รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

นวัตกรรมการปรับปรุงคุณภาพและอายุการเก็บรักษาผลลิ้นจี่ โดยใช้ไคโตแซน-อนุภาคนาโนเงินคอมโพไซต์

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. วารินทร์ พิมพาและคณะ

กันยายน 2558

สำนักหอสมุด

สัญญาเลขที่ R2558B066

รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่อง

นวัตกรรมการปรับปรุงคุณภาพและอายุการเก็บรักษาผลลิ้นจี่ โดยใช้ไคโตแซน-อนุภาคนาโนเงินคอมโพไซต์

Innovative improvement of quality and shelf-life of litchi with chitosan-Ag nanoparticle composites

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 17 ส.ค. 2559
เลขทะเบียน 1700041291
เลขเรียกหนังสือ ว TP 248 .65 .C55 ว4935 2558

คณะผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. วารินทร์ พิมพา
คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

นายจักรกฤษณ์ พิมพา
ฝ่ายปฏิบัติการภาคเหนือ พิษณุโลก การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย

สนับสนุนโครงการโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร
งบประมาณแผ่นดิน ปี 2558

นวัตกรรมการปรับปรุงคุณภาพและอายุการเก็บรักษาผลลิ้นจี่ โดยใช้ไคโตแซน-อนุภาคนาโนเงินคอมโพไซต์

รองศาสตราจารย์ ดร. วารินทร์ พิมพา[1]
นายจักรกฤษณ์ พิมพา[2]

[1]ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
[2]ฝ่ายปฏิบัติการภาคเหนือ พิษณุโลก การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย

ลิ้นจี่เป็นผลไม้เขตร้อนที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง แต่มีข้อจำกัดทางการตลาดจากการสูญเสียคุณภาพอย่างรวดเร็วหลังการเก็บเกี่ยว โดยเฉพาะสีแดงของผิวเปลือกที่เป็นที่ดึงดูดใจของผู้บริโภค เป็นที่ทราบกันดีว่าการเกิดสีน้ำตาลของลิ้นจี่หลังการเก็บเกี่ยวเป็นผลมาจากการย่อยสลายของแอนโทไซยานิน ที่เกี่ยวข้องกับเอ็นไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส การแก้ปัญหาดังกล่าวแต่เดิมอาศัยการใช้ไอของซัลเฟอร์และการชุบด้วยกรดซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส จึงส่งผลให้ชะลอการสูญเสียสีแดงของผิวเปลือกลิ้นจี่ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อคำนึงถึงความปลอดภัยของผู้บริโภคและกาจำกัดของการใช้สารเคมี จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องหาทางเลือกอื่นที่ไม่เป็นอันตรายในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงสีของผิวเปลือกลิ้นจี่ ถึงแม้จะมีรายงานว่า การใช้สารเคลือบผิวไคโตแซนสามารถยืดอายุการเก็บรักษาผักและผลไม้ได้หลากหลายชนิด แต่ไม่มีรายงานการใช้ไคโตแซนร่วมกับอนุภาคนาโนเงินมาก่อน ทั้งที่มีความสนใจใช้อนุภาคนาโนเงินทางอาหารเพิ่มขึ้นเนื่องจากสมบัติต้านจุลินทรีย์ของมัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้ไคโตแซน-อนุภาคนาโนเงินคอมโพไซต์เป็นสารเคลือบผิวผลลิ้นจี่ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของลิ้นจี่ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30±5 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ60±5) โดยคาดหมายว่าสารเคลือบผิวไคโตแซน-อนุภาคนาโนเงินจะมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นต่อการป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในขณะเดียวกันก็ยังคงให้ประสิทธิภาพเช่นเดียวกับการเคลือบผิวผลไม้ด้วยไคโตแซน โดยช่วยชะลอการสูญเสียน้ำ ยับยั้งกระบวนการหายใจ ปรับปรุงเนื้อสัมผัส และยังคงสารกลิ่นรสที่ระเหยได้ง่าย

ในงานวิจัยนี้อนุภาคนาโนเงินถูกเตรียมได้โดยการรีดิวส์ซิลเวอร์ไนเตรตด้วยไคโตแซนซึ่งเป็นสารที่ไม่เป็นพิษและย่อยสลายได้ โดยให้อนุภาคนาโนเงินที่มีรูปร่างกลมที่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางในช่วงกว้าง แต่น้อยกว่า 20 นาโนเมตร เมาอตรวจวัดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนแบบส่องผ่าน อนุภาคนาโนเงินที่เตรียมได้มีสมบัติต้านแบคทีเรียทั้งแกรมบวก (*S. aureus*) และแกรมลบ (*E. coli*) สำหรับการศึกษาผลของการใช้ร่วมกันของไคโตแซน (ความเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร) และอนุภาคนาโนเงิน (0.06 มิลลิกรัม/ลิตร) ต่อการชลอกการเกิดสีน้ำตาลและการยืดอายุการเก็บรักษาผลลิ้นจี่ที่อุณหภูมิห้องได้ทำการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงแอกติวีของเอ็นไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส ความเข้มข้นของแอนโทไซยานิน ดัชนีสี ปริมาณของแข็งทั้งหมด ความเป็นกรดที่ไตเตรทได้ และการปรากฏของร่องรอยการเน่าเสียพบว่า การใช้สารเคลือบผิวไคโตแซน-อนุภาคนาโนเงินต่อผลลิ้นจี่มีผลให้ชลอการลดลงอขงปริมาณแอนโทไซยานิน การเพิ่มขึ้นของแอกติวิตีของเอ็นไซม์พอลิฟีนอ

ลออกซิเดส และการเปลี่ยนแปลงของดัชนีสีและการสูญเสียน้ำหนัก สารเคลือบผิวไคโตแซน-อนุภาคนาโนเงินยังมีประสิทธิภาพในการชลอการเน่าเสียของลิ้นจี่ได้ดีกว่าเมื่อใช้สารเคลือบผิวที่ประกอบด้วยไคโตแซนเพียงอย่างเดียว ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่ามีความเป็นไปได้สำหรับการใช้สารเคลือบผิวไคโตแซน-อนุภาคนาโนเงินเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลลิ้นจี่ที่อุณหภูมิห้อง

คำสำคัญ : อนุภาคนาโนเงิน ไคโตแซน ลิ้นจี่ อายุการเก็บรักษา

มหาวิทยาลัยนเรศวร

Innovative improvement of quality and shelf-life of litchi with chitosan-Ag nanoparticle composites

Assoc. Prof. Dr. Warin Pimpa[1]
Chakkrit Pimpa[2]

[1]Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture, Natural Resource and Environment, Naresuan University
[2] Northern Region Operation Division, Electricity Generating Authority of Thailand

Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) is a tropical fruit of high commercial value. The major limitation in litchi marketing is the rapid lose of qualities especially its attractive red color after harvest. Postharvest browning of litchi was generally thought to be a rapid degradation of anthocyanin caused by polyphenol oxidase (PPO), producing brown byproducts. Postharvest treatments, such as sulphur fumigation and acid dip can effectively inhibited PPO activity and thus delay loss of red skin color of litchi fruit. However, alternative chemicals for color control without toxic effects in harvested litchi fruit are needed because of concerns for food safety and restrictions in the use of chemicals. Although the chitosan coating has been extensively studied to increase the shelf life of many fresh fruits and vegetables, no information is available regarding the application of the combined use of silver nanoparticle and chitosan as fruit coating. Silver nanoparticles (AgNPs) have recently gained increasing interests due to their antimicrobial activity in food processing applications. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of chitosan-silver nanoparticle (CS-AgNPs) coating on quality changes of litchi stored at ambient temperature (30±5°C, 60±5%RH). With the expectation that specially formulated edible CS-AgNPs coating may provide additional protection against contamination of microorganisms while serving the similar effect as chitosan-coated fruit storage in protection of perishable food products from deterioration by retarding dehydration, suppressing respiration, improving textural quality and helping retain volatile flavor compounds.

The fabrication of AgNPs was accomplished by reducing silver nitrate with nontoxic and biodegradable chitosan. The synthesized AgNPs presented a spherical shape with a wide range of diameters (<20 nm), as observed by transmission electron microscope (TEM). The AgNPs showed both fast and long-lasting antibacterial effectiveness against both gram-positive (*S. aureus*) and gram-negative (*E. coli*) bacteria. The further experiments were conducted to test the effect of combined chitosan (20 g/l) and AgNPs (0.06 mg/l) on retardation of skin browning and extension of litchi shelf life at ambient temperature. Changes in polyphenol oxidase (PPO) activity, anthocyanin concentration, colour index, total soluble solids and titratable acidity were measured. The effect of CS-AgNPs coating on decay incidence was also evaluated. Application of chitosan (CS)-AgNPs coating into litchi delayed the decrease in antrocyanin content, the increase in PPO activity and the changes in colour index and moisture loss. It also more effectively delayed the decay of stored litchi as

compared to chitosan coating itself. Hence, it could conclude that treatment with CS-AgNPs coating exhibited a potential for shelf life extension of litchi at ambient temperature.

Keywords: Silver nanoparticles, chitosan, litchi, shelf life

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนสนับสนุนการวิจัย กองบริหารการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร งบประมาณแผ่นดินปี 2558

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	1
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	3
กิตติกรรมประกาศ	5
สารบัญเรื่อง	6
สารบัญรูปภาพ	7
บทที่ 1 บทนำ	
- ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	8
- วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	9
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
บทที่ 2 การทบทวนเอกสารงานวิจัย	
- ลิ้นจี่	11
- วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวผลไม้	12
- การยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้โดยใช้สารเคลือบผิวที่บริโภคได้	13
- อนุภาคนาโนเงิน	15
- บรรจุภัณฑ์อาหารแอกทีฟที่บรรจุอนุภาคนาโนเงิน	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
- การเตรียมอนุภาคนาโนเงินและสารเคลือบผิวไคโตแซน-อนุภาคนาโนเงิน	20
- การศึกษาสมบัติของอนุภาคนาโนเงิน	21
- การเตรียมตัวอย่างผลลิ้นจี่	21
- การวิเคราะห์สมบัติของผลลิ้นจี่ในระหว่างการเก็บรักษา	22
- การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	23
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการทดลอง	
- **การเตรียมและสมบัติของอนุภาคนาโนเงิน**	24
- **ผลของสารเคลือบผิว CS-AgNPs ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของผลลิ้นจี่**	28
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	39
บรรณานุกรม	41

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 ผลลิ้นจี่และวิธีการเตรียมตัวอย่าง 22
รูปที่ 2 สเปกตราการดูดกลืนแสงในย่านวิสิเบิลของ AgNPs 25
รูปที่ 3 TEM micrograph ของ AgNPs 25
รูปที่ 4 สมบัติต้านแบคทีเรียของ AgNPs ต่อ *S. aureus* และ *E. coli* 27
รูปที่ 5 รูปภาพแสดง bacteriostatic test ของ AgNPs ต่อแบคทีเรีย *E. coli* 27
รูปที่ 6 ผลของสารเคลือบผิว Cs-AgNPs ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และความเป็นกรดที่ไตเตรทได้ของผลลิ้นจี่ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง 30
รูปที่ 7 การเปลี่ยนแปลงการสูญเสียน้ำหนักของกลุ่มตัวอย่างลิ้นจี่ที่เคลือบผิวด้วย CS-AgNPs ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง 32
รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของค่าดัชนีสีน้ำตาลและ การสูญเสียน้ำหนัก ของผลลิ้นจี่ที่เคลือบด้วย CS-AgNPs 32
รูปที่ 9 ลักษณะที่ปรากฏของผลลิ้นจี่ที่เคลือบด้วย CS-AgNPs ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง 33
รูปที่ 10 ความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอนโทไซยานิน และแอกติวิตีของเอ็นไซม์ PPO ของผลลิ้นจี่ที่เคลือบด้วย CS-AgNPs 35
รูปที่ 11 ผลของสารเคลือบผิว Cs-AgNPs ต่อปริมาณแอนโทไซยานินและแอกติวิตีของเอ็นไซม์ PPO ของผลลิ้นจี่ที่เคลือบด้วย Cs-AgNPs ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง 36
รูปที่ 12 การเปลี่ยนแปลงลักษณะที่ปรากฏที่แสดงถึงการเน่าเสียของของกลุ่มตัวอย่างลิ้นจี่ที่เคลือบผิวด้วย CS-AgNPs ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง 37

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.) จัดเป็นผลไม้ที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงโดยเฉพาะในตลาดต่างประเทศ ปัญหาที่สำคัญที่เป็นขีดจำกัดของการส่งออก/การตลาดของผลผลิตดังกล่าวมาจากการที่ผลไม้ชนิดนี้มีอายุการเก็บรักษาสั้น ผลลิ้นจี่หลังเก็บเกี่ยวจะสูญเสียคุณภาพทั้งความหวาน ความสดฉ่ำและสีแดงของผิวเปลือกอย่างรวดเร็วภายใน 2-3 วันภายใต้สภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ทำให้มูลค่าทางเศรษฐกิจของลิ้นจี่ลดลง วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมสำหรับการควบคุมคุณภาพและยืดอายุการเก็บรักษาผลผลิตต้องสัมพันธ์กับระยะทางที่ต้องขนส่งผลผลิตออกสู่ตลาดซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องคงคุณภาพของผลผลิตจนถึงมือผู้บริโภค ปัจจุบันเมื่อประเทศไทยจะเข้าสู่ AEC ในระยะเวลาไม่นานนี้ การกระจายสินค้าสู่ประเทศเพื่อนบ้านหรือประเทศที่ห่างไกลจำเป็นต้องใช้วิธีการจัดการที่เหมาะสมที่ช่วยคงคุณภาพและยืดอายุการเก็บรักษาผลลิ้นจี่ให้ได้ระยะยาวนานขึ้น เพื่อยังคงความสด คุณภาพและลักษณะที่ปรากฏจนถึงมือผู้บริโภคด้วยวิธีการที่ปลอดภัยเป็นที่ยอมรับและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

การเสื่อมสภาพ (senescence) ของผลลิ้นจี่เป็นผลมาจากการเกิดความร้อนจากการหายใจ (heat of respiration) และการระเหย (transpiration) ในระหว่างการเก็บรักษา (Underhill and Critchley, 1993) ที่ช่วยเร่งการสูญเสียน้ำของผลลิ้นจี่และการเกิดสีน้ำตาล (browning) ของสีผิวเปลือก การเกิดสีน้ำตาลของผิวเปลือกของผลลิ้นจี่มาจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยเอ็นไซม์ (enzymatic oxidation) ในสภาวะที่มีออกซิเจน (Ju and Zhu, 1988) โดยเกี่ยวข้องกับเอ็นไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase; PPO) และ เปอร์ออกซิเดส (peroxidase; POD) (Lin et al., 1988a,b; Zhang and Quantick, 1997) นอกจากนั้นการเข้าทำลายของโรคพืช (pathogen) (Chen, 1984) ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ผลลิ้นจี่หลังการเก็บเกี่ยวเน่าเสีย (decay) ในทางปฏิบัติการใช้สารเคมีกำจัดรามีข้อจำกัด (Wilson and Wisniewiski, 1989) เนื่องจากปัจจุบันผู้บริโภคเริ่มตระหนักถึงอันตรายทั้งต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมจากสารเคมีตกค้าง

การประยุกต์ใช้ไคโตแซน (chitosan) ซึ่งเป็นสารเคลือบที่บริโภคได้ (edible coating) เป็นวิธีการหนึ่งที่ให้ผลดีในการปรับปรุงคุณภาพและยืดอายุการเก็บรักษาผักและผลไม้ (Krochta and De Mulder, 1997) ไคโตแซนมีสมบัติที่ดีหลายประการ ได้แก่ มีความปลอดภัย เข้ากันได้ดีกับสารอื่น (biocompatibility) ย่อยสลายได้ (biodegradable) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและรา (antibacterial and antifungal activities) และสามารถขึ้นรูปเป็นเมมเบรน (membrane) ได้ (Chien et al., 2007; Zheng and Jiang-Feng Zhu, 2003) จากสมบัติดังกล่าวจึงสามารถใช้ไคโตแซนเป็นสารเคลือบผิวเพื่อควบคุมคุณภาพของผักและผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว โดยช่วยลดการสูญเสียน้ำหนักของผลไม้ ยืดอายุการเก็บรักษาและควบคุมการเน่าเสียของผลไม้

หลากหลายชนิด ได้แก่ สตอเบอรี่ ลูกพีช องุ่น แอปเปิ้ล มะม่วง และลิ้นจี่ (Dong et al., 2004; Romanazzi et al., 2002 Lin and Liang, 2003; Lin et al., 2008, 2009, 2011) เป็นต้น

ไคโตแซนสามารถชลอกระบวนการหายใจและลดการเกิดความร้อน ทำให้อุณหภูมิที่ผิวเปลือกของลิ้นจี่ที่เคลือบด้วยไคโตแซนมีอุณหภูมิต่ำกว่าที่ไม่ได้เคลือบ (Lin et al., 2011) และชะลอการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโทไซยานิน ฟลาโวนอยด์ และปริมาณฟีโนลิกส์ทั้งหมดด้วย (Zhang and Quantick, 1997) จึงทำให้สามารถควบคุมคุณภาพของผลลิ้นจีได้ และเนื่องจากการเกิดสีน้ำตาลของผิวเปลือก เป็นผลมาจากการสูญเสียน้ำของเปลือก และการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบพวกฟีนอลภายในเปลือก การเคลือบผิวด้วยไคโตแซน จึงเหมือนกับเป็นชั้นป้องกัน (protective barrier) บนพื้นผิวเปลือก ซึ่งจะช่วยลดการสูญเสียน้ำและการแพร่ผ่านของออกซิเจนที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงช่วยชลอการเกิดสีน้ำตาลของผิวเปลือกลิ้นจี่ได้ด้วย อย่างไรก็ตามไคโตแซนจะช่วยยับยั้งการเจริญของโรคพืช (pathogen) ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการเน่าเสียของผลลิ้นจี่หลังการเก็บเกี่ยวได้บางส่วนเท่านั้น ดังนั้นวิธีการเคลือบผิวลิ้นจี่ด้วยไคโตแซนจึงอาจใช้ได้กับการเก็บรักษาผลผลิตช่วงระยะเวลาสั้น ๆ เหมาะกับการขนส่งและการกระจายผลผลิตสำหรับจำหน่ายในพื้นที่ไม่ห่างไกลมากนัก แต่ถ้าการขนส่งผลผลิต/การเก็บรักษาที่ต้องการช่วงระยะเวลายาวขึ้น อาจจำเป็นต้องใช้ร่วมกับวิธีการจัดการแบบอื่น

จากปัญหาดังกล่าวจึงนำมาสู่งานวิจัยนี้ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของไคโตแซน โดยพัฒนาไคโตแซนให้อยู่ในรูปของไคโตแซน/อนุภาคนาโนเงินคอมโพไซต์ (chitosan-silver nanoparticles (CS-AgNPs) composites) เนื่องจากอนุภาคนาโนเงินมีสมบัติต้านจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย (Sanpui et al., 2008) และรา (Panacek et al., 2009) หลายสายพันธุ์ และมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ PPO ด้วย (Pribyl et al., 1980) ผู้วิจัยจึงเล็งเห็นว่าการผนวกสมบัติของทั้งไคโตแซนและอนุภาคนาโนเงินเข้าด้วยกัน จะสามารถปรับปรุงการควบคุมคุณภาพและการยืดอายุการเก็บเกี่ยวผลลิ้นจี่หลังการเก็บเกี่ยวได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยในงานวิจัยนี้จะเตรียม AgNPs ในทิศทางของ green technology โดยใช้ไคโตแซนให้ทำหน้าที่ทั้ง reducing agent และ stabilizing agent ผู้วิจัยต้องการนำเสนอทางเลือกโดยใช้ CS-AgNPs composites เป็นสารเคลือบผิวเพื่อปรับปรุงวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวของผลลิ้นจี่เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลลิ้นจี่ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง โดยคาดหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ผลการทดลองที่ได้จะให้ข้อมูลที่สามารถพัฒนาต่อยอดเพื่อให้ประโยชน์ทั้งต่อภาคการเกษตร อุตสาหกรรมแปรรูป และการส่งออกของลิ้นจี่

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. พัฒนาวิธีการเตรียมอนุภาคนาโนเงินในทิศทางของเคมีสีเขียวโดยใช้ไคโตแซน
2. ศึกษาผลของการใช้สารเคลือบผิว CS-AgNPs ต่อการยืดอายุการเก็บรักษาผลลิ้นจี่ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นการสร้างนวัตกรรมของการเตรียม AgNPs โดยอาศัยไคโตแซนทำหน้าที่เป็นทั้ง reducing agent และ capping agent เพื่อใช้สำหรับเตรียมสารเคลือบผิว CS-AgNP ที่ผนวกสมบัติที่ดีของทั้งไคโตแซนและอนุภาคนาโนเงินไว้ด้วยกัน สำหรับยืดอายุการเก็บรักษาผลลิ้นจี่ที่เก็บรักษาที่

สภาวะอุณหภูมิห้อง ซึ่งเป็นอีกหนึ่งทางเลือกของวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวผลลิ้นจี่ในทิศทางที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมที่มีประสิทธิภาพสูง

2. เป็นงานวิจัยที่ก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจสูง เพราะสามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลลิ้นจี่ได้ยาวนานขึ้น ซึ่งอาจนำไปสู่การขยายขอบเขตการค้า/การส่งออกของลิ้นจี่นี้ และลดการสูญเสียผลผลิตจากการเน่าเสียหรือเสื่อมสภาพในระหว่างการขนส่ง หรือการเก็บรักษาเพื่อรอจำหน่ายหรือแปรรูป
3. เป็นการพัฒนาความรู้ความสามารถของนักวิจัย และสร้างนักวิจัยใหม่ซึ่งเป็นทรัพยากรมนุษย์ที่สำคัญในการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี นอกจากนั้นนักวิจัยยังได้เรียนรู้เพื่อพัฒนาการวิจัยสำหรับการใช้เทคโนโลยีภายในประเทศ เพื่อการประยุกต์ใช้ในการแก้ปัญหาและพัฒนาประเทศต่อไป

บทที่ 2

การทบทวนเอกสารงานวิจัย

ลิ้นจี่

ลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn. Family SAPINDACEAE) เป็นไม้ผลยืนต้นเขตร้อนมีหลายพันธุ์ที่นิยมจำหน่าย ได้แก่ กิมเจ็ง ฮงฮวยและ จักรพรรดิ ปลูกได้หลายภาคของไทย ลิ้นจี่เป็นผลไม้ทางเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ที่สามารถนำผลผลิตที่ได้มาจำหน่ายในรูปของผลไม้สดและผลไม้แปรรูป เช่นการทำลิ้นจี่กระป๋อง ลิ้นจี่อบแห้ง เนื้อลิ้นจี่ มีรสชาติหวานหอมอร่อย เป็นผลไม้ที่นิยมรับประทานและแต่งรสชาติในอาหารหวานคาว และผสมในเครื่องดื่ม เนื้อลิ้นจี่เป็นผลไม้ที่อุดมไปด้วยวิตามิน และเกลือแร่ เช่น วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 ไนอะซีน วิตามินเอ ซี วิตามินบี 6 วิตามินอี โปแตสเซี่ยม ทองแดง สังกะสี ฟอสฟอรัส ซีลีเนียม โฟเลต และมีเส้นใยอาหารสูง นอกจากนี้มีกรดอะมิโนที่เป็นโครงสร้างของโปรตีนหลายชนิด ได้แก่ ไทโรซีน แอสปาราจีน อะลานีน ทรีโอนีน วาลีน และไกลซีน

เนื่องจากลิ้นจี่เป็นผลไม้ที่มีอายุการเก็บรักษาสั้นและเกิดการสูญเสียได้ง่าย ภายใต้สภาพอุณหภูมิห้อง ผิวของลิ้นจี่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลภายใน 2-3 วัน ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องใช้วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม ในทางปฏิบัติพบว่า ที่อุณหภูมิต่ำผลลิ้นจี่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเกิดการเน่าเสียได้ช้ากว่าที่อุณหภูมิสูง สำหรับอุณหภูมิที่นิยมใช้เก็บรักษาผลลิ้นจี่อยู่ในช่วง 0-7 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการเก็บรักษา การลดอุณหภูมิผลจะช่วยลดการคายน้ำของผลและถูกโรคเข้าทำลายได้ยากขึ้น ทำให้ผลลิ้นจี่มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น

นอกจากนั้นเป็นที่ทราบกันดีว่า ปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งต่ออายุการเก็บรักษาผลลิ้นจี คือการเกิดสีน้ำตาล วิธีการแก้ปัญหาดังกล่าวที่ได้ผลดีคือ การรมควันด้วยซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) เนื่องจาก SO_2 เป็นแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) ที่มีความแรงจะไปจำกัดการเกิดออกซิเดชันที่ทำให้เกิดสีน้ำตาลขึ้นที่ผิวเปลือกลิ้นจี่ นอกจากนั้นยังทำให้ที่ผิวเปลือกมีสภาพเป็นกรดจึงช่วยทำให้แอนโทไซยานินเสถียร และยังทำหน้าที่เป็นสารต้านเชื้อรา (antifungal agent) ด้วย (Zauberman et al., 1991) อย่างไรก็ตามวิธีการนี้มีข้อจำกัด ผิวเปลือกผลไม้จะถูกฟอกขาว (bleach) ก่อนและอาจไม่สามารถเปลี่ยนกลับ (recovery) เป็นสีแดงได้อย่างสมบูรณ์ (Underhill et al., 1992) แต่ที่เป็นปัญหาที่สำคัญกว่าคือการตกค้างของ SO_2 ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ปัจจุบันถูกห้ามใช้ในอเมริกากับผลิตภัณฑ์อาหารทุกชนิดยกเว้นองุ่น (Paull et al., 1995)

สีแดงของผิวเปลือกลิ้นจี่เป็นผลมาจากเม็ดสีแอนโทไซยานินทร์ (anthocyanin pigment) (Lee and Wicker, 1991) โดยมี Cyanidin-3-rutinoside และ cyanidine-3-glucoside เป็นองค์ประกอบหลักของแอนโทไซยานินที่พบในผิวเปลือกลิ้นจี่ (Zhang et al., 2004) ความเข้มสีของแอนโทไซยานินขึ้นกับ pH ที่มี

อิทธิพลต่อโครงสร้างของมัน โดยเมื่ออยู่ในรูปของ flavylium จะเสถียรในสภาวะที่เป็นกรด (สีแดง) ในขณะที่เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นเบส จะเปลี่ยนโครงสร้างอยู่ในรูป carabinol base (ไม่มีสี) chalcone (สีเหลือง) หรือ quinonic base (สีน้ำเงิน) (Prasad and Jha, 1978) การเกิดสีน้ำตาลของผิวเปลือกลิ้นจี่เกิดจากการสลายตัว (degradation) ของแอนโทไซยานินโดยการทำงานของเอ็นไซม์ polyphenol oxidase (PPO) และ peroxidase (POD) (Huang et al., 1990; Jiang, 2000; Zhang et al., 2005) การเกิดสีน้ำตาลจะขึ้นกับปัจจัยหลายประการที่ก่อให้เกิดความเครียด (stress) ทั้งสภาพอากาศในระหว่างการสุกของผลไม้ diseases, desiccation และ thermal shock (Underhill et al., 1992)

วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวผลไม้

โดยทั่วไปมีประมาณการสูญเสียผลไม้เขตร้อนหลังการเก็บเกี่ยวทั้งในประเทศที่พัฒนาและกำลังพัฒนาอยู่ในช่วงร้อยละ 10-80 ซึ่งมีสาเหตุมาจากทั้งความเสียหายทางกล (mechanical injury) ความเสียหายทางสรีระวิทยา (physiological damage) และความเสียหายจากการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (pathogen) จากปัญหาการสูญสียผลผลิตจำนวนมากดังกล่าว จึงทำให้จำเป็นต้องมีวิทยาหลังการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมสำหรับผลไม้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้

แต่เดิมวิธีการที่นิยมใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้คือการใช้สารถนอมอาหาร (food preservative) ที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและสามารถควบคุมการเกิดโรคของผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวได้ดี (Spotts et al., 1998; Lurie et al., 1995; Similanick et al., 1993; Wilson et al., 1987; Pusey and Wilson, 1984) เช่น เกลือไบคาร์บอเนต เป็นสารประกอบไอออนิกที่มีสมบัติต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial property) และสามารถยับยั้งการเกิดโรคบางชนิดในผลไม้ เช่น โรคแอนทราโนส (anthanose) ในมะละกอ ที่มีสาเหตุมาจาก *Colletotichum gloeosporiode* (Gamagae et al., 2003) ลดการเจริญของเส้นใยของรา *Rhizopus stolonfer, Alternaria allemate* และ *Fusarium* spp. ที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในแตงโมและพริกหวาน (sweet bell peper) (Aharoni et al., 1997)

Corral (1987) พบว่าการใช้โซเดียมไบคาร์บอเนต และโพแทสเซียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.06 โมล สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ เช่น *Escherichia coli, Lactobacillus plantalum, Strephylococus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* และ Homma, Arimoto & Misato (1981) พบว่าแอมโมเนียมไบคาร์บอเนตสามารถยับยั้งการสร้างคอร์นิเดีย และการงอกของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคราแป้ง โดยมีคุณสมบัติเป็น fungicide หรือสามารถฆ่าเชื้อราได้ และสามารถควบคุมโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวได้

เกลือไบคาร์บอเนตเป็นสารที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้สูงถึงร้อยละ 2 นอกจากใช้ในการถนอมอาหารแล้วยังมีวัตถุประสงค์ในการควบคุมพีเอช และเพื่อปรับปรุงเนื้อสัมผัสและรสชาติ (Lindsay, 1985) ในผักและผลไม้หลายชนิด เช่น มะนาว แครอท พริกหวาน และแตงโม (Punja and Gaye, 1993; Arimotao et al., 1977; Fallik et al., 1997; Aharoni et al., 1997) นอกจากการใช้เกลือไบคาร์บอเนตแล้ว ยังมีรายงานการใช้สารเคมีชนิดอื่น เช่น กรดจิบเบอเรลลิก (gibberellic acid) ที่ความเข้มข้น 330 มิลลิกรัม/ลิตร ไคเนติน (kinetin) ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร (Gautam and Chundawat,

1990) และไอโซโพรพิลฟีนิลคาร์บาเมต (iso-propyl-n-phenyl carbamate) (Luxminarayana and Subramanyam, 1967)

การเก็บรักษาผลไม้ที่อุณหภูมิต่ำก็สามารถใช้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้ได้เช่นกัน โดยลดการเกิดออกซิเดทีฟเมตาบอลิซึม (oxidative metabolism) และลดการปลดปล่อยแก๊สเอทิลีน (Laxminarayah, 1980; Broughten and Wong, 1979; Salunkhe and Desai, 1984) ถ้าเก็บผลไม้ที่อุณหภูมิ 4°C ช่วงระยะเวลาสั้น ๆ (น้อยกว่า 10 ชั่วโมง) จากนั้นย้ายไปเก็บที่อุณหภูมิ 20 °C จะสามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้ได้นานถึง 24 วัน (Broughten and Wong, 1979) อย่างไรก็ตาม การเก็บรักษาผลไม้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลานานจะทำให้เกิดบาดแผลจากความเย็น (chilling injury) และเมื่อนำมาทำให้สุกที่อุณหภูมิ 20°C จะทำให้การสุกของผลไม้ไม่เป็นแบบปกติ (ripened irregularly) ให้รสและกลิ่นที่ไม่ดี (Sulaunkhe and Desai, 1984) โดยทั่วไปอุณหภูมิที่นิยมใช้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้คือที่อุณหภูมิ 20 °C

นอกจากนั้นการสุกของผลไม้จะช้าลงเมื่อเก็บในสภาพดัดแปลงบรรยากาศ modified atmosphere) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ทำให้แก๊สในสภาวะที่ใช้เก็บรักษามีความเข้มข้นเปลี่ยนแปลงไปจากสภาพบรรยากาศปกติ มีผลให้ผลไม้มีอัตราการหายใจลดลง จึงสามารถชลอการสุกหรือการเน่าเสียของผลไม้ที่มีสาเกตุจากแก๊สเอทิลีน (ethylene) ที่ผลไม้ผลิตขึ้นมา ลดความเสียหายทั้งปริมาณและคุณภาพของผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวได้ดี เช่น เมื่อกำจัดเอทิลีนที่ผลไม้สร้างขึ้นมาออกจากบรรยากาศในสภาวะที่ใช้เก็บรักษา ผลละมุดจะมีอายุการเก็บรักษานานขึ้น หรือสามารถชลอการสุกได้นานถึง 23 วัน (Krishna and Rao, 1989) อย่างไรก็ตาม ถ้าการดัดแปลงบรรยากาศไม่เหมาะสมก็อาจส่งผลเสียต่อผลไม้ได้เช่นกัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลิ่น และรสชาติของผลไม้ จากการที่มีปริมาณแก๊สออกซิเจนต่ำ ในขณะที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์สูงเกินไป จนเกิดสภาวะการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic respiration) ขึ้น ในทางปฏิบัติมักพบว่าการเก็บักษาผลไม้ในสภาพดัดแปลงบรรยากาศจะได้ผลดียิ่งขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับการใช้อุณหภูมิต่ำ

การยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้โดยใช้สารเคลือบผิวที่บริโภคได้

ภายหลังการเก็บเกี่ยว ผลไม้จะมีการเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยาและกระบวนการหายใจที่ทำให้เกิดการสูญเสียเนื้อเยื่อของผลไม้ในระหว่างการเก็บรักษา ทำให้ผลไม้มีการสูญเสียน้ำ เปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอก เนื้อสัมผัสและคุณค่าทางอาหาร ส่งผลให้มูลค่าทางเศรษฐกิจลดลง การยืดอายุผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวข้องกับปัจจัย 3 ประการ คือ ลดการสูญเสียน้ำ ลดกระบวนการทางสรีรวิทยาที่ทำให้เกิดการสุก และลดอัตราการเจริญของจุลินทรีย์

วิธีการหนึ่งที่ได้รับการยอมรับว่าสามารถลดหรือแก้ปัญหาดังกล่าวได้คือ การใช้สารเคลือบผิวที่บริโภคได้ (edible coating) ซึ่งมีสมบัติเป็น semi-permeable coating ซึ่งจัดเป็นการรักษาผลไม้โดยการดัดแปลงบรรยากาศแบบหนึ่ง (Banks, 1984) ซึ่งจะช่วยปกป้องผลไม้ที่เน่าเสียได้ง่ายจากการเสื่อมสลายได้โดยการไปชลอการสูญเสียน้ำจากการระเหย ยับยั้งการแลกเปลี่ยนแก๊ส (gas exchange) โดยทำให้ปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากกระบวนการหายในมีมากขึ้น ในขณะที่มีปริมาณแก๊สออกซิเจนต่ำลง มีผลไปยับยั้งการทำงานของแก๊สเอทิลีน (Hulme, 1971) ควบคุมอัตราการหายใจ (respiration rate) เพิ่มคุณภาพทางเนื้อสัมผัส ช่วยให้สารประกอบที่ระเหยง่ายคงอยู่ ลดการสูญเสียคุณค่าทางโภชนะ และลดการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของผลไม้ (Debeaufort et al., 1998) โดยประสิทธิภาพขึ้นกับการเลือกใช้

สารเคลือบผิวที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดองค์ประกอบของแก๊สภายใน (internal gas composition) ที่เป็นประโยชน์ต่อการยืดอายุของผลไม้ได้ดี (Romanozzi et al., 2002)

ไคโตแซน (chitosan) เป็นสารพอลิแซคคาไรด์พวกแคทไอออนิก (cationic polysaccharide) ที่ได้จากกระบวนการดีอะเซติเลชัน (acetylation) ของไคตินที่สกัดมาจากเปลือกกุ้ง หรือกระดองปลาหมึก มีชื่อทางเคมีว่า poly-β(1,2)-2-deoxy-D-glucose เป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภท macromolecule linear polymer polysaccharide ต่อกันด้วยพันธะ 1,4-β-glycoside น้ำหนักโมเลกุลสูง ไม่ละลายน้ำ แต่มีสมบัติเป็น cationic polyelectrolyte เนื่องจากมีหมู่ $-NH_2$ ที่ตำแหน่งคาร์บอนตำแหน่งที่สองทำให้ไคโตแซนสามารถละลายได้ในสารละลายกรด และประจุบวก (NH_4^+) บนโครงสร้างไคโตแซน สามารถเกิดการกระทำกับประจุลบของสารประกอบอินทรีย์ เช่น โปรตีน แอนไอออนิกพอลิแซคคาไรด์ (anionic polysaccharide) กรดนิวคลิอิ ทำให้ได้ประจุไฟฟ้าที่เป็นกลาง และสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออนของโลหะหนักได้โดยใช้หมู่ NH_2^- ในการเกิด chelate metal ion กับโลหะได้หลายชนิด เช่น โครเมียม เงิน และแคดเมียม เป็นต้น เนื่องจากมีประจุบนสายโมเลกุล จึงสามารถย่อยสลายเองได้ตามธรรมชาติโดยไม่ก่อให้เกิดการตกค้างและเป็นมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม

จากสมบัติของไคโตแซนที่สามารถเกิดเป็น semi-permeable film ได้ดี การใช้ไคโตแซนเคลือบผิวผลไม้จึงเหมือนกับเป็นการดัดแปลงบรรยากาศภายใน (modify the internal atmosphere) พร้อมกับการลดสูญเสียน้ำจากการระเหยของผลไม้ (Bai et al., 1988) และชลอการสุกของผลไม้ เนื่องจากการเคลือบผิวเป็นการจำกัดการแลกเปลี่ยนแก๊สภายในผลไม้ นอกจากนั้นยังช่วยป้องกันการเหี่ยวย่นของผลจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี รวมทั้งเพิ่มความมันวาว ทำให้ผลไม้มีลักษณะที่ดีเป็นที่พึงพอใจของผู้บริโภคเพิ่มขึ้น แต่บรรยากาศที่สร้างขึ้นโดยการเคลือบผิวจะเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นกับสภาวะของสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ โดยขึ้นกับผลของการหายใจของผลไม้และการแพร่ผ่านได้ของสารเคลือบผิว ซึ่งประสิทธิภาพในการควบคุมแตกต่างกันไปขึ้นกับทั้งความเข้มข้นของไคโตแซน และสรีระวิทยาของผลไม้

El Ghaouth et al. (1992) ศึกษาการใช้ไคโตแซนเคลือบผิวมะเขือเทศ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 พบว่าการเคลือบผิวมะเขือเทศด้วย ไคโตแซนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 จะให้ผลในการยืดอายุการเก็บรักษาดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผลที่เคลือบด้วยความเข้มข้นร้อยละ 1 และผลที่ไม่ผ่านการเคลือบผิว และสามารถลดการเกิดโรคจาก *Botrytis cinere* ซึ่งเป็นเชื้อหลักที่ทำให้เกิดโรคในมะเขือเทศ ในขณะที่ El Ghaouth et al. (1991) พบว่าการใช้ไคโตแซนที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 และ 1.5 เคลือบบนผลสตรอเบอรี สามารถยับยั้งโรคจากราเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียสได้ไม่แตกต่างจากสารยับยั้งเชื้อรา Rovral ในช่วง 21 วันแรก แต่หลังจากนั้นไคโตแซนจะยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่า Rovral อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Du, Gemma and Iwahori (1997) พบว่าการเคลือบผิวสามารถลดการผลิตก๊าซเอทิลี มีปริมาณก๊าซ CO_2 ภายในผลเพิ่มขึ้น ในขณะที่มีปริมาณก๊าซ O_2 ของผลแพร์พันธุ์ Shinko ลดลง และไคโตแซนยังให้ผลยับยั้งการเจริญของ *Botrytis cinere* และราที่ทำให้ผลแพร์พันธุ์ Housui เกิดการเน่าเสียได้ ในทำนอง

เดียวกัน Zhang and Quantick (1998) พบว่าการเคลือบผิวด้วยไคโตแซนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Botrytis cinerea* และ *Rhizopus* sp. ที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของผลสตรอเบอรีและผลราสเบอรีได้

Yueming and Yuebiao (2000) รายงานว่าการเคลือบผิวด้วยไคโตแซนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5-2.0 มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยสามารถลดอัตราการหายใจ การสูญเสียน้ำหนัก ลดการเกิดเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส การเปลี่ยนสี คุณภาพการบริโภค และยับยั้งการเน่าเสียของลำไยระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียสได้บางส่วน และ Pen and Jiang (2003) รายงานว่าการเคลือบผิว fresh-cut Chinese water chestnut (CWC) ด้วยไคโตแซนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5-2.0 มีผลต่อคุณภาพการบริโภคและการเจริญของจุลินทรีย์ โดยสามารถชะลอการเปลี่ยนสี ซึ่งสัมพันธ์กับเอนไซม์ฟีนิลอะลานิล แอมโมเนียไลเอส (phenylalanine ammonia lyase), เอนไซม์ โพลีฟีนอล ออกซิเดส (polyphenol oxidase) และเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) รวมทั้งปริมาณฟีนอลทั้งหมด (total phenolic content) ลดต่ำลง และยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ด้วย

สำหรับการเคลือบผลลิ้นจี่ด้วยไคโตแซนที่ความเข้มข้น 1-2 ก./ 100 มล. (ในสารละลายกรด) จะชลอการเกิดสีน้ำตาลของผิวเปลือกลิ้นจี่ (Zhang and Quantick, 1997) วิธีการนี้จะจำกัดการสูญเสียแอนโทไซยานิน flavenoids และสารประกอบฟีโนลิกส์ทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบที่ผิวเปลือกลิ้นจี่ นอกจากนั้นยังชลอการทำงานของเอ็นไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส และยับยั้งการทำงานบางส่วนของเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส อีกทั้งยังสามารถยับยั้งแบคทีเรีย (phytopathogenic bacteria) และราด้วย (Allan and Hadwiger, 1979; Hirano and Nagao, 1989) เช่น *Botrytis cinere* ที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของผลแพร์และมะเขือเทศ (El Ghaouth et al., 1992; Du et al., 1997) และ *Rhizopus* sp. ที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของสตอเบอรี่และราสเบอรี เป็นต้น

กลไกการยับยั้งการเจริญของราของไคโตแซนมาจากการที่ไคโตแซนก่อให้เกิด phytoalexin formation และเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ไคติเนส (chitinase) และกลูคาเนส (β-1,3 glucanase) เอนไซม์ทั้งสองนี้สามารถเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของไคตินและกลูแคน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ราส่วนใหญ่เพื่อยับยั้งการเจริญของราที่ก่อให้เกิดโรคในพืชได้ ไคโตแซนจึงเป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับใช้เพื่อควบคุมการเสื่อมสลายของผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว โดยเฉพาะในสถานที่ที่ห้ามการใช้สารต้านราสังเคราะห์ (synthetic fungicides) จากสมบัติดังกล่าวหากนำไคโตแซนซึ่งเป็นกลุ่มสารที่ผลิตจากธรรมชาติมาใช้ นอกจากจะช่วยลดการสูญเสียจากการเกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยวได้แล้วยังไม่ก่อให้เกิดสารตกค้างที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นแนวทางในการพัฒนาระบบเกษตรอย่างยั่งยืน

อนุภาคนาโนเงิน

เทคโนโลยีนาโน (nanotechnology) เป็นการจัดการ (manipulate) สสารในขนาดนาโน (1-100 นาโนเมตร) ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่แตกต่างจากผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดใหญ่ โดยเฉพาะนาโนคอมโพไซต์พอลิเมอร์ (nanocomposite polymers) ได้รับความสนใจอย่างมาก มีประมาณการตลาดของการใช้นาโนคอมโพไซต์ในปี 2011 มากถึง 45 ล้านกิโลกรัม และมีอัตราการเติบโต 24% (Dallas et al., 2011) นาโนคอมโพไซต์พอลิเมอร์เป็นวัสดุใช้งานขั้นสูง (advanced functional materials) ประกอบด้วย

อนุภาคนาโน (nanoparticles) ที่กระจายตัวอยู่ภายในพอลิเมอร์แมทริกซ์ (polymer matrix) และ/หรือถูกเคลือบด้วยพอลิเมอร์ ทำให้เกิดโครงสร้างแบบ core-shell จึงทำให้มีสมบัติผสมของวัตถุดิบทั้งสอง โดยในจำนวนอนุภาคนาโนทั้งหมดที่มีการใช้งานเป็น polymer functionalizing agent อนุภาคนาโนเงิน (silver nanoparticles) ได้รับความสนใจมากที่สุด

อนุภาคนาโนเงินเป็นวัสดุที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในปัจจุบัน สามารถสังเคราะห์ได้ด้วยวิธีการทางกายภาพและชีวภาพ อนุภาคนาโนแต่ละชนิดจะมีสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์ทั้งทางไฟฟ้า ออปติคัล และสมบัติทางชีวภาพ จึงสามารถประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย เช่น ใช้เร่งปฏิกิริยา (catalysis) เป็นตัวตรวจวัดทางชีวภาพ (biosensing) การขนส่งตัวยา (drug delivery) การประดิษฐ์อุปกรณ์นาโน (nanodevice fabrication) และทางสิ่งแวดล้อม เป็นต้น (Ahamed et al., 2010) เมื่อไม่นานมานี้ความสนใจของอนุภาคนาโนเงินมุ่งเน้นไปที่สมบัติต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial properties) ของมัน โดยคาดหวังว่าสามารถใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในอนาคต เพราะเป็นที่ทราบกันดีว่าไอออนเงินและสารประกอบเงินเป็นพิษต่อจุลินทรีย์โดยเป็น strong biocidal effect กับแบคทีเรียถึง 16 สายพันธ์รวมถึง *E.coli* (Dallas et al., 2011) ถึงแม้ว่าโลหะเงินจะไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ แต่การได้รับโลหะเงินในปริมาณสูงในเนื้อเยื่อ จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนสีของผิวหนังเป็นสีฟ้า อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานผลกระทบทางลบที่เกิดกับผู้บริโภคที่ใช้สินค้าที่มีอนุภาคนาโนเงิน

แต่เดิมวิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินมักใช้ตัวทำละลายอินทรีย์และรีดิสซิงเอเจนต์ที่เป็นพิษ (Sakai et al., 2006; Pastoriza-Santos and Liz-Marzan, 2002) ทั้งต่อสิ่งมีชีวิตและเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันเมื่อประชากรของโลกเริ่มให้ความสนใจมากขึ้นเกี่ยวกับเคมีเขียว (green chemistry) จึงก่อให้เกิดความพยายามที่จะพัฒนากระบวนการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (eco-friendly) ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนที่เป็นกระบวนการง่าย มีต้นทุนต่ำ และสามารถประยุกต์ใช้งานได้ดีโดยเฉพาะสามารถขยายสเกลของการผลิตทางการค้าได้ วิธีการหนึ่งที่มีความเป็นไปได้สูงคือการใช้พอลิเมอร์ตามธรรมชาติ (natural polymers) ตัวอย่างเช่น Raveendran et al. (2003) สังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินโดยใช้แป้งเป็น capping agent และใช้กลูโคสเป็นรีดิวซิงเอเจนต์ หลีกเลี่ยงการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นพิษ

ถึงแม้การเตรียมอนุภาคนาโนเงินสามารถทำได้หลายวิธีทั้งอาศัยกระบวนการทางกายภาพและทางเคมี แต่ที่นิยมกันมากที่สุดวิธีหนึ่ง คือการเตรียมอนุภานาโนเงินที่ถูกกระจายและยึดเหนี่ยวในแมทริกซ์ของพอลิเมอร์ โดยการดักจับ (emtrapment) แคทไอออนเงินในโซ่พอลิเมอร์ตามด้วยการเกิดปฏิกิริยารีดักชันด้วยรีดิวซิงเอเจนต์ (reducing agent) การที่พอลิเมอร์เป็นสับเสตรทที่ได้รับความสนใจมากที่สุดชนิดหนึ่งเนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่จำเพาะเจาะจง (specific morphology) และมีธรรมชาติทางเคมีและโครงสร้างที่เหมาะสม มีโซ่พอลิเมอร์ที่ยาวทำให้อนุภาคนาโนยึดติดได้ อีกทั้งยังมีหมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์ที่เหมาะสมที่สามารถใช้เป็น targeted reactive site สำหรับควบคุมการสังเคราะห์อนุภาคนาโนได้ในขั้นตอนเดียว วิธีการนี้มีข้อดี 2 ประการคือ พอลิเมอร์ที่ทำหน้าที่เป็นเทมเพลต (template) ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนจะช่วยปรับปรุงการกระจายของอนุภาคนาโนเข้าสู่ภายในของพอลิเมอร์แมทริกซ์ และยังช่วยป้องกันการเกาะกลุ่มของอนุภาคเงิน พอลิเมอร์ที่เป็นเทมเพลตจะช่วยลดขนาดของอนุภาคนาโนทำให้มีช่วงการกระจายของขนาดแคบและมีรูปร่างดี (Dallas et al., 2011)

หลังจากไอออนเงินถูกยึดเหนี่ยวบนสายพอลิเมอร์แล้ว จึงอาศัยปฏิกิริยารีดักชันของเกลือเงินโดยใช้โบโรไฮไดร์ ซิเตรต แอสคอร์เบต หรือรีดักแตนต์ (reductant) ตัวอื่น เพื่อให้เกิดอะตอมเงิน (Ag^0) ที่จะเข้ามารวมกลุ่มกันเป็น oligomeric clusture และให้คอลลอยด์ของอนุภาคนาโนเงินที่เสถียรที่สามารถกระจายอยู่ในน้ำและในตัวทำละลายอินทรีย์ (Sharma et al., 2009) โดยที่ขนาด มอร์โฟโลจี (morphology) และสมบัติของอนุภาคนาโนเงินที่เตรียมได้จะขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้เตรียม เช่น จลนศาสตร์ (kinetics) ของการกระทำกับรีดิวซิงเอเจนต์ (reducing agent) และการดูดซับของ stabilizing agent บนอนุภาคนาโน ในระหว่างการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงิน ขนาดและการรวมเป็นกลุ่มก้อนจะถูกควบคุมโดยเสถียรภาพ (stabilization) ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการผลักกันของแรงดึงดูดของไฟฟ้าสถิต และ electrosteric repulsion กรณีของนาโนคอมโพไซต์เงิน (silver nanocomposites) จำเป็นต้องมีการกระจายของอนุภาคเงินบนพื้นผิวของพอลิเมอร์โดยไม่เกิดการเกาะกลุ่ม (aggregates) ที่จะส่งผลให้สมบัติต้านจุลินทรีย์ของมันลดลง และต้องมีขนาดเล็กโดยมีการกระจายของช่วงขนาดอนุภาคต่ำด้วย

บรรจุภัณฑ์อาหารแอกทีฟที่บรรจุอนุภาคนาโนเงิน

การเปลี่ยนแปลงของสังคม โลกาภิวัฒน์ วงจรชีวิตของบรรจุภัณฑ์ และความต้องการวิธีตรวจวัดความปลอดภัยอย่างเข้มงวดทำให้เกิดแรงผลักดันให้มีการสร้างบรรจุภัณฑ์แบบใหม่ที่ตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภค ดยเฉพาะปัจจุบันที่ผู้บริโภคมีความนิยมอาหารพร้อมปรุง (ready-to-eat) ที่คงความสดและดีต่อสุขภาพ แต่อาหารเหล่านี้มักง่ายต่อการแห้งหรือขาดน้ำที่พื้นผิว (surface dehydration) สูญเสียความชื้น ออกซิเดชัน การเกิดสีน้ำตาล และการปนเปื้อนแบบ cross contamination จากที่ตัด (cutting boards) มีดพื้นที่การทำงาน เครื่องมือ หรือสิ่งแวดล้อมของการทำงาน การเกิดไบโอฟิล์ม (biofilm) จากจุลินทรีย์ในอาหารหลายชนิดเกิดสารพิษที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค (Donlan, 2002) การเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคทางอาหาร ได้แก่ *Salmonella, Campylobacter, Listeria* และ *Escherichica coli* 0157:H7 จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำให้ลดลง (Luning et al., 2008)

เมื่อไม่นานมานี้ มีความนิยมใช้โลหะเงินเนื่องจากมีสมบัติ antibiotic resistant ต่อ *Staphylococcus aureus* (Deurenberg and Stobberingh, 2008) จึงทำให้มีการพัฒนาบรรจุภัณฑ์แอกทีฟที่สามารถปลดปล่อยไอออนเงินขึ้น โดยต้องมีปริมาณไอออนเงินอย่างต่ำในช่วง 50-100 Ag^+/kg ใน low buffered system หรือในน้ำ จึงจะสามารถแสดง biocidal effect ได้กับการประยุกต์ใช้ทางอาหาร (Fernandez et al., 2010) กลไกการต้านแบคทีเรียเกิดจากการที่ไอออนเงินเกิดการกระทำกับองค์ประกอบของไซโตปลาสซึมและกรดนิวคลีอิก และเปลี่ยนแปลงแอกติวิตีของเอ็นไซม์หลังจากเกิดคีเลชัน (chelation) ของหมู่ไทออล (thiol group) ของโปรตีน (Holt and Bard, 2005) โดยไอออนเงินจะเข้ากระทำที่ไรโบโซม (ribosome) ส่งผลให้ยับยั้งการแสดงออกของเอ็นไซม์ (expression of enzymes) และเข้ารบกวนการแพร่ผ่านของเมมเบรน (membrane permeability) โดยไอออนเงินจะไปเหนี่ยวนำให้เกิดการรั่วของดปรตอน (a massive proton leakage) ของเมมเบรน และขัดขวางห่วงโซ่ระบบทางเดินหายใจ (respiratory chain) และกลไกที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานของเซล

สำหรับอนุภาคนาโนเงิน (silver nanoparticles; AgNPs) มักหมายถึงอนุภาคเงินที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 100 นาโนเมตร ซึ่งมีสมบัติออปติคัลและเคมีที่เป็นเอกลักษณ์ขึ้นกับขนาดและรูปร่างของอนุภาคนา

โนเงิน ทำให้เหมาะกับการประยุกต์ใช้งานในหลากหลายสาขาวิชา รวมทั้งการใช้งานในรูปของบรรจุภัณฑ์แอกทีฟ โดยสมบัติต้านจุลินทรีย์ของ AgNPs เป็นผลมาจากการรั่วของเมมเบรนเนื่องจากการกะทำของ AgNPs กับเมมเบรนของแบคทีเรีย (Sondi and Salopek-Sondi, 2004; Pal et al., 2007) อย่างไรก็ตาม Marones et al. (2005) และ Fernandez et al. (2005) รายงานว่า แอกติวิตีต้านจุลินทรีย์มากที่สุดจะพบเมื่อ AgNPs มีขนาดในช่วง 1-10 นาโนเมตรและมีการกระจายที่ดี

การสังเคราะห์ AgNPs ทำได้หลายวิธี โดยอาจใช้พอลิเมอร์เป็นตัวพาทั้งอยู่ในรูปของแมคโครโมเลกุลทางชีวภาพ (biological macromolecules) สารอนินทรีย์ที่มีรูพรุน (mesoporous inorganic materials และไฮโดรเจล (hydrogels) (Mohan et al., 2007) การสังเคราะห์ AgNPs ทำได้โดยอาศัยปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ไอออนเงินที่มาจากสารประกอบเกลือของเงิน เช่น ซิลเวอร์ไนเตรท (silver nitrate) สำหรับ reducing agents อาจเป็นได้ทั้งกระบวนการทางกายภาพ เช่น การใช้ความร้อน หรือ แสงยูวี (UV radiation) สารเคมี เช่น โบโรไฮไดรด์ (borohydride) กลูโคส (D-glucose) กรดแอสคอร์บิก (L-ascorbic acid) กรดแลกติก (lactic acid) หรือเป็นกระบวนการผสม เช่น hydrothermal เป็นต้น (Llorens et al., 2012)

อนุภาคนาโนเงินสามารถตรึง (immobilize) เข้ากับพอลิเมอร์ที่เป็นวัสดุที่ใช้ทำบรรจุภัณฑ์อาหาร โดยมากนิยมใช้พอลิเมอระรรมชาติที่เป็นทรัพยากรหมุนเวียน (renewable resources) เป็นตัวพาอนุภาคนาโนเงิน อย่างไรก็ตามพอลิเมอร์ชีวภาพมักไวต่อความชื้น (sensitive to humidity) และดูดซับความชื้นได้ดี ทำให้เป็นปัญหาสำหรับการควบคุมการปลดปล่อย AgNPs อย่างไรก็ตามการที่พอลิเมอร์ธรรมชาติมีสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic nature) กลับช่วยส่งเสริมฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ตัวอย่างพอลิเมอร์ชีวภาพที่นิยมใช้เป็นตัวพาและรีดิวซิงเอเจนต์ คือ ไคโตแซน (chitopsan) ซึ่งเป็นพอลิแคทไอออนิกไบโอพอลิเมอร์ (polycationic biopolyemer) ที่มาจากไคตินโดยอาศัยปฏิกิริยา deacetylation

Rhim et al. (2006) แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพต้านแบคทีเรีย *E. coli*, *S. aureus* และ *Listeria monocytogenenes* ของนาโนคอมโพไซต์ที่มีไคโตแซนเป็นองค์ประกอบหลัก (chitosan based-nanocomposites) ที่ประกอบด้วย AgNPs ในขณะที่ Sanpui et al. (2008) ใช้ไคโตแซนเป็นทั้งสเตบิไลเซอร์และรีดิวซิงเอเจนต์ในการสังเคราะห์ silver/chitosan nanocomposite ที่มีสมบัติต้านจุลินทรีย์ และ Yoksan and Chirachanchai, 2010) แสดงการสังเคราะห์ AgNPs ที่มีขนาด 20-25 นาโนเมตรโดยอาศัยปฏิกิริยารีดักชันของซิลเวอร์ไนเตรตในสารละลายไคโตแซน-กรดอะซิติกโดยใช้รังสีแกรมมา 35 kGy จากนั้นจึงนำมาเติมลงในแป้งข้าวจ้าว (rice starch) เพื่อผลิตฟิล์มไคโตแซน/แป้งที่มีสมบัติต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial chitosan/starch films) โดยสามารถต้านการเจริญของทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนั้น Ali wt al. (2011) ได้เตรียม chitosan-silver nanoparticles ที่มีขนาด 165 นาโนเมตรโดยอาศัยการเกิด ionic gelation กับ tripolyphosphate ที่มีสมบัติต้านการเจริญของ *S. aureus*

อย่างไรก็ตามพอลิเมอร์ที่ใช้ทำบรรจุภัณฑ์อาหารจะต้องมีความปลอดภัยเป็นที่ยอมรับได้ตาม GRAS (Generally Recognized as Safe) Del Nobile et al. (2004) ศึกษาแอกติวิตีต้านจุลินทรีย์ของ polyethyleneoxide-like coating ที่บรรจุ AgNPs ที่มีขนาด 90 นาโนเมตรและมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ

Alicyclobacillus acidoterrestris และประยุกต์ใช้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาน้ำแอปเปิ้ล ในขณะที่ An et al. (2008) สามารถยืดอายุการเก็บรักษาแอสปารากัสที่ 2°C ได้นานถึง 10 วัน เมื่อนำมาเคลือบด้วยสารเคลือบผิว polyvinylpyrrolidone ที่บรรจุ AgNPs ที่มีขนาด 15-25 นาโนเมตร และ Li et al. (2009) ประเมินประสิทธิภาพของส่วนผสมที่ประกอบด้วย polyethylene, AgNPs อนุภาคนาโนของ TiO_2 และคาโอลิน (kaolin) เพื่อใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษา Chinese jujube พบว่าให้ผลดีกับทั้งปัจจัยทางกายภาพและเคมี และคุณภาพทางประสาทสัมผัส

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมอนุภาคนาโนเงินและสารเคลือบผิวไคโตแซน-อนุภาคนาโนเงิน

ในการทดลองนี้ใช้ chitosan flakes จากกระดองปู (practical grade > 85% deacylated: Sigma-Aldrich) ทั้งในกระบวนการเตรียมอนุภาคนาโนเงิน (AgNPs) และการเตรียมสารเคลือบไคโตแซน-อนุภาคนาโนเงิน (CS-AgNPs coating)

การเตรียมอนุภาคนาโนเงินปรับปรุงมาจากวิธีการของ Wei et al. (2009) โดยใช้ไคโตแซนทำหน้าที่เป็นทั้ง reducing agent และ capping agent วิธีการเตรียมทำได้ง่ายโดยผสมสารละลาย 52.0 mM $AgNO_3$ 4 มิลลิลิตร กับสารละลายไคโตแซนเข้มข้น 6.92 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 10 มิลลิลิตร คนอย่างสม่ำเสมอที่อุณหภูมิ 95°C สารละลายจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็น เหลืองอ่อน และน้ำตาลเหลือง (yellowish brown) ในที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นการเกิดขึ้นของอนุภาคนาโนเงิน (AgNPs) สารละลายดังกล่าวถูกนำไปใช้ในการตรวจวัดขนาดและรูปร่างของ AgNPs ด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนแบบส่องผ่าน และศึกษาสมบัติต้านจุลินทรีย์โดยใช้กลุ่มควบคุมเป็นสารละลายที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาทั้งหมดยกเว้นไม่มี $AgNO_3$ ในกรณีที่ต้องการใช้สำหรับเตรียมสารเคลือบผิว Cs-AgNPs ที่ต้องทราบความเข้มข้นแน่นอนของ AgNPs จะนำสารละลายดังกล่าวมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออก จากนั้นนำส่วนของ filtrate ที่ประกอบด้วยคอลลอยด์ของ AgNPs มาทำให้แห้ง อนุภาคของแข็ง AgNPs ที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ Ag ที่เป็นองค์ประกอบเพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณที่เหมาะสมสำหรับเติมลงในสารละลายไคโตแซนเพื่อเตรียมเป็นสารเคลือบผิว CS-AgNPs ต่อไป

สำหรับการเตรียมสารเคลือบ Cs-AgNPs ปรับปรุงมาจากวิธีการของ Sanpui, et al. (2008) เพื่อใช้สำหรับเคลือบผิวผลลิ้นจี่ โดยผสมอนุภาคนาโนเงินที่เตรียมได้ที่ความเข้มข้นที่กำหนดกับ 2%(w/v) ไคโตแซนในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 2%(w/v) คนให้ละลายและปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 5.0 ด้วย 1M NaOH การเลือกใช้ความเข้มข้นของไคโตแซนที่ความเข้มข้นนี้เนื่องจากมีรายงานว่าเป็นความเข้มข้นที่ดีที่สุดสำหรับการชลอการเกิดสีน้ำตาลและยืดอายุการเก็บรักษาลิ้นจี่และลำไยที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (Zhang and Quantick, 1997; Jiang and Li, 2000) สารเคลือบ CS-AgNPs ที่เตรียมได้จะถูกนำไปใช้เพื่อเคลือบผิวผลลิ้นจี่ สำหรับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองนี้เลือกใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของอนุภาคเงินที่ 0.06 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเป็นขนาดความเข้มข้นที่ยอมรับว่ามีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคตามมาตรฐานของ United State Environment Protection Agency (USEPA) สำหรับกลุ่มควบคุมที่ใช้ในการทดลองนี้จะเป็นผลลิ้นจี่ที่ไม่ได้เคลือบผิว

การศึกษาสมบัติของอนุภาคนาโนเงิน

การเกิดขึ้นของอนุภาคนาโนเงินสามารถตรวจวัดสารละลายสีน้ำตาลเหลืองที่เตรียมได้โดยด้วยเทคนิค UV-visible spectroscopy ที่ความยาวคลื่นในช่วง 350-800 นาโนเมตร และตรวจวัด ขนาดและมอฟอโลจีย์ (morphology) ของอนุภาคนาโนเงินด้วยเทคนิค transmission electron microscope (JEOL, JEM-1011; Japan) โดยใช้แรงดันไฟฟ้าที่ 360 kV การเตรียมสารตัวอย่างทำได้โดยหยด colloidal AgNPs 1 หยดบน carbon coated sample grid ที่อุณหภูมิห้อง

การศึกษาสมบัติต้านจุลินทรีย์ของอนุภาคนาโนเงิน โดยใช้ *E.coli* และ *A. aureus* เป็นแม่แบบสำหรับแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก ตามลำดับ ทำได้โดยเตรียม bacterial suspension (100 µl ของ 10^{-4}-10^{-5} CFU ml^{-1}) จากนั้นกระจาย (spread) ลงบนพื้นผิวของ nutrient agar plate (ทำ 4 ซ้ำ) ในที่นี้ได้ใช้เทคนิค disc diffusion assay ที่ดัดแปลงมาจากการใช้เพื่อหาความไว (sensitivity) ของแบคทีเรียต่อสารแอนติไบโอติก โดยแทนที่แผ่น (disc) ด้วยการเจาะ nutrient agar plates ที่ผ่านการ spread ด้วยแบคทีเรีย จากนั้นจึงบรรจุ AgNPs ที่ความเข้มข้นที่กำหนด นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจวัด zone of inhibition ของ AgNPs โดยวัดความกว้างของ clear zone ที่เกิดขึ้นรอบ ๆ ตำแหน่งเจาะ สำหรับการวิเคราะห์ the minimal inhibitory concentration (MIC) ของ AgNPs ทำได้โดย inoculate แบคทีเรีย *E. coli* จำนวน 10^6 cfu/ml ลงใน nutrient broth ที่เติม AgNPs ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันตามกำหนด นำไปบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมงที่ 37 °C ค่า MIC แสดงได้ด้วยปริมาณ AgNPs ต่ำสุดที่ไม่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื่อขุ่นเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า

การเตรียมตัวอย่างลิ้นจี่

ผลลิ้นจี่ที่ใช้ในการทดลองจะถูกเก็บเกี่ยวจากสวนภายในพื้นที่ปลูกในจังหวัดภาคเหนือและขนส่งสู่ห้องปฏิบัติการภายใน 24 ชั่วโมง โดยไม่ผ่านการจัดการเบื้องต้น จากนั้นจึงคัดเลือกให้มีขนาดและสีผิวเปลือกที่ใกล้เคียงกัน และไม่ปรากฏการเสื่อมสลายจากโรคพืชหรือจุลินทรีย์ โดยจัดแบ่งกลุ่มศึกษาเป็น 3 กลุ่ม แต่ละกลุ่มทำ 3 ซ้ำ/วัน คือ กลุ่มควบคุม (ผลลิ้นจี่ที่ไม่ได้เคลือบผิว) กลุ่มตัวอย่างที่เคลือบผิวด้วยสารละลายไคโตแซน และกลุ่มตัวอย่างที่เคลือบผิวด้วยสารเคลือบ CS-AgNPs โดยนำผลลิ้นจี่ชุบในสารละลายสารเคลือบผิวเป็นเวลา 2 นาทีและทำให้แห้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง บรรจุในถาดพลาสติกถาดละ 35 ผล คลุมด้วยพลาสติก (รูปที่ 1) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30±5°C; 60±5%RH) เป็นระยะเวลา 10 วัน (หรือจนกว่าผลผลิตจะแสดงให้เห็นถึงการเสื่อมสภาพอย่างเด่นชัด) โดยเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาตรวจวัดสมบัติที่บ่งชี้ถึงคุณภาพที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการเก็บรักษาตามระยะเวลาที่กำหนด เพื่อทำการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลลิ้นจี่

รูปที่ 1 ผลลิ้นจี่และวิธีการเตรียมตัวอย่าง

การวิเคราะห์สมบัติของผลลิ้นจี่ในระหว่างการเก็บรักษา

1. สมบัติทางเคมี ได้แก่
   - แอกติวีของเอ็นไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (PPO) วิเคราะห์โดยนำเปลือกลิ้นจี่ (2 กรัม) มาผ่านกระบวนการโมโมจิไนซ์ในสารละลาย 0.05 M phosphate buffer (pH 6.8) ที่ 4°C จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 20 นาที และนำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์หา PPO activity โดยใช้เทคนิค UV-visible spectrometry โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Tan and Li (1984) และ Zhang and Quantick (1997) โดยวัดการเกิดออกซิเดชันของ 4-methylcatechol ค่า PPO activity คำนวณได้จากการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น 0.001 หน่วยในเวลา 1 นาทีที่ความยาวคลื่น 398 นาโนเมตร ต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของเอ็นไซม์ที่สกัดได้ตามวิธีการของ Bradford (1976)
   - ปริมาณแอนโทไซยานิน วิเคราะห์โดยนำเปลือกลิ้นจี่ 10 กรัมมาตัดให้เป็นชิ้นเล็ก จากนั้นนำมาสกัดด้วยสารละลายผสมของกรดไฮโดรคลอริกกับเมทานอลในสัดส่วน 1:99 (1 ml HCl: 99 ml methol) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Pirie and Mullins (1976) และ Jaing (2000) กรองและทำให้สารละลายที่สกัดได้เจือจาง เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ความเข้มข้นของแอนโทไซยานินจะรายงานในหน่วยของ mg/ g fresh wt.
   - ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solids) ความเป็นกรดจากการไตเตรต (titratable acidity) วิเคราะห์โดยนำเนื้อลิ้นจี่ 20 กรัมมาโฮโมจิไนซ์ และปั่นเหวี่ยง จากนั้นจึงแยกเอาส่วนสารละลายใส (supernatant) มาวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมดโดยตรวจวัดด้วย hand refractometer และรายงานผลในหน่วย °Brix และค่าความเป็นกรดที่ไตเตรทได้จะวิเคราะห์โดยไตเตรทกับสารละลาย 0.1 M NaOH และรายงานผลในหน่วย g citric acid/g fresh wt.
2. สมบัติทางกายภาพ ได้แก่
   - ร้อยละของการสูญเสียน้ำหนัก (weight loss percentage) (Gol et al. 2013) ทำได้โดยชั่งน้ำหนักผลลิ้นจี่ที่เก็บรักษาตามระยะเวลาที่กำหนด

- ลักษณะที่ปรากฏของผิวเปลือกลิ้นจี่ (skin appearance) ทำโดยตรวจวัดปริมาณพื้นผิวทั้งหมดที่เกิดสีน้ำตาลของแต่ละผลในแต่ละทรีตเมนต์ตามระยะเวลาที่กำหนด โดยกำหนดสเกลดังนี้ 1= no browning (คุณภาพดีมาก) 9= > 1/2 browning (คุณภาพแย่) จากนั้นจึงนำค่ามาคำนวณเป็น browning index = Σ(browning scale x percentage of corresponding fruit within each class โดยกำหนดให้กลุ่มตัวอย่างลิ้นจี่ที่มีค่า browning index มากกว่า 6.0 จะถือว่าไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ค่า Skin browning index มีความสัมพันธ์กับการวิเคราะห์สารละลายสกัดจากเปลือกลิ้นจี่ด้วยเครื่องมือสเปกโตรโฟโตรมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 410 nm (Jaing, 2000)

3. การเน่าเสียของผลลิ้นจี่ ได้แก่
   - ร้อยละของการเน่าเสีย (decay incidence percentage) (Zheng et al., 2007) ที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาจากการการเจริญของราหรือจุดที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรียบนพื้นผิวเปลือกลิ้นจี่ โดยใช้ตัวอย่าง 100 ผล/ทรีตเมนต์
   - the good quality fruit percentage (GFP) (Zhang and Quantick, 1997) เป็นการตรวจวัดลักษณะที่ปรากฏของผลลิ้นจี่ โดยอาศัยพื้นที่ผิวที่เกิดสีน้ำตาลของเปลือกลิ้นจี่ โดยกำหนดให้ 1 = no browning (excellent quality); 2 = 1/3 browning; 3 = 1/3-1/2 browning; 4 = >1/2 browning (poor quality) ค่า GFP สามารถคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$GFP = \frac{W_1 + W_2}{W_2} x100\%$$

เมื่อ GFP= the good quality fruit percentage; W_1 = weight of the group 1 (no browning); W_2 = weight of the group 2 (browning less than 1/3); W_0 = weight of the total fruit โดยกำหนดให้อายุการเก็บรักษาของผลไม้ที่ยอมรับได้ของผู้บริโภคจะต้องมีค่ามากกว่า 60%

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวางแผนการวิจัยเป็นแบบ completely randomized design (CRD) โดยทุกการทดลองทำ 3 ซ้ำ และรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของแต่ละชุดข้อมูล ทุกการทดลองใช้สารเคมีที่มีความบริสุทธิ์สูง (Analytical grade) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีการแปรปรวนทางเดียว (One way analysis of variance) โดยใช้โปรแกรม SPSS กรณีที่ผลทดสอบทางสถิติพบนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 จะใช้การเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยของแต่ละสภาวะการทดลอง สำหรับข้อมูลที่มีความสำคัญจะทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลองที่ได้

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

การเตรียม และสมบัติของอนุภาคนาโนเงิน

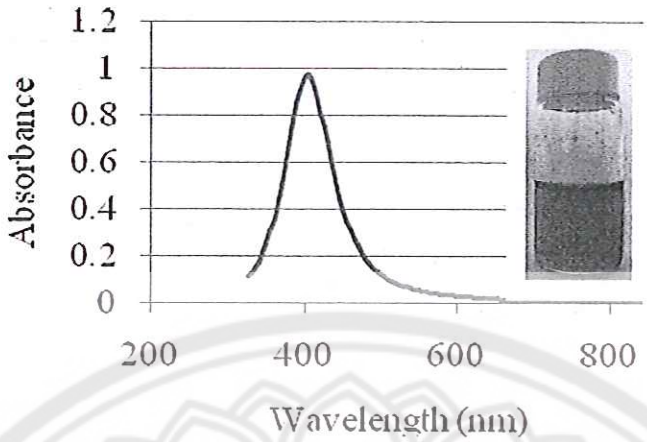
งานวิจัยนี้ อนุภาคนาโนเงินสามารถเตรียมได้โดยใช้ไคโตแซนทำหน้าที่ทั้งเป็น reducing agent และ capping agent ทั้งนี้เนื่องจากไคโตแซนมีความสามารถในการยึดเหนี่ยวกับไอออนโลหะได้ดีเนื่องจากมีหมู่เอมีนและไฮดรอกซิลมากมาย ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดลองนี้พบว่าไคโตแซนสามารถรีดิวส์ไอออน Ag^{+} เป็น AgNPs ภายในขั้นตอนเดียว ซึ่งอนุภาคนาโนเงินที่ได้จะเข้ายึดเหนี่ยวกับพอลิเมอร์เครือข่ายของไคโตแซน ทำให้ AgNPs ที่เกิดขึ้นมีความเสถียร การเกิดขึ้นของ AgNPs ที่สังเคราะห์ได้ยืนยันได้จากการเกิดสารละลายสีน้ำตาลเหลือง ซึ่งสอดคล้องกับพีก (peak) แคบที่มีความเข้มสูงสุดที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร เมื่อตรวจวัดด้วยเทคนิค UV-visible spectroscopy ดังแสดงในรูปที่ 2 ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษ (characteristic) ของ surface Plasmon resonance ของ AgNPs สำหรับ AgNPs ที่เตรียมได้มีความเสถียร โดยสามารถเก็บรักษาสารละลายแขวนลอยดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิห้องได้อย่างน้อย 1 เดือนโดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่ปรากฏและยังสามารถตรวจวัดพีกที่แสดงถึงการเกิดขึ้นของ AgNPs ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรได้

นอกจากนั้นเมื่อตรวจวัดด้วยเทคนิค TEM ให้ผลดังแสดงในรูปที่ 3 จะเห็นได้ว่า AgNPs ที่เตรียมได้ตามวิธีนี้จะให้รูปร่างกลมที่มีการกระจายที่ดี โดยมีขนาดของอนุภาคที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วงกว้าง แต่น้อยกว่า 20 ไมโครเมตร โดยทั่วไป AgNPs ที่มีขนาดเล็กจะมีความไวและมีประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ได้ดี AgNPs ที่มีขนาดใหญ่ (Gogoi et al., 2006) จึงมีความเหมาะสมที่จะนำ AgNPs ที่เตรียมได้ไปประยุกต์ใช้ในขั้นตอนถัดไปสำหรับการเตรียมเป็นสารเคลือบผิวไคโตแซน-อนุภาคนาโนเงินเพื่อใช้สำหรับยืดอายุการเก็บรักษาลิ้นจี่

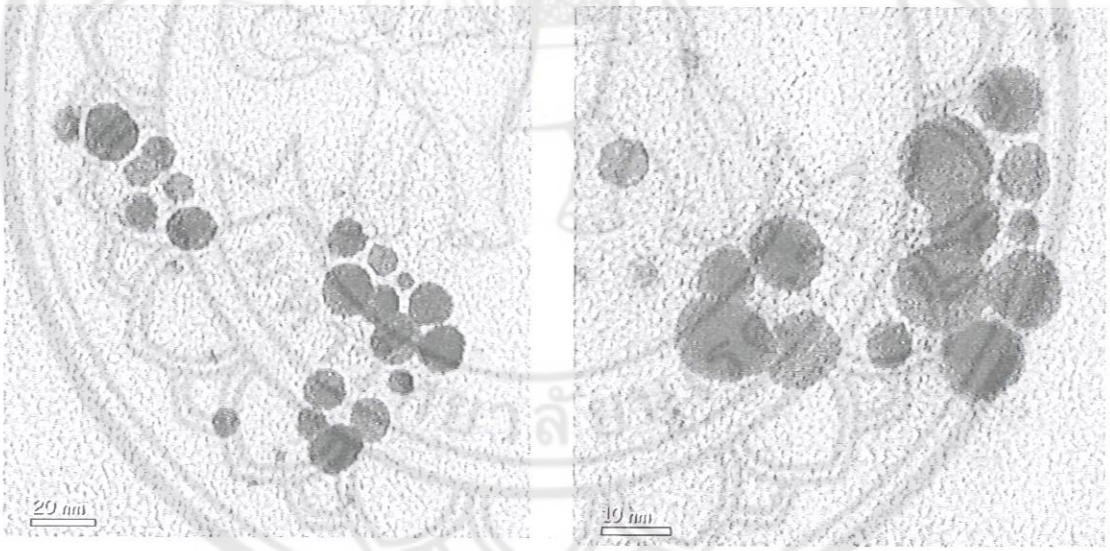
1 9004891

สำนักหอสมุด
17 ส.ค. 2559

จ TP
248
.65
.C55
จ4935
2558



รูปที่ 2 สเปกตราการดูดกลืนแสงในย่านวิสิเบิลของ AgNPs ที่เตรียมโดยใช้ไคโตแซนเป็นทั้ง reducing agent และ capping agent พีกที่ความเข้มสูงสุดที่ตำแหน่งความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรแสดงถึงการเกิดขึ้นของอนุภาคนาโนเงินที่สอดคล้องกับสารละลายสีน้ำตาลเหลืองที่ได้ (รูปแทรก)



รูปที่ 3 TEM micrograph ของ AgNPs (scale bar = 20 nm) ที่ตรวจวัดด้วย transmission electron microscope ที่ acceleration voltage 360 kV และ 650 kV ตามลำดับ

เป็นที่ทราบกันดีว่าสมบัติเด่นประการหนึ่งของ AgNPs คือ ความสามารถในการยับยั้ง/ต้านการเจริญของแบคทีเรีย (antibacterial action) เช่นเดียวกับกรณีของไอออนเงิน (silver ion) ที่อาจเป็น bacteriostatic (growth inhibition) หรือ bactericidal (antibacterial) (Morones et al., 2005) แต่ประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียของ AgNPs ดีกว่าไอออนเงินเนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นนาโนโมลาร์ ในขณะที่ของไอออนเงินจะอยู่ในระดับไมโครโมลาร์ (Kong and Jang et al., 2008)

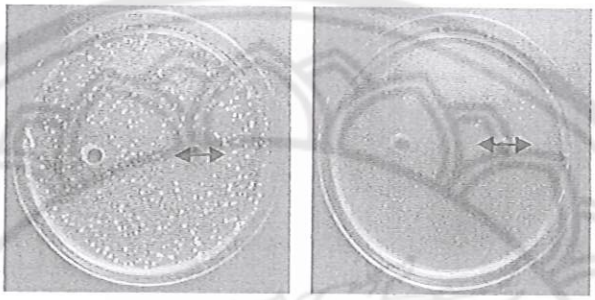
ในงานวิจัยนี้ เมื่อทำการตรวจวัดสมบัติต้านจุลินทรีย์ของ AgNPs โดยใช้เทคนิค disc diffusion และใช้ *E. coli* และ *S. aureus* เป็นแม่แบบของแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก ตามลำดับ จากรูปที่ 4 จะเห็น clear zone เกิดขึ้นภายหลังจากบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงทั้งกับ *E. coli* และ *S. aureus* ซึ่งแสดงให้เห็นได้ว่า AgNPs มีสมบัติที่ดีในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวก โดยให้ clear zone ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางใกล้เคียงกัน กลไกการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเกิดจากการเข้าทำปฏิกิริยาของ AgNPs หมู่ฟังก์ชันที่ประกอบด้วยซัลเฟอร์บน membrane-bound enzyme ของแบคทีเรีย (Duncan, 2011)

จากรายงานการวิจัยที่มีมาก่อน พบว่าสมบัติต้านแบคทีเรียของ AgNPs ที่เตรียมด้วยวิธีที่แตกต่างกันจะมีสมบัติแตกต่างกัน อาจให้ประสิทธิภาพที่ดีกว่ากับแบคทีเรียแกรมลบ หรือแกรมบวก ตัวอย่างเช่น AgNPs ที่เตรียมโดยใช้แป้งเม็ดทุเรียนเป็น stabilizing agent และกรดแอสคอร์บิกเป็น reducing agent มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ดีกว่า *S. aureus* (Pimpa and Pimpa, 2014) ในขณะที่ Ruparelia et al. (2008) รายงานว่า AgNPs ที่เตรียมในสภาวะที่กำหนดกลับมีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ปัจจัยในเรื่องของโครงสร้างเมมเบรนของแบคทีเรียคงไม่ใช่ปัจจัยหลักเพียงประการเดียวที่กำหนดกลไกการต้านแบคทีเรียของ AgNPs โดยทั่วไปแล้วสมบัติต้านจุลินทรีย์ของ AgNPs จะเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายประการ เช่น ขนาดของอนุภาค (particle size) การกระจายของขนาดอนุภาค (size distribution) การรวมตัวกันของอนุภาค (degree of particle agglomeration) ปริมาณเงิน และการกระทำของพื้นผิวเงินกับพอลิเมอร์ (Kim et al., 2007)

เมื่อนำ AgNPs มาทดสอบเพื่อหาค่า MIC พบว่าการเจริญของ *E.coli* จะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์เมื่ออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ที่มี AgNPs ที่ความเข้มข้นมากกว่า 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากรูปที่ 4 จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของ AgNPs 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะเป็นความเข้มข้นเริ่มต้นที่ให้ลักษณะที่ปรากฏของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี *E. coli* ไม่ขุ่น (รูปที่ 5) นั่นคือไม่สามารถสังเกตเห็นการเจริญของ *E. coli* เมื่อสังเกตด้วยตาจากความขุ่นที่เกิดขึ้น

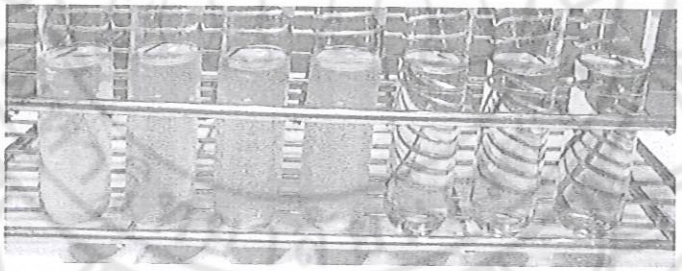
กลการต้านแบคทีเรีย *E. coli* ของ AgNPs ที่เตรียมได้โดยใช้ไคโตแซนเป็นทั้ง reducing agent และ capping agent แบบนี้ อาจอธิบายได้ว่าเนื่องจากผนังเซลภายนอก (outer membrane) ของ *E.coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบจะประกอบด้วยไลโปพอลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ที่มีหมู่ฟอสเฟตและไพโรฟอสเฟต ทำให้มีประจุที่พื้นผิวเป็นลบ (Prescott et al., 2002) และเนื่องจากไคโตแซนเป็นแคทไอออนิกพอลิเมอร์ (cationic polymer) จึงสามารถยึดเหนี่ยวกับผนังเซลของ *E. coli* ได้ด้วยแรงดึงดูดไฟฟ้าสถิต (electrostatic interaction) และทำให้ผนังเซลไม่เสถียรจากการเปลี่ยนแปลงสมบัติการแพร่ผ่านของผนัง

เซล (Helander et al., 2001; Rabea et al., 2003) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นเมื่อมีการยึดเหนี่ยวของ AgNPs ที่โปรตีนในตำแหน่งไทออลที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซล ซึ่ง AgNPs บางส่วนจะแทรกซึมผ่านผนังเซล (Morones et al., 2005; Gogoi et al., 2006) ทำให้เกิดการรั่วของโปรตีนและสารองค์ประกอบอื่นที่อยู่ภายในเซล ดังนั้นการเตรียม AgNPs โดยใช้ไคโตแซนในการทดลองนี้ นอกจากจะให้ AgNPs ที่เสถียรและสามารถเตรียมได้ง่ายในขั้นตอนเดียวแล้ว ยังให้ AgNPs ที่มีสมบัติต้านจุลินทรีย์ที่ดีจากผลของการทำงานร่วมกันของไคโตแซนและ AgNPs ด้วย



(a) (b)

รูปที่ 4 สมบัติต้านแบคทีเรียของ AgNPs ต่อ (a) *S. aureus* และ (b) *E. coli* โดยแสดงถึงการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วย clear zone inhibition



รูปที่ 5 รูปภาพแสดง bacteriostatic test ของ AgNPs ต่อแบคทีเรีย *E. coli* โดยในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ประกอบด้วย AgNPs เท่ากับ 0 (positive control), 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 และ 40.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ผลของสารเคลือบผิว CS-AgNPs ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลลิ้นจี่

ลิ้นจี่เป็นผลไม้เขตร้อนที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงทั้งในตลาดภายในและต่างประเทศ อย่างไรก็ตาม เมื่อเก็บเกี่ยวผลลิ้นจี่จากต้น ผลลิ้นจี่จะสูญเสียคุณภาพ เช่น ความหวาน และสีแดงของผิวเปลือก อย่างรวดเร็วภายใน 2-3 วันที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งเป็นผลมาจากการสูญเสียน้ำจากความร้อนที่เกิดขึ้นในกระบวนหายใจ (respiration) และการระเหย (transpiration) ในระหว่างการเก็บรักษา (Underhill and Critchley, 1994) เนื่องจากลิ้นจี่หลังถูกเก็บเกี่ยวจะยังคงมีกระบวนการหายใจอย่างต่อเนื่องในระหว่างการเก็บรักษา (Huang et al., 2005) กระบวนการหายใจจะก่อให้เกิดความร้อน (bio-heat) และทำให้อุณหภูมิของผลไม้เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้เร่งการสูญเสียน้ำและการเกิดสีน้ำตาล (Baldwin et al., 1995; Marie et al., 2008)

ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมสำหรับควบคุมอัตราการหายใจ ช่วยลดปริมาณความร้อนที่เกิดขึ้นที่จะทำให้อุณหภูมิของผลไม้เปลี่ยนแปลงในระหว่างการขนส่งและวางจำหน่าย ซึ่งส่งผลให้ลดการเปลี่ยนแปลงสีน้ำตาลอย่างรวดเร็วของผิวเปลือกหลังเก็บเกี่ยว ที่เป็นข้อจำกัดที่สำคัญต่อความพึงพอใจของผู้บริโภค โดยทั่วไปแล้วการเกิดสีน้ำตาลของลิ้นจี่ที่เป็นผลมาจากการย่อยสลาย (degradation) ของแอนโทไซยานินที่เกิดโดยอาศัยเอ็นไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสท (Lee and Wicker, 1991; Jiang, 2000) การแก้ไขปัญหาการเกิดสีน้ำตาลโดยใช้การลมควันซัลเฟอร์ (sulphur fumigation) ให้ผลดีเช่นเดียวกับการชุบด้วยกรด (acid dip) โดยสารเคมีดังกล่าวจะไปยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ PPO ส่งผลให้ชะลอการสูญเสียสีแดงที่ผิวเปลือกลิ้นจี่ (Zauberman wt al., 1991) อย่างไรก็ตามมีความจำเป็นต้องหาสารเคมีอื่นที่ไม่เป็นพิษเพื่อควบคุมการเปลี่ยนแปลงสีแดงของผิวเปลือกลิ้นจี่เนื่องจากความปลอดภัยของผู้บริโภคและข้อจำกัดการใช้สารเคมี (Jaing et al., 2013)

เป็นที่ทราบกันดีว่าการใช้สารเคลือบผิวที่บริโภคได้ เป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยปรับปรุงคุณภาพและยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้แปรรูปเล็กน้อย (Krochta and De Mulder, 1997) โดยสารเคลือบผิวที่บริโภคได้อาจเตรียมได้จากคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ลิปิด หรือส่วนผสมของสารเหล่านี้ก็ได้ ในองค์ประกอบที่ใช้เตรียมสารเคลือบผิวที่บริโภคได้ ไคโตแซน (chitosan) เป็นสารเคลือบผิวชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยมใช้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผักและผลไม้ ไคโตแซนเป็นแคทไอออนิกพอลิแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เป็นสารอนุพันธ์ที่ได้จากจากปฏิกิริยา deacetylation ของไคติน (chitin) ไคโตแซนมีสมบัติที่ดีหลายประการที่ทำให้ถูกนำมาใช้ประยุกต์ทางอาหารได้หลากหลาย ได้แก่ สามารถย่อยสลายได้ เข้ากับพอลิเมอร์อื่นได้ดี มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ละลายได้ดีในกรดอินทรีย์ สามารถเตรียมเป็นฟิล์มหรือเมมเบรนได้ง่าย (Balau et al., 2004; Chien et al., 2007) ปลอดภัยต่อผู้บริโภค (Hirano et al., 1990) และมีสมบัติต้านการเจริญของรา (antifungus activity) หลายสายพันธุ์ (Zheng and Jiang-Feng, 2003; El Ghaouth et al., 1992; Li and Yu, 2001; Romanazzi et al., 2002)

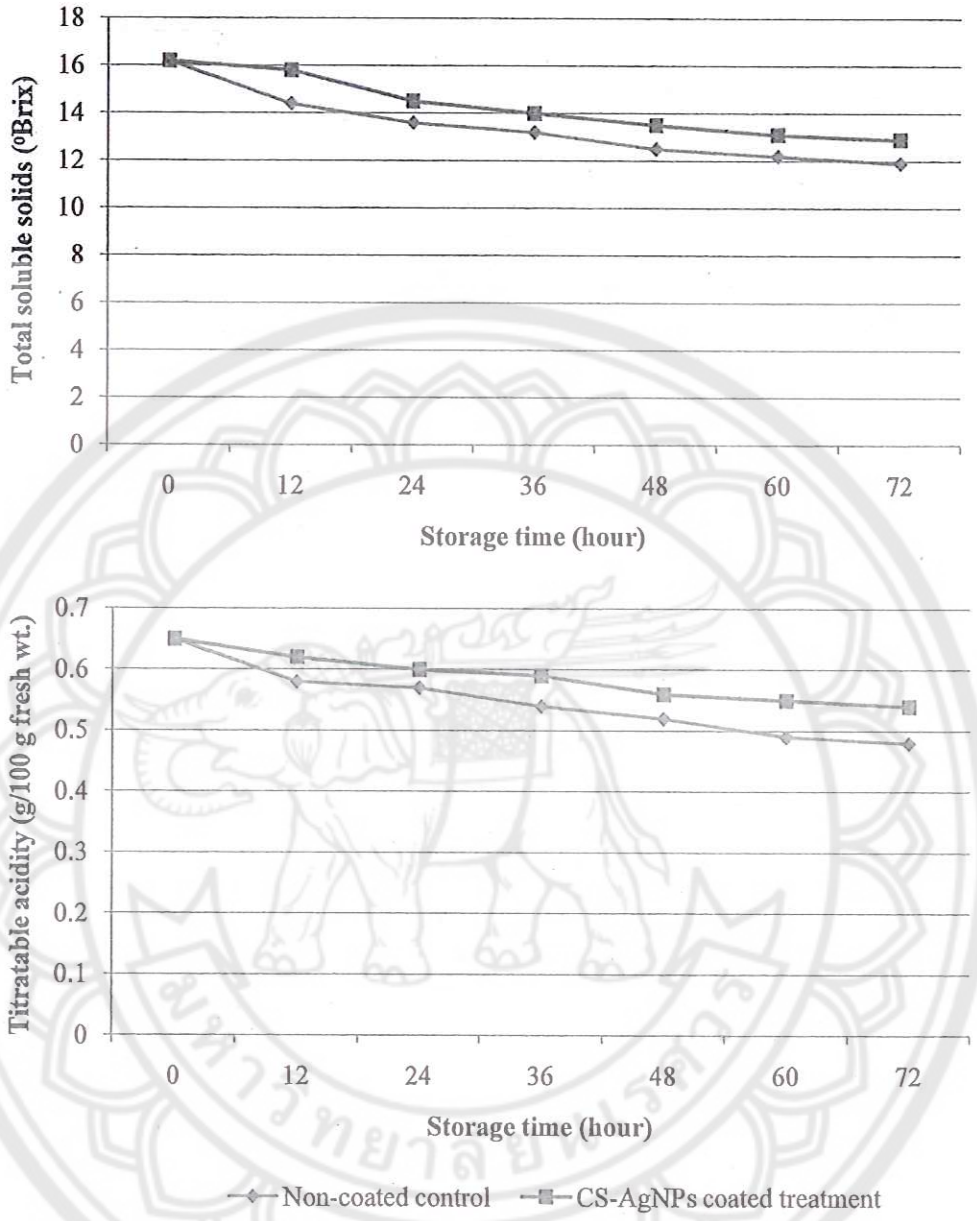
จากสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์ของไคโตแซนดังกล่าวทำให้มันสามารถถูกใช้เป็นสารเคลือบผิว เพื่อคงคุณภาพของผักและผลไม้หลังเก็บเกี่ยวได้ดี (Devlieghere et al., 2004) จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าไคโตแซนมีประสิทธิภาพในการยืดอายุและควบคุมการสื่อมสลายในผลไม้หลายชนิด ได้แก่ สตอเบอรี่ พีช องุ่น แอปเปิล และมะม่วง (Du et al., 1997; El Ghaouth et al., 1991; Chien et al., 2007; Dong et al.,

2004; Romanazzi et al., 2002; 2003) รวมทั้งลิ้นจี่ (lin and Liang, 2003; Lin et al., 2008; 2009; Zhang and Quantick, 1997; Jiang and Li, 2000)

เนื่องจากกระบวนการหายใจของลิ้นจี่เกี่ยวข้องกับทั้งลักษณะของผลไม้ อุณหภูมิที่เก็บรักษา และสมบัติของสารเคลือบผิว (Lin and Liang, 2003) ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการคงคุณภาพและยืดอายุการเก็บรักษาผลลิ้นจี่ งานวิจัยนี้จึงได้ได้นำอนุภาคนาโนเงิน ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่ามีสมบัติต้านจุลินทรีย์มาใช้ร่วมกับไคโตแซน เพื่อเตรียมเป็นสารเคลือบผิวผลลิ้นจี่หลังการเก็บเกี่ยว โดยคาดหวังว่าจากสมบัติที่ดีของสารทั้งสองชนิดและการทำงานร่วมกันของมัน น่าจะทำให้ผลลิ้นจี่สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องได้นานขึ้น ซึ่งจะช่วยลดการสูญเสียมูลค่าทางเศรษฐกิจจากการเสื่อมสลายของลิ้นจี่ในระหว่างการขนส่งหรือการวางจำหน่าย

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลลิ้นจี่ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง โดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณของแข็งที่ละลายได้และความเป็นกรดที่ไตเตรทได้ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 6 จะเห็นได้ว่าทั้งปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดและความเป็นกรดที่ไตเตรทได้ต่างก็มีแนวโน้มลดลงเมื่อเก็บรักษานานขึ้น แต่ผลลิ้นจี่ที่เคลือบด้วย Cs-AgNPs มีการลดลงช้ากว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เคลือบผิว ซึ่งอาจอธิบายได้ว่า สารเคลือบผิว Cs-AgNPs ที่ใช้เคลือบผิวลิ้นจี่ทำหน้าที่เช่นเดียวกับการเคลือบผิวด้วยไคโตแซน ซึ่งเครือข่ายพอลิเมอร์ของไคโตแซนจะเป็นตัวกีดกั้นการแพร่ผ่านของออกซิเจน หรือลดปริมาณออกซิเจนที่พื้นผิวส่งผลให้ลดการเกิดกระบวนการหายใจ (Jaing and Li, 2000; Yonemoto et al., 2002; Jiang et al., 2005) ส่งผลให้ลดการสูญเสียคุณภาพของผลลิ้นจี่ โดยไปชลอการลดลงของปริมาณของแข็งที่ละลายได้และความเป็นกรดที่ไตเตรทได้

อุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการหายใจของผลไม้ และในทางกลับกันกระบวนการหายใจก็ส่งผลกระทบต่ออุณหภูมิของผลไม้เช่นกัน (Luo and Cai, 2001) นั่นคือเมื่ออุณหภูมิรอบ ๆ ผลไม้สูงขึ้น กระบวนการหายใจจะมีอัตราสูงขึ้น ทำให้เพิ่มอุณหภูมิภายในผลไม้สูงขึ้น ส่งผลกระทบต่อการสูญเสียน้ำหนักของผลไม้ โดยทั่วไปแล้วการเคลือบผิวผลไม้ด้วย semi-permeable films มักจะช่วยชลอการสุกของผลไม้โดยไปดัดแปลงปริมาณแก๊สคาร์บอกนไดออกไซด์ ออกซิเจน และเอทิลีนภายในผลไม้ (Lowings and Cutts, 1982; Banks, 1984; El Ghouth et al., 1991)



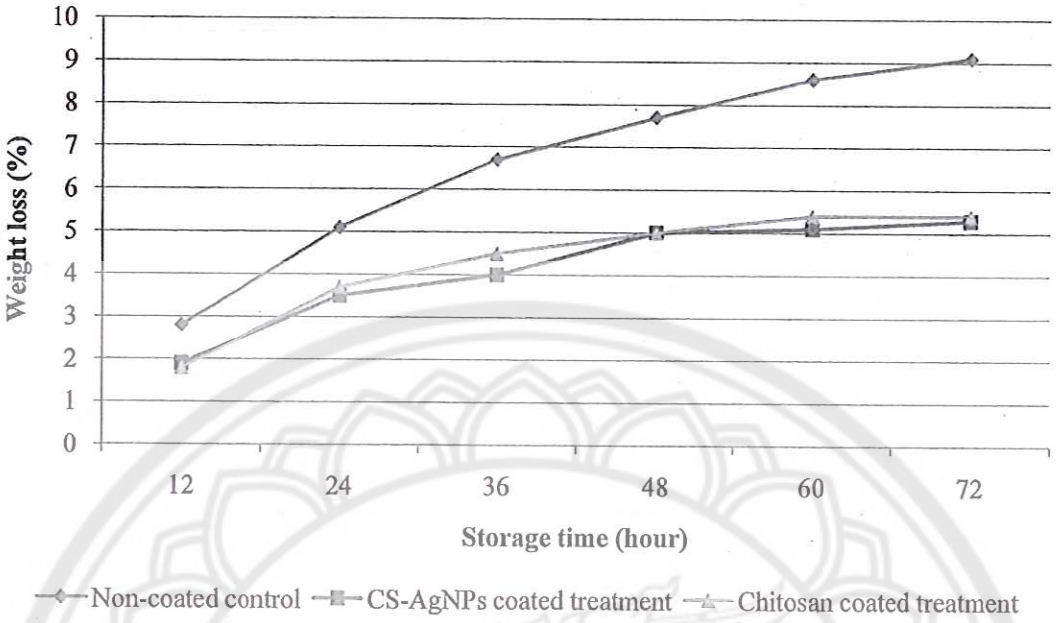
รูปที่ 6 ผลของสารเคลือบผิว Cs-AgNPs ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดและความเป็นกรดที่ไตเตรทได้ของผลลิ้นจี่ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เคลือบผิว

จากผลการทดลองพบว่า ผลลิ้นจี่ที่เคลือบด้วยสารเคลือบ CS-AgNPs ช่วยลดการสูญเสียน้ำหนัก เนื่องจากการสูญเสียความชื้นจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องได้ดีเช่นเดียวกับกลุ่มตัวอย่างลิ้นจี่ที่เคลือบด้วยไคโตแซน และกลุ่มตัวอย่างที่เคลือบผิวจะมีการสูญเสียน้ำหนักช้ากว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เคลือบผิว (รูปที่ 7) ผลที่เกิดขึ้นดังกล่าวของกลุ่มตัวอย่างที่เคลือบผิวทั้งสองที่ช่วยชลอการเปลี่ยนแปลงคุณภาพในเรื่องของการสูญเสียน้ำหนัก สามารถอธิบายได้เช่นเดียวกันว่า เนื่องจากไคโตแซนจะทำหน้าที่เหมือนฟิล์มห่อหุ้มผิวเปลือกของลิ้นจี่ โมเลกุลของไคโตแซนจะจัดเรียงเป็นเครือข่ายเหมือนตัวกีดกั้นที่ป้องกันการผ่านของความร้อนจากภายนอกสู่ภายในผลลิ้นจี (Lin et al., 2011) ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เคลือบผิว จะไม่มีตัวกีดกันดังกล่าว จึงทำให้เกิดการถ่ายโอนความร้อนจากสิ่งแวดล้อมเข้าสู่ภายในผลลิ้นจี่ได้โดยง่าย

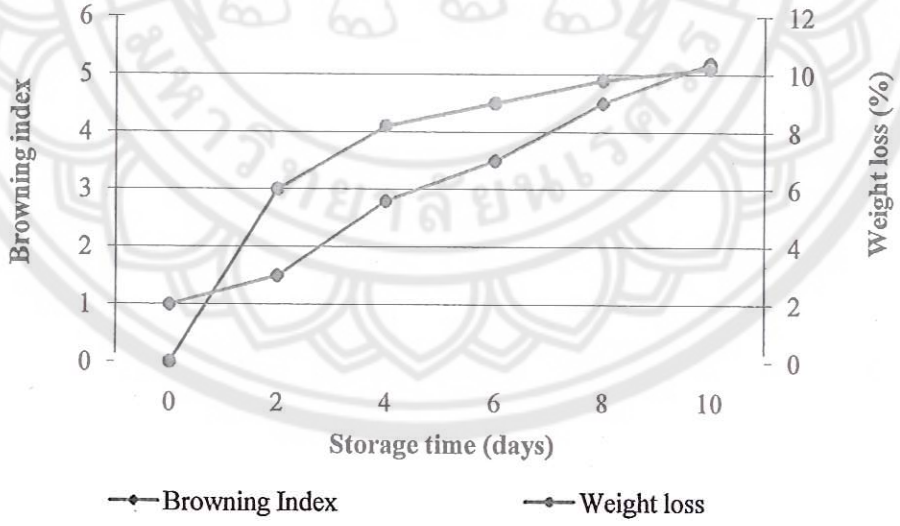
นอกจากความร้อนแล้วฟิล์มที่เกิดจากสารเคลือบผิวยังช่วยกีดกั้นการถ่ายโอนความชื้น ทำให้การระเหยของน้ำภายในผลลิ้นจี่ไม่เกิดขึ้นเร็วเกินไป นอกจากนั้นเป็นที่สังเกตว่าอัตราการสูญเสียน้ำหนักของกลุ่มตัวอย่างลิ้นจี่ที่เคลือบผิวด้วย CS-AgNPs และกลุ่มตัวอย่างที่เคลือบด้วยไคโตแซนไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) นั่นแสดงให้เห็นว่าการเติมอนุภาคนาโนเงินลงในสารละลายไคโตแซน การเข้าบรรจุของอนุภาคนาโนเงินในเครือข่ายพอลิเมอร์ของไคโตแซนไม่มีผลกระทบต่อโครงสร้างพอลิเมอร์ของฟิล์มไคโตแซน จึงยังคงสมบัติที่ดีของไคโตแซนที่เป็นตัวกีดกั้นที่ดีไว้ได้

นอกจากนั้นผลการทดลองยังพบว่า การเกิดสีน้ำตาลของผิวเปลือกลิ้นจี่มีความสัมพันธ์กับการสูญเสียน้ำหนัก โดยเมื่อเก็บรักษาผลลิ้นจี่ที่เคลือบผิวด้วย CS-AgNPs ระยะเวลานานขึ้นมีผลให้ผลลิ้นจี่มีการสูญเสียน้ำมากขึ้น ในขณะเดียวกันก็ทำให้ผิวเปลือกลิ้นจี่มีสีน้ำตาลมากขึ้น ซึ่งแสดงได้ด้วยการเปลี่ยนแปลงของค่าดัชนีการเกิดสีน้ำตาลและการสูญเสียน้ำหนักของกลุ่มตัวอย่างลิ้นจี่ที่เคลือบผิวด้วย Cs-AgNPs ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องดังแสดงในรูปที่ 8

Scott et al, (1982) แสดงให้เห็นว่าการสูญเสียน้ำ (desiccation) เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่ทำให้เกิดสีน้ำตาลของผลไม้ ในขณะที่ Underhill et al. (1992) รายงานว่า หลังกระบวนการเก็บเกี่ยว ความหนาของคิวติเคิล (cuticle) จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ทำให้เกิดการแตกแยก (micro-craking) ที่ผิวเปลือกลิ้นจี่จึงทำให้เกิดการระเหยน้ำได้อย่างรวดเร็ว ในระหว่างการเก็บรักษา เมื่อมีการสูญเสียน้ำ จะทำให้เปลือกลิ้นจี่มีค่า pH เพิ่มขึ้น และเกิดการเปลี่ยนแปลงของการแพร่ผ่านของเซลเมมเบรน (Underhill and Critchlev, 1994) นอกจากนั้นการสูญเสียน้ำยังทำให้เกิดการแตกแยกของ vacuole ทันที ทำให้เกิดการหลุดออก (leakage) ของแอนโทไซยานินและช่องว่าง (compartmentation) ของเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาลกับสับเสตรทถูกทำลายลง (Chen and Hong, 1992; Underhill and Critchley, 1994) ในทางปฏิบัติเราสามารถลดการสูญเสียน้ำได้โดยการใช้ฟิล์มพลาสติก (Chen and Zhang, 1988; Nip, 1988; Chen and Hong, 1992) ในทำนองเดียวกันสำหรับการทดลองนี้ การเกคลือบผิวด้วย Cs-AgNPs ก็เหมือนกับการสร้างชั้นฟิล์มบนพื้นผิวด้านนอกของเปลือกลิ้นจี่ จึงช่วยลดการสูญเสียน้ำ และการสูญเสียน้ำหนักของผลลิ้นจี่ส่งผลให้ลดการเกิดสีน้ำตาลลง

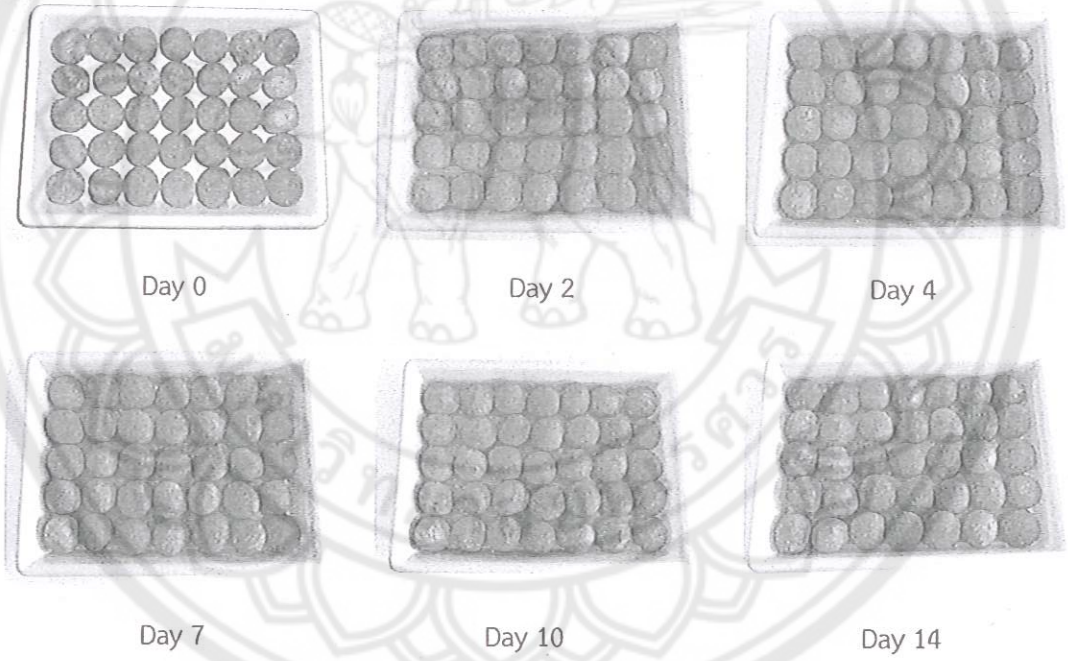


รูปที่ 7 การเปลี่ยนแปลงการสูญเสียน้ำหนักของกลุ่มตัวอย่างลิ้นจี่ที่เคลือบผิวด้วย CS-AgNPs ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่เคลือบด้วยไคโตแซน และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เคลือบผิว



รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของค่าดัชนีสีน้ำตาลและ การสูญเสียน้ำหนัก ของผลลิ้นจี่ที่เคลือบด้วย CS-AgNPs

ความสัมพันธ์ระหว่างการสูญเสียน้ำหนักกับการเกิดสีน้ำตาลสามารถแสดงได้ด้วยค่า GFP นั่นคือ เมื่อพิจารณาอายุการเก็บรักษาผลลิ้นจี่โดยใช้ค่า GFP จะพบว่าภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เคลือบผิวจะมีอายุการเก็บรักษาเพียง 3 วันเท่านั้น ในขณะที่กลุ่มตัวอย่างลิ้นจี่ที่เคลือบผิวด้วย CS-AgNPs จะมีอายุการเก็บรักษาที่ 10 วัน นั่นคือภายหลังจากการเก็บรักษาผลลิ้นจี่เป็นเวลา 3 วัน กลุ่มควบคุม จะมีค่า GFP ประมาณ 60% ในขณะที่กลุ่มตัวอย่างที่เคลือบผิวด้วยไคโตแซน และกลุ่มตัวอย่างที่เคลือบผิวด้วย CS-AgNPs ยังคงมีค่า GFP 100% และจะมีค่า GFP < 60% (เป็นค่าที่ผู้บริโภคยังยอมรับได้) จนถึงระยะเวลาการเก็บรักษา 8 และ 10 วัน ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการเคลือบผิวลิ้นจี่ด้วย CS-AgNPs สามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลลิ้นจีที่อุณหภูมิห้องจาก 3 วันเป็น 10 วัน และสารเคลือบผิว Cs-AgNPs มีประสิทธิภาพของการยืดอายุการเก็บรักษาผลลิ้นจี่ที่อุณหภูมิห้องเมื่อประเมินโดยใช้ค่า GFP ดีกว่าการใช้สารเคลือบผิวไคโตแซนเพียงอย่างเดียว รูปที่ 9 แสดงลักษณะที่ปรากฏของกลุ่มตัวอย่างลิ้นจี่ที่เคลือบผิวด้วย Cs-AgNPs และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องซึ่งสอดคล้องกับค่า GFP



รูปที่ 9 ลักษณะที่ปรากฏของผลลิ้นจี่ที่เคลือบด้วย CS-AgNPs ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

ปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีโนลิกส์เป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญต่อการเกิดสีน้ำตาลของผลไม้ (Macheix et al., 1990) เอ็นไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (PPO) เป็นเอ็นไซม์ประเภท terminal oxidase ที่พบในพืชที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารฟีโนลิกส์ให้เนื้อเยื่อของผักและผลไม้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (Dong, 1990) สำหรับการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของผิวเปลือกลิ้นจี่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโทไซยานินซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้ลิ้นจี่มีสีแดง (Jiang, 2000) โดยแอนโทไซยานินจะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วในระบบของ anthocyanin-PPO phenol system (Jaing, 2000)

จากผลการทดลองพบว่าการลดลงของปริมาณแอนโทไซยานินของกลุ่มตัวอย่างลิ้นจี่ที่เคลือบผิวด้วย AgNPs มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของแอกติวิตีของเอ็นไซม์ PPO (รูปที่ 10) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าเอ็นไซม์ PPO เป็นปัจจัยหนึ่งที่ก่อให้เกิดสีน้ำตาลของเปลือกลิ้นจี่ การที่ผลลิ้นจี่ที่เคลือบด้วย Cs-AgNPs มีการเกิดสีน้ำตาลของผิวเปลือกต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เคลือบผิว เป็นผลมาจากการใช้สารเคลือบผิว CS-AgNPs จะช่วยชลอการกระบวนการหายใจของลิ้นจี่ที่เป็นสาเหตุของการเกิดความร้อนขึ้น นั่นคืออาจกล่าวได้ว่าผลลิ้นจี่ที่เคลือบผิวจะมีอัตราการหายใจต่ำกว่าผลลิ้นจี่ที่ไม่ได้เคลือบผิว และส่งผลให้ผลิตความร้อน (bio-heat) น้อยกว่าผลลิ้นจี่ที่ไม่ได้เคลือบผิวในระหว่างการเก็บรักษา โดยทางอ้อมจึงทำให้ช่วยชลอการเพิ่มขึ้นของแอกติวิตีของเอ็นไซม์ PPO (Dong et al., 2004) หรือช่วยยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ POP PPO (Jiang et al., 2005) ส่งผลให้ช่วยชะลอการลดลงของปริมาณแอนโทไซยานิน

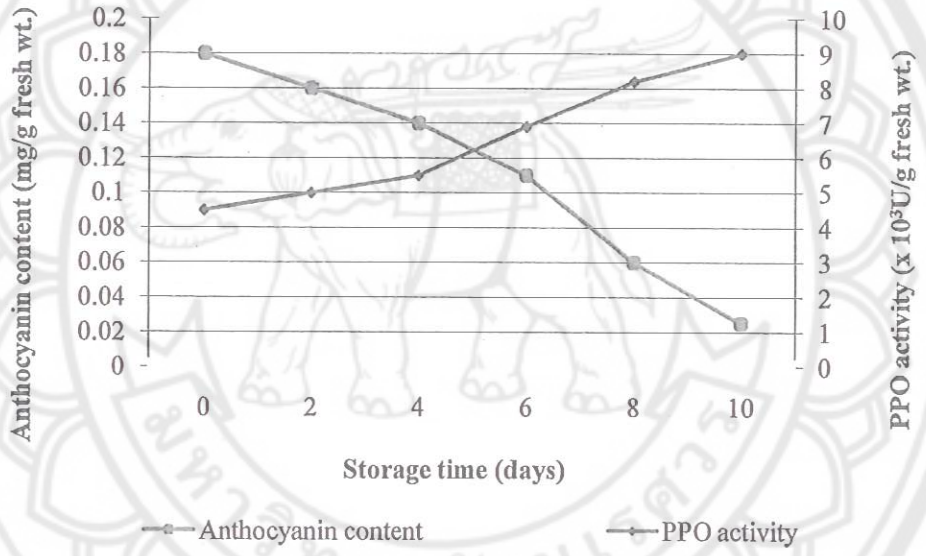
ดังจะเห็นได้จากผลการทดลองที่พบว่าผลลิ้นจี่ที่เคลือบด้วย Cs-AgNPs จะมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของแอกติวีของเอ็นไซม์ PPO และแนวโน้มการลดลงของปริมาณแอนโทไซยานินน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เคลือบผิว (รูปที่ 11) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ PPO โดยใช้สารเคลือบผิวไคโตแซนกับลำไยและ Chinese water chestnut ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (Jiang and Li, 2000; Peng and Jiang, 2003) โดยเอ็นไซม์ PPO เกี่ยวข้องกับการสลาย (degradation) ของแอนโทไซยานินและการเกิดออกซิเดชันของฟีโนลิก ทำให้เกิดผลพลอยได้ (by-product) เป็นสารสีน้ำตาล (Lee and Wicker, 1991)

อย่างไรก็ตาม การเกิดสีน้ำตาลของเปลือกลิ้นจี่เป็นผลมาจากการย่อยสลาย (degradation) ของสีแดง (red pigment) นอกจากจะเกี่ยวข้องกับเอ็นไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase; PPO) แล้วยังเกี่ยวข้องกับเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase; POD) ด้วย เอ็นไซม์ POD เป็นออกซิเดทีฟเอ็นไซม์ (oxidative enzyme) ที่พบในผิวเปลือกลิ้นจี่เช่นกัน ถึงแม้ในงานวิจัยนี้ไม่ได้ทำการตรวจวัดเอ็นไซม์ POD แต่ก็มีรายงานว่า จะสามารถตรวจวัดค่าแอกติวิตีของเอ็นไซม์ POD ได้เพิ่มขึ้นเมื่อผิวเปลือกลิ้นจี่มีสีน้ำตาลเพิ่มขึ้น (Underhill and Critchley, 1995)

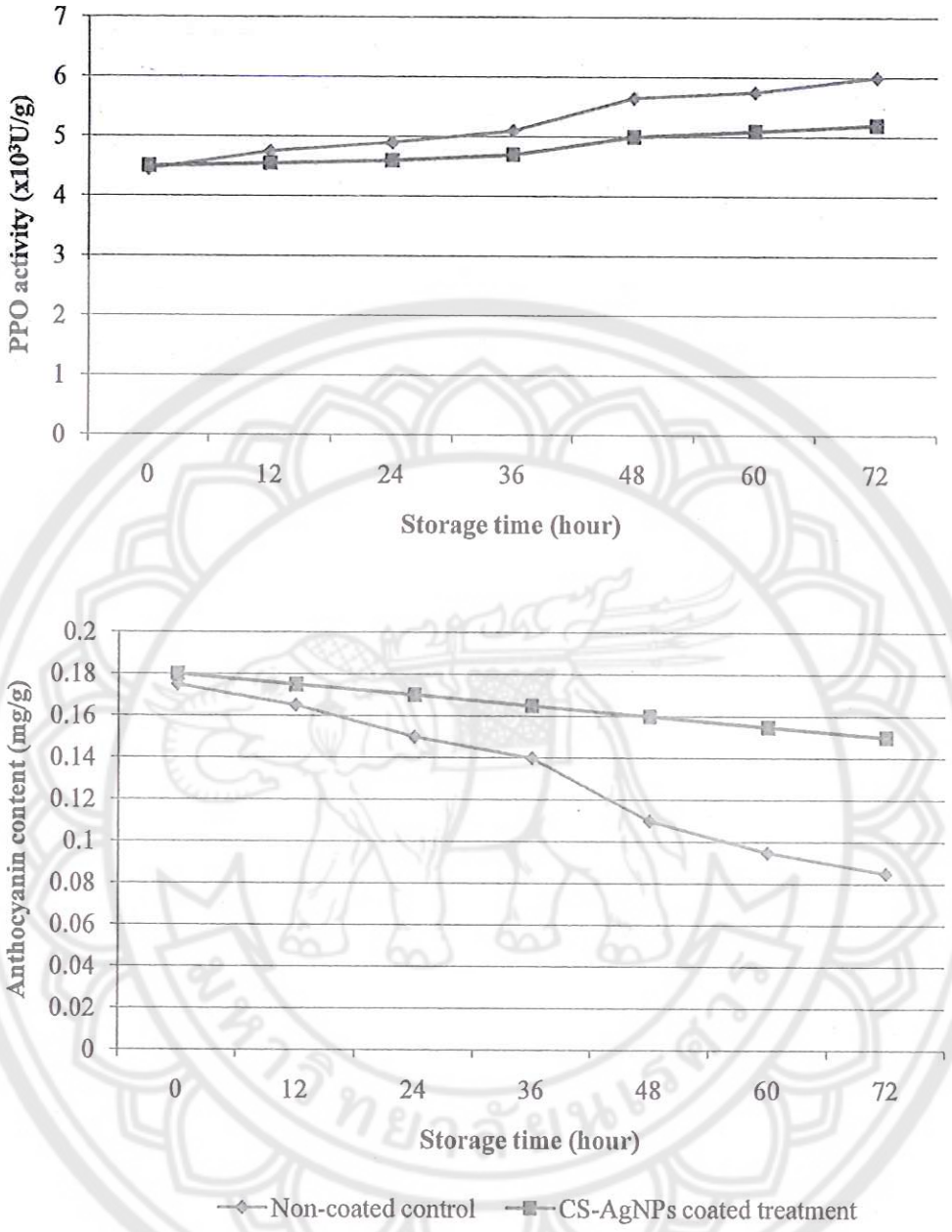
นอกจากนั้น Gong and Tian (2002) ยังรายงานว่า เอ็นไซม์ POD ที่แยกมาจากเปลือกลิ้นจี่ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนสามารถออกซิไดส์ 4-methylcatechol ในสภาวะที่มี H_2O_2 ได้ ซึ่งสนับสนุนการเกี่ยวข้องของเอ็นไซม์ POD ต่อการเกิดสีน้ำตาลจากเอ็นไซม์ (enzymatic browning) ถึงแม้ว่าเมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ (in vitro) จะพบว่าเอ็นไซม์ POD ไม่ได้ย่อยสลายแอนโทไซยานินโดยตรงในสภาวะที่มี H_2O_2 แต่ปริมาณแอนโทไซยานินจะลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากเติมสารละลาย guaiacol ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการย่อย

สลายของแอนโทไซยานินโดย POD มีกลไกการเกิดออกซิเดชันควบคู่กัน นอกจากนั้นการที่แอนโทไซยานินสามารถถูกใช้เป็นสับเสตรทของเอ็นไซม์ POD ได้

ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการเกิดสีน้ำตาลจากเอ็นไซม์ POD ของผิวเปลือกลิ้นจี่นั้นอาจเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา anthocyanase-anthocyanin-phenolic- H_2O_2 (Zhang et al., 2005) นั่นคือการเกิดสีน้ำตาลของเปลือกลิ้นจี่เป็นผลมาจากการถูกทำลายของเซล (cellular breaking) แล้วทำให้เกิดการผสมกันของเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดสีน้ำตาล (browning-related enzymes) และสับเสตรท ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยา enzymatic oxidation ในสภาวะที่มีออกซิเจน (Ju and Zhu, 1988) ดังนั้นการชลอหรือลดการเกิดปฏิกิริยา enzymatic oxidation จึงควรเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาและคงคุณภาพของผลลิ้นจี่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ



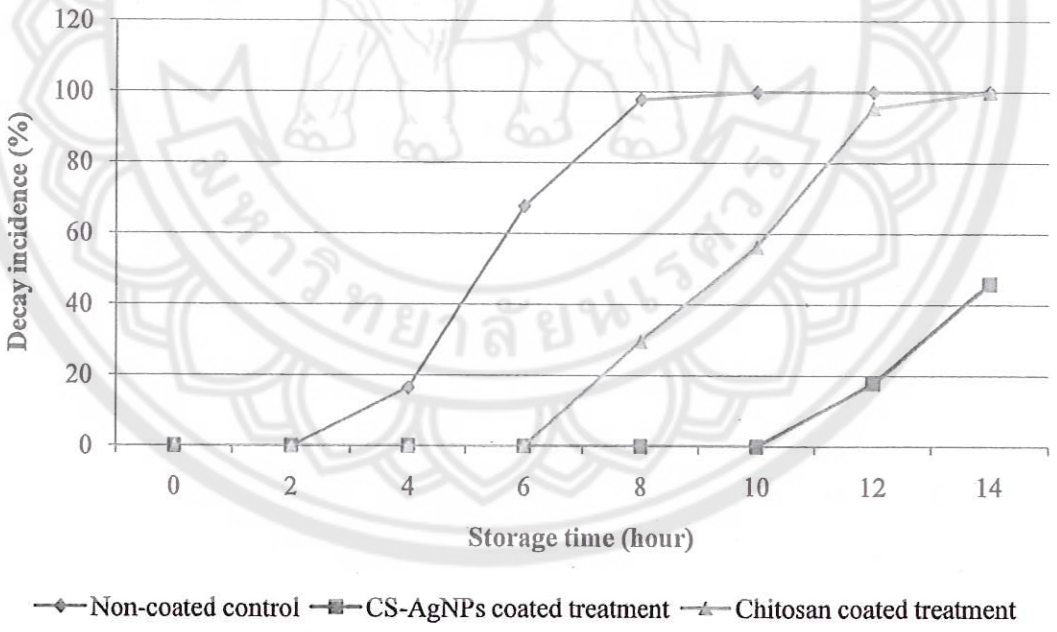
รูปที่ 10 ความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอนโทไซยานิน และแอกติวิตีของเอ็นไซม์ PPO ของผลลิ้นจี่ที่เคลือบด้วย CS-AgNPs



รูปที่ 11 ผลของสารเคลือบผิว Cs-AgNPs ต่อปริมาณแอนโทไซยานินและแอกติวิตีของเอ็นไซม์ PPO ของผลลิ้นจี่ที่เคลือบด้วย Cs-AgNPs ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เคลือบผิว

ปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่เร่งการเกิดสีน้ำตาลของผลไม้คือการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ (Chen, 1984; Jiang and Li, 2003) ดังนั้นวิธีการที่จะยับยั้งการเสื่อมสลาย (decay) ของผลไม้ จะช่วยชลอการเกิดสีน้ำตาลได้ จากผลการทดลองพบว่ากลุ่มตัวอย่างที่เคลือบผิวลิ้นจี่ด้วย CS-AgNPs จะแนวโน้มของการเสื่อมสลายจากจุลินทรีย์ที่สังเกตุเห็นได้ด้วยตาน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เคลือบผิว (รูปที่ 12) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการขัดขวางของสารเคลือบและจากสมบัติต้านจุลินทรีย์ของ AgNPs ที่บรรจุอยู่ภายในเครือข่ายฟิล์มพอลิเมอร์ไคโตแซนที่เคลือบผิวอยู่ จึงทำให้มีค่าร้อยละของการเสื่อมสลาย (percentage of decay) ของผลลิ้นจี่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่เคลือบผิวด้วยไคโตแซนและกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เคลือบผิว

นอกจากนั้นยังเป็นที่สังเกตได้ว่า กลุ่มตัวอย่างผลลิ้นจี่ที่เคลือบด้วย Cs-AgNPs มีแนวโน้มของการเน่าเสียเกิดได้ช้ากว่ากลุ่มตัวอย่างผลลิ้นจี่ที่เคลือบผิวด้วยไคโตแซนเพียงอย่างเดียว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารเคลือบผิว Cs-AgNPs มีประสิทธิภาพสูงกว่าไคโตแซนในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากเป็นการผนวกสมบัติที่ดีของทั้งไคโตแซนและ AgNPs เข้าด้วยกันดังที่คาดหมายไว้ ซึ่งจะเห็นได้ว่า นอกจากนั้นยังอาจกล่าวได้อีกว่า การเคลือบผิวลิ้นจี่ด้วย Cs-AgNPs ช่วยควบคุมการเกิดสีน้ำตาล และการเน่าสลายของผลลิ้นจี่ที่เก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิห้องได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการชะลอการเกิดสีน้ำตาลของเปลือกลิ้นจี่ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องที่เคลือบด้วยสารเคลือบผิว CS-AgNPs จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่เป็นผลมาจากสมบัติต้านจุลินทรีย์ที่ดีของ CS-AgNPs ที่ช่วยควบคุมการเสื่อมสลายของลิ้นจี่จากจุลินทรีย์นั่นเอง



รูปที่ 12 การเปลี่ยนแปลงลักษณะที่ปรากฏที่แสดงถึงการเน่าเสียของของกลุ่มตัวอย่างลิ้นจี่ที่เคลือบผิวด้วย CS-AgNPs ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่เคลือบด้วยไคโตแซน และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เคลือบผิว

สำหรับการอธิบายถึงความสามารถของสารเคลือบผิว AgNPs ที่ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากทั้งไคโตแซนและ AgNPs ต่างก็มีสมบัติต้านจุลินทรีย์ โดยไคโตแซนเป็นพอลิเมอร์ชีวิภาพในกลุ่มพอลิ-แคทไอออนิก (poly-cationic biopolymer) ที่มีสมบัติต้านจุลินทรีย์ โดยมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยสายพอลิเมอร์ที่เชื่อมต่อด้วยพันธะ 1-4 ของ 2-amino-2-deoxy-β-D-glucose ไคโตแซนเตรียมได้จากกระบวนการ alkaline deacylation ของไคติน ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่มักพบในเปลือกของสัตว์ทะเล และผนังเซลของรา (Wu et al., 2002; Rabea et al., 2003) เนื่องจากมีสมบัติต้านจุลินทรีย์กับจุลินทรีย์หลากหลายชนิด ย่อยสลายได้ เข้ากับได้ดีกับพอลิเมอร์ชนิดอื่น และง่ายต่อการเตรียมจึงถูกนำมาประยุกต์ใช้มากมาย

กลไกการต้านจุลินทรีย์ของไคโตแซนมาจากการเข้ายึดเหนี่ยวกับประจุลบของผนังเซลของแบคทีเรีย จึงทำให้เกิดความไม่เสถียรของ cell envelope และเปลี่ยนแปลงการแพร่ผ่านได้ของผนังเซล ตามด้วยการเข้ายึดเหนี่ยวที่ DNA ซึ่งจะยับยั้งขั้นตอน replication ของจุลินทรีย์ (Helander et al., 2001; Yi et al., 2003; Wang et al., 2004) โดยมีรายงานว่าการใช้สารเคลือบผิวไคโตแซนจะช่วยยับยั้งการเจริญของราในผลไม้บางชนิด (Allan and Hadwiger, 1979; El Ghaouth et al., 1989; 1992; Li and Yu, 2001; Romanazzi et al., 2002)

ในขณะที่ไอออนเงินมีสมบัติต้านจุลินทรีย์ทั้งในรูปแบบของ bacteriostatic และ bactericidal (Mcdonnell and Russel, 1999) กลไกการทำงานของ AgNPs โดยเข้ายึดเหนี่ยวกับผนังเซลของแบคทีเรียผ่านโปรตีนที่มีหมู่ไทออล (thiol-containing proteins) และอาจเข้ายึดเหนี่ยวกับ DNA ด้วยหลังจากแทรกผ่านเซลเมมเบรนของแบคทีเรียเข้าไปแล้ว ถึงแม้ไคโตแซนซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่ามีสมบัติต้านจุลินทรีย์เช่นกัน ซึ่งเกิดจากลักษณะโครงสร้างแคทไอออนิกของไคโตแซนที่มีผลต่อการเข้าทำลายที่เมมเบรนของจุลินทรีย์ แต่การที่สารเคลือบผิว CS-AgNPs มีสมบัติการต้านแบคทีเรียที่ดีกว่ามากเมื่อเปรียบเทียบกับไคโตแซน น่าจะเป็นผลมาจากการแทรกซึม (infiltration) ของ AgNPs โดยการเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ซัลเฟอร์ของเอ็นไซม์ที่ยึดอยู่ที่เมมเบรน ทำให้เกิดผลการทำลายแบคทีเรีย (bactericidal effect) (Rhim et al., 2006)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

ลิ้นจี่เป็นผลไม้ในเขตร้อนที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงที่เน่าเสียได้ง่าย โดยทั่วไปเมื่อผลลิ้นจี่ถูกเก็บเกี่ยวจะสูญเสียคุณภาพอย่างรวดเร็วทั้งทางด้านรสชาติฉ่ำหวานและสีแดงที่ดึงดูดของผิวเปลือกภายในระยะเวลาเพียง 2-3 วันเมื่ออยู่ในสภาวะบรรยากาศและอุณหภูมิห้อง การที่ลิ้นจี่มีอายุการเก็บรักษาสั้นนอกจากจะเป็นข้อจำกัดทางด้านการตลาดแล้ว ยังขัดขวางอุตสาหรรมการแปรรูปลิ้นจี่ด้วย เนื่องจากลิ้นจี่มีระยะการออกผลผลิตที่สั้นในช่วงกลางพฤษภาคม-ต้นกรกฎาคมเท่านั้น

การเสื่อมสภาพของลิ้นจี่จากการสูญเสียความชื้นและการเกิดสีน้ำตาลซึ่งเป็นผลมาจากความร้อนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหายใจของผลไม้ ซึ่งลักษณะการหายใจของลิ้นจี่เกี่ยวข้องทั้งกับลักษณะของผลไม้ อุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษา และสมบัติของสารเคลือบที่ใช้ เป็นที่ทราบกันดีว่าไคแซน ซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่เป็นสารอนุพันธ์จากปฏิกิริยาดีอะซิเลชันของไคติน สามารถใช้เป็นสารเคลือบผิวที่รับประทานได้สำหรับยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้หลายชนิดรวมถึงลิ้นจี่ โดยพบว่าลิ้นจี่ที่เคลือบผิวด้วยไคโตแซนจะผลิตความร้อนจากกระบวนการหายใจได้น้อยกว่าลิ้นจี่ที่ไม่ได้เคลือบผิว

ในขณะที่มีการใช้อนุภาคนาโนเงินทางอาหารเพิ่มมากขึ้นโดยอาศัยสมบัติต้านจุลินทรีย์ได้หลากหลายของมัน อย่างไรก็ตาม จากที่สืบค้นเอกสารงานวิจัยยังไม่พบการใช้ร่วมกันของอนุภาคนาโนเงินกับไคโตแซนเพื่อเป็นสารเคลือบผิวผลไม้ ซึ่งผู้วิจัยคาดหวังว่าสารเคลือบwผิวไคโตแซน-อนุภาคนาโนเงิน (Cs-AgNPs) ที่ได้จะผนวกสมบัติที่ดีของทั้งไคโตแซนและอนุภาคนาโนเงิน ทำให้สามารถแก้ปัญหาการเกิดสีน้ำตาลและยืดอายุการเก็บรักษาผลลิ้นจี่ได้ดียิ่งขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงอาจเป็นการเปิดมุมมองใหม่ของการศึกษาการเตรียมและการประยุกต์ใช้ไคโตแซน-อนุภาคนาโนคอมโพไซต์เป็นสารเคลือบผิวลิ้นจี่เพื่อชลอการเปลี่ยนแปลงคุณภาพและยืดอายุการเก็บรักษาลิ้นจี่ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง

สำหรับการเตรียมอนุภาคนาโนเงิน (silver nanoparticles; AgNPs) สามารถทำได้ง่ายเพียงขั้นตอนเดียวโดยอาศัยไคโตแซนทำหน้าที่ทั้งเป็น reducing agent และ capping agent ซึ่งจัดเป็นวิธีการสังเคราะห์แบบ green synthesis หลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีที่เป็นพิษและไม่เหมาะกับการประยุกต์ใช้กับทางอาหาร การเตรียม AgNPs โดยอาศัยไคโตแซนสามารถเกิดขึ้นได้ เนื่องจากไคโตแซนมีความสามารถในการยึดเหนี่ยวกับไอออนโลหะได้ดีเนื่องจากมีหมู่เอมีนและไฮดรอกซิลมากมาย ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดลองนี้พบว่าไคโตแซนสามารถรีดิวส์ไอออน Ag^{+} เป็น AgNPs ภายในขั้นตอนเดียว ซึ่งอนุภาคนาโนเงินที่ได้จะเข้ายึดเหนี่ยวกับพอลิเมอร์ ทำให้มีความเสถียรสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลามากกว่า 1 เดือน AgNPs ที่เตรียมได้มีลักษณะรูปร่างกลมและมีขนาดเล็กที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 20 นาโนเมตรเมื่อตรวจวัดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนแบบส่องผ่าน ซึ่งการที่ AgNPs ที่เตรียมได้มีขนาดเล็กจึงเป็นข้อดีในเรื่องของความไวและสมบัติการต้านจุลินทรีย์

การเกิดสีน้ำตาลของผิวเปลือกลิ้นจี่หลังการเก็บเกี่ยวเป็นปัจจัยที่สำคัญที่เป็นขีดจำกัดทางการค้าของผลลิ้นจี่ เนื่องจากการยอมรับของผู้บริโภคและมูลค่าของผลลิ้นจี่ลดลงอย่างมากเมื่อสีผิวของลิ้นจี่เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีน้ำตาล ถึงแม้ว่าคุณภาพและเนื้อสัมผัสของเนื้อลิ้นจี่อาจไม่ยังไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก การเกิดสีน้ำตาลของผิวเปลือกลิ้นจี่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจของผลลิ้นจี่หลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งจะส่งผลกระทบกับปัจจัยที่ก่อให้เกิดสีน้ำตาล ทั้งเอ็นไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (PPO) การสูญเสียน้ำ การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอนโทไซยานิน การเข้าทำลายของจุลินทรีย์ และปัจจัยอื่น ๆ ที่ยังไม่ทราบแน่ชัด

สำหรับงานวิจัยนี้เมื่อเคลือบผิวผลลิ้นจี่ด้วยสารเคลือบผิว Cs-AgNPs พบว่าสามารถชะลอการเกิดสีน้ำตาลและยืดอายุการเก็บรักษาผลลิ้นจี่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยช่วยชลอการสูญเสียน้ำหนัก การเพิ่มขึ้นค่าดัชนีสีน้ำตาลและของแอกติวิตีของเอ็นไซม์ PPO และการลดลงของปริมาณแอนโทไซยานิน อีกทั้งยังช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้นอกจากผลลิ้นจี่ที่เคลือบด้วย Cs-AgNPs จะมีอัตราการเกิดสีน้ำตาลลดลงแล้ว ยังช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลลิ้นจี่ที่อุณหภูมิห้องเป็น 10 วันเมื่อพิจารณาจากค่า GFP (the good quality fruit percentage) เมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่างผลลิ้นจี่ที่ไม่ได้เคลือบผิว ที่มีอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเพียง 3 วันเท่านั้น

ดังนั้นจึงอาจกล่าวโดยสรุปได้ว่า การใช้สารเคลือบผิว Cs-AgNPs เป็นวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวผลลิ้นจี่ที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่งเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลลิ้นจี่ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งเหมาะกับการขนส่งหรือการกระจายสินค้าในพื้นที่ไม่ไกลมากนัก และเนื่องจากวิทยาการการเก็บรักษาผลลิ้นจี่ที่มีประสิทธิภาพเกี่ยวข้องกับหลายกระบวนการ/ปัจจัย เช่น โครงสร้างของสารเคลือบผิว การระเหย (transpiration) การหายใจ (respiration) และอื่น ๆ ที่ยังไม่ทราบแน่ชัด ดังนั้นผู้วิจัยขอแนะนำว่า การใช้สารเคลือบผิว Cs-AgNPs ร่วมกับวิธีการอื่น เช่น อุณหภูมิต่ำ และบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสม จะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาได้นานขึ้นเพื่อให้เหมาะกับการขนส่ง/กระจายสินค้าในพื้นที่ห่างไกลมากขึ้น รวมทั้งช่วยยืดระยะเวลาการวางจำหน่ายให้นานขึ้นด้วย

บรรณานุกรม

Ahamed, M., Alsahi, M.S. and Siddiqui, M.K.J. (2010) Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica Chim. Acta*, 411, 1841-1848.

Aharoni, Y., Fallik, E., Copel, A., Gil, M., Grinberg, S. and Klein, J.D. (1997) Sodium bicarbonate reduces posthavest decay development on melon. *Posth. Biol. Technol.*, 10, 201-206.

Ali, A.W., Rajendran, J. and Koshi, M. (2011) Synthesis and characterization of chitosan and silver-loaded-chitosan nanoparticles for bioactive polyester. *Carbohydrate Polymers*, 83, 438-446.

Allan, C.R. and Hadwiger, L.A. (1979) The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Exp. Mycol.*, 3, 285-287.

An, J., Zhang, M., Wang, S. and Tang, J. (2008) Physical, chemical and microbiological changes in stored green asparagus spears as affected by coating of silver nanoparticles-PVP, *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1000-1007.

Arimotao, Y., Homma, Y. and Misato, T. (1977) The effect of sodium hydrogencarbonate on the occurrence of citrus storage diseases. *J. Pesticide Sci.*, 2, 163-167.

Bai , R.K., Huang, M.Y. and Jiang, Y.Y. (1988) Selective permeabilities of chitosan-acetic acid complex membrane and chitosan-polymer complex membrane for oxygen and carbon dioxide. *Polym. Bull.*, 20, 83-86.

Balau, L., Lisa, G., Popa, M.I., Tura, V. and Melnig, V. (2004) Physicochemical properties of chitosan films. *Central Eur. J. Chem.*, 2, 638-647.

Baldwin, E.A., Castro Vidaurre, E.F., Armada, M. and Gottifredi, J.C. (1995) Use of edible coating for lightly processed fruits and vegetables, *Hortic. Sci.*, 30, 35-38.

Banks, N.H. (1984) Some effects of TAL prolong coating on ripening bananas. *J. Exp. Biol.*, 35, 127-137.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.

Broughten, W.J. and Wong, H.C. (1979) Storage conditions and ripening of chicku fruits. *Sci. Hort.*, 10, 337.

Chen, W.S. (1984) A brief profile on studies of postharvest storage of litchi fruit. *Litchi Sci. Bull.*, 34, 47-51.

Chen, W.J. and Hong, Q.Z. (1992) Studies on senescence and browning of litchi fruit pericarp during storage. *Acta Hortic. Sin.*, 19, 227-232.

Chen, M.D. and Zhang, D.L. (1988) Studies on postharvest physiology and technology of litchi fruit during storage. *China Fruit Res.*, 4, 1-4.

Chien, P., Sheu, F. and Yang, F. (2007) Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *J. Food Eng.*, 78, 225-229.

Corral, L.G. (1987). Antimicrobial Activity of Soduim Bicarbonates Against Food-relate Bacteria and Yeasts. M.S. Thesis, Rutger University New Brunswick, NJ., U.S.A.

Dallas, P., Sharma, V. and Zboril, R. (2011) Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: Classification, synthesis path, applications, and perspectives. *Advanced Colloid and Interface Science*, 166, 119-135.

Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J.A. and Voilley, A. (1998) Edible films and coatings: Tomorrow packaging: A review. *Crit. Rev. Food Sci.*, 38, 299-313.

Del Nobile, M.A., Cannarsi, M., Altieri, C., Sinigaglia, M., Favia, P., Iacoviello, G. et al. (2004) Effect of Ag-contianing nanocomposite active packaging system on survival of *Alicyclobacillus acidoterrestris. Journal of Food Science*, 6, 379-383.

Devlieghere, F., Vermeulen, A. and Debevere, J. (2004) Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiol.*, 21, 703-714.

Diaz-Perez, J.C., Bautista, S. and Villanueva, R. (2000) Quality changes in sapote mamey fruit during ripening and storage. *Post. Biol. Tech*nol., 18, 67-73.

Dong, H., Cheng, L., Tan, J., Zheng, K. and Jiang, Y. (2004) Effects of chitosan coating on quality and shelf life of peeled litchi fruit. *J. food Eng.*, 64, 355-358.

Donlan, R.M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Immerging Infectious Diseases*, 8, 881, 890.

Du, J.M., Gemma, H. and Iwahori, S. (1997) Effects of chitosan coating on the storage of peach, Japanese pear, and kiwifruit. *J. Japanese Hortic. Sci.*, 66, 15-22.

Duncan, T.V. (2011) Application of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363, 1-24.

Ducamp-Collin, M., Ramarson, H. and Lebrun, M. (2008) *Postharvest Biol. Technol.*, 49, 241-246.

El Ghaouth, A., Ponnamoalam, R., Arul, J. (1989) Anti-fungal properties of chitosan fragments. Presented at the 34th Annual Meeting of Canadian Society of Horticultural Science, Montreal, Quebec, Canada, July 9-13.

El Ghaouth, A., Arul, J., Ponnampalam, R. and Boulet, M. (1991) Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *J. Food Sci.*, 56, 1618-1620.

El Ghaouth, a., Arul, J., Grenier, J. and Asselin, A. (1992) Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology*, 82, 398-402.

Fallik, E., Grinberg, S. and Ziv, O. (1997) Potassium bicarbonate reduces posthavest decay development on bell pepper fruits. *J. Hort. Sci.*, 72, 35-41.

Fernandez, A., Soriano, E., Lopez-Carballo, G., Picouet, P., Lloret, E., Gavara, R. et al. (2009) Preservation of aseptic conditions in absorbent pads by using silver nanotechnology. *Food Research International*, 42, 1105-1111.

Fernandez, A., Picouel, P. and Lloret, E. (2010) Reduction of the apoilage-related microflora in absorbent pads by silver nanotechnology Turing MAP packaging of beef meat. *Journal of Food Protection*, 73, 2263-2269.

Gamagae, S.U., Sivakumar, D., Wilson Wijeratnam, R.S. & Wijesundera, R.L.C. (2003). Use of sodium bicarbonate and *Candida oleophila* to control anthracnose in papaya during storage. *Crop Protect.*, 22, 775-779.

Gautam, S.K. and Chundawat, B.S. (1990) Posthavest changes in sapota cv. Kalipatti; II. Effect of various posthavest treatments on physiochemical attributes, *Indian J. Hort.*, 47, 264

Gogoi, S.K., Gopinath, P., Paul, A., Ramesh, A., Ghosh, S.S. and Chattopadhyay, A. (2006) Green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli* as amodel system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles. *Langmuir*, 22, 9322-9328.

Galeano, B., Korff, E. and Nicholson, W.L. (2003) Inactivation of vegetative cells, but not spores, of *Bacillus anthracis*, *B. cereus* and *B. subtilis* on stainless steel surfaces coated with an antimicrobial silver- and zinc-containing zeolite formation. *Applied Environmental Microbiology*, 69, 4329-4331.

Gol, N.B., Patel, P.R. and Rao, R. (2013) *Posth.* Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coating enriched with chitosan. *Biol. Technol.*, 85, 185-195.

Gong, Q.Q. and Tian, S.P. (2002) Partial characterization of soluble peroxidase in pericarp of lichi fruit. *Prog. Biochem. Biophys.*, 29, 891-896.

Helander, L.M., Murmiaho-Lassila, E.L., Ahvenainen, R., Rhoades, J. and Roller, S. (2001) Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 71, 235-244.

Henglein, A. (1998) Colloidal silver nanoparticles: Photochemical preparation and interaction with O_2, CCl_4 and some metal ions. *Chemistry of Materials*, 10, 444-450.

Holt, K.B. and Bard, A.J. (2005) Interaction of silver (I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag. *Biochemistry*, 44, 13214-13223.

Hirano, S., Itakura, C., Seino, H., Akiyama, Y., Nonaka, I., Kanbara, N. and Kawakami, T. (1990) Chitosan as an ingredient for domestic animal feeds. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1214-1217.

Homma, Y., Arimoto, Y. & Misato, T. (1981). Effect of sodium bicarbonate on each growth stage of cucumber powdery mildew fungus (*Spaerotheca fuliginea*) in its life cycle. *J. Pestic. Sci.*, 6, 201-209.

Huang, S., Hart, H., Lee, H.S. and Wicker, L. (1990) Enzymatic and colour changes during postharvest storage of lychee fruit. *J. Food Sci.*, 55, 1762-1763.

Hulme, A.C. (1971). The mango, pp.233-235. *In* A.C. Hulme (ed.). *The Biochemistry of Fruit and Their Products*. Academic press, London and New York.

Jiang, Y.M. (2000) Role of anthocyanins. Polyphenol oxidase and phenol in lychee pericarp browning. *J. Sci. Food, Agri.*, 80, 305-310.

Jiang, Y., Li, J. and Jiang, W. (2005) Effect of chitosan coating on shelf life of cold-stored kitchi fruit at ambient temperature. *LWT*, 38, 757-761.

Jiang, T., Feng, L. and Wang, Y. (2013) Effect of alginate/nano-Ag coating on microbial and physicochemical characteristics of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) during cold storage. *Food Chem.*, 141, 954-960.

Jiang, Y.M. and Li, Y.B. (2000) Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. *Food Chem.*, 73, 139-143.

Ju, Z.G. and Zhu, G.L. (1988) Research on tissue browning of fruits during storage. *Plant Physiol. Commun.*, 4, 46-48.

Kim, J.S., Kuk, K.E., Yu, K.N., Kim, J.H. et al. (2007) Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3, 95-101.

Kong, H.; Jang, J. (2008). Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanparticles, *Langmuir,* 24, 2051-2056

Krishna, M. R. and Rao, R. (1989) Posthavest changes in sapota under different storage treatments. *Andhra Agr. J.*, 36, 166.

Krochta, J.M. and De Mulder, C. (1997) Edible and biodegrable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technol.*, 51, 61-77.

Laxminarayan, S. (1980) Sapodilla and prickly pear. Tropical and subtropical fruits In: Nagy, S. and Shaw, P.E. (eds.), AVI, Westport, CT., p.415.

Laxminarayan, S. and Subramanyam, H. (1967) Effect of preharvest spay of maleic hydrazide and isopropyle-n-phenyl carbamate on sapota. *J. Food Sci.*, 4, 70.

Lee, H.S. and Wicker, L. (1991) Quantitative changes in anthocyanin pigments of lychee fruit during refrigerated storage. *Food Chem.*, 40, 263-270.

Li, H. and Yu, T, (2001) Effect of chitosan on incidence of brown rot quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. *J. Sci. Food Agric.*, 81, 269-274.

Li, H., Li, F., Wang, L., Sheng, J., Xin, X., Zhao, L. et al. (2009) Effect of nano-packing on preservation quality of Chinese jujube (*Ziziphus jujube* Mill. Var. inermis (Bunge) Rehd). *Food Chemistry*, 114, 547-552.

Lin, Z.F., Li, S.S., Zhang, D.L., Lin, G.Z., Li, Y.B., Liu, S.X. and Chen, M.D. (1988a) The changes of pigments, phenolics contents and activities of polyphenol oxidase and phenolanine ammonia-lyase in pericarp of postharvest litchi fruit. *Acta Bot. Sin.*, 30, 40-45.

Lin , ZF., Li, S.S., Zhang, D.L., Liu, S.X., Li, Y.B., Lin, G.Z. and Chen, M.D. (1988b) The changes of oxidation and peroxidation in postharvest litchi fruit. *Acta Bot. Sin.*, 30, 382-387.

Lin, B., Du, Y., Liang, X., Wang, X. and Yang, J. (2011) Effect of chitosan coating on respiratotry behavior and quality of stored litchi under ambient temperature. *J. Food Eng.*, 102, 94-99.

Lin, B.F., Du, Y.M., Liang, X,Q. and Yu, Z.H. (2009) Study on the heat transfer character of chitosan coating film material. *Packaging Eng.*, 30, 1-3.

Lin, B.F., Liang, X.Q., and Chen, L. et al. (2008) Study on the characteristic of wrapper coated with chitosan. *Packaging Eng.*, 29, 1-3.

Lin, B.F. and Liang, X.Q. (2003) The effect of polysaccharide-based material crystallization on the postharvest life of litchi at normal temperatures. *Guangxi Sci.*, 10, 68-71.

Lindsay, R.C. (1985). Food additives. Ch.10. p. 632. *In Food Chemistry*. Fennema, O.R. (ed.). Marcel Decker Inc., NY.

Lok, C., Ho, C.M., Chen, R., He, Q.Y., Yu, W.Y., Sun, H. et al. (2007) Silver nanoparticles: partial oxidation and antimicrobial activities. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12, 527-534.

Lowings, P.H. and Cutts, D.F. (1982) The preservation of fresh fruits and vegetables. In: Proc. Institute of the Food Science and Technology Annual Symp., Nottingham, UK, July 1981, vol. 15, pp. 52-54.

Luo, Y.B. and Cai, T.Y. (2001) Storage and Process of Horticulture Product. China Agricultural University Publishing Company, Beijing, pp. 3-25.

Luning, P.A., Mango, L., Kussaga, J., Rovira, J. and Marcells, W.J. (2008) Comprehensive analysis and differentiated assessment of food safety control systems: a diagnostic instrument. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 522-534.

Lurie, S., Drobey, S., Chalupowicz, L. & Chalutz, E. (1995). Efficacy of *Candida oleophila* Strain 182 in preventing *Penicilium expansum* infection of nectarine fruits. *Phytoparasitica*, 23, 231-234.

Macheix, J.J., Fleuriet, A. and Billot, J. (1990) Fruit Phenolics. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-24.

Mcdonnell, G. and Russel, A.D. (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clinical Miocrobiol. Rev.*, 12, 147-179.

Mohan, Y.M., Lee, K., Premkumar, T. and Geckeler, K.E. (2007) Hydrogel networks as nanoreactors: a novel approach to silver nanoparticles for antibacterial applications. *Polymers*, 48, 158-164.

Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramirez, J.T. and Yacaman, M.J. (2005) The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnol.*, 16, 2346-2355.

Nip, W.K. (1988) Handling and preservation of lychee with emphasis on colour retention. *Tropic. Sci.*, 28, 5-11.

Pal, S., Tak, Y.K. and Song, J.M. (2007) Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli. Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1712-1720.

Panacek, A., Kolar, M., Vecerova, R., Prucek, R., Soukupova, J., Krystof, V., Hamal, P., Zboril, R. and Kvitek, L. (2009) *Biomaterials*, 30, 6333-6340.

Pastoriza-Santos, I. and Liz-Marzan, L.M. (2002) Synthesis of silver nanoprisms in DMF. *Nano Letters*, 2, 903-905.

Pen, L.L and Jiang, Y.M. (2003) Effects on chitosan coating on shelf life and quality of fresh-cut Chinese water chestnut. *LWT*, 36, 359-364.

Pimpa, W. and Pimpa C. (2014) Morphology and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Stabilized with Durian Seed Starch. *The 31th Annual Conference of the Microscopy Society of Thailand (MST31)*, January 29-31, Nakhonratchasima, Thailand.

Pirie, A. and Mullins, M.G. (1976) Changes in anthocyanin and phenolics content of grapevine leaf and fruit tissue treated with sucrose, nitrate and ascorbic acid. *Plant Physiol.*, 58, 468-472.

Prasad, U.S. and Jha, O.O. (1978) Changes in pigmentation patterns during litchi ripening: Flavonoid production. *J. Plant Biochem.*, 5, 44-49.

Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A. (2002) *Microbilogy*, 5th edition, The McGraw-Hill Companies, New York, pp. 46-61.

Punja, Z.K. and Gaye, M.M. (1993) Influence of postharvest handling practices and dip treatments on development of black root rot on fresh marker carrots. *Plant Dis.*, 77, 989-995.

Pusey, P.L., & Wilson, C.L., (1984). Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis. Plant Distribution*, 68, 753-756.

Rabea, E.I., Badawy, M.E.T., Stevens, C.V., Smagghe, G. and Steurbaut, W. (2003) Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromol.*, 4, 1457-1465.

Raveedran, P., Fu, J. and Wallens, S.L. (2003) *J. Amer. Chem. Soc.*, 125, 13940-13941.

Rhim, J.W., Hong, S.I., Park, H.M. and Ng, P.K.W. (2006) Prepartion and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 5814-5822.

Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, A., Di Venere, D. and Salerno, M. (2002) Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of tabele grapes. *J. Food Sci.*, 67, 1862-1867.

Romanazzi, G., Nigro, F. and Ippolito, A. (2003) Short hypobaric treatments potentiate the effect of chitosan in reducing storage decay of sweet cherries. *Post. Boil. Technol.*, 29, 73-80.

Sakai, H., Kanda, T., Shibata, H., Ohkubo, T and Ding, S. (2006) A study on grafting poly(1,4-dioxan-2-one) into starch via 2,4-tolylene diisocyanate. *Carbohydrate Polymer*, 65, 28-34.

Salunkhe, D.K. and Desai, B.B. (1984) Sapota, Posthavest Biotechnolgy of Fruits, Vol. II, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 59.

Sanpui, P., Murugadoss, A., Durga Prasad, P.V., Ghosh, S.S. and Chattopadhyay, A. (2008) The antibacterial properties of a novel chitosan-Ag-nanoparticle composite. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 142-146.

Scott, K.J., Brown, B.I., Chaplin, G.R., Wilcox, M.E. and Bain, J.M. (1982) The control of rotting and browning of lychee fruit by hot benomyl and plastic film. *Sci. Hortic.*, 16, 253-262.

Sharma, V.K., Yngard, Y. and Lin, Y. (2009) Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid Interface and Science*, 145, 83-96.

Similanick, J.L., Dennis-Arrue, R., Bosch, J.R., Gonzalez, A.R., Henson, D. & Janisiewicz., W.J. (1993). Control of posthavest rot of nectarines and peaches by *Pseudomonas* species. *Crop Prot.*, 12, 513-520.

Sondi, I. and Salopek-Sondi, B. (2004) Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria.

Spotts, R.A., Cervantes, T.J., Facteau, T.J. & Chang-Goyal, T. (1998). Control of brown rot and blue mold of sweet cherry with preharvest iprodione, postharvest *Cryptococcus infirmo-miniatus* and modified atmosphere packaging. *Plant Distribution*, 82, 1158-1160.

Tan, X.J. and Li, Y.B. (1984) Partial purification and properties of polyphenol oxidase in lichi fruit peel. *Acta Polyphys. Sin.*, 10, 339-346.

Underhill, S., Bagshaw, J., Prasad, A., Zaubermam, G., Ronen, R. and Fuchs, Y. (1992) The control of litchi postharvest skin browning using sulphur dioxide and low pH. *Acta Hortic.*, 732-741.

Underhill, S.J.R. and Critchley, C. (1994) Anthocyanin decolourisation and its role in lychee pericarp browning. *Aust. J. Exp. Agric.*, 34, 115-122.

Underhill, S>J.R. and Critchley, C. (1995) Cellular localization of polyphenol oxidase and peroxidase activity in *Litchi chenensis* Sonn. Pericarp. *Plant Physiol.*, 22, 627-632.

Wang, X., Du, Y. and Liu, H. (2004) Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex. *Carbohyd. Polym.*, 56, 21-26.

Wei, D., Sun, W., Qian, W., Ye, Y. and Ma, X. (2009) The synthesis of chitosan-base silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohyd. Res.*, 344, 2375-2382.

Wilson, C.L. and Wisniewiski, M.E. (1989) Biological control of postharvest disease of fruit and vegetables: an emerging technology. *Ann. Rev. Phytopath.*, 27, 425-441.

Wilson, C.L., Frankiln, J.D. & Pusey, P.L. (1987). Biological control of *Rhizopus* rot of peach with *Enterobacter cloacae*. *Phytopathology*, 77, 303-305.

Wu, L.Q., Gadre, A.P., Yi, H., Kastantin, M.J., Rubloff, G.W., Bentley, W.E., Payne, G. F. and Ghodssi, R. (2002) Voltage-dependent assembly of the polysaccharide chitosan onto an electrode surface. *Langmuri*, 18, 8620-8625.

Yi, Y., Wang, Y. and Liu, H. (2003) Preparation of new crosslinked chitosan with crown ether and their adsorption for silver ion for antibacterial activities. *Carboh. Polym.*, 53, 425-430.

Yoksan, R. and Chirachanchai, S. (2010) Silver nanoparticles loaded chitosan starch based films: fabrication and evaluation of tensile, barrier and antimicrobial properties. *Material Science and Engineerign*, 30, 891-897.

Yonemoto, Y., Higuchi, H. and Kitano, Y. (2002) Effects of storage temperature and wax coating on ethylene production, respiration and shelf life in cherimoya fruit. *J. Japanese Soc. Hortic. Sci.*, 71, 643-650.

Yueming J. & Yuebiao L. (2000). Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit.. *Food Chem.*, 73 (2), 139-143.

Zauberman, G., Ronen, R., Akerman, M., Weksler, A., Rot, I., Fuchs, Y. (1991) Postharvest retention of the red colour of lichi fruit pericarp. *Sci. Hort., 47, 89-97.*

Zhang, Z., Xuequn, P., Yang, C., Ji, Z. and Jiang, Y. (2004) purification and structural analysis of anthocyanins from litchi pericarp. *Food Chem.*, 84, 601-604.

Zhang, Z., Pang, X., Xuequn, P., Ji, Z. and Jiang, Y. (2005) Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp. *Food Che.*, 90, 47-52.

Zhang, D. and Quantick, C. (1997) Effect of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi* chinensis Son.) Postharvest *Biol. Technol.*, 12, 195-202.

Zhang, D. and Quantick, P.C. (1998) Antifungal Effects of Chitosan Coating on Fresh Strawberries and Raspberries During Storage. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 73, 763-767.

Zheng, X., Tian, S., Gidley, M.J., Yue, H. and Li, B. (2007) Effects of exogenous oxalic acid on ripening and decay incidence in mango fruit during storage at room temperature. *Posth. Biol. Technol.*, 45, 281-284.

Zheng, I.Y., and Jiang-Feng Zhu, J.F. (2003) Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydr. Polym.*, 54, 527-530.