

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาการสแดงออกของโปรตีนและเพปไทด์ในน้ำหมักชีวภาพของผักผลไม้และศึกษาคุณลักษณะรวมทั้งกิจกรรมต่างๆของโปรตีนหรือเพปไทด์ในน้ำหมัก มีความสำคัญและจำเป็นในการเพิ่มมูลค่า เป็นข้อมูลในการกำหนดคุณภาพประสิทธิภาพของน้ำหมักชีวภาพ เป็นข้อมูลที่เกี่ยวข้องความปลอดภัย ความเสี่ยงในการใช้น้ำหมักชีวภาพ และเป็นข้อมูลในการศึกษาเพิ่มเติมในเชิงลึกต่อไปโดยเฉพาะการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำหมัก ที่อาจสามารถนำมาพัฒนาใช้ในด้านอุตสาหกรรมต่างๆได้

ผลจากการศึกษาน้ำหมักผักผลไม้ที่ทำขึ้นในห้องปฏิบัติการเป็นระยะเวลา 50 วัน จากการสังเกตลักษณะทางเคมีและกายภาพเบื้องต้นพบว่าค่าตลอดระยะเวลาของการหมัก pH ของน้ำหมักมีค่าประมาณ 4 มีความเป็นกรด ซึ่งอาจเกิดจากในกระบวนการหมักนั้นมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดต่างๆอยู่ในน้ำหมัก น้ำหมัก ในระยะแรกๆของการหมักจะปรากฏกลิ่นเหม็นเปรี้ยว มีกลิ่นฉุนของแอลกอฮอล์และแก๊ซ เกิดขึ้นโดยเฉพาะที่ระยะการหมัก 20 วัน แสดงให้เห็นว่าระยะนี้มีกิจกรรมของจุลินทรีย์จำพวก ยีสต์ ที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นแอลกอฮอล์ สูงและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว สีของน้ำหมักมีสีน้ำตาลแดงเข้มและข้น โดยสีที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากพืชเกิดการย่อยสลายปล่อยสารต่างๆออกมาผสมกับสีน้ำตาลเข้มของกากน้ำตาลที่เติมเป็นวัตถุดิบในการหมักหรือเกิดจากปฏิกิริยาของสารสีในผักและผลไม้ นอกจากนี้ในระหว่างหมักยังพบว่ามีราสีเขียว ราสีขาว และมีหนอนเกิดขึ้นด้วย ซึ่งหนอนที่เกิดอาจปนเปื้อนมากับผักผลไม้ที่นำมาหมัก และปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมเนื่องจากกระบวนการหมักเป็นระบบเปิด

เมื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลที่เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมักโดยวิเคราะห์ด้วยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid ซึ่งจะตรวจวัดปริมาณ reducing sugar โดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นสารมาตรฐาน พบว่ามีปริมาณ reducing sugar ลดลงเรื่อยๆ โดยมีการลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงตั้งแต่เริ่มหมักจนถึงระยะการหมักครบ 20 วัน สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบมีการสร้างกรด แอลกอฮอล์และแก๊ซจำนวนมากในช่วงระยะการหมัก 20 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่จุลินทรีย์มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะยีสต์ มีการนำน้ำตาลไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและกระบวนการหมัก ส่วนปริมาณโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการหมักจะมีการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Brad ford พบปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงหลังจากระยะการหมัก 20-30 วัน ซึ่งโปรตีนที่เพิ่มขึ้นนี้อาจได้มาจากการย่อยสลายซากพืชผัก หรือจากเซลล์จุลินทรีย์ที่มีการตายลงหลังจากใช้น้ำตาลในช่วง 20 วันหมด ทำให้มีการปลดปล่อยสารต่างๆออกมานอกเซลล์ และยังพบกรดอะมิโนอิสระหรืออาจจะรวมไปถึงเพปไทด์สายสั้นๆ เพราะเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ โดยจะพบ spot ที่ติดสีม่วงเมื่อทำปฏิกิริยา ninhydrin จากการศึกษารูปแบบโปรตีนที่แสดงออกในน้ำหมักฯระยะต่างๆ ด้วยวิธี SDS-PAGE พบแถบแบนโปรตีนอย่างน้อย 4 ชนิด ที่มีขนาดประมาณ 20, 25, 28 และ 35 kDa โดยโปรตีนดังกล่าวมีการแสดงออกลดลงตามระยะเวลาการหมัก

เราพบการสแดงออกของโปรตีนและเพปไทด์ในน้ำหมักผักผลไม้ จึงมีความน่าสนใจว่าโปรตีนดังกล่าวเหล่านี้มีกิจกรรมอย่างไรบ้าง โดยในเบื้องต้นนี้จะตรวจสอบกิจกรรมของโปรตีนในน้ำหมักใน 3 กิจกรรม คือ Protease, Ribonuclease (RNase) และ Amylase โดยใช้วิธี Activity gel staining ผลการศึกษาพบกิจกรรม

ของเอนไซม์ Protease ปรากฏบน activity gel ที่ตำแหน่งขนาดโมเลกุลประมาณ 24, 25 และ 35 kDa และ protease ดังกล่าวไม่ใช่กลุ่ม Metalloprotease โดยจะพบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ในปริมาณที่สูง และพบสูงสุดที่ระยะการหมักครบ 30 วัน นอกจากนี้ยังพบกิจกรรมของเอนไซม์ RNase ปรากฏบนเจลที่ขนาดประมาณ 20, 25 และ 35 kDa และมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆตามระยะการหมัก แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ Amylase ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากไม่มีเอนไซม์ชนิดนี้หรืออาจจะมีน้อยจนไม่สามารถตรวจพบด้วยวิธีนี้ได้ หรืออาจเกิดจากเอนไซม์ เสื่อมสภาพในระหว่างการเตรียมสารตัวอย่าง

ส่วนเพปไทด์ที่พบในน้ำหมักนั้นได้มีการตรวจสอบกิจกรรมโดยการศึกษาความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion assay โดยใช้เชื้อที่ใช้ทดสอบคือ *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *S. aureus* และ *B. megaterium* น้ำหมักที่ใช้ในการตรวจสอบได้แก่ น้ำหมักผักผลไม้ที่ทำขึ้นในห้องปฏิบัติการในระยะต่างๆ และน้ำหมักชีวภาพที่นำมาจากแหล่งต่างๆ ปรากฏว่าน้ำหมักผักผลไม้ที่หมักขึ้นเองในห้องปฏิบัติการสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 4 ชนิด แต่น้ำหมักชีวภาพที่นำมาจากแหล่งต่างๆที่มีความสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้เพียงบางชนิดเท่านั้น โดย สารที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้นั้นอาจจะเป็นโปรตีน หรือเพปไทด์ในน้ำหมัก ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป