รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสกัด องค์ประกอบ คุณสมบัติบางประการ และการประยุกต์ใช้ของสารสกัดแทนนินจากวัสดุเศษเหลือของพืช

Extraction, composition, some properties and application of tannin extract from plant by-product

ดร.ปุณณาณี สัมภวะผล

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประจำปีงบประมาณ 2554 รหัสโครงการ AGR540687S

การสกัด องค์ประกอบ คุณสมบัติบางประการ และการประยุกต์ใช้ของสารสกัดแทนนินจากวัสดุเศษเหลือของพืช

Extraction, composition, some properties and application of tannin extract from plant by-product

ดร.ปุณณาณี สัมภวะผล
ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประจำปีงบประมาณ 2554

บทคัดย่อ

การศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในวัสดุเศษเหลือของพืชจำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างใบเคี่ยมมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด คือ 158.14 มิลลิกรัมสมมูลของ gallic acid ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด รองลงมาคือ ใบทับทิม เปลือกลูกตาล และเปลือกเงาะ ซึ่งมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 135.69, 134.15 และ 109.20 มิลลิกรัมสมมูลของ gallic acid ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด ตามลำดับ และจากการศึกษาปริมาณแทนนินทั้ง 2 ชนิด คือ คอนเดนซ์แทนนิน และไฮโดรไลซ์แทนนิน พบว่าใบมังคุดมีปริมาณคอนเดนซ์แทนนินมากที่สุด (241.41 มิลลิกรัมสมมูลของ tannic acid ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด) รองลงมาคือ ใบฝรั่ง เปลือกลูกตาล ใบมะม่วงหิมพานต์ และใบยาง ซึ่งมีปริมาณคอนเดนซ์แทนนินเท่ากับ 128.33, 126.94, 124.57 และ 100.72 มิลลิกรัมสมมูลของ tannic acid ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด ตามลำดับ แต่ไม่พบไฮโดรไลซ์แทนนินในตัวอย่างวัสดุเศษเหลือของพืชทั้งหมด

ทำการคัดเลือกตัวอย่างวัสดุเศษเหลือของพืชที่มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณคอนเดนซ์แทนนินสูงมา 15 ชนิด ได้แก่ ใบฝรั่ง ใบเงาะ ใบยาง ใบมันสำปะหลัง ใบทับทิม ใบมะม่วงหิมพานต์ ใบมังคุด ใบเคี่ยม ไม้เคี่ยม เปลือกทับทิม เปลือกสะตอ เปลือกเงาะ เปลือกมังคุด เปลือกลูกตาล และกาบมะพร้าว เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และคุณสมบัติในการตกตะกอนโปรตีน พบว่าสารสกัดจากใบมะม่วงหิมพานต์ สารสกัดจากใบเคี่ยม และสารสกัดจากเปลือกสะตอสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคที่นำมาทดสอบทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* และ *Vibrio cholerae* ได้ จากนั้นนำสารสกัดทั้ง 3 ชนิด มาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และคุณสมบัติในการตกตะกอนโปรตีน ซึ่งพบว่าสารสกัดจากเปลือกสะตอมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH radical (405.28 ± 3.65 ไมโครโมลสมมูลของ tolox ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด) และ metal ion chelating activity (220.96 ± 1.25 ไมโครโมลสมมูลของ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด) อีกทั้งมีคุณสมบัติในการตกตะกอนโปรตีนเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงคัดเลือกเปลือกสะตอเพื่อใช้ในการศึกษากระบวนการสกัดที่เหมาะสม

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารจากเปลือกสะตอ โดยศึกษาชนิดของตัวทำละลาย อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายต่อตัวอย่าง อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด และเวลาที่ใช้ในการสกัด ที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยวิธีการแสดงผลแบบตอบสนองโครงร่างพื้นผิว พบว่าสารสกัดจากเปลือกสะตอที่สกัดด้วยเอทานอล โดยใช้อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 15:1 มิลลิลิตรต่อกรัม สกัดที่อุณหภูมิ 46.56 °C เป็นเวลา 60 นาที เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จะให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 538.75 มิลลิกรัมสมมูลของ gallic acid ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด

เมื่อนำสารสกัดจากเปลือกสะตอที่สกัดได้จากสภาวะที่เหมาะสมมาทดสอบคุณสมบัติการตกตะกอนโปรตีน พบว่ามีสมบัติการตกตะกอนโปรตีนคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี ABTS radical, DPPH radical และตรวจสอบความสามารถในการจับโลหะ (metal ions chelating

activity) พบว่ามีกิจกรรมการต้านออกซิเดชันเท่ากับ 4352.00 ไมโครโมลสมมูลของ tolox ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด, 1383.72 ไมโครโมลสมมูลของ tolox ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด และ 4.36 ไมโครโมลสมมูลของ EDTA ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยวิธี Agar-well diffusion โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium และ *Vibrio cholera* พบว่าสารสกัดจากเปลือกสะตอมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทุกชนิดที่นำมาทดสอบ และมีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 7.38 ถึง 15.94 มิลลิเมตร โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) อยู่ในช่วง 3.12 ถึง 12.5 และ 6.25 ถึง 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเปลือกสะตอ พบว่ามีสาร Apigenin 7-glucoside เป็นองค์ประกอบหลัก

การศึกษาฟิล์มเจลาตินที่เติมสารสกัดเปลือกสะตอที่ระดับความเข้มข้น 1 ถึง 5 เท่าของค่า MBC พบว่าฟิล์มเจลาตินที่เติมสารสกัดเปลือกสะตอจะทำให้ความหนาเพิ่มขึ้น มีค่า L* และ a* ลดลง แต่มีค่า b* เพิ่มขึ้น การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของฟิล์ม พบว่าแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดถูกยับยั้งด้วยฟิล์มต้านจุลินทรีย์ โดยเกิดเป็นวงใสบริเวณที่สัมผัสกับแผ่นฟิล์ม ยกเว้น *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* จะเกิดเป็นวงใสขนาดใหญ่ล้อมรอบแผ่นฟิล์ม โดยความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ขนาดของวงใสใหญ่ขึ้น เมื่อนำฟิล์มเจลาตินที่เติมสารสกัดจากเปลือกสะตอมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ปูอัดเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา โดยศึกษาที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 1 และ 2 เท่า ของค่า MBC โดยศึกษาคุณภาพทางเคมี พบว่าปูอัดที่ห่อด้วยฟิล์มเจลาตินที่เติมสารสกัดจากเปลือกสะตอทั้ง 2 ระดับความเข้มข้นมีค่าความเป็นกรดด่างและปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมดน้อยกว่าปูอัดที่ห่อด้วยฟิล์มเจลาติน (ไม่เติมสารสกัด) และโพลีโพรพิลีน ปูอัดที่ห่อด้วยฟิล์มเจลาตินที่เติมสารสกัดจากเปลือกสะตอทั้ง 2 ระดับความเข้มข้นมีค่า TBARS มากกว่าปูอัดที่ห่อด้วยโพลีโพรพิลีน แต่น้อยกว่าฟิล์มเจลาติน เมื่อทดสอบคุณภาพทางกายภาพโดยการวัดค่าสีของด้านสีแดงและสีขาวของปูอัดพบว่าปูอัดทุกชุดการทดลองมีค่า L* และ a* ลดลง แต่ค่า b* เพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษามากขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบแต่ละชุดการทดลองพบว่าปูอัดที่ห่อด้วยฟิล์มที่เติมสารสกัดจากเปลือกสะตอที่ความเข้มข้น 2 เท่าของค่า MBC มีค่า L* และค่า a* น้อยกว่า แต่มีค่า b* มากกว่าฟิล์มที่เติมสารสกัดจากเปลือกสะตอที่ความเข้มข้น 1 เท่าของค่า MBC ฟิล์มเจลาติน และฟิล์มโพลีโพรพิลีน ตามลำดับ เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลินทรีย์ของปูอัด พบว่าปูอัดที่ห่อด้วยฟิล์มเจลาตินที่เติมสารสกัดจากเปลือกสะตอที่ความเข้มข้น 2 เท่าของค่า MBC มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (mesophile และ psychrophile) จำนวน *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* น้อยกว่าปูอัดที่ห่อด้วยฟิล์มเจลาตินที่เติมสารสกัดจากเปลือกสะตอที่ความเข้มข้น 1 เท่าของค่า MBC ฟิล์มเจลาตินและโพลีโพรพิลีนในระยะเวลาเก็บรักษา 14 วัน ดังนั้นการเติมสารสกัดเปลือกสะตอลงในฟิล์มสามารถช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดจากเปลือกสะตอมีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาของอาหารได้

ABSTRACT

Total phenolic content of 30 samples of plant by-products was studied. It was found that resak tembaga leaf extract showed the highest total phenolic content (158.14 mg gallic acid equivalent (GAE)/g dry weight (DW)), followed by pomegranate leaf, palmyra peel and rambutan peel, which contain 135.69, 134.15 และ 109.20 mg GAE/g DW, respectively. Condensed and hydrolyzed tannin were also investigated. Mangosteen leaf showed the highest content of condensed tannin (241.41 mg tannic acid equivalent (TAE)/g DW), followed by guava leaf, palmyra peel, cashew leaf and para rubber leaf, which contain 128.33, 126.94, 124.57 and 100.72 mg TAE/g DW, respectively. However, hydrolyzed tannin was not detected in all plant by-products.

Fifteen samples were selected base on the contents of total phenolic and condensed tannin. Guava leaf, rambutan leaf, para rubber leaf, cassava leaf, pomegranate leaf, cashew leaf, mangosteen leaf, resak tembaga leaf, resak tembaga bark, pomegranate peel, stink bean peel, rambutan peel, mangosteen peel, palmyra peel and coconut husk, were used to study the bioactive activities (antimicrobial, antioxidant activities and protein precipitation). The results showed that cashew leaf, resak tembaga leaf and stink bean podextract inhibited all 6 tested pathogenic bacteria (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio cholerae*). These extracts were then investigated for antioxidant activity and protein precipitation. Stink bean pod extract showed the highest antioxidant activity by using DPPH radical (405.28 ± 3.65 µmol tolox equivalent (TE)/g DW), metal ion chelating activity (220.96 ± 1.25 µmol Ethylenediaminetetraacetic acid equivalent (EDTAE)/g DW) and completely protein precipitation (100%). Thus, stink bean pod extract was chosen for study the optimal extraction condition.

The effects of solvent type, solvent-sample ratio, extraction temperature and extraction time, were studied to elucidate the optimal condition for extract the phenolic compounds and antimicrobial agent using response surface methodology. Ethanol was the most efficient solvent for extraction with solvent-sample ratio of 15:1 ml/g at 46.56 $^{\circ}$C in the dark for 60 min under maceration at 200 rpm, which provide the phenolic content of 538.75 mg GAE/g DW.

Stink bean pod extract obtained from the optimal condition showed 100% protein precipitation. Antioxidant activity of stink bean pod extract were 4352.00 µmol TE/g DW,

1383.72 µmol TE/g DW and 4.36 µmol EDTAE/g DW by using ABTS radical, DPPH radical method and metal ions chelating activity assay, respectively. Antimicrobial activity against 6 pathogenic bacteria (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium and *Vibrio cholerae*) was determined by using agar-well diffusion. Stink bean pod extract inhibited all 6 tested pathogenic bacteria. The inhibition zone ranged from 7.38 - 15.94 mm. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) values of stink bean pod extract ranged between 3.12 to 12.5 and 6.25 to 50 mg/ml, respectively. Major chemical composition of optimized stink bean pod extract was apigenin 7-glucoside (48.45 mg/l).

Gelatin film incorporated with stink bean pod extract at the concentration of 1-4 folds of MBC values increased the thickness, decreased in L* and a* values but increased in b*. Gelatin film incorporated with stink bean pod extract could inhibit all tested bacteria especially *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* which showed high diameter of inhibition zone around film. When the concentration of the extract increased, the diameters of inhibition zone were enhanced. Application of gelatin film incorporated with stink bean pod extract at the concentration of 1-2 folds of MBC values by wrapping the imitated crab meat was studied. Imitated crab meat wrapped with gelatin film incorporated with stink bean pod extract (1MBC and 2MBC) had lower pH and TVB values than those wrapped with gelatin film (without the extract) and polypropylene (PP). However, imitated crab meat wrapped with gelatin film incorporated with both concentration levels of stink bean pod extract had higher TBARS value than PP, but lower than gelatin film. The decrease in L* and a* value, but increase in b* values of imitated crab meat (red and white site) were observed in all samples throughout the storage period. Gelatin film incorporated with stink bean pod extract at 2MBC demonstrated lower L* and a* value, but higher b* values than those of 1MBC, gelatin film and PP, respectively in both of red and white site of imitated crab meat. In addition, imitated crab meat wrapped with gelatin film incorporated stink bean pod extract at 2MBC showed lower total viable count (mesophile and psychrophile), *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* populations than those of gelatin film incorporated stink bean pod extract at 1MBC, gelatin film and PP during storage for 14 days. Therefore, the addition of stink bean pod extract into gelatin film could inhibit the microbiological growth, since stink bean pod extract act as antimicrobial agents, which is able to prolong the shelf-life of food products.