การติดตามแอคทิวิทีของเอนไซม์บางชนิดในกระบวนการทำน้ำหมักชีวภาพ

ชัยวัฒน์ วงศ์เศวตศิลา[1] วิชิตพล มีแก้ว[1] เฉลิมพร เสริมมติวงศ์[1] ณัฐพล ขันธปราบ[1] สุชาดา ตุงคนาคร[1] ภูตะวัน แสนใจอิ[1] สุภาภรณ์ ศิริโสภณา[1,2] สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ[2,3] และสุรศักดิ์ ละลอกน้ำ[1,2*]

[1]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ 10110
[2]หน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ 10110
[3]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ 10110

*E-mail : surasakl@swu.ac.th

รับบทความ: 10 พฤษภาคม 2554 ยอมรับตีพิมพ์: 13 กรกฎาคม 2554

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อติดตามกิจกรรมของเอนไซม์ในกระบวนการทำน้ำหมักชีวภาพ โดยใช้สูตรน้ำหมักจำนวน 4 สูตร ซึ่งมีอัตราส่วนดังนี้ สูตร F1 (ข้าวสุก : กากน้ำตาล = 3:1) F2 (ผัก : กากน้ำตาล = 3:1) F3 (เนื้อหมู : กากน้ำตาล = 3:1) และ F4 (ข้าวสุก : ผัก : เนื้อหมู : กากน้ำตาล = 3:3:3:1) โดยติดตามกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส โพรทิเอส และไลเปส ทุก ๆ วัน เป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่า สูตรอาหารทุกสูตรให้กิจกรรมเอนไซม์ทุกชนิดตั้งแต่วันแรกของการทำน้ำหมักชีวภาพ โดยสูตร F1 ให้กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดในวันที่ 3 รองลงมาคือ เซลลูเลส โพรทิเอส และไลเปส ตามลำดับ สูตร F2 ให้กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดในวันที่ 3 ตาม รองลงมาคือ อะไมเลส โพรทิเอส และไลเปส ตามลำดับ สูตร F3 ให้กิจกรรมเอนไซม์โพรทิเอสสูงสุดในวันที่ 3 รองลงมาคือ ไลเปส เซลลูเลส และอะไมเลส ตามลำดับ สูตร F4 ให้กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดในวันที่ 3 รองลงมาคือ โพรทิเอส อะไมเลส และเซลลูเลส ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ทุกชนิด จากการติดตามปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำหมักสูตรต่าง ๆ ทุกสัปดาห์เป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่า น้ำหมักชีวภาพทุกสูตรอาหารมีจำนวนแบคทีเรียสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 โดยมีปริมาณประมาณ 10^4–10^{10} cfu/mL จำนวนแบคทีเรียคงที่ประมาณ 6 สัปดาห์และลดลงเป็นครึ่งหนึ่งที่สัปดาห์ที่ 10 จากการศึกษานี้อธิบายได้ว่า ในกระบวนการทำน้ำหมักชีวภาพพบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส โพรทิเอส และไลเปส ซึ่งอาจมาจากสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิของจุลินทรีย์ที่สร้างออกมาในระหว่างการหมัก

คำสำคัญ: อะไมเลส เซลลูเลส โพรทิเอส ไลเปส น้ำหมักชีวภาพ

Detection of Some Enzyme Activities in Bio-Fermented Extracts

Chaiwat Wongsawetsila[1] Wichitpol Meekaew[1] Chalermporn Sermmatiwong[1] Nattapol Kantapab[1]
Suchada Toonkanakorn[1] Putawan Saenjai-i[1] Supaporn Sirisopana[1,2]
Somkiat Phornphisutthimas[2,3] and Surasak Laloknam[1,2]

[1]Department of General Science, [2]Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning and [3]Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Klongtoey Nua, Wattana, Bangkok 10110, Thailand

*E-mail : surasakl@swu.ac.th

Abstract

This research aimed to detect the enzyme activity during fermentation process of four bio-extracts, which were different ingredient ratios as follows: F1 (cooked rice: molasses = 3:1), F2 (vegetables: molasses = 3:1), F3 (pork: molasses = 3:1), and F4 (cooked rice: vegetables: pork: molasses = 3:3:3:1). The activities of amylase, cellulase, protease and lipase were investigated and analysed each day for three months. The result showed that all enzyme activities were found in all fermented bio-extracts at first-day fermentation. After 3-day fermentation, the F1 gave the highest amylase activity following cellulase, protease and lipase activities, respectively; the F2 gave the highest cellulase activity following amylase, protease and lipase activities, respectively; the F3 gave the highest protease activity following lipase, cellulase and amylase activities, respectively; the F4 gave the highest lipase activity following protease, amylase and cellulase activities, respectively. All enzyme activities were not determined after 1-month fermentation. In addition, the total bacterial amounts in all fermented bio-extracts were investigated each week for 3 months. All fermented bio-extracts had the largest number of bacteria in a range of 10^4–10^{10} cfu/mL after 2-week fermentation. The bacterial amounts were not changed at 6-week fermentation, and then reduced to a half after 10 weeks. The results revealed that the amylase, cellulase, protease and lipase activities found in all fermentation process may be the secondary metabolites produced from bacteria during the fermentation process.

Keywords: Amylase, Cellulase, Protease, Lipase, Bio-extract

บทนำ

เอนไซม์ (enzyme) เป็นตัวเร่งชีวภาพ (biocatalyst) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา สลายซับสเทรตให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเพาะสูง ปฏิกิริยาส่วนใหญ่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ทั้งพวกโพรคาริโอตและยูคาริโอต เช่น อะไมเลส (amylase) เร่งปฏิกิริยาสลายพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ในอะไมโลสเป็นกลูโคส เซลลูเลส (cellulase) เร่งสลายพันธะไกลโคซิดิกในเซลลูโลสเป็นกลูโคส โพรทิเอส (protease) สลายพันธะเพปไทด์ (peptide bond) ในโปรตีนเป็นเพปไทด์หรือกรดอะมิโน และไลเปส (lipase) สลายพันธะเอสเทอร์ในไตรกลีเซอไรด์ให้เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน (สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ, 2552; สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ และคณะ, 2551, 2552; ชัยศาสตร์ คเชนทร์สุวรรณ และคณะ, 2551, 2552; อภิญญาณ บุญ-ประกอบกุล และคณะ, 2549; Laloknam et al., 2009, 2007, 2010)

เอนไซม์สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ในสัตว์ เช่น เรนนิน อะไมเลส ซูเครส ในพืช เช่น ปาเปน โบรมิเลน และในจุลินทรีย์ เช่น โพรทิเอส ไลเปส เซลลูเลส และไคทิเนส ชัยศาสตร์ คเชนทร์สุวรรณ และคณะ (2552)

ตรวจพบไลเปสในผลไม้ และสุรศักดิ์ ละลอกน้ำ และคณะ (2551, 2552) พบเอนไซม์ทั้งในผักและผลไม้

น้ำหมักชีวภาพ (fermented bio-extracts) เป็นของเหลวที่ได้จากการหมักส่วนของพืชผัก ผลไม้ และสัตว์ด้วยน้ำตาลในสภาพไร้ออกซิเจน ซึ่งน้ำหมักที่ได้ประกอบด้วยจุลินทรีย์ ธาตุอาหาร และสารอินทรีย์หลายชนิดที่เป็นประโยชน์ในการเกษตร (สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ, 2552; สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ และคณะ, 2552) ปัจจุบันมีการนำน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากเศษอาหารที่เป็นพืช เนื้อสัตว์ และผลไม้บางชนิด เพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านการเกษตรเร่งการเจริญเติบโตของพืช และกำจัดศัตรูพืช (ภาวนา ลิกขนานนท์, 2543 เยาวภา จิระเกียรติกุล, 2547; รุศมา มฤบดี และคณะ, 2551; สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ, 2552; สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ และคณะ, 2552; บุญนิธิ คัสกุล และคณะ, 2554; ศิริรัตน์ ก่ำวิเขียว และคณะ, 2554; Aguilar et al., 2009; Noisopa et al., 2010) เนื่องจากน้ำหมักชีวภาพได้จากกระบวนการหมักที่เกิดจากการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจนของจุลินทรีย์ที่อยู่ในอากาศและเศษอาหารหรือวัสดุที่ใช้เตรียม (กองเกษตรเคมี, 2545; อรรถ บุญนิธิ, 2544) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะมีแบคทีเรียที่มีความจำเพาะในการเร่งสลายเศษอาหารแต่ละประเภท เช่น ผลิตเอนไซม์อะไมเลสมาย่อยสารอาหารประเภทแป้ง ผลิตเอนไซม์โพรทิเอสมาย่อยสารอาหารประเภทโปรตีน และผลิตเซลลูเลสมาย่อยสารประเภทเซลลูโลส ซึ่งแบคทีเรียย่อยสลายสารอาหารโมเลกุลใหญ่ให้มีขนาดเล็กลงเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเอง

ในงานวิจัยนี้จึงเป็นการติดตามกิจกรรมของเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ อะไมเลส ไลเปส โพรทิเอส และเซลลูโลส ในกระบวนการทำน้ำหมักชีวภาพ โดยใช้อาหารที่มีน้ำหมักชีวภาพสูตรต่างกัน รวมทั้งการติดตามปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เกิดขึ้นในกระบวนการทำน้ำหมักชีวภาพ

วิธีดำเนินการวิจัย

***การเตรียมสูตรน้ำหมักชีวภาพ 4 สูตร*:** สูตรที่ 1 (F1) ประกอบด้วยข้าวสุกและกากน้ำตาลในอัตราส่วน 3:1 สูตรที่ 2 (F2) ประกอบด้วยผักและกากน้ำตาลในอัตราส่วน 3:1 สูตรที่ 3 (F3) ประกอบด้วยเนื้อหมูและกากน้ำตาลในอัตราส่วน 3:1 และสูตรที่ 4 (F4) ประกอบด้วยข้าวสุก ผัก เนื้อหมู และกากน้ำตาลในอัตราส่วน 3:3:31 ตามลำดับ ใส่น้ำหมักแต่ละสูตรในขวดพลาสติกขนาด 1,000 มิลลิลิตร ติดตามปัจจัยทางกายภาพและเคมีบางประการ ได้แก่ สี อุณหภูมิ พีเอช และปริมาณของกรดทั้งหมดโดยใช้วิธีการไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ เพื่อหาปริมาณกรดไขมันโดยใช้ฟีนอล์พทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ ในช่วงระยะเวลาเริ่มต้นของการศึกษา ติดตามทุก ๆ วัน เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นติดตามทุก ๆ 3 วัน เป็นระยะเวลา 12 วัน จาและติดตามทุกๆ 7 วัน จนครบระยะเวลาศึกษารวม 90 วัน

***การติดตามแอคทิวิทีของอะไมเลส*:** ทำได้โดยเก็บตัวอย่างน้ำหมัก F1–F4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในวันที่ศึกษาปัจจัยทางกายภาพและเคมี ในการติดตามแอคทิวิทีมีส่วนผสมต่าง ๆ ดังนี้ สารละลายน้ำแป้งเข้มข้นร้อยละ 0.5 (w/v) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำหมักชีวภาพปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยใช้สารละลายไดไนโทรซาลิซาลิกปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ (Jenway 6405 UV/Vis) นำค่าที่อ่านได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส กำหนดให้ 1 ยูนิตของอะไมเลสแอคทิวิทีเท่ากับปริมาณเอนไซม์ 1 มิลลิลิตรที่เร่งสลายแป้งแล้วให้น้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้ภาวะทดลอง

***การติดตามแอคทิวิทีของเซลลูเลส*:** ทำได้โดยเก็บตัวอย่างน้ำหมัก F1–F4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในวันที่ศึกษาปัจจัยทางกายภาพและเคมี ในการติดตามแอคทิวิทีทำได้ดังนี้ ตัดกระดาษกรองให้มีขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร ผสมกับน้ำหมักชีวภาพปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำกระดาษกรองออก และหยุดปฏิกิริยาโดยใช้สารละลายไดไนโทรซาลิซาลิก ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 5 นาที และตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ (Jenway 6405 UV/Vis) นำค่าที่อ่านได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส กำหนดให้ 1 ยูนิตของเซลลูเลสแอคทิวิทีเท่ากับปริมาณเอนไซม์ 1 มิลลิลิตรที่เร่งการสลาย

กระดาษกรองให้ได้น้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้ภาวะทดลอง

***การติดตามแอคทิวิทีของไลเปส*:** ทำได้โดยเก็บตัวอย่างน้ำหมัก F1–F4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในวันที่ศึกษาปัจจัยทางกายภาพและเคมี ในการติดตามแอคทิวิทีทำได้ดังนี้ สารละลายน้ำมันมะกอกเข้มข้นร้อยละ 0.5 (w/v) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำหมักชีวภาพปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยใช้เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 (v/v) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ เพื่อหาปริมาณกรดไขมันโดยใช้ฟีนอล์พทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ กำหนดให้ 1 ยูนิตของไลเปสแอคทิวิทีเท่ากับปริมาณเอนไซม์ 1 มิลลิลิตรที่เร่งสลายน้ำมันมะกอกแล้วให้กรดไขมัน 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้ภาวะทดลอง

***การติดตามแอคทิวิทีของโพรทิเอส*:** ทำได้โดยเก็บตัวอย่างน้ำหมัก F1–F4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในวันที่ศึกษาปัจจัยทางกายภาพและเคมี ในการติดตามแอคทิวิทีมีส่วนผสมต่างๆ ดังนี้ สารละลายเคซีนเข้มข้นร้อยละ 0.1 (w/v) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำหมักชีวภาพปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยใช้สารละลายไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 (w/v) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที และนำไปเซนทริฟิวจ์ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (Jenway 6405 UV/Vis) นำค่าที่อ่านได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของไทโรซีน กำหนดให้ 1 ยูนิตของโพรทิเอสแอคทิวิทีเท่ากับปริมาณเอนไซม์ 1 มิลลิลิตรที่เร่งการสลายเคซีนและได้เป็นไทโรซีน 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้ภาวะทดลอง

***การติดตามปริมาณแบคทีเรียในกระบวนการทำน้ำหมักชีวภาพ*:** ทำได้โดยเก็บตัวอย่างน้ำหมัก F1–F4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มิลลิลิตร ในวันที่ศึกษาปัจจัยทางกายภาพและเคมี โดยเจือจางน้ำหมักชีวภาพเป็นลำดับทีละ 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นดูดสารละลายเจือจางปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหารวุ้นแข็ง LB และกระจายเชื้อให้ทั่ว บ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงของการอบ นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารวุ้นแข็ง LB ในหน่วย cfu/mL

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

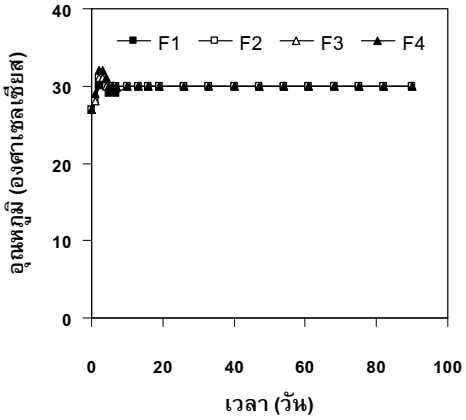
เมื่อเตรียมน้ำหมักชีวภาพทั้ง 4 สูตร F1–F4 ตามวิธีการทดลองเรียบร้อยแล้ว ติดตามการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมี ได้แก่ สี อุณหภูมิ พีเอช และปริมาณกรดทั้งหมด พบว่า สีของน้ำหมักชีวภาพทุกสูตรช่วงแรกเป็นสีน้ำตาลเข้มของกากน้ำตาล และมีตะกอนเศษอาหารที่ใส่ลงไป เช่น ข้าวสุกมีสีขาว ผักบุ้งมีสีเขียว และเนื้อหมูมีสีแดงอ่อน เมื่อตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ พบว่า สีของกากน้ำตาลอ่อนลง และสีเศษอาหารทุกชนิดเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาล และมีตะกอนของกากอาหารอยู่ที่ก้นขวด เมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ ขนาดของอาหารชนิดต่างๆ ลดลง และมีตะกอนเศษอาหารเพิ่มขึ้น และเมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน มีตะกอนของอาหารเป็นชิ้นเล็กๆ อยู่ที่ก้นของขวด และน้ำหมักชีวภาพเปลี่ยนเป็นน้ำตาลอ่อน (ไม่แสดงผลการศึกษา)

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ พีเอช และความเข้มข้นน้ำหมักชีวภาพทั้ง 4 สูตร เป็นระยะเวลา 90 วัน (ภาพที่ 1) พบว่า น้ำหมักชีวภาพทุกสูตรมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นใน 3 วันแรกของการศึกษา แล้วอุณหภูมิคงที่ตลอดการศึกษา และค่าพีเอชของน้ำหมักทุกสูตรมีค่าลดลงสอดคล้องกับความเข้มข้นของกรดที่เพิ่มขึ้น โดยค่าพีเอชและความเข้มข้นของกรดคงที่เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 2 สัปดาห์ น้ำหมักชีวภาพสูตรที่ 4 มีค่าพีเอชต่ำสุด คือ pH 3 และความเข้มข้นของกรดสูงสุดที่ 710 มิลลิโมลาร์ ลักษณะการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้สอดคล้องกับผลการวิจัยของ สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ (2552) และสมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ และคณะ (2552)

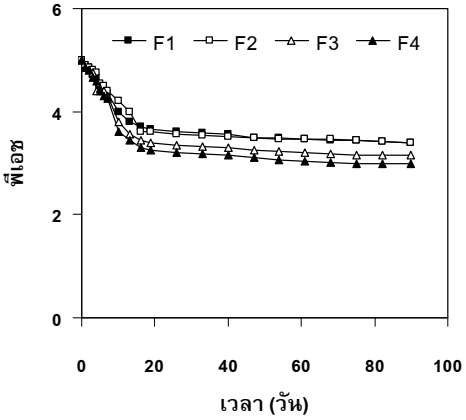
จากการติดตามกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ไลเปส โพรทิเอส และเซลลูเลส ตามวิธีการทดลอง พบว่า น้ำหมักชีวภาพทุกสูตรให้กิจกรรมเอนไซม์ทุกชนิดตั้งแต่วันแรกของการหมัก โดยสูตร F1 ให้กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดในวันที่ 3 รองลงมาคือ เซลลูเลส โพรทิเอส และไลเปส ตามลำดับ (ภาพที่ 2) สูตร F2 ให้กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดในวันที่ 3 รองลงมาคือ อะไมเลส โพรทิเอส และไลเปส ตามลำดับ (ภาพที่ 3) สูตร F3 ให้กิจกรรมเอนไซม์โพรทิเอสสูงสุดในวันที่ 3 รองลงมาคือ ไลเปส เซลลูเลส และอะไมเลส ตามลำดับ (ภาพที่ 4) และสูตร F4 ให้กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดใน

วันที่ 3 รองลงมาคือ โพรทิเอส อะไมเลส และเซลลูเลส ตามลำดับ (ภาพที่ 5)

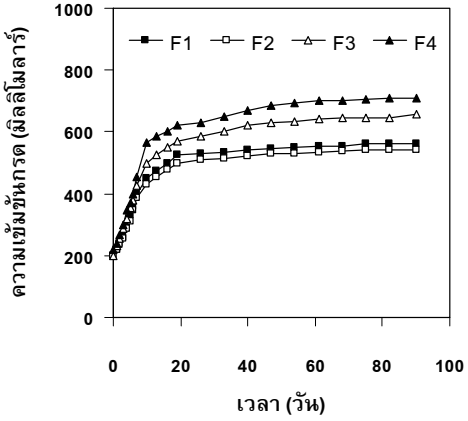
(ก)



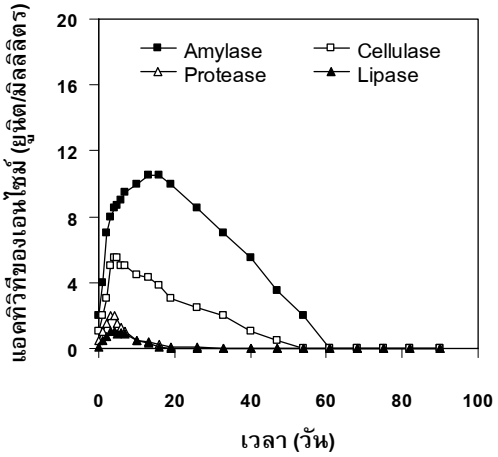
(ข)



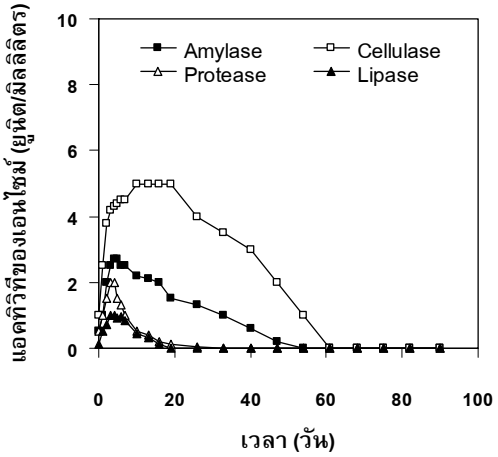
(ค)



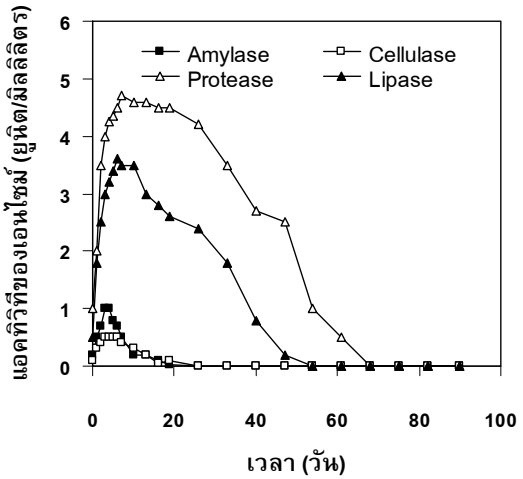
ภาพที่ 1 การเปลี่ยนแปลง (ก) อุณหภูมิ (ข) พีเอช และ (ค) ความเข้มข้นกรดของน้ำหนักชีวภาพทั้ง 4 สูตร



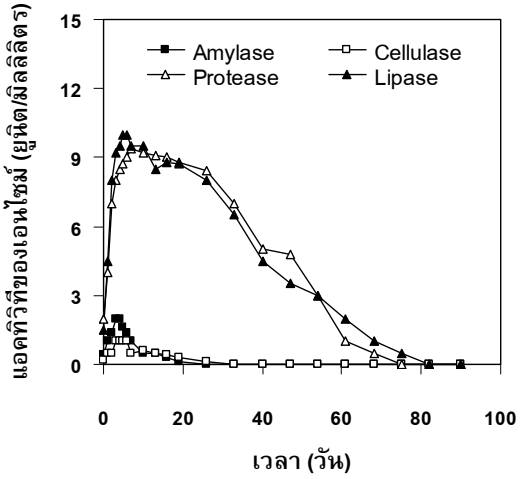
ภาพที่ 2 แอคทิวิทีของอะไมเลส เซลลูเลส โปรทิเอส และไลเปส ในน้ำหมักชีวภาพสูตร F1



ภาพที่ 3 แอคทิวิทีของอะไมเลส เซลลูเลส โปรทิเอส และไลเปส ในน้ำหมักชีวภาพสูตร F2



ภาพที่ 4 แอคทิวิทีของอะไมเลส เซลลูเลส โพรทิเอส และไลเปสในน้ำหมักชีวภาพสูตร F3



ภาพที่ 5 แอคทิวิทีของอะไมเลส เซลลูเลส โพรทิเอส และไลเปสในน้ำหมักชีวภาพสูตร F4

การที่น้ำหมักชีวภาพแต่ละชนิดมีแอคทิวิทีของเอนไซม์แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากชนิดของสารอาหารที่ใส่ในน้ำหมัก ซึ่งกระตุ้นให้แบคทีเรียหลั่งเอนไซม์ต่างชนิดกันออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) ซึ่งขึ้นอยู่กับการชักนำของซับสเทรตที่ใส่ลงไป เช่น ข้าวสุกกระตุ้นให้แบคทีเรียสร้างเอนไซม์อะไมเลส ส่วนโปรตีน ผัก และลิพิดกระตุ้นให้แบคทีเรียสร้างเอนไซม์โพรทิเอส เซลลูเลส และไลเปส ตามลำดับ ดังนั้นเอนไซม์เหล่านี้จึงเป็นเอนไซม์จากการชักนำ (inducible enzyme) เมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน จึงไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ทุกชนิด เนื่องจากสารอาหารที่ใช้กระตุ้นเอนไซม์เหล่านี้ถูกใช้หมดแล้ว

จากการติดตามปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดตามวิธีการทดลอง พบว่า น้ำหมักชีวภาพทุกสูตรมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 อยู่ในช่วง 10^4–10^{10} cfu/mL (ตาราง 1) ปริมาณแบคทีเรียคงที่ประมาณ 6 สัปดาห์และลดลงเป็นครึ่งหนึ่งในสัปดาห์ที่ 10 จากการศึกษานี้อธิบายได้ว่า แบคทีเรียที่ตรวจพบอาจผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิในระหว่างการหมัก ทำหน้าที่ในการย่อยเศษอาหารชนิดต่าง ๆ ที่เป็นซับสเทรต ได้แก่ อะไมเลส โพรทิเอส ไลเปส และเซลลูเลส

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

กิจกรรมของเอนไซม์ทุกชนิดตรวจพบในน้ำหมักชีวภาพทั้ง 4 สูตรที่ใช้ในการศึกษา กิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิดที่ตรวดวัดได้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารอาหารที่ใส่ลงไปในน้ำหมักชีวภาพ ข้าวสุกชักนำให้แบคทีเรียผลิตอะไมเลส เนื้อหมูชักนำให้ผลิตโพรทิเอส ลิพิดชักนำให้ผลิตไลเปส และผักชักนำให้ผลิตเซลลูเลส โดยสูตรที่ 1 (F1) และสูตรที่ 4 (F4) ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด ในขณะที่สูตรที่ 2 (F2) และสูตรที่ 3 (F3) ให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและโพรทิเอสสูงสุด ตามลำดับ

เมื่อทราบว่าเอนไซม์ต่าง ๆ ที่แบคทีเรียผลิตได้เป็นเอนไซม์ที่เกิดจากการชักนำด้วยสารอาหาร จึงควรติดตามกิจกรรมของเอนไซม์อื่น ๆ ที่มีต่อซับสเทรตอื่น ๆ เช่น เปลือกกุ้งเปลือกปู อาจชักนำให้ผลิตไคทิเนส นอกจากนี้ควรติดตามการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ต่าง ๆ เพื่อแยกประเภทของจุลินทรีย์ เช่น ยีสต์ และรา เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ ต่อไป

ตาราง 1 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เกิดขึ้นในน้ำหมักชีวภาพในวันที่ 3 ของการศึกษา

สูตรน้ำหมักชีวภาพ	ปริมาณแบคทีเรีย (cfu/mL)*
F1	8.1×10^4
F2	3.3×10^7
F3	4.6×10^9
F4	5.2×10^{10}

หมายเหตุ *ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดได้จากการทดลอง 3 ซ้ำที่เป็นอิสระต่อกัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

กองเกษตรเคมี. (2545). **ฮอร์โมนพืชและธาตุอาหารพืชในน้ำหมักชีวภาพ**. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ชัยศาสตร์ คเชนทร์สุวรรณ กนกวรรณ โกมลกิตติกานต์ และสุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. (2551, ตุลาคม). การตรวจสอบแอคทิวิทีของไลเปสในผลไม้. **การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 34**. ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพฯ.

ชัยศาสตร์ คเชนทร์สุวรรณ กนกวรรณ โกมลกิตติกานต์ สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ สุภาภรณ์ ศิริโสภณา และสมเกียรติ

พรพิสุทธิมาศ. (2552, มีนาคม). การตรวจหาแหล่งผลิตไลเปสที่ดีที่สุดในสับปะรด. **การประชุมวิชาการศรีนครินทรโรฒวิชาการ ครั้งที่ 32** (หน้า 141–146). มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ.

บุญนิธิ คัสกุล นงลักษณ์ มีแก้ว ศิริรัตน์ ก่ำวีเขียว สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ สุภาภรณ์ ศิริโภณา และ สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ. (2554). การติดตามการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทำน้ำหมักชีวภาพ 7 สูตรต่อการงอกของถั่วเขียว (*Vigna radiata* L.). **วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้** 2(1): 22–29.

ภาวณา ลิกขนานนท์. (2543). น้ำสกัดชีวภาพ-ปุ๋ยชีวภาพคืออะไรและได้ผลคุ้มค่าเพียงใด. **วารสารเคหการเกษตร** 24: 173–181.

เยาวพา จิระเกียรติกุล. (2547). **ผลของน้ำสกัดชีวภาพที่มีต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของคะน้าในระบบการปลูกพืชแบบไร้ดิน**. รายงานการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี.

รุศมา มฤบดี วีณารัตน์ มูลรัตน์ อรรถกร พรมวี และสมชาย ชคตระการ. (2551). ผลของการใช้น้ำสกัดชีวภาพร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB–Pin–01 ชนิดสดที่มีต่อการเจริญเติบโตของผักโขมพันธุ์ผัก (*Anaranthus tricolor*). **วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร** 39(3 พิเศษ): 363–366.

ศิริรัตน์ ก่ำวีเขียว บุญนิธิ คัสกุล นงลักษณ์ มีแก้ว สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ สุภาภรณ์ ศิริโภณา และสมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ. (2554). ผลของน้ำหมักชีวภาพต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของถั่วเขียว (*Vigna radiata* L.). **วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้** 2(1): 30 – 39.

สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ สายสุณีย์ ลิ้มชูวงศ์ สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ และทิพวรรณ เหล่าหาโคตร. (2552, ตุลาคม). ผลของน้ำหมักชีวภาพต่อการเจริญเติบโตของพืชวงศ์ถั่ว. **การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 35**. มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี.

สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ. (2552, กรกฎาคม). ผลการใช้น้ำหมักชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของราก่อโรค *Phytophthora* spp. บนต้นยางพารา. **การประชุมวิชาการ นเรศวรวิจัย ครั้งที่ 5.** มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.

สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ (2552). มหัศจรรย์เอนไซม์. **เอกสารประกอบโครงการพัฒนาความรู้ด้านวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ในโรงเรียนเครือข่ายคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ระยะที่ 1: โครงงานวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ไม่ยากอย่างที่คิดเมื่อร่วมคิดอย่างยั่งยืน**. กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ สุภาภรณ์ ศิริโสภณา สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ สุดารัตน์ แซ่ลิ้ม และรสสุคนธ์ พลีทั้งกาย. (2551). การศึกษาการตรวจวัดแอคติวิตีของโปรติเอสจากผักในห้องเรียนระดับปริญญาตรี. **การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 34**. ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพฯ.

สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ สุภาภรณ์ ศิริโสภณา สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ สุวิภา ภูหัวไร่ และพรพรรณ อัตภิญโญ. (2552). **การตรวจหาแอคทิวิทีของเซลลูเลสโดยใช้วุ้นสวรรค์เป็นซับสเทรต. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 35**. มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี.

อภิญญาณ บุญประกอบกุล สมบัติ คงวิทยา เกรียงศักดิ์ ไชยโรจน์ วุฒินันท์ รักษาจิตร์ สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ และสุรินทร์ เทพสวัสดิ์. (2549). การตรวจหาแอคทิวิที**ของโปรติเอสในผลไม้. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 32**. ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพฯ.

อรรถ บุญนิธี. (2544, พฤกษภาคม). **เอกสารประกอบคำอภิปรายในการสัมมนาเรื่อง การผลิตและการใช้น้ำสกัดชีวภาพ**. จัดโดย โครงการพัฒนาการเกษตรยั่งยืน สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6. โรงแรม เค พี แกรนด์ จันทบุรี.

Aguilar, M. L., Espadas, F., Maust, B., and Sáenz, L. (2009). Endogenous cytokinin content in coconut palms affected by lethal yellowing. **J. Plant Pathol.** 91(1): 141–146.

Laloknam, S., Sirisopana, S., and Phornphisutthimas, S. (2007, November). A simple detection of protease activity from fruits in undergraduate classroom. **ICASE Asian Symposium 2007: Science Education for All: Towards Sustainable Development Regardless of Resource**, Pattaya, Thailand.

Laloknam, S., Sirisopana, S., and Phornphisutthimas, S. (2010). Learning retention in undergraduate biology using a hands-on practical “Enzyme detection from vegetables and fruits”. **J. Chem. Chem. Eng.** 4(5): 29–35.

Laloknam, S., Sirisopana, S., Attaphinyo, P., Poohuarai, S. and Phornphisutthimas, S. (2009). Detection of amylase activity from fruit and vegetables in an undergraduate classroom. **As. J. Food Ag-Ind.** 2(2): 402–411.

Noisopa, C., Prapagdee, B., Navanugraha, C., and Hutacharoen, R. (2010). Effects of Bio-extracts on the growth of Chinese kale. **Kasetsart J. (Nat. Sci.).** 44: 808–815.