ประสิทธิภาพของกระดาษเคลือบไคโตซานผสมวานิลลินที่มีต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้

Efficacy of Chitosan and Vanillin Coated Paper Against Anthracnose Disease in Mango cv. Nam Doc Mai

รัชฎาพร ใจมั่น[1,4] **เจิมขวัญ สังข์สุวรรณ**[1,3,4] **และ ปริญญา จันทรศรี**[2,3,4]
Ratchadaporn Jaimun[1,4], Jurmkwan Sangsuwan[1,3,4] and Parinya Chantrasri[2,3,4]

Abstract

The aim of this study was to evaluate the inhibitory effect of coated paper against *Colletotrichum gloeosporioides*, a causal agent of anthracnose disease in mango cv. Nam Doc Mai. Coated paper containing 1.5 %(w/v) chitosan and chitosan mixed with vanillin at concentration 0.5, 1, 2, and 4 %(w/v) were tested with *C. gloeosporioides in vitro* by dual culture technique. The result demonstrated that coated paper containing vanillin at concentration 1 %(w/v) was the most effective for inhibiting radial growth of *C. gloeosporioides* by 63.3%. Moreover, the inhibitory effect of coated papers on spore germination were tested by slide culture technique. It was found that chitosan-vanillin coated paper at all concentrations could inhibit spore germination as well as chitosan coated paper caused abnormal of germ tube after treat for 6 hours whereas uncoated paper could not inhibit spore germination. This finding demonstrated that combined vanillin and chitosan enhance inhibitory effect on *C. gloeosporioides*. Therefore, chitosan-vanillin coated paper could be an alternative method for prolonging mango fruits shelf-life by wrapping.

Keywords: chitosan, vanillin, coated paper

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของกระดาษเคลือบในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้หลังการเก็บเกี่ยว จากการประเมินประสิทธิภาพของกระดาษเคลือบไคโตซานเข้มข้น 1.5 %(w/v) และกระดาษเคลือบไคโตซานผสมวานิลลินที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 2, และ 4 %(w/v) ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี dual culture technique พบว่ากระดาษเคลือบไคโตซานผสมวานิลลินความเข้มข้น 1 %(w/v) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุได้ดีที่สุด คิดเป็น 63.3% เมื่อประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราด้วยวิธี slide culture ที่เวลา 6 ชั่วโมง ไม่พบการงอกของ germ tube สปอร์บนกระดาษเคลือบไคโตซานผสมวานิลลินที่ทุกระดับความเข้มข้น และพบลักษณะการงอกที่ผิดปกติของสปอร์บนกระดาษที่เคลือบเฉพาะไคโตซาน ในขณะที่กระดาษไม่เคลือบพบลักษณะการงอกของสปอร์ตามปกติ แสดงว่าการใช้ไคโตซานร่วมกับวานิลลินช่วยเสริมประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุให้ดียิ่งขึ้น กระดาษเคลือบไคโตซานผสมวานิลจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการนำไปประยุกต์ใช้ห่อผลมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยวให้มีอายุการเก็บรักษาได้นานมากขึ้น

คำสำคัญ: ไคโตซาน วานิลลิน กระดาษเคลือบ

คำนำ

การผลิตมะม่วงน้ำดอกไม้เพื่อการส่งออกในปัจจุบันยังคงประสบปัญหาโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยว โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคแอนแทรคโนส การกำจัดโรคในแปลงปลูกด้วยสารเคมีไม่สามารถคุ้มครองผลผลิตให้ปลอดจากการเน่าเสียภายหลังการเก็บเกี่ยวได้ การพัฒนากระดาษยับยั้งเชื้อก่อโรคแอนแทรคโนสเพื่อนำมาใช้ห่อผลมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยวก่อนบรรจุในโฟมเน็ต

[1] คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50100
[1] Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100
[2] สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200
[2] Science and Technology Research Institute, Chiang Mai 50200
[3] สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200
[3] Postharvest Technology Research Institute, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200
[4] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กทม.10400
[4] Postharvest Technology Innovation Center, Office of the Higher Education Commission, Bangkok 10400

น่าจะเป็นกรรมวิธีทางเลือกในการควบคุมโรคระหว่างการขนส่งที่น่าสนใจ กระดาษยับยั้งจุลินทรีย์จัดเป็นวัสดุบรรจุภัณฑ์แบบแอคทีฟ (Active packaging material) ที่มีความสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บริเวณผิวหน้าของอาหารที่สัมผัสกับบรรจุภัณฑ์ (Lee *et al.,* 2003) โดยทั่วไปสามารถผลิตได้โดยการเคลือบสารยับยั้งจุลินทรีย์บนแผ่นกระดาษ ให้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย หรือเชื้อราบนผิวกระดาษได้ การศึกษานี้จึงทำการพัฒนากระดาษเคลือบสารยับยั้งเชื้อก่อโรคแอนแทรคโนส โดยใช้วานิลลินซึ่งได้รับการยอมรับว่าเป็นสารเคมีที่ปลอดภัย ในโครงสร้างมีสารประกอบฟีนอลิกที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับยูจีนอลในกานพลูที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางว่ามีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี (Beuchat and Golden, 1989) เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่เติมลงไปในสารเคลือบชีวฐานที่เตรียมจากไคโตซาน ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ ไม่เป็นพิษ อีกทั้งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย (Begin and Calsteren, 1999)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อสาเหตุโรคจากมะม่วง

แยกเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี Tissue transplanting method

2. การเตรียมสารเคลือบและกระดาษเคลือบไคโตซานผสมวานิลลิน

ละลายไคโตซาน 1.5 กรัม ในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1 (โดยน้ำหนัก) ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 ชม. จากนั้นนำมาใช้เป็นตัวทำละลายในการเตรียมสารละลายไคโตซานผสมวานิลลินที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 2, และ 4 %(w/v) โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 83±2 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นนำสารเคลือบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 มิลลิลิตร เคลือบลงบนกระดาษลอกลายขนาด 29.5 × 21.0 เซนติเมตร ด้วยเครื่อง RK Print Coat Instruments model K303 MULTI COATER, U.K. ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เคลือบซ้ำอีกครั้งหนึ่ง

3. ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides*

3.1 ประสิทธิภาพของสารเคลือบในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา

หยดสารเคลือบ 20 ไมโครลิตร ลงบนเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 1 วัน โดยชุดควบคุมไม่หยดสารเคลือบ บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน จากนั้นทำการวัดความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (เกษม, 2532)

3.2 ประสิทธิภาพของกระดาษเคลือบในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา ด้วยวิธี dual culture technique

ใช้ cork borer เจาะบริเวณปลายเส้นใยเชื้อราสาเหตุวางบนผิวหน้าอาหาร PDA ห่างจากกระดาษเคลือบขนาด 1 × 1 เซนติเมตร ประมาณ 4 เซนติเมตร ส่วนชุดควบคุมให้วางเชื้อราสาเหตุโรคบนผิวหน้าอาหาร PDA ที่ไม่มีกระดาษ ในตำแหน่งเดียวกับชุดทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อราสาเหตุในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการวัดรัศมีโคโลนีของเชื้อราสาเหตุเพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราสาเหตุ (เกษม, 2532)

4. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides*

เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อ *C. gloeosporioides* ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร

4.1 ทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์ของสารเคลือบ ด้วยวิธี Slide culture โดยนำสารเคลือบแต่ละความเข้มข้นผสมลงในสารแขวนลอยสปอร์ที่เตรียมไว้ ในอัตราส่วน 1:1 เขย่าจนเข้ากันแล้วนำสารละลายที่ได้ 10 ไมโครลิตร มาหยดลงบนชิ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ขนาด 1×1 เซนติเมตร ที่วางบนสไลด์ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชม. จากนั้นหยด Lactophenol cotton blue ตรวจดูการงอก germ tube ของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

4.2 ทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์ของกระดาษเคลือบ โดยนำสารแขวนลอยของสปอร์มาหยดลงบนกระดาษเคลือบขนาด 1×1 เซนติเมตร ที่วางบนสไลด์ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชม. จากนั้นหยด Lactophenol cotton blue ตรวจดูการงอก germ tube ของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

ผล

1. ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides*

พบว่าสารละลายไคโตซานผสมวานิลลินความเข้มข้น 4 %(w/v) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สารละลายไคโตซานผสมวานิลลินความเข้มข้น 2, 1, 0.5 %(w/v) และสารละลายไคโตซานที่ไม่ผสมวานิลลิน ตามลำดับ (Figure 1) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้เท่ากับ

82.50, 74.58, 60.42, 40.42 และ 25.00 ตามลำดับ (Table 1) เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของกระดาษเคลือบในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุ พบว่ากระดาษเคลือบไคโตซานผสมวานิลลินความเข้มข้น 1 %(w/v) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุได้ดีที่สุด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้เท่ากับ 63.3% รองลงมาคือกระดาษเคลือบไคโตซานผสมวานิลลินความเข้มข้น 4, 2, 0.5 %(w/v) และเคลือบสารละลายไคโตซานที่ไม่ผสมวานิลลินตามลำดับ (Figure 2) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้เท่ากับ 63.33, 49.17, 43.33, 36.67 และ 5.83 ตามลำดับ (Table 1) ในขณะที่กระดาษไม่เคลือบไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้

2. ประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides*

เมื่อประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง ไม่พบการงอกของ germ tube สปอร์บนสารเคลือบไคโตซานผสมวานิลลินที่ทุกระดับความเข้มข้น และพบลักษณะการงอกที่ผิดปกติของสปอร์บนสารเคลือบไคโตซานที่ไม่ผสมวานิลลิน เทียบกับชุดควบคุมที่มีการงอกของสปอร์ตามปกติ (Figure 3) เช่นเดียวกับผลการทดสอบบนกระดาษเคลือบที่แสดงผลไปในทิศทางเดียวกับสารเคลือบ (Figure 4)

Figure 1 The efficacy of various coating solutions against mycelial growth of *C. gloeosporioides* on PDA after 7 days of incubation.

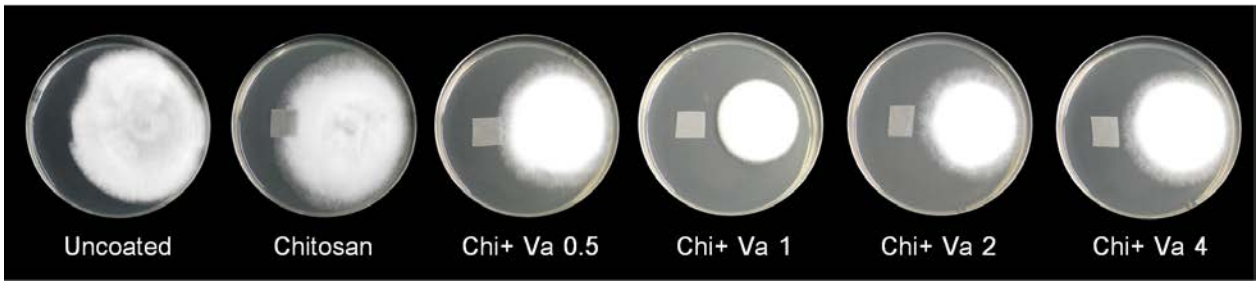

Figure 2 The efficacy of various coated paper against mycelial growth of *C. gloeosporioides* on PDA after 7 days of incubation.

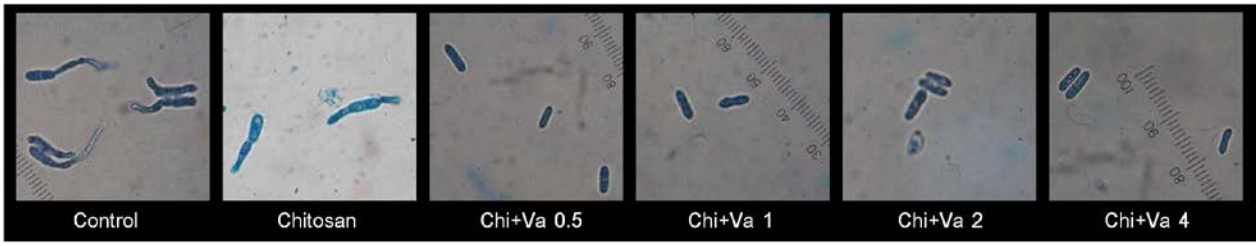

Figure 3 The efficacy of various coating solutions against spore germination after 6 h. of incubation.

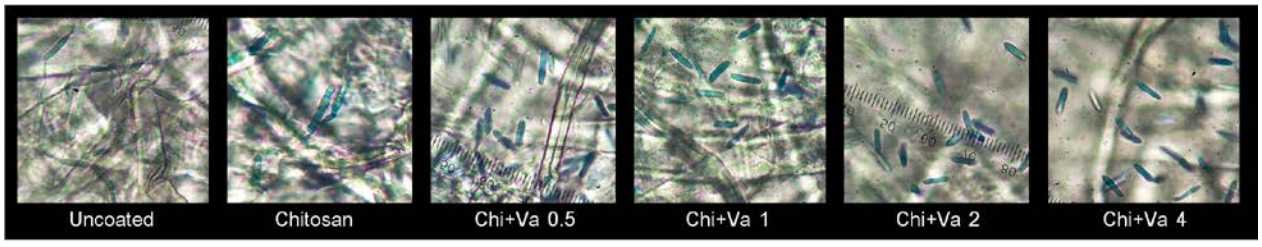

Figure 4 The efficacy of various coated paper against spore germination after 6 h. of incubation.

Table 1 Percent inhibition of radical growth (PIRG) of *C. gloeosporioides* after 7 days of incubation.

Sample	Percent inhibition of radical growth (PIRG)*					
	Control	Chitosan	0.5%(w/v)	1%(w/v)	2%(w/v)	4%(w/v)
Coating solution	0	25.00	40.42	60.42	74.58	82.50
Coated paper	0	5.83	36.67	63.33	43.33	49.17

***** Percent inhibition of radical growth was calculated using the following formula:
PIRG = (x - y / x) × 100 Where, x = Average growth (cm) of *C. gloeosporioides* in control petridish
y = Average growth (cm) of *C. gloeosporioides* in each treated petridish

วิจารณ์ผล

กระดาษเคลือบไคโตซานผสมวานิลลินความเข้มข้น 1 %(w/v) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุได้ดีกว่ากระดาษที่เคลือบไคโตซานเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้เป็นผลมาจากการทำงานที่เสริมประสิทธิภาพกันระหว่างไคโตซานและวานิลลิน กล่าวคือ ไคโตซานซึ่งมีประจุบวกเมื่อจับกับประจุลบที่เซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์จะทำให้เกิดการรั่วไหลของสารสำคัญออกจากเซลล์ทำให้เซลล์เสียสภาพ ในขณะที่การยับยั้งเชื้อของวานิลลินเป็นผลมาจากการทำให้ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ถูกทำลายจึงเกิดการสูญเสียสมดุลไอออนของสารภายในเซลล์ ของเหลวภายในเซลล์จึงเกิดการรั่วไหลออกมา (Fitzgerald *et al*., 2004) ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับระดับความเข้มของสารประกอบฟินอลิกในวานิลลิน ที่ระดับความเข้มข้นต่ำจะส่งผลกระทบต่อเอมไซม์ที่ทำหน้าที่ให้พลังงานแก่เซลล์ของจุลินทรีย์ ในขณะที่ระดับความเข้มข้นสูงจะทำให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีนของเซลล์ อย่างไรก็ตามเนื่องจากวานิลลินสามารถละลายในน้ำได้เพียง 1 g/100 ml ที่อุณหภูมิ 25 °C สารละลายไคโตซานผสมวานิลลินที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 1 %(w/v) จะเกิดการตกผลึกเมื่อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของกระดาษเคลือบไคโตซานผสมวานิลลินที่ความเข้มข้นมากกว่า 1 %(w/v) ไม่ได้ดีไปกว่ากระดาษเคลือบที่ความเข้มข้น 1 %(w/v) ความสามารถในการละลายของวานิลลินจึงเป็นข้อจำกัดหนึ่งที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ การพัฒนากระดาษเคลือบจากไคโตซานผสมวานิลลินให้มีปริมาณวานิลลินเพิ่มขึ้นจึงต้องแก้ปัญหาโดยการเพิ่มจำนวนชั้นในการเคลือบ อย่างไรก็ตามการเคลือบสามารถทำได้ไม่เกิน 3 ชั้น ด้วยข้อจำกัดของกระดาษที่บาง ซึ่งการประยุกต์ใช้กระดาษเคลือบห่อผลมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อยืดอายุการเก็บรักษากำลังอยู่ในระหว่างดำเนินการศึกษาต่อไป

สรุป

กระดาษเคลือบไคโตซานผสมวานิลลินความเข้มข้น 1 %(w/v) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงในสภาพห้องปฏิบัติการได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับกระดาษเคลือบไคโตซานผสมวานิลลินที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ และกระดาษเคลือบไคโตซานเพียงอย่างเดียว

คำขอบคุณ

ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กทม. 10400 ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

เกษม สร้อยทอง. 2532. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 326 หน้า.

Begin, A and M.R.V. Calsteren. 1999. Antimicrobial films produced from chitosan. International Journal of Biological Macromolecules 26: 63-67.

Beuchat, L.R. and D.A. Golden. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. Food Technology 43: 134-142.

Fitzgerald, D. J., M. Stratford, M. J. Gasson, J. Ueckert, A. Bos and A. Narbad. 2004. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli, Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. Journal of Applied Microbiology 97: 104-113.

Lee, C.H., D.S. An, H.J. Park and D.S. Lee. 2003. Wide spectrum antimicrobial packaging materials incorporating nisin and chitosan in the coating. Packaging Technology Science 16: 99-106.