sent for protein identification at NSTDA by LC-MS/MS technique. 33 spots were identifiable. Most were identified as enzyme concerning basic metabolic processes. No spot was able to be defined as amylase enzyme. 2D-PAGE amylase activity showed 3 clear spots at about 40 kDa on the gel. They were identified as granule-bound starch synthase. This enzyme catalyzes starch synthesis. However, in the reversed reaction, we predicted that it can break starch down into sugar resulting in clear zone of the test. For Nhamdokmai mango with 6.8% of starch and 134 mM of reducing sugar, SDS-PAGE analysis showed protein band about 40-60 kDa. Amylase activity gel staining showed clear band at about 40 kDa. After 2D-PAGE analysis, ten major spots (MI 1-10) had been analyzed for partial amino acid sequences by LC-MS/MS technique. Five spots were identified as glutathione-S-transferase ,heat-shock protein, S-adenosylhomocystein hydrolase and phosphopyruvate hydratase. For sapodilla with 10.90% of starch and 12.7 mM of reducing sugars, SDS-PAGE analysis showed many of protein bands. The activity gel staining showed clear band about 40 kDa. Proteomic pattern of ripening sapodilla was analyzed by 2D-PAGE. 33 from 51 spots were identifiable. Most expressed proteins were basic metabolism concerning. Although one glycoside hydrolase, beta-1,3-glucanase, had been identified. Amylase is still mysterious.

For Monthong durians with 1.10% starch of durian pulp and 134 mM reducing sugar, protein bands between 28-97 kDa were found after SDS-PAGE analysis. Clear transparent band exhibited at 45 kDa by gel zymographic method. 2D-PAGE and LC-MS/MS clarified 31 from 40 spots. After grouping, they concerned in carbohydrate, protein and lipid metabolism. Some are predicted to be involved in secondary metabolism, ripening process, antioxidative stage and cell wall hydrolysis. In this study, although we found some glycoside hydrolase, amylase are still unfound, possibly from low expression of protein with low resolution on 7 cm IPG dry strip. Ohterwise, study in depth of these glycoside hydrolase will provide us more usable enzyme for converting starch into sugar, as well.

161.การแยกและการศึกษาลักษณะของโปรตีนและเพปไทด์ในน้ำหมักชีวภาพจากผลไม้

(Isolation and characterization of protein and peptides in fruit biofertilizer)

ผู้วิจัย สมพร เกษแก้ว

ปีที่ได้ทุน 2552

การแสดงออกของโปรตีนหรือเพปไทด์ในระหว่างการหมักของน้ำหมักผลไม้ โดยใช้ผักผลไม้ที่หาได้ในท้องถิ่นจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ สับปะรด มะละกอ แตงโม กล้วย ฟักทอง มะเขือเทศ ผักกาดขาวและแตงกวา โดยใช้ในอัตราส่วนน้ำหนักที่เท่ากัน ทำการหมัก เป็นเวลา 50 วัน ทุก 10 วันจะทำการตรวจสอบลักษณะทางเคมีและกายภาพ และเก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อนำมาศึกษาการแสดงออก ของโปรตีนและตรวจสอบกิจกรรมต่างๆของโปรตีน ผลการทดลองพบว่า น้ำหมักมีค่า pH ประมาณ 4 มีแก๊ซและแอลกอฮอล์เกิดขึ้นและเกิดขึ้นมากในช่วงการหมัก 30 วัน น้ำหมักมีสีน้ำตาลแดงเข้ม มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยวและ นอกจากนี้ยังพบว่ามีราที่มีสีเขียว ราขาวและหนอนเกิดขึ้นในน้ำหมักด้วย เมื่อทำการตรวจสอบกรดอะมิโนหรือเพปไทด์สายสั้นๆในน้ำหมักด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบกระดาษและติดตาม ผลด้วยสารละลาย Ninhydrin พบว่ามีกรดอะมิโน หรือเพปไทด์สายสั้นๆเป็นองค์ประกอบ เมื่อ ตรวจสอบปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford พบว่าช่วงระยะเวลาแรกๆของการหมักตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงระยะการหมักครบ 30 วันมีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นและจะเริ่มคงที่จนถึงระยะการหมักครบ 50 วัน การศึกษารูปแบบของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบการแสดงออกของโปรตีน 4 ชนิดตามขนาดโมเลกุล คือ 20,

25, 28 และ35 kDa ส่วนการศึกษากิจกรรมของโปรตีนในเบื้องต้นนี้จะตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ 3 กลุ่มคือ Amylase, Protease และ Ribonuclease (RNase) ด้วยวิธี Activity staining gel (refolding gel) ผลการทดลองพบกิจกรรมของเอนไซม์ protease ที่ตำแหน่งประมาณ 24, 25 และ35 kDa และพบกิจกรรมของเอนไซม์ RNase ที่ตำแหน่งประมาณ 20, 25 และ35 kDa ซึ่งปริมาณของ Protease มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณของ RNase มีแนวโน้มลดลงตามระยะการหมัก ส่วน Amylase แสดงผลของกิจกรรมไม่ชัดเจนในทุกระยะของการหมัก นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *B. megaterium*, *E .coli*, *Ps. aeruginosa* และ *S. aureus* ATCC25923 พบว่าน้ำหมักผลไม้ทุกระยะมีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 4 ชนิด แต่น้ำหมักชีวภาพที่เก็บตัวอย่างมาจากแหล่งต่างๆพบว่า สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้บางชนิดเท่านั้น สารที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อเหล่านี้อาจจะเป็นสารในกลุ่ม polyphenol และ peptides ต่างๆ โดยเฉพาะกลุ่ม antimicrobial peptides การ พบกิจกรรมของเอนไซม์ Protease และ RNase ที่ active ในน้ำหมักผลไม้ อาจเป็นไปได้ที่สารชีวโมเลกุลทั้งสองชนิดนี้จะมีบทบาทสำคัญในการกำหนดคุณภาพของน้ำหมัก จึงมีความน่าสนใจในการศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะด้านต่างๆต่อไป

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 agenst 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. Founding 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.

162.การคัดแยกและเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งขนมจีนในระดับอุตสาหกรรมชุมชนเพื่อการผลิตสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคพืชเศรษฐกิจ

(Screening and cultivation of bacteria using wastewater from local community Chinese noodle factories in the production of bioactive metabolites for the control of economical plant pathogenic fungi)

ผู้วิจัย ประสาท โพธิ์นิ่มแดง

ปีที่ได้ทุน 2552

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำเสียโรงงานผลิตแป้งขนมจีนระดับชุมชน พบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp.*lycopersici* (Fol) และ *Colletotrichum anthracnose* ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรคพืชเศรษฐกิจ ในระดับห้องปฏิบัติการ ในขั้นต้นสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีข้าวจ้าวเป็นแหล่งคาร์บอนได้จำนวน 250 ไอโซเลท เมื่อใช้เทคนิคของ dual culture technique ควบคู่กับ well diffusion technique สำหรับการตรวจวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช พบว่ามีเพียง 11 ไอโซเลท ที่สามารถแสดงกิจกรรมต้านการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. *sp.lycopersici* และมีเพียง 3 ไอโซเลท คือ isolate WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp.lycopersici และColletotrichum anthracnose ผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีและการหาค่า % similarity เทียบเคียงกับเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน *Bacillus lycheniformis*, *Bacillus polymyxa* และ *Bacillus subtilis* พบว่าเชื้อแบคทีเรีย isolate WWPB 25, WWPB 30 และ WWPB 76 ต่างก็เป็นแบคทีเรีย Gram positive มีการสร้าง endospores ภายในเซลล์ การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีและการคำนวณค่าทาง % similarity ของทั้ง 3 ไอโซเลตมีค่าเท่ากับ 91% เมื่อเทียบกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ผลการเทียบเคียงนี้สามารถคาดได้ว่า เชื้อแบคทีเรีย isolate WWPB 25,WWPB 30 และ WWPB 76 น่าจะเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน จึงควรถูกจัดให้อยู่ในสกุล (Genus)Bacillus และ specific epithet เป็น subtilis ด้านของการนำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่คัดแยกได้ใหม่ไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งขนมจีนระดับชุมชนในระดับห้องปฏิบัติการ ผลการตรวจวิเคราะห์ค่า Chemical Oxygen Demand (COD) ของน้ำเสียทั้งก่อนและหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (≈27-290C) เป็นเวลา 7 วัน มีความสามารถในการลดค่า COD ได้เพียง 68 เปอร์เซ็น หมายความว่ายังมีค่า COD เหลือในปริมาณสูงถึง 10,176 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับค่า COD ของน้ำเสียมาตรฐานระดับอุตสาหกรรม ซึ่งระบุว่ามีค่า COD ของน้ำทิ้งมีค่าสูงสุดต้องไม่เกิน 400 มิลลิกรัมต่อลิตร การบำบัดครั้งนี้จึงถือได้ว่ายังต้องมีการศึกษาความเป็นได้ต่อไป ทั้งด้านการใช้เชื้อแบคทเรียและเวลาการเพาะเลี้ยง

This study involved isolation of bacteria contaminated in starchy wastewater from local community Chinese noodle factories which was expected to possess the ability of producing secondary metabolites against the growth of economical plant pathogenic fungi such as *Fusarium oxysporum* f. sp.*lycopersici* (Fol) and *Colletotrichum anthracnose*. The isolation medium used was solely rice starch as carbon source with minimal dose of growth promoting ingredients, with the hope to produce antifungal substance controlling the spread of Fusarium *oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (FOL) and *Colletotrichum anthracnose* at laboratory level. At first instance 250 bacterial colonies were seen on Rice Starch Agar. Using