สมบัติกายภาพ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งแบคทีเรีย ของฟิล์มไคโตซานนาโนเซลลูโลสร่วมกับสารสกัดจากใบมะม่วง
Physical Properties, Antioxidant Capacity and Microbial Inhibition of Chitosan-nanocellulose Film Combine with Mango Leaves Extract

ระจิตร สุวพานิช[1] และญาณกร จรูญสุวรรณ[1]
Rachit Suwapanich*[1] and Yanakorn Charoonsuwarn[1]

Abstract

The aim of this research to study physical properties, antioxidant and inhibition of microbial of combination chitosan-nanocellulose film (CTS_NFC) and crude mango leaves extract (MLE) 1:1, 1:2 and 1:3 (weight of nanocellulose: volume of MLE) Forming film by solvent casting method. The results showed that all treatments no difference to thickness, Young's modulus and tensile strength of CTS_NFC_MLE film significant at 95 percent confidence level. The thickness, Young's modulus and tensile strength of film in the range of 2.55-3.15 µm, 0.11-0.17 MPa and 0.04 Mpa, respectively. While % elongation at break of the film decreased when the amount of MLE was increased, it was 39.1, 27.43 and 23.61%, respectively. The lightness value (L*) of film was decreased with the high concentration of MLE. On the other hand, the green value (-a*) was increased. CTS_NFC_MLE 3 ml showed antioxidant capacity as tested by DPPH radical scavenging assay and the percentage of growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by a McFarland calibration curve carried out with 0.5–4 McFarland standards was the best were 51.70, 61.01%. While the percentage of growth inhibition of *Escherichia coli* was 3.07%. Therefore, it is possible to use CTS_NFC film combined with MLE as bio-packaging to reduce the growth of *S. aureus* that cause food poisoning in the ready to eat products.
Keywords: chitosan-nanocellulose film, mango leaves extract**,** physical properties

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาสมบัติกายภาพ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งแบคทีเรียของฟิล์มไคโตซานนาโนเซลลูโลสร่วมกับสารสกัดจากใบมะม่วงในอัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:3 (น้ำหนักแห้งของนาโนเซลลูโลสต่อปริมาตรสารสกัดใบมะม่วง) ขึ้นรูปฟิล์มด้วยวิธีการหล่อขึ้นรูปด้วยสารละลาย พบว่า แผ่นฟิล์มไคโตซานนาโนเซลลูโลสที่มีปริมาณของสารสกัดใบมะม่วงที่เพิ่มขึ้น ไม่มีผลต่อความหนา ค่า Young's modulus และค่า tensile strength อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์โดยมีค่าเท่ากับ 2.55-3.15 µm, 0.11-0.17 Mpa และ 0.04 Mpa ตามลำดับ ในขณะที่ค่า % elongation at break ของฟิล์มมีค่าลดลง โดยมีค่าเท่ากับ 39.1, 27.43 และ 23.61% ตามลำดับ ค่าความสว่างของฟิล์มมีค่าลดลงแต่ค่าความเป็นสีแดงเพิ่มขึ้น เมื่อมีการเพิ่มปริมาณสารสกัดจากใบมะม่วงในแผ่นฟิล์ม และในแผ่นฟิล์มไคโตซานนาโนเซลลูโลสที่มีปริมาณสารสกัดใบมะม่วง 3 มิลลิตร มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแผ่นฟิล์มเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยการเทียบค่าความขุ่นกราฟมาตรฐาน 0.5-4 McFarland ได้ดีที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 51.70 และ 61.01% ตามลำดับ ในขณะที่ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* มีค่าเท่ากับ 3.07% จึงมีความเป็นไปได้ในการนำฟิล์มไคโตซานนาโนเซลลูโลสร่วมกับสารสกัดจากใบมะม่วงมาใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ชีวภาพเพื่อลดการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ที่เป็นสาเหตุอาหารเป็นพิษในผลิตภัณฑ์พร้อมบริโภค
คำสำคัญ: ฟิล์มไคโตซานนาโนเซลลูโลส สารสกัดจากใบมะม่วง สมบัติทางกายภาพ

[1] สาขาวิศวกรรมแปรรูปอาหาร คณะอุตสาหกรรมอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
[1] Program in Food Process Engineering. School of Food Industry. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

คำนำ

ปัจจุบันประเทศไทยมีการใช้ฟิล์มพลาสติกสำหรับห่ออาหารเป็นจำนวนมากซึ่งส่งผลเสียต่อสภาพแวดล้อม จึงได้มีการผลิตแผ่นฟิล์มไคโตซาน ไคโตซานเป็นไบโอโพลิเมอร์ธรรมชาติ มีองค์ประกอบสำคัญในรูปของ D-glucosamine ตามธรรมชาติพบได้ในเปลือกนอกของสัตว์พวกกุ้ง ปู แมลง และเชื้อรา เป็นสารธรรมชาติที่มีลักษณะโดดเด่นเฉพาะตัว จัดเป็นวัสดุชีวภาพ (biometerials) สามารถย่อยสลายตามธรรมชาติได้ อย่างไรก็ตามการนำไคโตซานไปใช้ประโยชน์โดยเฉพาะในรูปแบบแผ่นฟิล์มบางยังมีข้อจำกัด เนื่องจากธรรมชาติของฟิล์มไคโตซานที่มีความเปราะ การนำแผ่นฟิล์มไคโตซานไปใช้จึงจำเป็นต้องปรับปรุงให้แผ่นฟิล์มมีความแข็งแรง และมีความยืดหยุ่น ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีแนวคิดในการนำนาโนเซลลูโลสมาใช้ในการเสริมความแข็งแรงของแผ่นฟิล์ม

แมงจิเฟอริน (Mangiferin) เป็นสารพฤกษเคมีที่มีโครงสร้างจัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก ในกลุ่มแซนโธนไกลโคไซด์ (xanthone glycoside) แมงจิเฟอรินเป็นสารที่พบได้หลายส่วนของมะม่วง โดยเฉพาะส่วนของใบเป็นส่วนที่มีรายงานว่าพบสารแมงจิเฟอรินในปริมาณที่มากกว่าส่วนอื่น ๆ จากรายงานการศึกษาพบว่าใบมะม่วงมีสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ ผู้วิจัยจึงเกิดแนวความคิดในการนำสารสกัดจากใบมะม่วงมาใช้ร่วมกับแผ่นฟิล์มไคโตซานนาโนเซลลูโลส เพื่อพัฒนาเป็นแผ่นฟิล์มชีวภาพ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสมบัติ กายภาพ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งแบคทีเรียของฟิล์มไคโตซานนาโนเซลลูโลสร่วมกับสารสกัดจากใบมะม่วง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมผงใบมะม่วง

นำใบมะม่วงเขียวเสวย มาล้างทำความสะอาด ผึ่งแดดให้แห้ง แล้วนำมาตัดให้มีขนาด 1-2 เซนติเมตร อบให้แห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำใบมะม่วงที่ผ่านการอบแห้งแล้วมาบดด้วยเครื่องบดสมุนไพร และนำไปร่อนผ่านตระแกรง บรรจุผงมะม่วงที่ร่อนได้ในกล่องพลาสติกสุญญากาศ (สีชา) เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสาร

นำผงมะม่วงที่ได้จากข้อที่ 1 มาทำการสกัดในสารละลายเอทธานอลที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 95 % ในอัตราส่วนผงมะม่วงต่อสารละลายเอทธานอล 1:3 (น้ำหนัก:ปริมาตร) ระยะเวลาในการสกัดสาร 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำไปสารสกัดที่ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 rpm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำของเหลวที่ได้ ไปทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ เก็บสารสกัดที่ได้จากการระเหย (crude extract) ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดใบมะม่วง (crude extract) โดยวิธี Folin – Ciocalteu’s คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดใบมะม่วง รายงานค่าเป็น magGAE/g (dry weight) คัดเลือกสภาวะที่ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด มาใช้เป็นส่วนผสมในการขึ้นรูปแผ่นฟิล์ม

3. การขึ้นรูปแผ่นฟิล์ม

ขึ้นรูปแผ่นฟิล์มโดยใช้สารละลายไคโตซาน 1 เปอร์เซ็นต์ 20 กรัม สารละลายกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ 1 กรัม และนาโนเซลลูโลส 50 มิลลิกรัม ผสมด้วยสารสกัดจากใบมะม่วง (50 มิลลิกรัม/มิลลิตร) ในอัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:3 (น้ำหนักแห้งของนาโนเซลลูโลสต่อปริมาตรสารสกัดใบมะม่วง) ปั่นกวนผสมด้วยเครื่องกวนผสม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปเข้าเครื่องอัลตร้าโซนิกเพื่อไล่ฟองอากาศ (degas) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายที่ได้เทใส่ในเพลทพลาสติก นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บรรจุฟิล์มที่ได้ในถุงอลูมิเนียมฟอยด์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. ตรวจวัดสมบัติกายภาพ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งแบคทีเรียของฟิล์ม

แผ่นฟิล์มที่ขึ้นรูป จะถูกนำตรวจวัดความหนาของฟิล์มด้วยไมโครมิเตอร์ วัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี (Colormeter) รุ่น Color Quest XE รายงานค่าเป็น L* a* b* ตัดแผ่นฟิล์มตัดฟิล์มกว้าง 1 เซนติเมตร ยาว 5 เซนติเมตร นำมาตรวจวัดคุณสมบัติทางกลด้วยเครื่อง texture analyzer รายงานค่าที่วัดได้เป็น ค่า Young’s modulus ค่า tensile strength และค่า % elongation at break อ้างอิงตามวิธีการทดสอบของ Bastante *et. al.*, (2021)

การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระของแผ่นฟิล์ม ทำโดยการตัดแผ่นฟิล์มขนาด 1x1 เซนติเมตร ใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมสารละลายลาย DPPH ความเข้มข้น 6×10^{-5} โมลาร์ 10 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตรที่เวลา 0, 3, 5 และ 24 ชั่วโมง (Bastante *et. al*., 2021) คำนวณหาความสามารถในการยับยั้ง

$$\%\ Inhibition = \left(\frac{Abs_i - Abs_t}{Abs_i}\right) \times 100$$

เมื่อ Abs_i คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาเริ่มต้น และ Abs_t คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 3, 5 และ 24 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของฟิล์ม อ้างอิงตามวิธีการทดสอบของ Bastante *et al.* (2021) คำนวณหาความเข้มข้นของเซลล์ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน McFarland ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 - 4 (C=8.0698T+0.5022 R^2=0.9989 เมื่อ C คือ ค่าความเข้มข้นของเซลล์ และ T คือ ค่าความขุ่น) คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยการวัดค่าความขุ่นของสารละลายด้วยเครื่อง Visible-Spectrophotometer (Thermo รุ่น Genesys20) ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร คำนวณหาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ

$$\%\ Growth\ Inhibition = \left(1 - \frac{C_i}{C_0}\right) \times 100$$

เมื่อ C_i คือ ความเข้มข้นของเซลล์ในหลอดที่มีแผ่นฟิล์ม และ C_0 คือค่าความเข้มข้นของเซลล์ในหลอดที่ไม่มีแผ่นฟิล์ม

ผลการศึกษา

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารจากใบมะม่วง พบว่า ที่สภาวะการสกัดด้วยสารละลายเอทธานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการสกัด 48 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 120.05±0.54 (mgGAE/g) จึงได้เลือกสภาวะนี้ในการสกัดสารจากใบมะม่วง เพื่อนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในการขึ้นรูปแผ่นฟิลม์

ผลการศึกษาสมบัติทางกายภาพของแผ่นฟิล์มที่ขึ้นรูปได้ พบว่า การเพิ่มปริมาณสารสกัดใบมะม่วงในส่วนผสมแผ่นฟิล์มไคซานนาโนเซลลูโลสไม่มีผลต่อความหนา ค่า Young's modulus และค่า tensile strength ของแผ่นฟิล์มที่ขึ้นรูปได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ แผ่นฟิล์มที่ได้มีค่าความหนาอยู่ในช่วง 2.55±1.27 ถึง 3.15±0.61 ไมโครเมตร ค่า Young's modulus อยู่ในช่วง 0.08±0.02 ถึง 0.17±0.04 MPa และ ค่า tensile strength มีค่าเท่ากับ 0.04 MPa เมื่อแผ่นฟิล์มมีปริมาณของสารสกัดใบมะม่วงเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ค่าการยืดตัวของแผ่นฟิล์ม (% Elongation at break) และค่าความสว่าง (L*) ของแผ่นฟิล์มลดลง ในขณะที่ค่าความเป็นสีแดงมีค่าเพิ่มขึ้น (Table 1) สอดคล้องกับลักษณะปรากฏของแผ่นฟิลม์ที่ขึ้นรูปได้จะมีสีออกน้ำตาลแดงเมื่อแผ่นฟิล์มมีปริมาณสารสกัดใบมะม่วงเพิ่มขึ้น

แผ่นฟิล์มไคโตซานนาโนเซลลูโลสที่มีปริมาณสารสกัดใบมะม่วง 3 มิลลิลิตร มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแผ่นฟิล์มเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยการเทียบค่าความขุ่นกราฟมาตรฐาน 0.5-4 McFarland ได้ดีที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 51.70 และ 61.01% ตามลำดับ ในขณะที่ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* มีค่าเท่ากับ 3.07% (Figure 1 and 2)

Table 1 Physical properties of CTS_NFC at difference concentration of MLE

Type	Thickness^{ns} (μm)	Young's modulus^{ns} (MPa)	Tensile strength^{ns} (MPa)	%Elongation at break	L*	a*	b*
CTS_NFC	3.06±1.78	0.08±0.02	0.03±0.01	34.62±2.98^{a}	87.36±1.93^{a}	2.18±0.82^{d}	10.81±5.21^{c}
CTS_NFC_MLE(1)	3.1±0.81	0.11±0.02	0.04±0.01	39.10±3.62^{a}	72.17±2.86^{b}	5.94±2.38^{c}	48.93±3.54^{b}
CTS_NFC_MLE(2)	2.55±1.27	0.14±0.03	0.04±0.01	27.43±4.08^{b}	67.47±1.20^{c}	11.69±1.69^{b}	59.07±2.30^{a}
CTS_NFC_MLE(3)	3.15±0.61	0.17±0.04	0.04±0.00	23.61±4.05^{b}	61.60±4.05^{d}	19.14±4.14^{a}	57.46±2.73^{a}

*Result are presented as mean ± standard deviation (n=3)

*Mean with different upper letter superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$)

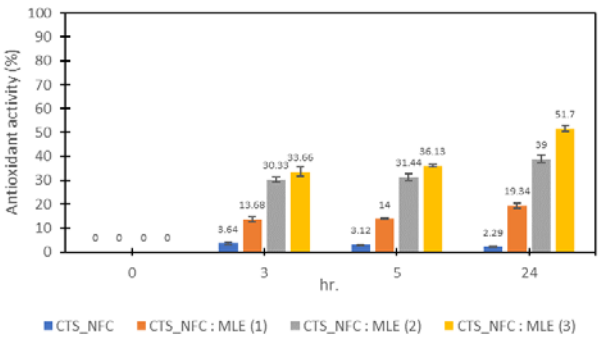

Figure 1 Antioxidant activity (%) of CTS_NFC at difference concentration of MLE

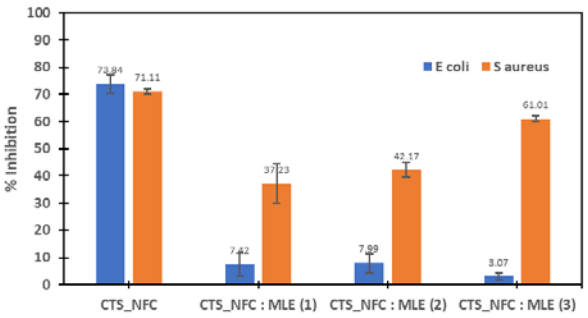

Figure 2 Antimicrobial activity (% inhibition) of CTS_NFC at difference concentration of

วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการศึกษาพบว่า การเติมสารสกัดใบมะม่วงลงในแผ่นฟิลม์ไคโตซานนาโนเซลลูโลส มีผลทำให้ความแข็งแรงแผ่นฟิล์มลดลง ลักษณะของฟิล์มที่ขึ้นรูปได้ค่อนข้างเปราะ การยืดตัวของแผ่นฟิล์มต่ำ สอดคล้องกับค่า % Elongation ของแผ่นฟิลม์ที่มีค่าลดลง อาจเป็นผลเนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกที่มีในสารสกัดใบมะม่วงเกิดการรวมตัวกับนาโนเซลลูโลส ส่งผลให้แผ่นฟิล์มมีความยืดหยุ่นที่ต่ำ สอดคล้องกับการศึกษาของ Bastante *et al*. (2021) พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดใบมะม่วงในแผ่นฟิล์มนาโนเซลลูโลสมีผลทำให้ค่าการยืดตัวของแผ่นฟิล์มลดลง เช่นเดียวกับการศึกษาของ ปิยพรและคณะ (2557) พบว่า การผสมน้ำมันมะรุมลงในแผ่นฟิล์มไคโตซาน มีผลต่อค่าความต้านทานแรงดึงขาดและเปอร์เซ็นต์การยืดตัวของฟิล์มลดลง เนื่องจากน้ำมันมะรุมที่เติมลงไป ส่งผลให้แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของหมู่อัลคิลระหว่างอนุพันธ์ไคโตซานอ่อนตัวลง จนทำให้การรวมตัวของสายพอลิเมอร์เกิดการสูญเสียแรงโคฮีชัน และความต้านทานทางเชิงกลของฟิล์มไป (Bonilla *et al.*, 2012) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแผ่นฟิล์มมีค่าเพิ่มขึ้นตามปริมาณของสารสกัดใบมะม่วง อย่างไรก็ตามกลับพบว่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มที่ไม่ได้เติมสารสกัดใบมะม่วงมีค่าลดลง เห็นได้ชัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E coli* ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการที่สารประกอบฟีนอลิกที่มีในสารสกัดใบมะม่วงเกิดการรวมตัวกับนาโนเซลลูโลสหรือไคโตซาน ทำให้ค่าความสามารถในการละลายน้ำของแผ่นฟิล์มลดลง เมื่อทดสอบการยับยั้งของเชื้อในอาหารเหลวจึงมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อต่ำกว่าแผ่นฟิล์มที่ไม่มีสารสกัดใบมะม่วง อย่างไรก็ตามแผ่นฟิล์มที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ต้องมีการปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพในสอดคล้องกับมาตราฐานของ มอก. 1136-2559 เรื่อง ฟิล์มยืดห่อหุ้มอาหาร

สรุป

สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดจากใบมะม่วง คือ การสกัดด้วยสารละลายเอทธานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการสกัด 48 ชั่วโมง แผ่นฟิล์มไคโตซานนาโนเซลลูโลสร่วมกับสารสกัดใบมะม่วง 3 มิลลิตร มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและคุณสมบัติต้านแบคทีเรียชนิด *S. aureus* ดีที่สุด อย่างไรก็ยังต้องมีการปรับปรุงคุณสมบัติทางด้านกายภาพของแผ่นฟิล์มให้ตรงตามมาตราฐานของ มอก. 1136-2559 เรื่อง ฟิล์มยืดห่อหุ้มอาหาร

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณคณะอุตสาหกรรมอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ปิยพร แซ่หย่อง, สุธีรา วัฒนกุล และ อนุวัตร แจ้งชัด. 2557. การศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของฟิล์มไคโตซานผสมน้ำมันมะรุม. *ใน* การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52: สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. หน้า 131-137.

Bastante, C.C., N. H. Silva, L.C. Cardoso, C.M. Serrano, E.J.M. de la Ossa, C.S. Freire and C. Vilela. 2021. Biobased films of nanocellulose and mango leaf extract for active food packaging: Supercritical impregnation versus solvent casting. Food Hydrocolloids 117: 106709.

Bonilla, J., L. Astarés, M. Vargas and A. Chiralt. 2012. Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. Food hydrocolloid 26: 9-16.