

การผลิตแผ่นเส้นใยนาโนเจลาคินที่มีสมบัติด้านจุลินทรีย์โดยการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิต

นางสาวชนุดพร ชีรประสารณ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF ANTIMICROBIAL GELATIN NANOFIBERS BY ELECTROSTATIC SPINNING

Miss Chanutporn Dherapasart

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

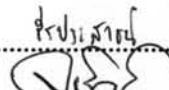


Copyright of Chulalongkorn University

501951

ชุนตพร วีรประสาธน์ : การผลิตแผ่นเส้นใยนาโนเจลาตินที่มีสมบัติต้านจุลินทรีย์โดยการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิต. (PRODUCTION OF ANTIMICROBIAL GELATIN NANOFIBERS BY ELECTROSTATIC SPINNING) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. จิรารัตน์ ทัดติยกุล,
อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. พิชญ์ สุภผล 101 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตแผ่นเส้นใยนาโนเจลาตินที่มีสมบัติต้านจุลินทรีย์โดยการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิต สารต้านจุลินทรีย์ที่ใช้คือไนซิน ซึ่งมี Minimum Inhibitory Concentration (MIC) เท่ากับ 0.05 mg/mL เมื่อให้ความร้อนสารละลายไนซิน (pH 2) ที่ 120 °C นาน 30 นาที ไนซินยังคงกิจกรรมยับยั้งจุลินทรีย์ได้ไม่ต่างจากเดิม เมื่อละลายเจลาตินกับไนซินในสารละลายกรดอะซิติกและน้ำในอัตราส่วน 70:30 (pH ~ 3) ความหนืดและค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเจลาตินและไนซินเพิ่มขึ้น เมื่อบั่นเส้นใยของสารละลายเจลาติน 22% w/v ที่ผสมไนซินความเข้มข้นต่างๆ (0% - 3% w/w) นาน 5 นาที โดยควบคุมให้ระยะห่างระหว่างปลายเข็มและแผ่นรองรับเป็น 20 cm และความต่างศักย์ไฟฟ้า 15 kV ได้เส้นใยที่ต่อเนื่อง ไม่มีปม และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเส้นใยในช่วง 220 - 250 nm เมื่อบั่นเส้นใยจากสารละลายเจลาตินความเข้มข้นต่างๆ (20% - 24% w/v) และผสมไนซิน 3% w/w นาน 5 นาที พบว่าเฉพาะสารละลายเจลาติน 22% w/v และ 24% w/v ให้เส้นใยที่เรียบสม่ำเสมอ มีความต่อเนื่องไม่มีปม และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเส้นใย 250 nm และ 320 nm ตามลำดับ แต่พบว่าเมื่อ crosslink แผ่นเส้นใยนาโนด้วยไอของ glutaraldehyde อิมมัวที่ 37 °C นาน 5 นาที tensile strength Young's modulus และ elongation ของแผ่นเส้นใย (ความหนา 47.8 μ m - 132.8 μ m) มีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของไนซินเพิ่มมากขึ้น โดย tensile strength และ elongation ของแผ่นเส้นใยนาโนเจลาติน 22% w/v และ 24% w/v มีค่าไม่แตกต่างกัน ขณะที่ Young's Modulus มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบสมบัติการยับยั้ง *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 (10^6 CFU/mL) พบว่าแผ่นเส้นใยนาโนเจลาตินที่ผสมไนซินความเข้มข้นมากกว่าจะให้บริเวณการยับยั้งยิ่งเฉลี่ยมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่แผ่นเส้นใยนาโนเจลาตินที่ผสมไนซินความเข้มข้นคงที่แต่แปรปริมาณเจลาตินจะให้บริเวณการยับยั้งเฉลี่ยไม่ต่างกัน โดยพบว่าปริมาณไนซินคงเหลือในแผ่นเส้นใยนาโนเจลาตินที่มีสมบัติต้านจุลินทรีย์ที่ผ่านการ crosslink ในช่วง 1.08% - 1.22% w/w ของไนซินที่เดิม การปลดปล่อยไนซินจากแผ่นเส้นใยที่ผ่านการ crosslink ที่ผลิตจากสารละลายเจลาติน 22% w/v ผสมไนซิน 3% w/w ในช่วงอุณหภูมิ 5 °C - 45 °C และ water activity (a_w) 0.955 - 0.992 เป็นแบบปลดปล่อยออกมาทันที (burst release) โดยเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นการปลดปล่อยไนซินจะมากขึ้นในขณะที่การปลดปล่อยไนซินจากแผ่นเส้นใยในช่วง a_w 0.955 - 0.992 ให้ผลไม่แตกต่างกัน แผ่นเส้นใยนาโนเจลาตินผสมไนซินสามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Salmonella Typhimurium* และเมื่อเก็บแผ่นเส้นใยที่ 25 °C นาน 5 เดือน พบว่ายังคงกิจกรรมยับยั้งจุลินทรีย์

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร
ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนิสิต..... พจนน 
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... 

4872259023 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEY WORD: ANTIMICROBIAL / GELATIN / NANOFIBERS

CHANUTPORN DHERAPRASART : PRODUCTION OF ANTIMICROBIAL GELATIN NANOFIBERS BY ELECTROSTATIC SPINNING. THESIS ADVISOR : Assistant Professor Jirarat Tattiyakul, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : Associate Professor Pitt Supaphol, Ph.D, 101 pp.

The objective of this research was to produce antimicrobial gelatin nanofibers by electrostatic spinning. The antimicrobial compound contained in the nanofibers was nisin which has the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 0.05 mg/mL. After heated at 120 °C for 30 minutes, nisin in acid solution (pH 2) still retained its antimicrobial activity. Gelatin-nisin solutions (pH ~ 3) were prepared in acetic acid: water (70:30 v/v). Viscosity and conductivity of the solutions increased as the concentration of gelatin and nisin increased. Only nanofiber made from 22% and 24% w/v gelatin concentration was smooth without beads on string. Nisin concentration did not affect the average diameter of nanofiber, while increasing gelatin concentration caused an increase in nanofiber average diameter. The antimicrobial gelatin nanofiber mats were crosslinked by saturated glutaraldehyde vapor at 37 °C for 5 minutes. Tensile strength, Young's modulus and elongation of nanofiber mats (47.8 µm - 132.8 µm) decreased with increasing initial nisin concentration. Tensile strength and elongation of nanofiber mats (3% w/w nisin concentration and 20% - 24% w/v gelatin concentrations) were not significantly different, while their Young's moduli were significantly different. Increasing initial nisin concentration in the nanofiber increased the width of inhibition zone of *Lactobacillus plantarum* TISTR 850. Antimicrobial gelatin nanofiber which was produced from gelatin-nisin solution with different gelatin concentrations showed no significant difference in inhibition zone width. The nisin retention in crosslinked antimicrobial gelatin nanofiber mat was 1.08% - 1.22% w/w. Effects of temperature and water activity (a_w) on nisin release from crosslinked antimicrobial gelatin nanofiber mat were investigated on nanofiber that was produced from 22% w/v gelatin solution with 3% w/w nisin concentration. It was found that increasing temperature in the 5 °C - 45 °C range caused an increase in nisin release but increasing a_w in the 0.955 - 0.992 range caused no significant difference in the release. Crosslinked antimicrobial gelatin nanofiber mat showed an inhibition effect on *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* but not *Salmonella* Typhimurium. After storage at 25 °C for 5 months, the crosslinked antimicrobial gelatin nanofiber mat still retained its inhibition activity against *Lactobacillus plantarum*.

Department of Food Technology
Field of study Food Technology
Academic year 2007

Student's signature.....
Advisor's signature.....
Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere thanks and grateful appreciation to my advisor, Asst. Prof. Dr. Jirarat Tattiyakul of Food Technology Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for giving all her support and guidance throughout the research work. I am also sincerely grateful to Assoc. Prof. Dr. Pitt Supaphol of the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, my co-advisor for his suggestion, guidance, encouragement and support during my research.

In addition, my appreciation also extends to all thesis committee, Assoc. Prof. Dr. Sirirat Rengpipat of Microbiology Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Asst. Prof. Dr. Pasawadee Pradipasena, and Dr. Chuenjit Prakitchaiwatthana of Food Technology Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for their comments regarding this thesis.

I would like to express my deepest thanks to Assoc. Prof. Dr. Sirirat Rengpipat of Microbiology Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for allowing me to work in her laboratory room number 408, and for her support for microorganisms and equipments.

Many thanks go to all members and staff of the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, and all members of the laboratory room number 408 in Department of Microbiology, for advice and friendships over the past valuable periods. I also express to all my friends of the Department of Food Technology, and many involved persons for their kind helps, encouragement and assistance throughout my study – especially one of my intimate friends from Asian Institute of Technology (AIT) who sees the faith that is in me.

Finally, I would like to express my warmest thanks to my family for their love, care, encouragement, understanding, and support throughout my life.

CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	xi
LIST OF FIGURES.....	xii
CHAPTER 1 INTRODUCTION.....	1
CHAPTER 2 LITERATURE REVIEW.....	2
2.1 Nisin.....	2
2.2 Gelatin.....	4
2.2.1 Structure of Gelatin.....	5
2.2.2 Gelatin for Packaging Material Preparation	7
2.3 Electrostatic Spinning	8
2.3.1 Parameters Effect of Electrostatic Spinning Process..	10
2.3.2 Electrostatic Spinning of Biopolymer.....	12
CHAPTER 3 MATERIAL AND METHODS.....	14
3.1 Materials and Chemicals.....	14
3.2 Tested Microorganisms Preparation.....	15
3.3 Instruments.....	15
3.4 Experimental Procedures.....	17
3.4.1 Determination of Nisin Properties.....	17
3.4.1.1 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of Nisin.....	17
3.4.1.2 Determination of Nisin Stability.....	20
3.4.1.3 Determination of Nisin by Agar Diffusion Technique.....	20

	PAGE
3.4.2 Determination of Effects of Nisin Concentration and Diameter of Gelatin Nanofiber on Nisin Release.....	22
3.4.2.1 Production of Gelatin Nanofibers and Antimicrobial Gelatin Nanofiber.....	22
3.4.2.2 Crosslinking Gelatin Nanofibers and Antimicrobial Gelatin Nanofibers Mats.....	25
3.4.2.3 Determination of Mechanical Properties of Crosslinked Gelatin Nanofibers and Crosslinked Antimicrobial Gelatin Nanofibers Mats.....	25
3.4.2.4 Construction of Nisin Standard Curve.....	25
3.4.2.5 Determination of Concentration of Nisin in Antimicrobial Gelatin Nanofibers Mats.....	26
3.4.2.6 Statistical Analysis.....	27
3.4.3 Determination of Effects of Temperature and Water Activity (a_w) on Nisin Release.....	28
3.4.3.1 Determination of Effect of Temperature on Nisin Release.....	28
3.4.3.2 Determination of Effect of Water Activity (a_w) on Nisin Release.....	28
3.4.4 Determination of Effects of Crosslinked Antimicrobial Gelatin Nanofiber Mat on the Inhibiting of Bacterial Growth.....	29
3.4.5 Determination of Antimicrobial Activity of Crosslinked Antimicrobial Gelatin Nanofibers Mats after 5 Months Storage.....	31
CHAPTER 4 RESULTS AND DISCUSSION.....	32
4.1 Properties of Nisin.....	32
4.1.1 Minimum Inhibitory Concentration of Nisin.....	32
4.1.2 Stability of Nisin.....	34

	PAGE
4.2 Effects of Nisin Concentration and Diameter of Gelatin Nanofiber on Nisin Release.....	35
4.2.1 Characteristics of Gelatin-nisin Solution.....	35
4.2.2 Characteristics of Gelatin Nanofibers and Antimicrobial Gelatin Nanofibers.....	38
4.2.3 Crosslinking Gelatin Nanofibers and Antimicrobial Gelatin Nanofibers Mats.....	42
4.2.4 Mechanical Properties of Crosslinked Gelatin Nanofibers and Crosslinked Antimicrobial Gelatin Nanofibers Mats.....	45
4.2.5 Concentration of Nisin in Antimicrobial Gelatin Nanofibers Mats.....	51
4.3 Effects of Temperature and Water Activity (a_w) on Nisin Release from Crosslinked Antimicrobial Gelatin Nanofiber Mat.....	58
4.3.1 Effect of Temperature on Nisin Release.....	59
4.3.2 Effect of Water Activity on Nisin Release.....	62
4.4 Effects of Crosslinked Antimicrobial Gelatin Nanofiber Mat to Inhibiting Growth of Bacteria.....	64
4.5 Antimicrobial Activity of Crosslinked Antimicrobial Gelatin Nanofibers Mats after 5 Months Storage.....	67
CHAPTER 5 CONCLUSIONS.....	68
REFERENCES.....	70
APPENDICES.....	75
Appendix A.....	76
Appendix B.....	85
Appendix C.....	89
Appendix D.....	91

CURRICULUM VITAE.....

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
2.1 Gelatin Composition.....	5
3.1 Determination of final nisin concentration.....	18
4.1 Absorbance at 600 nm of MRS broth containing nisin at different concentrations and <i>Lactobacillus plantarum</i> both before and after incubating overnight at 37 °C in anaerobic condition.....	33
4.2 Average width of inhibition zone of non-heated and heated nisin (0.28 mg/mL) against <i>Lactobacillus plantarum</i> TISTR 850.....	35
4.3 Initial nisin concentration, inhibition zone, nisin retention, and % nisin retention in crosslinked antimicrobial gelatin nanofiber mat.....	58
4.4 Inhibition zone of crosslinked antimicrobial gelatin nanofiber mat of <i>Lactobacillus plantarum</i> TISTR 850 at different storage times.....	67

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1 Nisin molecule structure.....	3
2.2 Hydrolysis of collagen to gelatin.....	6
2.3 The general structure of gelatin.....	6
2.4 Electrostatic spinning apparatus set-up.....	9
2.5 Bending instability.....	10
3.1 Determination of minimum inhibitory concentration of nisin.....	19
3.2 Procedure for determination of nisin by agar diffusion technique.....	21
3.3 Electrospinning process for the production of gelatin nanofibers and antimicrobial gelatin nanofibers using various nisin concentrations and various gelatin concentrations.....	24
3.4 Procedure for determination of nisin concentration in antimicrobial gelatin nanofibers mats.....	27
3.5 Procedure for the determination of the effects of crosslinked antimicrobial gelatin nanofiber mat on the inhibition bacterial growth...	30
4.1 Tubes containing solution of MRS broth and <i>Lactobacillus plantarum</i> with/without nisin at different concentrations after overnight incubation	34
4.2 The width of inhibition zone of non-heated and heated nisin (0.28 mg/mL) against <i>Lactobacillus plantarum</i> TISTR 850 for both heated (upper zone) and non-heated (lower zone).....	35
4.3 Effect of initial nisin concentration on viscosity at 72.5 s^{-1} Shear rate and conductivity of gelatin solution.....	36
4.4 Effect of gelatin concentration on viscosity at 72.5 s^{-1} Shear rate and conductivity of gelatin-nisin solution.....	37
4.5 Scanning Electron Micrographs of electrospun gelatin-nisin nanofibers. (22% w/v gelatin concentration and 0% - 3% w/w initial nisin concentration).....	39

FIGURE	PAGE
4.6 Average diameter of gelatin nanofibers which were electrospun from 22% w/v gelatin concentration and nisin at different concentrations (0% - 3% w/w).....	40
4.7 Scanning Electron Micrographs of electrospun gelatin-nisin nanofibers. (3% w/w nisin concentration and 20% - 24% w/v gelatin concentration).....	41
4.8 Average diameters of antimicrobial gelatin nanofibers which were electrospun from gelatin at different concentrations (20% - 24% w/v) and 3% w/w nisin concentration.....	42
4.9 Scanning Electron Micrographs of electrospun gelatin-nisin nanofibers which were crosslinked for 5 minutes. (22% w/v gelatin concentration and 0% - 3% w/w initial nisin concentration).....	44
4.10 Scanning Electron Micrographs of electrospun gelatin-nisin nanofibers which were crosslinked for 5 minutes. (3% w/w nisin concentration and 20% - 24% w/v gelatin concentration)	45
4.11 Tensile strength of crosslinked gelatin nanofiber mat (22% w/v gelatin concentration and 0% - 3% w/w initial nisin concentration).....	47
4.12 Young's modulus of crosslinked gelatin nanofiber mat (22% w/v gelatin concentration and 0% - 3% w/w initial nisin concentration).....	47
4.13 Elongation of crosslinked gelatin nanofiber mat (22% w/v gelatin concentration and 0% - 3% w/w initial nisin concentration).....	48
4.14 Tensile strength of crosslinked antimicrobial gelatin nanofiber mat (3% w/w nisin concentration and 20% - 24% w/v gelatin concentration).....	49
4.15 Young's modulus of crosslinked antimicrobial gelatin nanofiber mat (3% w/w nisin concentration and 20% - 24% w/v gelatin concentration).....	50
4.16 Elongation of crosslinked antimicrobial gelatin nanofiber mat (3% w/w nisin concentration and 20% - 24% w/v gelatin concentration).....	50

FIGURE	PAGE
4.17 The width of inhibition zone of nisin from antimicrobial gelatin nanofiber mat (22% w/v gelatin concentration and 0% - 3% w/w initial nisin concentration) against <i>Lactobacillus plantarum</i>	53
4.18 The width of inhibition zone of nisin from antimicrobial gelatin nanofiber mat (3% w/w nisin concentration and 20% - 24% w/v gelatin concentration) against <i>Lactobacillus plantarum</i>	54
4.19 The width of inhibition zone (cm) in plates of nisin from antimicrobial gelatin nanofiber (upper zone) and crosslinked antimicrobial gelatin nanofiber mat (lower zone) (22% w/v gelatin concentration and 0% - 3% w/w initial nisin concentration) against <i>Lactobacillus plantarum</i>	55
4.20 The width of inhibition zone (cm) in plates of nisin from antimicrobial gelatin nanofiber (upper zone) and crosslinked antimicrobial gelatin nanofiber mat (lower zone) (3% w/w nisin concentration and 20% - 24% w/v gelatin concentration) against <i>Lactobacillus plantarum</i>	56
4.21 Inhibition zone of <i>Lactobacillus plantarum</i> caused by nisin released from crosslinked antimicrobial gelatin nanofiber mat in distilled water at 5 °C.....	60
4.22 Inhibition zone of <i>Lactobacillus plantarum</i> caused by nisin released from crosslinked antimicrobial gelatin nanofiber mat in distilled water at 25 °C.....	61
4.23 Inhibition zone of <i>Lactobacillus plantarum</i> caused by nisin released from crosslinked antimicrobial gelatin nanofiber mat in distilled water at 35 °C.....	61
4.24 Inhibition zone of <i>Lactobacillus plantarum</i> caused by nisin released from crosslinked antimicrobial gelatin nanofiber mat in distilled water at 45 °C.....	62

FIGURE	PAGE
4.25 Inhibition zone of <i>Lactobacillus plantarum</i> caused by nisin released from crosslinked antimicrobial gelatin nanofiber mat in distilled water-glycerol that had 0.955, 0.975 and 0.992 water activity (25 °C).....	63
4.26 Effect of nisin in crosslinked gelatin nanofiber mat on the inhibition of <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (10 ⁶ CFU/mL).....	65
4.27 Effect of nisin in crosslinked gelatin nanofiber mat on the inhibition of <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 (10 ⁶ CFU/mL).....	66
4.28 Effect of nisin in crosslinked gelatin nanofiber mat on the inhibition of <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311 (10 ⁶ CFU/mL).....	66