ α-amino ในโปรตีน หรือเพปไทด์ พบว่ามีทุกระยะการหมักจะปรากฏจุดของกรดอะมิโนอิสระ หรือเพปไทด์สายสั้นๆบนของกระดาษโครมาโตกราฟี

ที่ย้อมติดสีม่วงของ ninhydrin และยังพบจุดสีม่วงที่ด้านล่างบริเวณเส้นแนวระยะเริ่มต้นของกระดาษโครมาโตกราฟีที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ไปบนกระดาษได้ ดังรูปที่ 15 และ 16

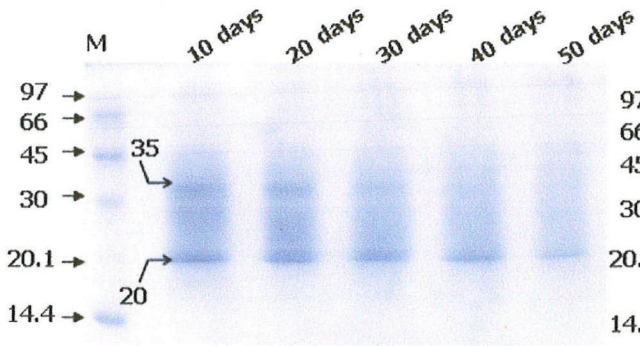


รูปที่ 15 แสดงการเคลื่อนที่ของกรดอะมิโนมาตรฐานบนกระดาษโครมาโตกราฟี

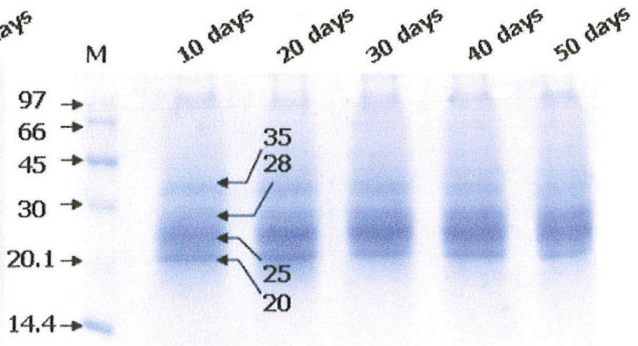


รูปที่ 16 แสดงการเคลื่อนที่ของกรดอะมิโนในน้ำหมักผักผลไม้ในระยะต่างๆด้วยโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ

5. การศึกษารูปแบบของโปรตีนในน้ำหมักผักผลไม้ด้วยวิธี SDS-PAGE



รูปที่ 17 แสดงรูปแบบของโปรตีนในน้ำหมักผักผลไม้ ที่ไม่มี β-mercaptoethanol ใน sample

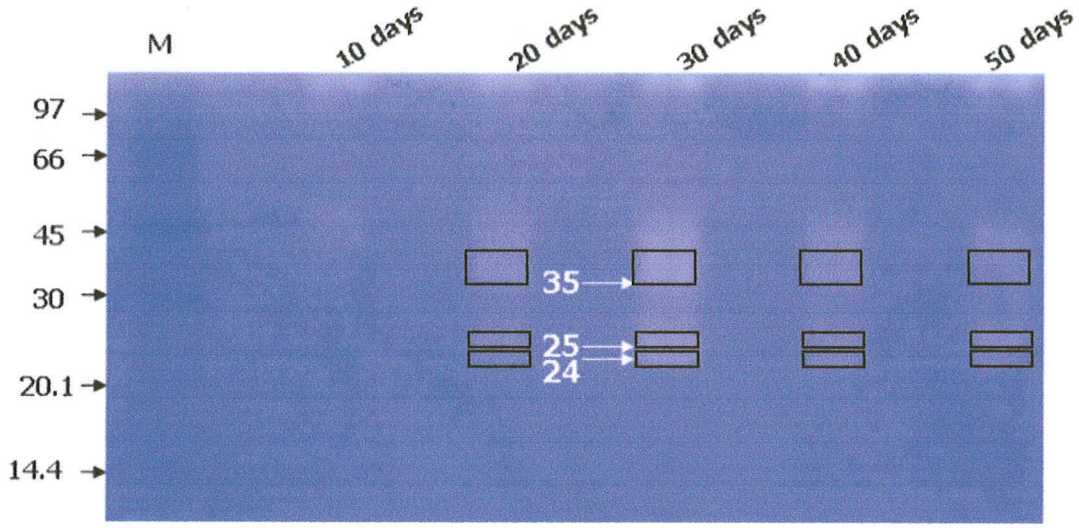


รูปที่ 18 แสดงรูปแบบของโปรตีนในน้ำหมักผักผลไม้ที่มี β-mercaptoethanol ใน sample

จากการศึกษารูปแบบของโปรตีนในน้ำหมักผักผลไม้ที่หมักครบ 10,20,30,40 และ 50วัน ด้วยวิธี

SDS-PAGE พบว่า sample ที่เติม solubilizing solution ที่ปราศจาก β-mercaptoethanol เมื่อแยกบน SDS gel พบแถบของ major protein อย่างน้อย 2 แถบ ซึ่งมีขนาดประมาณ 20 และ 35 kDa ส่วนรูปแบบของโปรตีนใน sample ที่เติม solubilizing solution ที่มี β-mercaptoethanol พบแถบของ major protein อย่างน้อย 4 แถบ ซึ่งมีขนาดประมาณ 20, 25, 28 และ35 kDa โดยแถบโปรตีนขนาด 20 และ 35 kDa ของทั้ง 2 เจลมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ ในขณะที่แถบโปรตีนขนาด 25 และ 28 kDa ในเจลที่ 2 นั้น จะมีความเข้มขึ้นจากช่วงแรกและสูงสุดที่ 20 วัน หลังจากนั้นจะมีแนวโน้มลดลง ดังรูปที่ 17 และ 18

6. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ Protease ในน้ำหมักผักผลไม้

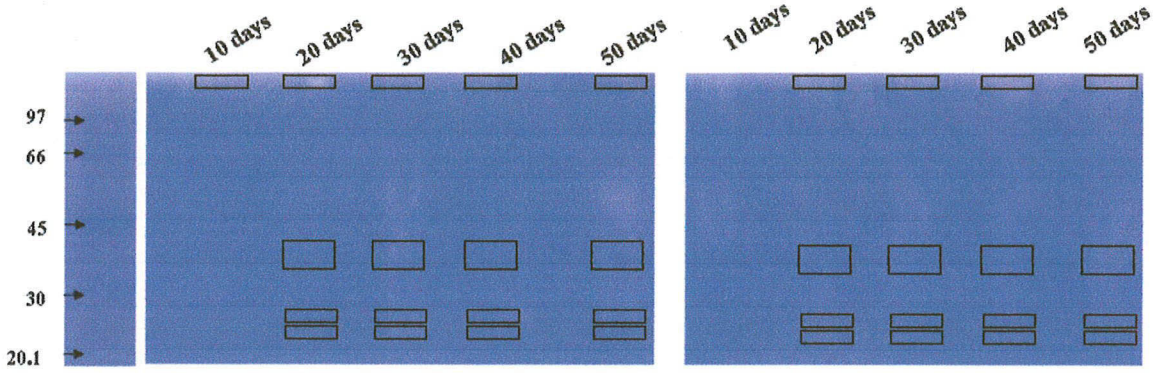


รูปที่ 19 แสดงActivity ของ Protease ในน้ำหมักผักผลไม้ในระยะต่างๆด้วยวิธี SDS-PAGE

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ Protease จากน้ำหมักผักผลไม้ที่หมักครบ 10,20,30,40 และ 50วัน

ด้วยวิธี activity gel พบว่ามีแถบของโปรตีนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์Protease อย่างน้อย 3 แถบที่มีขนาดประมาณ 24, 25 และ 35 kDa โดยจะมีการแสดงออกตั้งแต่เริ่มต้นการหมักและสูงสุดที่ระยะการหมัก 30 วัน จากนั้นจะมีกิจกรรมลดลง

7. การตรวจสอบชนิดของเอนไซม์ Protease

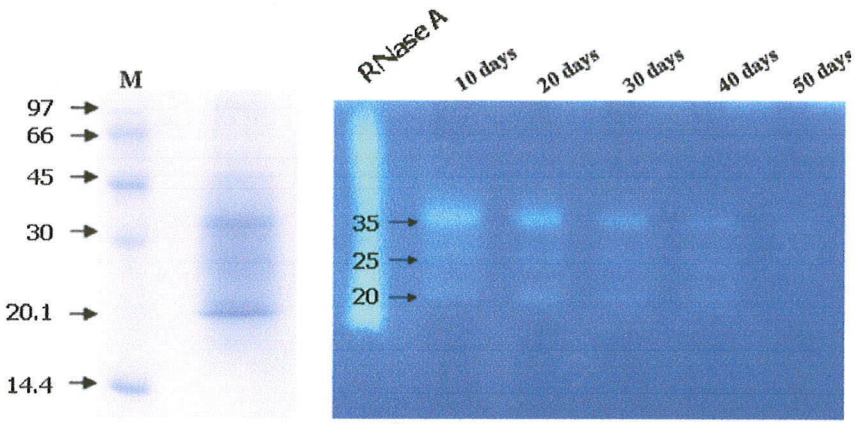


รูปที่ 20 Activity gel ของ Protease แบบธรรมดา (ซ้าย) และ Activity gel ของ Protease โดยมี EDTA ใน incubate buffer (ขวา)ของหมักผักผลไม้ในระยะต่างๆ

จากการที่พบว่าในน้ำหมักมีการแสดงออกของเอนไซม์ Protease และคาดว่าน่าจะเป็นกลุ่มที่เรียกว่า non-metalloprotease เพราะปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจสอบไม่มีการเติมion ของโลหะ เพื่อเป็นการยืนยันผลดังกล่าว จึงทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Protease ในสารลายปฏิกิริยาที่มีและไม่มี สาร EDTAโดยสาร EDTA จะเป็นตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์กลุ่ม metalloprotease ซึ่งจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองเงื่อนไขมีความแตกต่างกัน ผลปรากฏว่ากิจกรรมของ Protease ทั้งมีและไม่มี EDTA ใน ไม่มีความแตกต่างกัน ดังรูปที่ 20

8. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ RNase ในน้ำหมักผักผลไม้

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ RNase จากน้ำหมักผักผลไม้ที่หมักครบ 10, 20, 30, 40 และ 50วัน ด้วยวิธี Activity gel พบว่ามีแถบของโปรตีนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์Protease อย่างน้อย 3 แถบที่มีขนาดประมาณ 20, 25และ 35kDa และมีแนวโน้มของกิจกรรมลดลงเรื่อยๆตามระยะการหมัก ดังรูปที่ 21

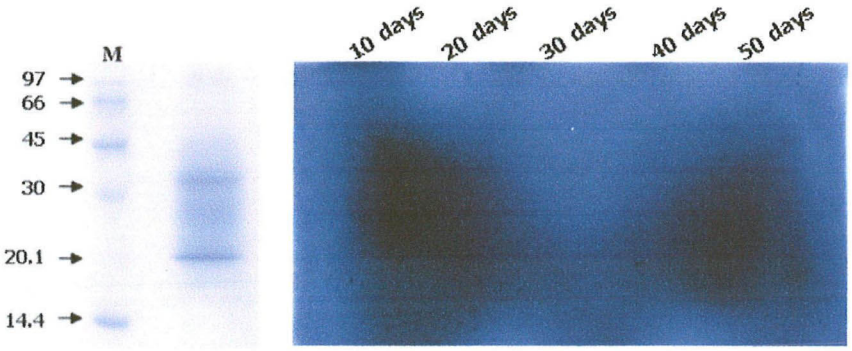


รูปที่ 21 แสดงActivity ของ RNase ในน้ำหมักผักผลไม้ในระยะต่างๆด้วยวิธี SDS-PAGE

9. ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ Amylase ในน้ำหมักผักผลไม้

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Amylase จากน้ำหมักผักผลไม้ที่หมักครบ 10,20,30,40 และ 50วัน

ด้วยวิธี SDS-PAGE ผลปรากฏว่าไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ Amylase ในทุกระยะของการหมักน้ำหมักผักผลไม้

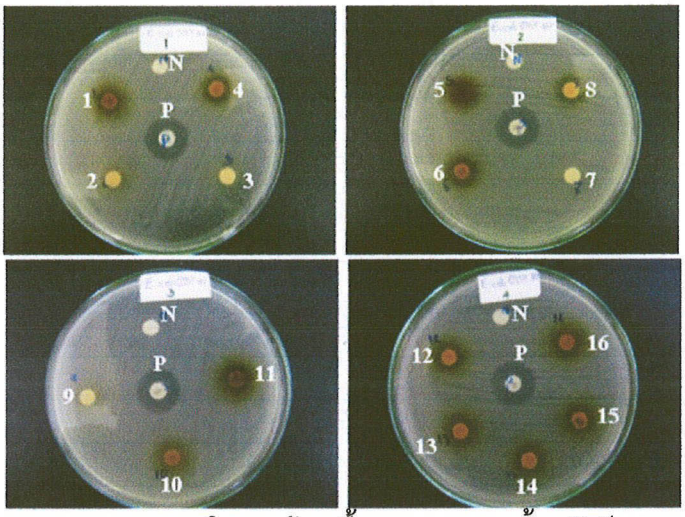


รูปที่ 22 แสดงActivity ของ Amylase ในน้ำหมักผักผลไม้ในระยะต่างๆด้วยวิธี SDS-PAGE

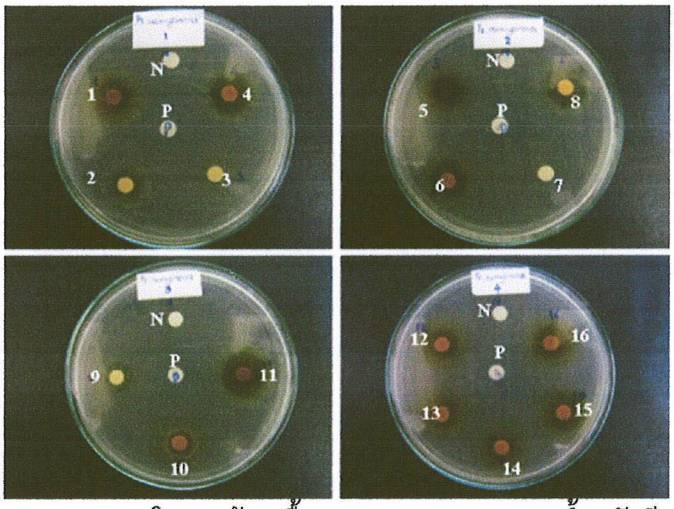
10. การทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion assay

จากการตรวจพบเพปไทด์ปรากฏในนำหมักผักผลไม้ เพื่อศึกษาว่าสารเพปไทด์เหล่านี้มีกิจกรรมอย่างไร ใน

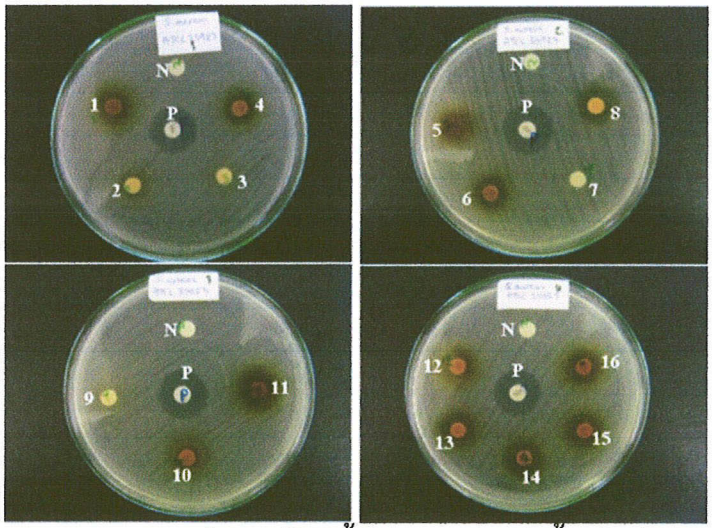
เบื้องต้นนี้จะศึกษาความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ มาทดสอบกิจกรรมของเพปไทด์ดังกล่าว โดยในการศึกษาครั้งนี้จะใช้น้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากแหล่งอื่นๆมาศึกษาเปรียบเทียบด้วย ผลการทดลองแสดงดังภาพด้านล่าง



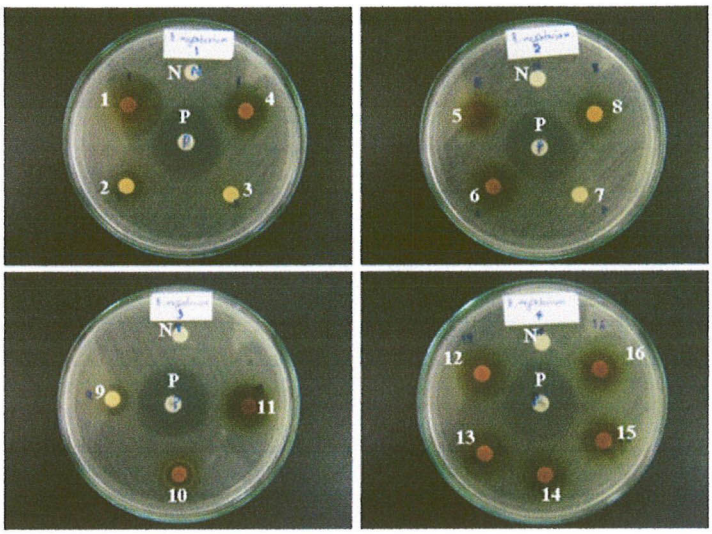
รูปที่ 23 แสดงความสามารถในการต้านเชื้อ *E. coli* ของน้ำหมักชีวภาพชนิดต่างๆ*



รูปที่ 24 แสดงความสามารถในการต้านเชื้อ *Ps.aeruginosa* ของน้ำหมักชีวภาพชนิดต่างๆ*



รูปที่ 25 แสดงความสามารถในการต้านเชื้อ *S.aureus* ของน้ำหมักชีวภาพชนิดต่างๆ*



รูปที่ 26 แสดงความสามารถในการต้านเชื้อ *B.megaterium* ของน้ำหมักชีวภาพชนิดต่างๆ*

หมายเหตุ*

1 = กากน้ำตาล
2 = น้ำหมักผัก
3 = น้ำหมักผักรวม
4 = น้ำหมักหอยเชอรี่
5 = น้ำหมักหอยเชอรี่+EM
6 = น้ำหมักหอยเชอรี่ EM+กากน้ำตาล
7 = น้ำหมักรวม+EM
8 = น้ำหมักรวมเติมกากน้ำตาล
9 = น้ำจุลินทรีย์
10 = บิ๊ก ปูแดง
11 = Vinasses,
12 = น้ำหมักผักผลไม้ครบ 10 วัน
13 = น้ำหมักผักผลไม้ครบ 20 วัน
14 = น้ำหมักผักผลไม้ครบ 30 วัน
15 = น้ำหมักผักผลไม้ครบ 40 วัน
16 = น้ำหมักผักผลไม้ครบ 50 วัน
P = positive control
N = negative contol

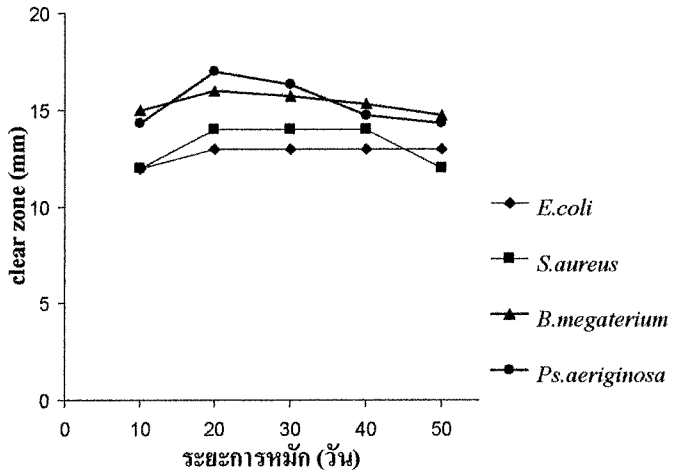
น้ำหมักชีวภาพที่มีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด แสดงดังตารางด้านล่าง

ตารางที่ 11 แสดงความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำหมักชีวภาพ

ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ	*E.coli*	*Ps.aeruginosa*	*S.aureus*	*B.megaterium*
1. กากน้ำตาล	√	√	√	√
2. น้ำหมักผัก	-	√	-	√
3. น้ำหมักผักรวม	-	-	-	-
4. น้ำหมักหอยเชอรี่	√	√	√	√
5. น้ำหมักหอยเชอรี่+EM	-	-	-	-
6. น้ำหมักหอยเชอรี่ EM+ กากน้ำตาล	√	√	√	√

7. น้ำหมักรวม+EM	-	-	-	-
8. น้ำหมักรวมเติมกากน้ำตาล	√	√	√	√
9. น้ำจุลินทรีย์	-	√	-	√
10. บิ๊ก ปูแดง	-	√	-	√
11. Vinasses	√	√	√	√
12. น้ำหมักผักผลไม้ครบ 10 วัน	√	√	√	√
13. น้ำหมักผักผลไม้ครบ 20 วัน	√	√	√	√
14. น้ำหมักผักผลไม้ครบ 30 วัน	√	√	√	√
15. น้ำหมักผักผลไม้ครบ 40 วัน	√	√	√	√
16. น้ำหมักผักผลไม้ครบ 50 วัน	√	√	√	√

น้ำหมักผักผลไม้ที่หมักขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ และน้ำหมักชีวภาพที่หาได้จากแหล่งต่างๆ เมื่อทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิดได้แก่ *E. coli, Ps. aeruginosa, S. aureus* และ *B. megaterium* พบว่า น้ำหมักชีวภาพที่นำมาจากแหล่งต่างๆที่มีความสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้เพียงบางชนิดเท่านั้น แต่น้ำหมักผักผลไม้ที่หมักขึ้นเองสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 4 ชนิด (ดังตารางที่11) โดยน้ำหมักผักผลไม้ที่หมักขึ้นเองที่ระยะการหมักครบ 20-30 วัน สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้สูงที่สุด และมีความสามารถต้านเชื้อ *Ps. aeruginosa* ได้ดีที่สุด ดังแสดงในกราฟ



รูปที่ 27 กราฟแสดงการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ของน้ำหมักผักผลไม้ที่ระยะต่างๆ