วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ปีที่ 29 ฉบับที่ 2 เม.ย.–มิ.ย. 2562
The Journal of KMUTNB., Vol. 29, No. 2, Apr.–Jun. 2019

บทความวิจัย

การกำจัดโปรตีนจากเปลือกกุ้งด้วยเอนไซม์ปาเปนและฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ของไคโตซาน

อภิรดี บุญคำ สุนิษา สุวรรณเจริญ และ พิมใจ สุวรรณวงค์*
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี
บุษยพรรณ บุณธรรม และ จุฑามาศ เงินดี
สาขาวิชาเคมี คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทรศัพท์ 0 3947 1060 ต่อ 28913 อีเมล: pimjai.s@rbru.ac.th DOI: 10.14416/j.kmutnb.2019.02.001
รับเมื่อ 20 สิงหาคม 2561 แก้ไขเมื่อ 23 พฤศจิกายน 2561 ตอบรับเมื่อ 30 พฤศจิกายน 2561 เผยแพร่ออนไลน์ 12 กุมภาพันธ์ 2562
© 2019 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

บทคัดย่อ

ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ได้จากการกำจัดหมู่อะซิติลซึ่งถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ อย่างแพร่หลาย รวมถึงการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคพืชเพื่อทดแทนการใช้สารเคมี งานวิจัยนี้เริ่มด้วยการเตรียมไคตินด้วยวิธีทางชีวภาพในขั้นตอนกำจัดโปรตีนเนื่องจากเป็นวิธีที่อันตรายน้อยกว่าการใช้สารเคมี และยังได้ไฮโดรไลเซตโปรตีนที่ไม่มีสารเคมีปนเปื้อนซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมโปรตีนของสัตว์ได้ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยคือหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดโปรตีนจากเปลือกกุ้งโดยใช้เอนไซม์ปาเปนเกรดการค้า และนำไคตินที่ได้มาเตรียมเป็นไคโตซานเพื่อนำไคโตซานมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวในพืชหลายชนิด ผลการวิจัยพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดโปรตีนคือ ที่พีเอช 8.0 อุณหภูมิ 40°ซ อัตราส่วนระหว่างเปลือกกุ้งต่อปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 1 กรัม : 1 ยูนิต เมื่อใช้เวลา 60 นาที ซึ่งให้ค่าร้อยละการกำจัดโปรตีนและแร่ธาตุเท่ากับ 63.54 ± 0.0171% และ 45.98% ตามลำดับ ไคโตซานมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *F. oxysporum* โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.762%w/v การวิจัยครั้งนี้ทำให้ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดโปรตีนจากเปลือกกุ้งโดยใช้เอนไซม์ปาเปน และได้ไคโตซานซึ่งเป็นตัวยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* ที่ดี

คำสำคัญ: เปลือกกุ้ง, วิธีสกัดไคติน, ไคติน, *Fusarium oxysporum*

การอ้างอิงบทความ: อภิรดี บุญคำ สุนิษา สุวรรณเจริญ พิมใจ สุวรรณวงค์ บุษยพรรณ บุณธรรม และ จุฑามาศ เงินดี, "การกำจัดโปรตีนจากเปลือกกุ้งด้วยเอนไซม์ปาเปนและฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ของไคโตซาน," *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ*, ปีที่ 29, ฉบับที่ 2, หน้า 282–291, เม.ย.–มิ.ย. 2562.

Research Article

Shrimp Shell Deproteinization by Using Papain and Antifungal of Chitosan Against *Fusarium oxysporum*

Aphiradee Boonkham, Sunisa Suwancharoen and Pimjai Suwannawong*
Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Rambhaibarni Rajabhat University, Chanthaburi, Thailand
Busayaphan Buntham and Juthamart Nguendee
Department of Chemistry, Faculty of Technical Education, Rambhaibarni Rajabhat University, Chanthaburi, Thailand

* Corresponding Author, Tel. 0 3947 1060 Ext. 28913, E–mail: pimjai.s@rbru.ac.th DOI: 10.14416/j.kmutnb.2019.02.001
Received 20 August 2018; Revised 23 November 2018; Accepted 30 November 2018; Published online: 12 February 2019
© 2019 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

Abstract

Chitosan is a deacetylation chitin derivative widely used in various fields. It is also used as a fungicide instead of a chemical substance. This study started with chitin preparation using a biological method in deproteinization process. This method is less harmful than other chemical one, and also obtains Hydrolysate, a protein with no chemical contamination, which can be used as a protein source for animals. The aim of this study was to define the optimal conditions for deproteinization of shrimp shells using commercial papain. The chitin product was used for chitosan preparation and then, the chitosan was tested for antifungal activity against *F. oxysporum*, which is the cause of Fusarium wilt disease in many plants. The results showed that the optimal conditions for deproteinization were pH 8.0, a temperature of 40°C and the ratio of shrimp shell to papain was 1 gram : 1 unit. Within 60 minutes, the percentage of deproteinization and demineralization was achieved 63.54 ± 0.0171% and 45.98%, respectively. The chitosan from shrimp shells exhibited *F. oxysporum* inhibitory activity with IC_{50} value of 0.762% w/v. This research obtained the optimal conditions for deproteinization of shrimp shell using papain and the chitosan which is a good inhibitor for *F. oxysporum*.

Keywords: Shrimp Shells, Chitin Extraction, Chitin, *Fusarium oxysporum*

Please cite this article as: A. Boonkham, S. Suwancharoen, P. Suwannawong, B. buntham, and J. Nguendee, "Shrimp shell deproteinization by using papain and antifungal of chitosan against *Fusarium oxysporum*," *The Journal of KMUTNB*, vol. 29, no. 2, pp. 282–291, Apr.–Jun. 2019 (in Thai).

1. บทนำ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมกุ้งไทยมีการขยายตัวเป็นอย่างมาก โดยพบว่ามีกุ้งป้อนเข้าโรงงานถึงปีละ 180,000 ตัน ซึ่งมีส่วนที่เป็นเปลือกกุ้งและหัวกุ้งมากถึง 90,000 ตัน [1] เปลือกและหัวกุ้งเหล่านี้ถูกนำไปบดผสมเป็นอาหารสัตว์ราคาถูก และมีบางส่วนถูกทิ้งให้เน่าเสีย ซึ่งในเปลือกกุ้งมีองค์ประกอบทางเคมีที่น่าสนใจ เช่น ไคติน และโปรตีน [2] ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากกว่าการปล่อยทิ้งให้เน่าเสียสร้างมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม หรือการทำเป็นอาหารสัตว์ราคาถูก โดยเฉพาะไคตินซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไคโตซานสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ อย่างแพร่หลาย เช่น ด้านเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมสิ่งทอ ด้านการเกษตร หรือด้านการแพทย์ [3], [4]

ไคตินเป็นพอลิเมอร์ที่เกิดจากโมเลกุลของ *N*-acetyl-*D*-glucosamine มาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-glycosidic และเมื่อทำการกำจัดหมู่อะซิติล (Deacetylation) ออกจากโมเลกุลของไคตินจะได้เป็นไคโตซาน ซึ่งหน่วยย่อยจะเปลี่ยนจาก *N*-acetyl-*D*-glucosamine เป็น *D*-glucosamine จากรายงานวิจัยพบว่าไคโตซานและโอลิโกไคโตซานมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ไม่ว่าจะเป็นฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ยับยั้งแบคทีเรีย ต้านอนุมูลอิสระ [5], [6] หรือยับยั้งเชื้อรา [7] ดังนั้นจึงทำให้ไคโตซานถูกนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ อย่างหลากหลาย [3], [4] รวมถึงด้านการเกษตรซึ่งใช้ไคโตซานทดแทนสารเคมีทางการเกษตรเพื่อควบคุมโรคพืช เนื่องจากไคโตซานมีความเป็นพิษต่อเชื้อเซลล์ของแบคทีเรีย ไวรัส และราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช [8] รวมถึงเชื้อรา *F. oxysporum* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคเหี่ยว หรือโรคตายพราย (Fusarium wilt Disease) ในพืชหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็น กล้วย พริก มะละกอ มะเขือเทศ ขิง แตงโม แตงกวา โดยเฉพาะกล้วยไข่ ซึ่งชาวสวนจังหวัดจันทบุรีนิยมปลูกเพื่อส่งออก โดยกล้วยที่ติดเชื้อรา *F. oxysporum* จะถูกทำลายรากและท่อลำเลียงของพืช ส่งผลให้ใบพืชเหี่ยว หยุดการเจริญเติบโตและตายในที่สุด ถ้าเป็นกล้วยที่ตกเครือแล้ว ผลจะลีบเล็กไม่สม่ำเสมอ หรือแก่ก่อนกำหนด [9] ทั้งนี้มีรายงานวิจัยพบว่าไคโตซานสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *F. oxysporum* ในพืชชนิดต่างๆ ได้ [10]–[12] อีกทั้งยังลดความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภคอีกด้วย

การเตรียมไคตินเพื่อนำไปผลิตเป็นไคโตซานประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนการกำจัดแร่ธาตุ (Deminerization) ขั้นตอนการกำจัดโปรตีน (Deproteinization) และขั้นตอนการฟอกสี (Decolorization) [4] ซึ่งในขั้นตอนการกำจัดโปรตีนนั้นสามารถทำได้ 2 วิธีคือ 1) วิธีทางเคมี โดยการใช้สารเคมี เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งมีข้อเสียคือไม่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และไคตินที่ได้มีสมบัติทางกายภาพไม่ตรงตามต้องการ [13] และ 2) วิธีทางชีวภาพ โดยการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ [14] หรือใช้เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบจากเชื้อจุลินทรีย์ [5], [15]–[17] หรือใช้เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ เช่น เอนไซม์อะคาเลส (Alcalase) แพนครีเอติน (Pancreatin) ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) โบรมิเลน (Bromelain) และปาเปน (Papain) [15], [18] ซึ่งวิธีทางชีวภาพนี้จะมีความปลอดภัยมากกว่า นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์พลอยได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของโปรตีนคือไฮโดรไลเซตโปรตีนที่มีเพปไทด์และกรดอะมิโนที่มีประโยชน์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีความปลอดภัยจากการปนเปื้อนของสารเคมีมากกว่าวิธีทางเคมี [19] และยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ [17], [18], [20] ทำให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหรือใช้เป็นแหล่งเสริมโปรตีนได้ แต่เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์มีราคาแพงทำให้วิธีนี้ใช้ต้นทุนในการผลิตสูง

คณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นความสำคัญของการนำเปลือกกุ้งเหลือทิ้งมาใช้ประโยชน์ในการผลิตไคติน โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสที่มีราคาไม่แพงซึ่งได้แก่เอนไซม์ปาเปน ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดโปรตีนจากเปลือกกุ้งขาวโดยใช้เอนไซม์ปาเปน จากนั้นนำไคตินที่ได้มากำจัดหมู่อะซิติลเพื่อให้ได้ไคโตซานและทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* ของไคโตซานที่ได้

2. วิธีการวิจัย

2.1 การเตรียมเปลือกกุ้ง

เก็บเปลือกกุ้งขาวจากร้านอาหารภายในโรงอาหารของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพรรณี ล้างน้ำให้สะอาดผึ่งให้สะเด็ดน้ำ

และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นบดและใช้ตะแกรงร่อนเอาเฉพาะเปลือกกุ้งที่มีขนาด 0.30–0.60 มม.

2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกำจัดโปรตีนจากเปลือกกุ้ง

การกำจัดโปรตีนจากเปลือกกุ้งโดยเอนไซม์ปาเปน (เกรดอาหาร บริษัท Remeddies PVT. Limited ประเทศอินเดีย) วัดกิจกรรมเอนไซม์โดยใช้เคซีน (Casein) เป็นสับสเตรท โดยดัดแปลงจากวิธีของ Cupp-Enyard [21] ศึกษาการกำจัดโปรตีนที่ระยะเวลา 60 นาที เพื่อดูประสิทธิภาพการกำจัดโปรตีนเมื่อใช้เวลาน้อยกว่าวิจัยอื่นๆ ที่รายงานไว้ [5], [15], [16] จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที กรองแยกไคตินออกจากส่วนสารละลายโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 และล้างไคตินที่ได้ด้วยน้ำกลั่น 3 รอบ ก่อนนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°ซ ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

2.2.1 ผลของอุณหภูมิต่อการกำจัดโปรตีน

ศึกษาการกำจัดโปรตีนที่อุณหภูมิต่างๆ ให้สอดคล้องกับรายงานวิจัยก่อนหน้า [5], [22], [23] ได้แก่ ที่อุณหภูมิ 30°ซ, 40°ซ และ 50 °ซ โดยใช้อัตราส่วนเปลือกกุ้ง : เอนไซม์ เท่ากับ 1 ก. : 1 ยูนิต ในสารละลาย 0.05 โมล Tris-HCl buffer ปริมาตร 20 มล. จากนั้นปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 8.0 สำหรับชุดควบคุมทำเช่นเดียวกันแต่ไม่ใส่เอนไซม์

2.2.2 ผลของพีเอชต่อการกำจัดโปรตีน

ศึกษาการกำจัดโปรตีนที่อุณหภูมิ 40°ซ โดยใช้อัตราส่วนเปลือกกุ้ง : เอนไซม์ เท่ากับ 1 ก. : 1 ยูนิต ในสารละลาย 0.05 โมล Tris-HCl buffer ปริมาตร 20 มล. จากนั้นปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 6.0, 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ ซึ่งเป็นช่วงพีเอชที่มีรายงานว่าเอนไซม์ โปรติเอสสามารถกำจัดโปรตีนได้ดี [22]–[24] สำหรับชุดควบคุมทำเช่นเดียวกันแต่ไม่ใส่เอนไซม์

2.2.3 ผลของอัตราส่วนระหว่างเปลือกกุ้งกับปริมาณเอนไซม์ต่อการกำจัดโปรตีน

ศึกษาการกำจัดโปรตีน ที่อุณหภูมิ 40°ซ โดยใช้อัตราส่วนเปลือกกุ้ง : เอนไซม์ เท่ากับ 1 ก. : 0.5 U, 1 ก. : 1 ยูนิต และ 1 ก. : 2 ยูนิต ในสารละลาย 0.05 โมล Tris-HCl buffer ปริมาตร 20 มล. จากนั้นปรับพีเอชให้เท่ากับ 8.0 สำหรับชุดควบคุมทำเช่นเดียวกันแต่ไม่ใส่เอนไซม์

2.2.4 การวิเคราะห์ร้อยละการกำจัดโปรตีน

นำส่วนของเหลวที่ได้จากการกรองแยกไคตินในชุดทดสอบ และชุดควบคุมมาทำการวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford Assay) [25] โดยใช้โปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน คำนวณร้อยละการกำจัดโปรตีน (% Deproteinization) ตามสมการที่ (1) โดยคำนวณจากการทดลองทั้ง 3 ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานด้วยโปรแกรม Excel

$$\%DPP = [(P_R \times R) - (P_O \times O)] \times 100 / (P_O \times O) \quad (1)$$

เมื่อ P_O และ P_R คือ ปริมาณโปรตีน (มก./มล.) ของชุดควบคุมและชุดทดสอบ ตามลำดับ

O และ R คือ น้ำหนัก (ก.) เปลือกกุ้งของชุดควบคุมและชุดทดสอบ ตามลำดับ

2.2.5 การวิเคราะห์หาค่าร้อยละการกำจัดแร่ธาตุ

นำไคตินที่ได้มาวิเคราะห์หาร้อยละการกำจัดแร่ธาตุด้วยวิธีของ AOAC (2000) จากสูตรดังสมการที่ (2)

$$\%DM = (W_2 - W_1) \times 100 / \text{น้ำหนักตัวอย่าง (ก.)} \quad (2)$$

W_2 คือ น้ำหนักถ้วยรวมกับน้ำหนักตัวอย่างหลังการเผา

W_1 คือ น้ำหนักถ้วยเปล่าและฝา

2.3 การกำจัดหมู่อะซิทิล (*N*-deacetylation)

นำไคตินที่ได้จากกระบวนการกำจัดโปรตีนมากำจัดหมู่อะซิทิลโดยดัดแปลงจากวิธีของ Sutheera และ Suthida [26] โดยใช้ 40% w/v NaOH ปริมาตร 100 มล. ต่อไคติน 1 ก. ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นให้พีเอชเป็นกลางและอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°ซ

2.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธี Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

บดตัวอย่างเปลือกกุ้ง ไคติน หรือไคโตซาน ผสมกับผงโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) ในอัตราส่วน 1 : 100 จากนั้นอัดให้เป็นแผ่นบางด้วยแท่นอัดไฮดรอลิกเพื่อวิเคราะห์หมู่

ฟังก์ชันด้วยเครื่อง FTIR (บริษัท Bruker รุ่น Alpha) วิเคราะห์สเปกตรัมช่วง 400–4,000 ซม.$^{-1}$ [27]

2.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum*

ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราตามวิธี Poisoned Food Technique [28] โดยเชื้อรา *F. oxysporum* รหัส DOAC 2269 ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิชาการเกษตรนำมาเลี้ยงในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) 7–15 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อต้นแบบ สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา ทำโดยเตรียมอาหารสูตรเดียวกันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 PSI เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารที่ได้มาผสมสารละลาย ไคโตซานหรือสารละลายแคปแทน (Captan) ซึ่งใช้เป็นสารควบคุมบวก (Positive Control) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 มก./มล. และปรับค่าพีเอชของอาหารให้เท่ากับ 7.0 ก่อนเทใส่จานเพาะเชื้อ สำหรับชุดควบคุม (Negative Control) ใช้สารละลายกรดอะซิติก 0.5% v/v แทนสารละลายไคโตซาน หลังจากอาหารแข็งตัวใช้แท่งเจาะรูเชื้อราขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. เจาะเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* จากจานเพาะเชื้อต้นแบบและนำไปวางลงบนผิวหน้าอาหารในจานเพาะเชื้อสำหรับทดสอบ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราเพื่อคำนวณหาร้อยละการยับยั้งดังสมการที่ (3)

$$\%\text{การยับยั้ง} = [(C - T)/T] \times 100 \quad (3)$$

C คือ รัศมีการเจริญเติบโตในชุดควบคุม

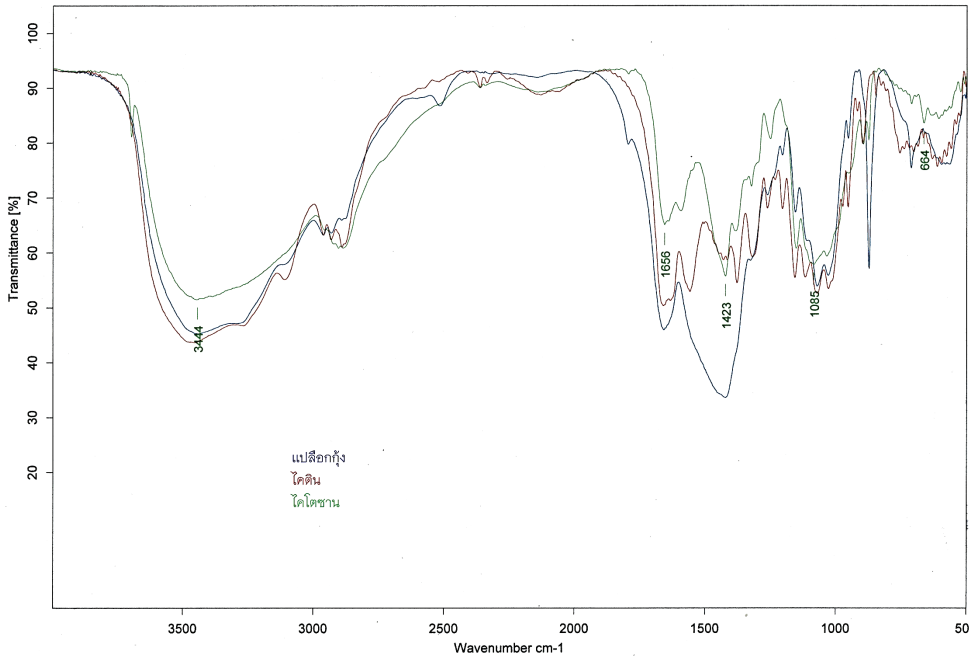
T คือ รัศมีการเจริญเติบโตในชุดทดสอบ

โดยข้อมูลที่ได้จากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ นำมาหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานด้วยโปรแกรม Excel

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

3.1 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดโปรตีนจากเปลือกกุ้ง

จากการศึกษาการกำจัดโปรตีนในกระบวนการเตรียมไคตินจากเปลือกกุ้งโดยใช้เอนไซม์ปาเปนเกรดการค้า ซึ่งมีราคาไม่แพงมากนัก อีกทั้งยังสามารถเตรียมได้จากยางมะละกอ [22] ซึ่งเป็นพืชที่ปลูกอย่างแพร่หลายทุกภูมิภาคของประเทศนั้น ได้ผลการวิจัยดังนี้ ผลของอุณหภูมิต่อการกำจัดโปรตีนจากเปลือกกุ้งด้วยเอนไซม์ปาเปนที่อุณหภูมิ 30°ซ, 40°ซ และ 50°ซ พบว่าที่อุณหภูมิ 40°ซ ให้ค่าร้อยละการกำจัดโปรตีนสูงกว่าอุณหภูมิ 30°ซ และ 50°ซ ซึ่งผลที่ได้เป็นไปตามทฤษฎีที่ว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นอัตราเร็วของปฏิกิริยาก็จะเพิ่มตาม แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ [29] การกำจัดโปรตีนจากเปลือกกุ้งที่พีเอช 6.0, 7.0 และ 8.0 ซึ่งเป็นช่วงที่มีรายงานว่าเอนไซม์โปรติเอสสามารถกำจัดโปรตีนในขั้นตอนการเตรียมไคตินได้ดี [22]–[24] ผลการวิจัยพบว่า ที่พีเอช 8.0 ให้ค่าร้อยละการกำจัดโปรตีนสูงที่สุด และอัตราส่วนระหว่างเปลือกกุ้งกับปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมคือ 1 ก. : 1 ยูนิต จากผลการวิจัยพบว่าที่สภาวะที่เหมาะสมเอนไซม์ปาเปนให้ค่าร้อยละการกำจัดโปรตีนสูงที่สุดคือ 63.54 ± 0.0171 % และไคตินที่ได้มีค่าร้อยละการกำจัดแร่ธาตุอยู่ในช่วง 36.52–45.98% (ดังตารางที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yuli *et al.* ที่ศึกษาการกำจัดโปรตีนจากเปลือกกุ้งโดยใช้เอนไซม์ปาเปนที่เตรียมจากยางมะละกอ พบว่าโปรตีนในเปลือกกุ้งลดลงจาก 44.78 ± 0.2% เหลือแค่ 11.95 ± 0.1% ภายในเวลา 72 ชั่วโมง [26] และเมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้กับงานวิจัยที่กำจัดโปรตีนจากเปลือกกุ้งโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสจากแหล่งอื่น เช่น เอนไซม์อะคาเลส และเอนไซม์โบรมิเลนบริสุทธิ์ ซึ่งให้ค่าร้อยละการกำจัดโปรตีนเท่ากับ 67 ± 3% และ 54 ± 3% ตามลำดับ ภายในเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อใช้เปลือกกุ้ง 20 มก. ต่อปริมาณเอนไซม์ 20 ยูนิต [15] และการใช้เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus Licheniformis* NH1 และ *Aspergillus Clavatus* ES1 ซึ่งให้ค่าร้อยละการกำจัดโปรตีนเท่ากับ 65 ± 3% และ 59 ± 3% ตามลำดับ และเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบจากเชื้อ *Bacillus Licheniformis* MP1, *Vibrio Metschnikovii* J1, *Bacillus Mojavensis* A21 และ *Bacillus Subtilis* A26 ให้ค่าร้อยละการกำจัดโปรตีนประมาณ 76 ± 4% เมื่อใช้เปลือกกุ้ง 20 มล. ต่อเอนไซม์ 20 ยูนิต



รูปที่ 1 สเปกตรัม FTIR ของ เปลือกกุ้ง ไคติน และไคโตซาน

และใช้เวลา 3 ชั่วโมง [5], [15], [16] แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ปาเปนซึ่งมีราคาไม่แพง หรือสามารถเตรียมได้ไม่ยากจากยางมะละกอ [25] สามารถกำจัดโปรตีนในขั้นตอนการเตรียมไคตินได้ดีไม่ด้อยไปกว่ากับเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ หรือเอนไซม์โปรติเอส สกัดหยาบจากเชื้อจุลินทรีย์

ตารางที่ 1 ร้อยละการกำจัดโปรตีน (% DDP) และแร่ธาตุ (% DM) ที่สภาวะต่างๆ

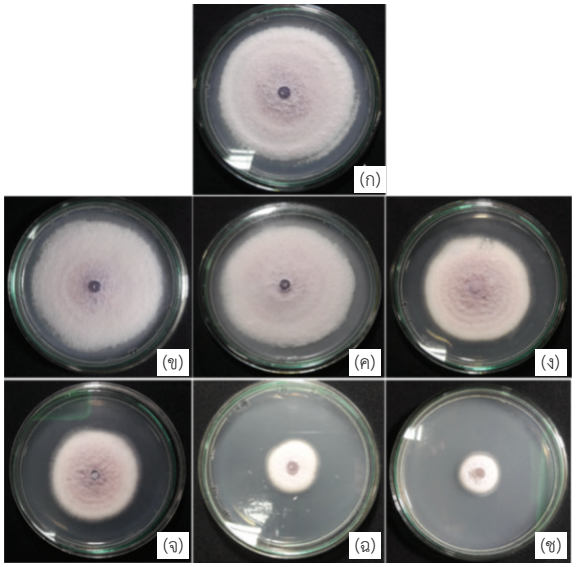
ตัวแปร	สภาวะ	% DDP	% DM
พีเอช	6	48.65 ± 0.0024	37.53
	7	51.54 ± 0.0017	39.88
	8	58.68 ± 0.0036	41.13
อุณหภูมิ (°ซ)	30	41.36 ± 0.0163	39.00
	40	58.73 ± 0.0193	40.34
	50	35.17 ± 0.0083	38.90
อัตราส่วน (ก./ยูนิต)	1 : 0.5	35.73 ± 0.0049	38.50
	1 : 1	63.54 ± 0.0171	45.98
	1 : 2	55.67 ± 0.0205	36.52

3.2 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธี Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

โดยทั่วไปโครงสร้างของไคตินจะมีหมู่อะซิติล (*N*-acetyl group : $NHC=OCH_3$) เป็นหมู่ฟังก์ชันซึ่งประกอบด้วยพันธะ N-H, C-H, C=O และ C-N เมื่อกำจัดหมู่อะซิติลออกจะได้ไคโตซานที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่อะมิโน (Amino group : $-NH_2$) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลการวิเคราะห์ด้วย FTIR พบว่าที่เลขคลื่น 1656.0 (C=O) ของไคโตซานจะลดลงเมื่อเทียบกับไคตินที่ได้จากขั้นตอนการกำจัดไคตินจากเปลือกกุ้ง (ดังรูปที่ 1) แสดงให้เห็นว่าไคตินถูกเปลี่ยนเป็นไคโตซานบางส่วน

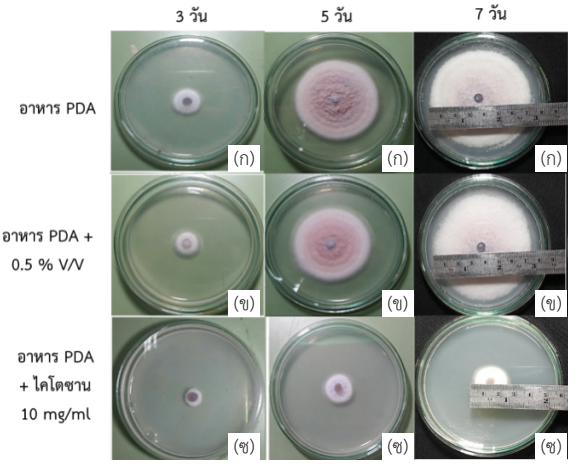
3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum*

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* ของไคโตซานที่ได้จากการนำไคตินที่ผ่านการกำจัดโปรตีนด้วยเอนไซม์ปาเปนมากำจัดหมู่อะซิติล พบว่าไคโตซานที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *F. oxysporum* ได้ดี ทั้งนี้เมื่อความเข้มข้นของสารไคโตซานเพิ่มขึ้นความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก็จะเพิ่มตาม โดยที่ความเข้มข้น 10 มก./มล. สามารถยับยั้ง



รูปที่ 2 การเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ในอาหาร PDA (ก), PDA ผสมกับกรดอะซิติก 0.5 %v/v (ข) และอาหาร PDA ผสมไคโตซานที่เข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 มก./มล. ตามลำดับ (ค–ช) ที่ระยะเวลา 7 วัน

เชื้อราได้ 71.71 ± 0.108% และที่ความเข้มข้น 7.62 มก./มล. ไคโตซานสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ 50% (IC_{50}) ในขณะที่แคปแทนซึ่งเป็นสารเคมีกำจัดเชื้อราที่เกษตรกรนิยมใช้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่าไคโตซาน โดยสามารถยับยั้งได้ถึง 80.16 ± 0.014% เมื่อใช้ความเข้มข้นเพียง 2 มก./มล. (ดังตารางที่ 2 และรูปที่ 2) และจากรูปที่ 3 จะเห็นว่าไคโตซานที่ความเข้มข้น 10 มก./มล. สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้อย่างชัดเจนตั้งแต่วันที่ 3 และสามารถยับยั้งได้มากกว่า 50% ภายในวันที่ 5 ของการเพาะเชื้อ ทั้งนี้ผลการวิจัยที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Younes *et al.* ซึ่งพบว่าไคโตซานจากเปลือกกุ้งที่ผ่านการกำจัดโปรตีนโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบจากแบคทีเรีย *Bacillus mojavensis* A21 สามารถยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum*, *F. solani* และ *Fusarium* sp. ได้ดีโดยที่ความเข้มข้น 50 มก./มล. ให้รัศมีการของยับยั้งเท่ากับ 13.0 ± 0.5, 17.0 ± 0.5 และ 14.0 ± 0.3 มม. ตามลำดับ และยังพบว่าไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าจะสามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่า [5] ในขณะที่



รูปที่ 3 การเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลา 3, 5 และ 7 วัน

ไคโตซานบริสุทธิ์จากเปลือกกุ้งที่ความเข้มข้น 15 มก./มล. สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* ได้ 100% โดยใช้ระยะเวลา 10 วัน [7] เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Al-Hetar *et al.* ที่พบว่าไคโตซานบริสุทธิ์จากเปลือกกุ้งสามารถยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. cubense. ซึ่งเป็นราที่ก่อโรคในกล้วยได้สูงสุด 76.36 ± 1.79% โดยใช้ความเข้มข้นของไคโตซานเท่ากับ 8 มก./มล. [11] แสดงให้เห็นว่าไคโตซานจากเปลือกกุ้งที่ผ่านการกำจัดโปรตีนด้วยวิธีชีวภาพในงานวิจัยนี้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้ดีเช่นเดียวกับไคโตซานบริสุทธิ์ที่มีราคาแพง

ตารางที่ 2 ร้อยละการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* ของไคโตซานเทียบกับแคปเทนที่เวลา 7 วัน

ความเข้มข้น (มก./มล.)	ร้อยละการยับยั้งเชื้อรา (%)	
	ไคโตซาน	แคปเทน
2	2.76 ± 0.0928	80.16 ± 0.014
4	18.95 ± 0.177	81.34 ± 0.004
6	30.79 ± 0.261	84.76 ± 0.047
8	59.47 ± 0.038	89.36 ± 0.012
10	71.71 ± 0.108	100 ± 0.000

4. สรุป

การกำจัดโปรตีนจากเปลือกกุ้งโดยใช้เอนไซม์ปาเปนมีสภาวะที่เหมาะสมคือที่พีเอช 8.0 อุณหภูมิ 40°ซ โดยใช้อัตราส่วนเปลือกกุ้ง : เอนไซม์ เท่ากับ 1 ก. : 1 ยูนิต พบว่าที่เวลา 60 นาที ให้ค่าร้อยละการกำจัดโปรตีนและแร่ธาตุสูงสุดเท่ากับ 63.54 และ 45.98% ตามลำดับ และไคโตซานที่ได้จากการนำไคตินมากำจัดหมู่อะซิติลมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* ได้ดีโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.762% w/v จากผลการวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปต่อยอดเพื่อเตรียมและศึกษาสมบัติทางชีวภาพของไฮโดรไลเซทโปรตีนจากเปลือกกุ้งโดยใช้เอนไซม์ปาเปนอันจะนำไปสู่การเปลี่ยนเปลือกกุ้งซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมให้เป็นแหล่งเสริมโปรตีนสำหรับสัตว์ต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยงบสนับสนุนการวิจัย กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ประจำปีงบประมาณ 2558 รวมทั้งขอขอบคุณบุคคลากรคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทุกท่านที่เอื้ออำนวยการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จได้ด้วยดี และขอขอบคุณคุณปพิชญา กองจินดา ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมเกษตรสร้างสรรค์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อรา *F. oxysporum*

เอกสารอ้างอิง

[1] The Agricultural Research Development Agency (Public Oganization). (2018, November). Shrimp. The Agricultural Research Development Agency. Bangkok, Thailand [Online]. Available: http://www.arda.or.th/kasetinfo/south/shrimp/used/01-02.php

[2] S. kongthong, "Chitin-chitosan," *Journal of Industrial Education*, vol. 3, no. 1, pp. 1–7, 2009.

[3] P. K. Dutta, J. Dutta, and V. S. Tripathi, "Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications," *Journal of Scientific and Industrial Research*, vol. 63, pp. 20–31, 2004.

[4] S. Pokhrel, P. NathYadav, and R. Adhikari, "Applications of chitin and chitosan in industry and medical science: A review," *Nepal Journal of Science and Technology*, vol. 16, no. 1, pp. 99–104, 2015.

[5] I. Younes, S. Hajji, V. Frachet, M. Rinaudo, K. Jelloulia, and M. Nasria, "Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment, antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 69, pp. 489–498, 2014.

[6] M. S. Benhabiles, R. Salah, H. Lounici, N. Drouiche, M. F. A. Goosen, and N. Mameri, "Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste," *Food Hydrocolloids*, vol. 29, pp. 48–56, 2012.

[7] S. Bautista-Baños and M. Hernández-López, "Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts," *Maxical Journal of Phytopatology*, vol. 22, pp. 178–186, 2004.

[8] A. E. Hadrami, L. R. Adam, I. E. Hadrami, and F. Daayf, "Chitosan in plant protection," *Marine Drugs*, vol. 8, pp. 968–987, 2010.

[9] Department of Argiculture. (2016, Febuary). Fusarium Oxysporum, cause of Fusarium wilt in plants. Department of Argiculture. Bangkok, Thailand [Online] Available: http://www.doa.go.th/share/attachment.php?aid=1213

[10] N. Benhamou, "Ultrastructure and cytochemical aspects of chitosan on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices lycopersici*, agent of tomato crow and

root rot," *Phytopathology*, vol. 82, pp. 1185–1193, 1992.

[11] M. Y. Al-Hetar, M. A. ZainalAbidin, M. Sariah, and M. Y. Wong, "Antifungal activity of chitosanagainst *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 120, pp. 2434–2439, 2011.

[12] A. A. Bell, J. C. Hubbard, and L. Liu, "Effects of chitin and chitosan on the incidence and severity of Fusarium yellows of celery," *Plant Disease*, vol. 82. no. 3, pp. 322–328, 1998.

[13] C. J. Brine and P. R. Austin, "Chitin variability with species and method of preparation," *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry*, vol. 69, no. 2, pp. 283–286, 1981.

[14] TK. Sini, S. Santhosh, and P. T. Mathew, "Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation," *Carbohydrate Research*, vol. 342, no. 16, pp. 2423–2429, 2007.

[15] I. Younes, O. Ghorbel-Bellaaj, R. Nasri, M. Chaabouni, M. Rinaudo, and M. Nasri, "Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization," *Process Biochemistry*, vol. 47, no. 12, pp. 2032–2039, 2012.

[16] I. Younesa, S. Hajji, M. Rinaudo, M. Chaabouni, K. Jellouli, and M. Nasri, "Optimization of proteins and minerals removal from shrimp shells to produce highly acetylated chitin," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 84, pp. 246–253, 2016.

[17] H. He, X. Chen, C. Sun, Y. Zhang, and P. Gao, "Preparation and functional evaluation ofoligopeptide-enriched hydrolysate from shrimp (*Acetes chinensis*) treated with crude protease from *Bacillus* sp. SM98011," *Bioresource Technology*, vol. 97, no. 3, pp. 385–390, 2006.

[18] H. D. Holanda and F. Netto, "Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis," *Journal of Food Science*, vol. 71, no. 5, pp. 298–303, 2006.

[19] J. G. dos Santos Aguilar and H. H. Sato, "Microbial proteases: Production and application in obtaining proteinhydrolysates," *Food Research International*, vol. 103, pp. 253–262, 2018.

[20] G. H. Jo, R. D. Park, and W. J. Jung, "Enzymatic production of chitin from crustacean shell waste," in *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives*, London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2011, pp. 37–45.

[21] C. Cupp-Enyard, "Sigma's non-specific protease activity assay-casein as a substrate," *Journal of Visualized Experiments*, vol. 19, pp. 899, 2008.

[22] Y. Rohyami, R. B. Istiningrum, and I. Sulistyaningrum, "Preparation of chitin from shrimp shells by papain latex (*Carica papaya*)," in *proceeding of International Conference on Research*, Implementation and Education of Mathematics and Sciences, Yogyakarta State University, 2014, pp. C259–C265.

[23] A. Gopalakannan, G. Indra Jasmine, S. A. Shanmugam, and G. Sugumar, "Application of proteolytic enzyme, papain for the production of chitin and chitosan from shrimp waste," *Journal of the Marine Biological Association of India*, vol. 42, pp. 167–172, 2000.

[24] C. Gartner, C. A. Pelaez, and B. L. Lopez, "Characterization of chitin and chitosan extracted from shrimp shells by two methods," *e-Polymers*, vol. 10, no. 1, pp. 1–16, 2010.

[25] H. Fanglian, "Bradford protein assay," *Bio-protocol*, vol. 1, no. 6, 2011.

[26] S. Khantaphant and S. Akkarachaneeyakorn, "Comparative study on properties of chitosan from raw and cooked shrimp shell and the use as clarifying agent in apple juice," *The Journal of Applied Science*, vol. 16, no. 1, pp. 74–86, 2017.

[27] S. Hajji, O. Ghorbel-Bellaaj, I. Younes, K. Jellouli, and M. Nasri, "Chitin extraction from crab shells by Bacillus bacteria. Biologicalactivities of fermented crab supernatants," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 79, pp. 167–173, 2015.

[28] P. Srinivas, V. Ratan, P. Narayan Reddy, and G. B. Madhavi, "In vitro antifungal efficacies of aqueous extract of fungicide, biocontrol agents and plant extracts against rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia Solani*," *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, vol. 5, no. 1, pp. 122–126, 2014.

[29] F. A. Bettelheim, W. H. Brown, M. K. Campbell, M. O. Farrell, and O. J. Torres, *Introduction to General, Organic, and Biochemistry*, 10th ed. United States of America: Wiley, 2011.