

ชื่อโครงการ: การแยกและการศึกษาลักษณะของโปรตีนและเพปไทด์ในน้ำหมักชีวภาพจากผลไม้

บทคัดย่อ

247304

การแสดงผลของโปรตีนหรือเพปไทด์ในระหว่างการหมักของน้ำหมักผลไม้ โดยใช้ผักผลไม้ที่หาได้ในท้องถิ่นจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ สับปะรด มะละกอ แตงโม ถั่วฝักยาว ฟักทอง มะเขือเทศ ผักกาดขาวและแตงกวา โดยใช้ในอัตราส่วนน้ำหนักที่เท่ากัน ทำการหมัก เป็นเวลา 50 วัน ทุก 10 วันจะทำการตรวจสอบลักษณะทางเคมีและกายภาพ และเก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อนำมาศึกษาการแสดงออก ของโปรตีนและตรวจสอบกิจกรรมต่างๆของโปรตีน ผลการทดลองพบว่า น้ำหมักมีค่า pH ประมาณ 4 มีแก๊ซและแอลกอฮอล์เกิดขึ้นและเกิดขึ้นมากในช่วงการหมัก 30 วัน น้ำหมักมีสีน้ำตาลแดงเข้ม มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยวและ นอกจากนี้ยังพบว่ามียีสที่มีสีเขียว ราขาวและหนอนเกิดขึ้นในน้ำหมักด้วย เมื่อทำการตรวจสอบกรดอะมิโนหรือเพปไทด์สายสั้นๆในน้ำหมักด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบกระดาษและ ติดตาม ผลด้วยสารละลาย Ninhydrin พบว่ามีกรดอะมิโน หรือเพปไทด์สายสั้นๆเป็นองค์ประกอบ เมื่อ ตรวจสอบปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford พบว่าช่วงระยะเวลาแรกๆของการหมักตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงระยะการหมักครบ 30 วันมีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นและจะเริ่มคงที่จนถึงระยะการหมักครบ 50 วัน การศึกษารูปแบบของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบการแสดงออกของโปรตีน 4 ชนิดตามขนาดโมเลกุล คือ 20, 25, 28 และ 35 kDa ส่วนการศึกษากิจกรรมของโปรตีนในเบื้องต้นนี้จะตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ 3 กลุ่มคือ Amylase, Protease และ Ribonuclease (RNase) ด้วยวิธี Activity staining gel (refolding gel) ผลการทดลองพบกิจกรรมของเอนไซม์ protease ที่ตำแหน่งประมาณ 24, 25 และ 35 kDa และพบกิจกรรมของเอนไซม์ RNase ที่ตำแหน่งประมาณ 20, 25 และ 35 kDa ซึ่งปริมาณของ Protease มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณของ RNase มีแนวโน้มลดลงตามระยะการหมัก ส่วน Amylase แสดงผลของกิจกรรมไม่ชัดเจนในทุกๆระยะของการหมัก นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *B. megaterium*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa* และ *S. aureus* ATCC25923 พบว่าน้ำหมักผลไม้ทุกระยะมีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 4 ชนิด แต่น้ำหมักชีวภาพที่เก็บตัวอย่างมาจากแหล่งต่างๆพบว่า สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้บางชนิดเท่านั้น สารที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อเหล่านี้ อาจจะเป็นสารในกลุ่ม polyphenol และ peptides ต่างๆโดยเฉพาะกลุ่ม antimicrobial peptides การ พบกิจกรรมของเอนไซม์ Protease และ RNase ที่ active ในน้ำหมักผลไม้ อาจเป็นไปได้ที่สารชีวโมเลกุลทั้งสองชนิดนี้จะมียับยั้งหรือยับยั้งสำคัญในการกำหนดคุณภาพของน้ำหมัก จึงมีความน่าสนใจในการศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะด้านต่างๆต่อไป

Research title: Isolation and characterization of proteins and peptides in fruit fertilizer

Abstract

247304

The expression of the proteins or peptides during the fermentation of fruits by using 8 local kinds of vegetables and fruits such as pineapples, papayas, watermelons, bananas, pumpkins, tomatoes, Chinese cabbages and cucumbers with the ratio of weight equally. The fermentation was done for 50 days. Every 10 days, the medium was taken and examined the chemical, physical properties, protein expression and determined the activities of contained protein. The results showed the fermented medium had the pH around 4. There were gas and alcohol produced and more increased during 30 days of fermentation. In addition, rancid smell, dark brown color, white-mold, green-mold and fly worms also found in fermented medium. Amino acids or peptides medium examined by paper chromatography stained with ninhydrin reaction. There were dark blue spots present on chromatogram indicated the fermented medium contained amino substances like amino acids and peptides. The proteins were determined by Bradford, the results showed the protein content increased from the beginning phase to 30 days and then quite stable till to 50 days fermentation. The pattern of proteins were done by 15%gel SDS-PAGE showed the expression of 4 proteins, which differed on its molecular weight (20, 25, 28 and 35 kDa). For the activities of proteins, the fermented sample in each taken times were determined for 3 kinds of enzyme, amylase, protease and ribonuclease, by activity staining gel (refolding gel). The activity of protease showed clear band on gel at position around 24, 25 and 35 kDa, and RNase activity at position around 20, 25 and 35 kDa. Protease activity was increased, but the activity on RNase tends to decrease according to the fermentation period. Amylase activity was not clear display in all stages of fermentation. In addition, the antimicrobial properties against 4 stains of bacterial; *B. megaterium*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa* and *S. aureus* ATCC25923 were studied. The results showed that every stage of fermented fruits had antibacterial activity, biofertilizer samples collected from various sources found only some bacterial stains can be inhibited. The substances inhibit bacteria growth might be the polyphenol compounds and peptides, especially group of antimicrobial peptides. Finding active protease and RNase activity in fermented fruits might be possible that both types of biomolecules will play a key role in determining the quality of the fermentation broth. Therefore, to study the purification and characterization of these enzymes is very interesting.