



ผลของการเอนแคปซูเลชันต่อฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มที่มีสารสกัดจากกากกาแฟ



สิริพัฒน์ มหาผล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2566

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

ผลของการเอนแคปซูลชันต่อฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มที่มีสารสกัดจากกากกาแฟ



สิริพัฒน์ มหาผล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2566

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

EFFECT OF ENCAPSULATION ON ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF COFFEE GROUND
RESIDUE-IMPREGNATED FILM



SIRAPAT MAHAPOL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR MASTER DEGREE OF SCIENCE
IN FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
BURAPHA UNIVERSITY

2023

COPYRIGHT OF BURAPHA UNIVERSITY

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ สิริพัฒน์ มหาผล ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร ของมหาวิทยาลัย
บูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

.....

(ดร.สิริมา ชินสาร)

..... ประธาน

(ศาสตราจารย์ ดร.พรชัย ราชตะนະพันธุ์)

..... กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภรณ์ ศรีปรีชาศักดิ์)

(ดร.ลลิตา โชติพิฤทธิพงษ์)

..... กรรมการ

(ดร.สิริมา ชินสาร)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภรณ์ ศรีปรีชาศักดิ์)

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. อุษาวดี ตันติวานุรักษ์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร ของ
มหาวิทยาลัยบูรพา

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิทวัส แจ่มเยี่ยม)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

62910144: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร; วท.ม. (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร)
 คำสำคัญ: กากกาแฟ, फिल्मด้านจุลินทรีย์, เอนแคปซูเลชัน, फिल्मโคโคซาน
 สিরพัฒน์ มหาผล : ผลของการเอนแคปซูเลชันต่อฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มที่มีสารสกัดจากกากกาแฟ. (EFFECT OF ENCAPSULATION ON ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF COFFEE GROUND RESIDUE-IMPREGNATED FILM) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: สิริมา ชินสาร, ธรณี ศรีปรีชาศักดิ์ ปี พ.ศ. 2566.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาฟิล์มด้านจุลินทรีย์โคโคซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน โดยการทดลองที่ 1 ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มโคโคซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (S-CH) ที่มีสารสกัดจากกากกาแฟ (S) 0 0.25 0.5 0.75 และ 1.0 % (w/v) ต่อ *Staphylococcus aureus* TISTR2329 *Bacillus subtilis* TISTR1984 *Escherichia coli* TISTR527 และ *Salmonella typhimurium* TISTR2519 โดยพบว่าฟิล์ม S-CH สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบทุกสายพันธุ์ และจำนวนการรอดชีวิตของแบคทีเรียลดลงเมื่อความเข้มข้นของ S ในฟิล์ม S-CH เพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) การทดลองที่ 2 ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของฟิล์ม eS-CH ที่มีสารสกัดจากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eS) 0.5 0.75 และ 1.0 % (w/v) เปรียบเทียบกับฟิล์ม S-CH ที่มีปริมาณ S ที่เทียบเท่ากัน พบว่าฟิล์ม eS-CH มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์มากกว่าฟิล์ม S-CH อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และพบว่าฟิล์ม eS-CH มีปริมาณ TPC CGA CF และฤทธิ์ต้านอนุมูลเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของ eS ในฟิล์มเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) อย่างไรก็ตามพบว่า ฟิล์มทั้งสองชนิดที่มีปริมาณของ S ที่เทียบเท่ากัน มีปริมาณ TPC CGA และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) การทดลองที่ 3 ทำการศึกษาสมบัติสมบัติทางกายภาพ สมบัติทางกล และสมบัติทางเคมีกายภาพของฟิล์ม eS-CH 1.0 % เปรียบเทียบกับฟิล์ม S-CH 1.0 % และฟิล์มโคโคซาน (CH) พบว่าฟิล์ม S-CH 1.0 % และ eS-CH 1.0 % มีค่า TS และ EAB น้อยกว่าฟิล์ม CH มีค่าความหนา และ WS มากกว่าฟิล์ม CH ($p \leq 0.05$) และมีค่า WVTR ไม่แตกต่างกับฟิล์ม CH ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามพบว่าฟิล์ม S-CH และ eS-CH มีค่าความหนา TS EAB WS และ WVTR แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จึงสามารถสรุปได้ว่าการเอนแคปซูเลชันช่วยเสริมฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของฟิล์ม แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อสมบัติทางกายภาพ สมบัติทางกล และทางเคมีกายภาพของฟิล์ม การเอนแคปซูเลชันจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้สำหรับการพัฒนาฟิล์มด้านจุลินทรีย์จากกากกาแฟเพื่อใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ด้านจุลินทรีย์ในอาหารได้

62910144: MAJOR: FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY; M.Sc. (FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY)

KEYWORDS: Coffee ground, Antimicrobial film, Encapsulation, Chitosan film

SIRAPAT MAHAPOL : EFFECT OF ENCAPSULATION ON ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF COFFEE GROUND RESIDUE-IMPREGNATED FILM. ADVISORY COMMITTEE: SIRIMA CHINNASARN, Ph.D., PARANEE SRIPREECHASAK, Ph.D. 2023.

This work aimed to develop an encapsulated spent coffee grounds extract-incorporated chitosan film (eS-CH). The experiment 1, The antimicrobial activity of the chitosan film containing spent coffee grounds extract (S-CH) with various spent coffee grounds extract (S) concentrations (0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1.0 % (w/v)) against *Staphylococcus aureus* TISTR2329 *Bacillus subtilis* TISTR1984 *Escherichia coli* TISTR527 and *Salmonella typhimurium* TISTR2519. It was found that S-CH film significantly inhibited all the tested microorganisms and the microbial survivability decreased with the increasing S concentrations in the S-CH film ($p \leq 0.05$). In the Exp. 2, The antimicrobial and antioxidant activity of the chitosan film containing encapsulated spent coffee grounds extract (eS-CH) with various encapsulated spent coffee grounds extract (eS) concentrations (0.5, 0.75 and 1.0 % (w/v)) compared with the S-CH film with equivalent S concentrations. The results showed that the eS-CH film significantly exhibited the higher antimicrobial than the S-CH film ($p \leq 0.05$). The eS-CH film had TPC, CGA, CF content and antioxidant activity increased with increasing content of eS in the film ($p \leq 0.05$). However, there was no significant different in the antioxidant activity of both S-CH and eS-CH films containing equivalent amount of S ($p > 0.05$). Exp 3, the physical, mechanical and physicochemical properties of eS-CH 1.0 % compared with S-CH 1.0 % and chitosan film (CH). It was found that TS and EAB values of the S-CH 1.0 % and eS-CH 1.0 % films were less than those of the CH film ($p \leq 0.05$). The thickness and WS of the S-CH 1.0 % and eS-CH 1.0 % films were greater than those of the CH film ($p \leq 0.05$) and WVTR was not different from CH film ($p > 0.05$), whereas the TS, EAB WSI and WVTR values of both the S-CH 1.0 % and the eS-CH 1.0 % films were not statistically significant ($p > 0.05$). The results suggest that encapsulation could enhance the antimicrobial and antioxidant activities of the films, however other film properties, including the physical, mechanical and physicochemical properties of the film could not be impaired. Encapsulation therefore, could be an alternative that can be applied for the antimicrobial film development from the spent coffee ground as an antimicrobial food packaging.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิรมล ปัญญาบุษยกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภรณี ศรีปรีชาศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษา ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องในการดำเนินงานวิจัยต่างๆ ตลอดจนมา จึงขอกราบ ขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณประธานกรรมการ และกรรมการทุกท่านที่กรุณาตลอดเวลา และให้ ข้อเสนอแนะในการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณครอบครัว ที่สนับสนุน และเป็นกำลังใจให้แก่ผู้วิจัยในการทำวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย บูรพา ที่กรุณาให้ คำปรึกษา และให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือ สารเคมี และห้องปฏิบัติการ ทำ ให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณร้านกาแฟสตาร์บัคส์ สาขาแหลมทอง ถนนลงหาดบางแสน อ.เมืองชลบุรี จ. ชลบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ผลิตผลพลอยได้จากกากกาแฟ เพื่อนำมาเป็นวัตถุดิบหลักในงานวิจัยนี้

ทั้งนี้งานวิจัยนี้ส่วนหนึ่งได้รับทุนอุดหนุนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปี งบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๔ และได้รับการสนับสนุนจากหน่วยบริการนวัตกรรมทางวิทยาศาสตร์ คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (SIFN-62910144) จึงขอขอบพระคุณ ณ ที่นี้ด้วย

ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์และเป็นแนวทางสำหรับผู้ ที่ สนใจหากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้วิจัยต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

สิริพัฒน์ มหาผล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	4
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร.....	6
2.1 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ลงในอาหาร.....	6
2.2 สารต้านจุลินทรีย์.....	7
2.3 กากกาแฟ.....	11
2.4 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของกากกาแฟ.....	13
2.5 กลไกการออกฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์.....	17
2.6 การประยุกต์ใช้สารต้านจุลินทรีย์ในอาหาร.....	18
2.7 บรรจุภัณฑ์แบบแอคทีฟ.....	21
2.8 ฟิล์มบิโกลไค.....	23
2.9 ไคโตซาน.....	26

2.10 การใช้โคโตซานเป็นบรรจุภัณฑ์แอคทีฟ	29
2.11 การเอนแคปซูลแข็ง	30
2.12 ชนิดของสารห่อหุ้มที่ใช้ในกระบวนการเอนแคปซูลแข็ง	32
2.13 เทคนิคที่ใช้ในกระบวนการเอนแคปซูลแข็ง	34
2.14 ปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มที่มีสารต้านจุลินทรีย์เอนแคปซูลแข็ง	37
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	40
3.1 วัตถุประสงค์	40
3.2 สายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์	40
3.3 สารเคมี	40
3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ	41
3.5 วิธีดำเนินการทดลอง	42
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	50
4.1 ผลของการศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มโคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูลแข็ง (C-CH)	50
4.2 ผลของการศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ของฟิล์มโคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลแข็ง (eC-CH) เปรียบเทียบกับฟิล์มโคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูลแข็ง (C-CH)	55
4.3 ผลของการศึกษาสมบัติทางกายภาพ ทางกล ทางเคมีกายภาพ และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟิล์มโคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลแข็ง (eC-CH)	64
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	70
บรรณานุกรม	71
ภาคผนวก	95
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์	96
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพและทางเคมี	99

ภาคผนวก ค ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ..... 105

ประวัติย่อของผู้วิจัย..... 127



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2-1 สารต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ในอาหาร	8
ตารางที่ 2-2 สารต้านจุลินทรีย์จากผลิตภัณฑ์จากอุตสาหกรรมอาหารที่ใช้ในอาหาร	11
ตารางที่ 2-3 องค์ประกอบทางเคมีของกากกาแฟ	12
ตารางที่ 2-4 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของกากกาแฟ	13
ตารางที่ 2-5 การใช้สารต้านจุลินทรีย์ในอาหารรูปแบบต่างๆ ในอาหาร	19
ตารางที่ 2-6 การประยุกต์ใช้ฟิล์มบิโกลได้เป็นบรรจุภัณฑ์แบบแอคทีฟในอาหาร	25
ตารางที่ 4-1 ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์ม C-CH ในปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี Drop test method	52
ตารางที่ 4-2 ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี Drop test method	58
ตารางที่ 4-3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด กรดคลอโรจีนิก และคาเฟอีนของฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %)	62
ตารางที่ 4-4 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %)	64
ตารางที่ 4-5 ความหนา ความทึบแสง และสมบัติเชิงกลของฟิล์มไคโตซาน ฟิล์ม eC-CH และฟิล์ม C-CH	66
ตารางที่ 4-6 สมบัติทางเคมีกายภาพของฟิล์มไคโตซาน ฟิล์ม eC-CH และ C-CH	67

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2-1 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลบางชนิด	14
ภาพที่ 2-2 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์	15
ภาพที่ 2-3 โครงสร้างทางเคมีของกรดควินิก (A) กรดคาเฟอิก (B) และกรดคลอโรจีนิก (C)	16
ภาพที่ 2-4 โครงสร้างทางเคมีของคาเฟอีน	16
ภาพที่ 2-5 โครงสร้างทางเคมีของไคติน และไคโตซาน	27
ภาพที่ 2-6 โครงสร้างส่วนประกอบของเอนแคปซูลชนิดแกนเดี่ยว (single core)	31
ภาพที่ 2-7 โครงสร้างส่วนประกอบของเอนแคปซูลชนิดหลายแกน (multi – core)	31
ภาพที่ 2-8 โครงสร้างส่วนประกอบของเอนแคปซูลชนิดผนังหลายชั้น (multi – wall)	32
ภาพที่ 2-9 การเอนแคปซูลเลชัน โดยวิธี โคะอะเคอเวชัน	34
ภาพที่ 2-10 การเอนแคปซูลเลชัน โดยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย	35
ภาพที่ 2-11 การเอนแคปซูลเลชัน โดยวิธีฟลูอิดไดส์เบด	35
ภาพที่ 2-12 การเอนแคปซูลเลชัน โดยวิธีเอกซ์ทรูชัน	36
ภาพที่ 2-13 การเอนแคปซูลเลชัน โดยวิธีแช่เยือกแข็ง	36
ภาพที่ 4-1 ฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟ (C) ในปริมาณต่าง ๆ กัน (a) 0 % (b) 0.25 % (c) 0.5 % (d) 0.75 % (e) 1.0 %	50
ภาพที่ 4-2 บริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ A) <i>Staphylococcus aureus</i> TISTR2329 B) <i>Bacillus subtilis</i> TISTR1984 C) <i>Escherichia coli</i> TISTR527 D) <i>Salmonella typhimurium</i> TISTR2519 ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟ (C) ในปริมาณต่าง ๆ กัน (a) 0 % (b) 0.25 % (c) 0.5 % (d) 0.75 % (e) 1.0 % และ (N) Negative control (P) Positive control	51
ภาพที่ 4-3 จำนวนการรอดชีวิตของ a) <i>Staphylococcus aureus</i> TISTR2329 b) <i>Bacillus subtilis</i> TISTR1984 c) <i>Escherichia coli</i> TISTR527 d) <i>Salmonella typhimurium</i> TISTR2519 ในสาร	

แขวนลอยเชื้อที่มีฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันใน ปริมาณ C ต่างๆกัน (0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 8 วัน ...54

ภาพที่ 4-4 ฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟ (C) ในปริมาณต่าง ๆ กัน (a) 0 % (b) 0.50 % (c) 0.75 % (d) 1.0 % และสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC) ในปริมาณต่าง ๆ กัน (e) 0.50 % (f) 0.75 % และ (g) 1.0 %56

ภาพที่ 4-5 บริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ A) Staphylococcus aureus TISTR2329 B) Bacillus subtilis TISTR1984 C) Escherichia coli TISTR527 D) Salmonella typhimurium TISTR2519 ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟ (C) ในปริมาณต่าง ๆ กัน (a) 0 % (b) 0.50 % (c) 0.75 % (d) 1.0 % และสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC) ในปริมาณ ต่าง ๆ กัน (e) 0.50 % (f) 0.75 % (g) 1.0 % และ (N) Negative control (P) Positive control57

ภาพที่ 4-6 จำนวนการรอดชีวิตของ a) Staphylococcus aureus TISTR2329 b) Bacillus subtilis TISTR1984 c) Escherichia coli TISTR527 d) Salmonella typhimurium TISTR2519 ในสารแขวนลอยเชื้อที่มีฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันในปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 8 วัน60

ภาพที่ 4-7 ภาพผิวหน้าของ (a) ฟิล์มไคโตซาน (b) ฟิล์ม C-CH (c) ฟิล์ม eC-CH ที่กำลังขยาย 50 เท่า และภาพตัดขวางของ (d) ฟิล์มไคโตซาน (e) ฟิล์ม C-CH และ (f) ฟิล์ม eC-CH ที่กำลังขยาย 500 เท่า69

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

อาหารและวัตถุดิบทางการเกษตรปริมาณ 1 ใน 3 ของปริมาณอาหารและวัตถุดิบทางการเกษตรที่ผลิตได้ทั้งหมดในโลกเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ (FAO, 2011) และในแต่ละปีมีผู้ป่วยที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ประมาณ 600 ล้านคน โดยในจำนวนดังกล่าวมีผู้เสียชีวิตประมาณ 480,000 คน ซึ่งเป็นสาเหตุหลัก ๆ ที่ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมากในหลายประเทศทั่วโลก (WHO, 2019) วิธีการที่ใช้ควบคุม ยับยั้ง หรือกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารมีหลายวิธี เช่น การใช้ความร้อน การใช้ความเย็น และการใช้สารต้านจุลินทรีย์ (Naidu, 2000) โดยวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด คือ การใช้สารต้านจุลินทรีย์ เนื่องจากสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้แบบจำเพาะเจาะจง และมีผลต่อคุณภาพของอาหารน้อยกว่าวิธีอื่นๆ (Macdonald & Reitmeier, 2017; Potter & Hotchkiss, 1995) สารต้านจุลินทรีย์มี 2 ประเภท คือ สารต้านจุลินทรีย์สังเคราะห์ และสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติ

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันผู้บริโภคมีความกังวลเกี่ยวกับสุขภาพจากการใช้สารต้านจุลินทรีย์สังเคราะห์ในอาหาร (Faleiro, 2011; Saeed et al., 2019) ดังนั้นสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติจึงเป็นทางเลือกที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน โดยแหล่งของสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่ได้รับความสนใจ คือ พืช เนื่องจากสามารถหาได้ง่าย และมีความหลากหลาย เช่น กานพลู อบเชย กระเทียม และโสมเป็นต้น (Atabani et al., 2018; Liu et al., 2017; Nejad et al., 2014) โดยมีรายงานว่าฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ ส่วนของพืช วิธีการสกัด เป็นต้น (Afroja et al., 2017; Cowan, 1999; Elisha et al., 2017) นอกจากนี้ผลิตผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ได้รับนิยมนซึ่งนอกจากจะเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตผลพลอยได้ดังกล่าวแล้วยังสามารถช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย (Agourram et al., 2013; Mandalari et al., 2007; Saini et al., 2019) มีรายงานว่าสารสกัดเปลือกสับปะรด เปลือกทับทิม และกากใบชาซึ่งเป็นผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารยังคงมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารหลายชนิด เช่น *Staphylococcus aureus* *Bacillus cereus* และ *Escherichia coli* เป็นต้น (Bansal et al., 2013; Punbusayakul et al., 2018; Rosas-Burgos et al., 2016)

กาแฟเป็นหนึ่งในเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยม โดยเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นที่นิยมเป็นอันดับ 2 ของโลกรองจากชา (Buratti et al., 2018; Ramon-Goncalves et al., 2019) จากข้อมูลขององค์กรกาแฟนานาชาติรายงานว่ามีการผลิตกาแฟเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นในทุกๆ ปี (ICO, 2020) ทำให้มีกากกาแฟ (Coffee ground, C) ซึ่งเป็นผลผลิตพลอยได้หลักจากธุรกิจกาแฟ คิดเป็นปริมาณ 0.91 กรัมกาแฟสด 1 กรัม และมีปริมาณมากถึง 60 ล้านตันต่อปี (Forcina et al., 2023) ในปัจจุบันการใช้ประโยชน์จากกากกาแฟยังมีอยู่ค่อนข้างจำกัด เช่น ใช้ผลิตเป็นปุ๋ยอินทรีย์ ผลิตตัวดูดซับ ใช้เป็นเชื้อเพลิง และผลิตแผ่นไม้อัด เป็นต้น (Blinova et al., 2017; Cervera et al., 2017; Kovalcik et al., 2018; Rachtanapun et al., 2012) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า กากกาแฟยังคงมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นองค์ประกอบ เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แครโทีนอยด์ (carotenoids) กรดคลอโรจีนิก (chlorogenic acid) และคาเฟอีน (caffeine) เป็นต้น ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ (Bartel et al., 2015; Chotanakoon & Naradisorn, 2013; Sousa et al., 2015) โดยมีรายงานว่า สารสกัดจากกากกาแฟมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารหลายชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* *Bacillus cereus* และ *Listeria monocytogenes* เป็นต้น (Jaisan et al., 2015; Monente et al., 2015; Sousa et al., 2015)

อย่างไรก็ตามการเติมสารต้านจุลินทรีย์ลงในอาหารโดยตรงมีข้อจำกัดหลายประการ โดยจะต้องเติมในปริมาณที่กฎหมายกำหนดเท่านั้น นอกจากนี้สารต้านจุลินทรีย์ถึงแม้จะเป็นสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติก็อาจทำปฏิกิริยากับอาหารทำให้ประสิทธิภาพของสารต้านจุลินทรีย์ลดลง หรืออาจทำให้คุณภาพของอาหารเปลี่ยนแปลงได้ เช่น สีสน้ำตาลเข้มของสารสกัดจากกากกาแฟอาจมีผลทำให้อาหารเกิดสีผิดปกติได้ หรือกลิ่นเฉพาะของสารต้านจุลินทรีย์อาจมีผลทำให้กลิ่นรสอาหารเปลี่ยนแปลงไป ทำให้ผู้บริโภคไม่ยอมรับ เป็นต้น (Karel & Lund, 2003; Malavi et al., 2018; Potter & Hotchkiss, 1995; Saeed et al., 2019)

การผสมสารต้านจุลินทรีย์ลงในพอลิเมอร์บรรจุภัณฑ์ (packaging polymer) เป็นหนึ่งวิธีที่ใช้หลีกเลี่ยงการเติมสารต้านจุลินทรีย์ลงในอาหารโดยตรง โดยวิธีนี้ยังสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารต้านจุลินทรีย์ได้บางส่วน และสามารถลดการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารต้านจุลินทรีย์กับอาหารที่เกิดจากการสัมผัสกันโดยตรงได้ (Huang et al., 2019; Rocha et al., 2013; Vermeiren et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การผสมสารต้านจุลินทรีย์ลงในฟิล์มหรือสารเคลือบสามารถทำให้สมบัติทางกลของฟิล์มดีขึ้นอีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มและสารเคลือบที่ไม่มีการผสมสารต้านจุลินทรีย์ (Dhumal et al., 2019; Lee & Chang, 2017; Lei et al., 2019) อย่างไรก็ตามพอลิเมอร์บรรจุภัณฑ์ส่วนใหญ่ทำจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ซึ่งเป็นวัสดุที่ย่อยสลายยาก และก่อให้เกิดการ

สะสมส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอย่างมากในปัจจุบัน (Arancibia et al., 2014; Rubilar et al., 2013) ดังนั้นการใช้พอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradable polymer) จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากพอลิเมอร์เหล่านี้นอกจากจะสามารถย่อยสลายได้แล้ว ยังมีคุณสมบัติที่ดีอื่นๆ ด้วย เช่น สามารถรักษาความคงตัวของสีที่ผสมลงในพอลิเมอร์ได้ดี สามารถรวมตัวกับสารต้านจุลินทรีย์ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ เป็นต้น (Abdollahi et al., 2012; Embuscado & Huber, 2009; Rhim & Shellhammer, 2007)

พอลิเมอร์จากธรรมชาติสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มหลักๆ คือ โพรตีน ลิพิด และพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งหนึ่งในพอลิเมอร์จากธรรมชาติที่ได้รับความนิยม คือ ไคโตซาน ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ในกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ มีปริมาณมากเป็นอันดับสองในธรรมชาติ หาได้ง่าย ไม่เป็นพิษ มีคุณสมบัติที่สามารถต้านทานการซึมผ่านของไขมัน และก๊าซได้ นอกจากนี้ยังมีสมบัติที่โดดเด่นในการขึ้นรูปฟิล์มได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ในกลุ่มอื่น แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากสมบัติในการชอบน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์ส่งผลให้สมบัติในการต้านทานความชื้นต่ำ (Montero-Garcia et al., 2017) นอกจากนี้ไคโตซานยังมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ จึงสามารถช่วยเสริมฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารที่เติมลงในไคโตซานได้อีกด้วย (Rhim & Shellhammer, 2007; Zhang et al., 2019) อย่างไรก็ตามสารต้านจุลินทรีย์ที่เติมลงในฟิล์มไคโตซานยังคงสามารถแพร่เข้าสู่อาหารได้โดยอาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพของอาหาร เช่น เกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์เนื่องจากกลิ่นเฉพาะของสารต้านจุลินทรีย์เอง เป็นต้น (Gutierrez et al., 2009) และในกระบวนการผลิตฟิล์มซึ่งมีความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้องอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพของสารต้านจุลินทรีย์ลดลงได้ (Diblan & Kaya, 2018)

การเอนแคปซูลชัน (encapsulation) เป็นเทคนิคเคลือบหรือกักเก็บสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ (core material) ไว้ในโครงสร้างของสารอีกชนิดหนึ่ง (shell material หรือ wall material) (Madene et al., 2006) โดยการเอนแคปซูลชันสามารถช่วยป้องกันสารออกฤทธิ์สำคัญจากสภาพแวดล้อม ทำให้สารออกฤทธิ์ดังกล่าวมีความคงตัว และสามารถควบคุมและชะลอการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ได้ (Desai & Jin Park, 2005; Fanga & Bhandaria, 2012; Gibbs et al., 1999) นอกจากนี้การเอนแคปซูลชันยังช่วยป้องกันสมบัติที่ไม่พึงประสงค์ของสารออกฤทธิ์ที่อาจส่งผลกระทบต่อสมบัติหรือคุณภาพของผลิตภัณฑ์ รวมทั้งยังช่วยลดการสัมผัสของสารสกัดกับผลิตภัณฑ์โดยตรงซึ่งสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาระหว่างผลิตภัณฑ์และสารออกฤทธิ์ดังกล่าวได้ (Chacon et al., 2006; Liolios et al., 2009) โดยมีรายงานว่า สารต้านจุลินทรีย์ที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน มีความคงตัวกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านจุลินทรีย์ที่ไม่ผ่านกระบวนการเอนแคปซูลชัน (Azmi et al., 2019; Noudoost et al., 2015; Ruiz-Gonzalez et al., 2019) อย่างไรก็ตามการเติมสารต้านจุลินทรีย์ที่ผ่านการเอนแคปซูลชันลงในอาหารนั้น สารต้านจุลินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการเอนแคปซูลชันดังกล่าว

ยังคงสัมผัสกับอาหาร อีกทั้งสารที่ใช้ห่อหุ้มอาจทำปฏิกิริยากับอาหารทำให้คุณภาพของอาหาร เช่น สี และกลิ่นเปลี่ยนแปลงได้เช่นกัน

นอกจากนี้มียางานว่า การผสมสารต้านจุลินทรีย์ที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันลงในฟิล์มสามารถรักษาความคงตัวของสารต้านจุลินทรีย์ได้ โดยฟิล์มที่มีการผสมสารต้านจุลินทรีย์ที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์มากกว่าเมื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี disc-diffusion (Mekkerdchoo et al., 2009; Nonsee et al., 2011) และเมื่อนำไปบรรจุอาหารสามารถยืดอายุการเก็บรักษาไว้ได้นานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มหรือสารเคลือบที่มีการผสมสารต้านจุลินทรีย์ที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (Chen et al., 2019; Zhang et al., 2019) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันรายงานเกี่ยวกับการผสมสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันลงในพอลิเมอร์บรรจุภัณฑ์ที่สามารถย่อยสลายหรือบริโภคได้ยังมีอยู่จำกัด และยังไม่มีการนำกากกาแฟซึ่งเป็นผลผลิตพลอยได้จากการผลิตกาแฟผ่านการเอนแคปซูเลชันแล้วผสมลงในพอลิเมอร์บรรจุภัณฑ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาฟิล์มต้านจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายหรือบริโภคได้ เพื่อเป็นแนวทางสำหรับนำไปใช้เป็นบรรจุภัณฑ์อาหารต้านจุลินทรีย์ และยังเป็นการเพิ่มคุณค่าให้กากกาแฟซึ่งเป็นผลผลิตพลอยได้จากกระบวนการผลิตเครื่องดื่มกาแฟอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาฟิล์ม โคลิโดซานต้านจุลินทรีย์ที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน
2. เพื่อศึกษาสมบัติและฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์ม โคลิโดซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟเปรียบเทียบกับฟิล์ม โคลิโดซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง ได้แก่

การทดลองที่ 1 ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (*Staphylococcus aureus* TISTR2329 *Bacillus subtilis* TISTR1984 *Escherichia coli* TISTR527 และ *Salmonella typhimurium* TISTR2519) ของฟิล์ม C-CH ที่มีสารสกัดจากกากกาแฟ (C) ในปริมาณต่าง ๆ กัน (0 0.25 0.5 0.75 และ 1.0 % (w/v))

การทดลองที่ 2 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของฟิล์ม eC-CH ที่มีสารสกัดจากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC) และฟิล์ม C-CH ซึ่งมีปริมาณสารสกัดจากกากกาแฟเทียบเท่ากับปริมาณสารสกัดจากกากกาแฟในฟิล์ม C-CH ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์สูงสุด 3 ความเข้มข้นจากการทดลองที่ 1

และการทดลองที่ 3 ศึกษาสมบัติสมบัติทางกายภาพ สมบัติทางกล และสมบัติทางเคมี
กายภาพของฟิล์ม eC-CH ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์สูงสุดเปรียบเทียบกับฟิล์ม C-CH ที่มีปริมาณสาร
สกัดจากกากกาแฟในปริมาณเทียบเท่ากัน และฟิล์มไคโตซาน (CH)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบแนวทางการใช้ฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคป
ซูเลชันเพื่อนำไปใช้บรรจุอาหาร
2. ช่วยเพิ่มมูลค่าของกากกาแฟ



บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ลงในอาหาร

การเสื่อมเสียของอาหารเป็นการลดลงของคุณภาพอาหาร เช่น สี กลิ่น รส รูปร่าง ลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหาร และคุณค่าทางโภชนาการและอาจส่งผลให้ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค หรืออาจทำให้อาหารไม่ปลอดภัยได้ โดยสาเหตุของการเสื่อมเสียของอาหารมี 3 สาเหตุหลักๆ ได้แก่ จากการเปลี่ยนแปลงจากสาเหตุทางกายภาพ การเปลี่ยนแปลงจากปฏิกิริยาเคมี และการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากจุลินทรีย์ (Smith & Hui, 2004) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.1.1 การเปลี่ยนแปลงจากสาเหตุทางกายภาพ

การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพอาจเกิดขึ้นในระหว่างการเก็บเกี่ยว การขนส่ง และการเก็บรักษา อาจเกิดจากการกระแทกทำให้อาหารนั้นเกิดการแตกหัก บิดขาด หรือเกิดรอยขีดได้ และการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงด้านอื่นๆ ได้ด้วย เช่น การเกิดบาดแผลจากรอยแตกหักหรือรอยขีดของอาหาร อาจทำให้อาหารสัมผัสกับสิ่งแวดล้อม เช่น ออกซิเจน หรือความชื้นในบรรยากาศ สามารถเร่งปฏิกิริยาทางเคมีภายในอาหาร หรือบาดแผลที่เกิดจากสาเหตุทางกายภาพของอาหารอาจส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถปนเปื้อนและทำให้อาหารเสื่อมเสียได้ง่ายขึ้น

2.1.2 การเปลี่ยนแปลงจากปฏิกิริยาจากเคมี

การเปลี่ยนแปลงจากปฏิกิริยาทางเคมีเกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างส่วนประกอบของอาหาร บรรจุภัณฑ์ หรือสภาวะแวดล้อม เช่น การเกิดสีน้ำตาลของอาหารระหว่างการแปรรูปและเก็บรักษาอาหารที่สามารถเกิดจากปฏิกิริยา 2 ประเภท คือ ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ เช่น เอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) หรือพอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) และปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ หรือ ปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) การเกิดการหมิ่นหืนซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่มีอยู่ในอาหาร ทำให้อาหารไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (Skibsted et al., 2010) และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากเอนไซม์ในอาหารตามธรรมชาติ เช่น เอนไซม์เพคตินเนสทำให้ผักและผลไม้ นิ่ม และมีลักษณะเนื้อสัมผัสเปลี่ยนแปลงไป

2.1.3 การเปลี่ยนแปลงเนื่องจากจุลินทรีย์

การเปลี่ยนแปลงเนื่องจากจุลินทรีย์เกิดจากจุลินทรีย์ปนเปื้อนลงในอาหาร โดยอาจปนเปื้อนระหว่างการเก็บเกี่ยว การผลิต การบรรจุ และการขนส่ง ทั้งนี้การเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์

มี 2 ลักษณะ คือ 1) เกิดจากการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีในอาหาร โดยจุลินทรีย์จะมีการใช้สารอาหารในอาหารและทำให้เกิดสารประกอบต่าง ๆ ที่ส่งผลให้อาหารไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค 2) เกิดจากเอนไซม์ที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์จุลินทรีย์หลังจากเซลล์ตายแล้ว โดยการนำเอนไซม์จากจุลินทรีย์จะทำให้ลักษณะของอาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงไป เช่น กลิ่นรส เนื้อสัมผัส การเกิดแก๊ส การไหลเยิ้มของของเหลว เป็นต้น (สุดสาย ตริวานิช และวราภา มหากาญจนกุล, 2555)

อย่างไรก็ตามการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และสารพิษจากจุลินทรีย์ถือเป็นปัญหาหลัก ๆ ที่ทำให้อาหารถูกเรียกคืน และตีกลับทั้งในประเทศไทยและในต่างประเทศทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมากโดยมีรายงานว่า 1 ใน 3 ของปริมาณอาหารและวัตถุดิบทางการเกษตรที่ผลิตได้ทั้งหมดในโลกเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ (FAO, 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในแต่ละปีมีผู้ป่วยที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ประมาณ 600 ล้านคน และมีผู้เสียชีวิตจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ประมาณ 480,000 คน (WHO, 2019) ดังนั้นการปนเปื้อนจุลินทรีย์ลงในอาหารเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจ โดยวิธีในอุตสาหกรรมอาหารที่จะนำมาใช้ ควบคุม ยับยั้งหรือกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารนั้นมีหลากหลายวิธี เช่น การใช้ความร้อน การใช้ความเย็น และการใช้สารต้านจุลินทรีย์ (Naidu, 2000) แต่วิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด คือการใช้สารต้านจุลินทรีย์ เนื่องจากสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้แบบจำเพาะเจาะจง และมีผลต่อคุณภาพของอาหารน้อยกว่าวิธีอื่น ๆ (Macdonald & Reitmeier, 2017; Potter & Hotchkiss, 1995)

2.2 สารต้านจุลินทรีย์

สารต้านจุลินทรีย์ หรือสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ สารต้านจุลินทรีย์จากการสังเคราะห์ เช่น กรดอินทรีย์ ซัลไฟด์ และแอลกอฮอล์ และ สารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติ เช่น โลโซไซม์ ไนซิน น้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ และสารสกัดจากพืช (Cowan, 1999) ตารางที่ 2-1 แสดงสารต้านจุลินทรีย์สังเคราะห์ และสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติจากแหล่งต่างๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารได้หลายชนิด อย่างไรก็ตามในปัจจุบันผู้บริโภคมีความกังวลเกี่ยวกับสุขภาพ ดังนั้นสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติจึงเป็นทางเลือกที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน โดยแหล่งของสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติสามารถแบ่งได้เป็น 3 แหล่ง ได้แก่ พืช (เช่น ออริกาโน กานพลู กระเทียม ไบมะรุม เลมอน) สัตว์ (เช่น โลโซไซม์ ไคโตซาน) และจุลินทรีย์ (เช่น ไนซิน นาดามัยซิน) โดยการที่สารต้านจุลินทรีย์สามารถต้านจุลินทรีย์ได้เกิดจากหลายกลไก ตั้งแต่การทำให้สภาวะภายนอกไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น ทำให้อาหารมีสภาวะเป็นกรดทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ เช่น กรดเบนโซอิก หรือมีผลในระดับเซลล์ เช่น ทำให้สมบัติการเลือกผ่านของผนังเซลล์ถูกทำลายส่งผลให้สารภายใน

ตารางที่ 1 สารต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ในอาหาร

สารต้านจุลินทรีย์	แหล่งที่พบ	กลไกการออกฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์	จุลินทรีย์เป้าหมาย	อ้างอิง
สารต้านจุลินทรีย์สังเคราะห์				
กรดเบนโซอิก	-	ทำให้การทำงานของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ผิดปกติ และยับยั้งการสร้างเอนไซม์ที่มีผลต่อการดำรงชีพของจุลินทรีย์	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> และ <i>Salmonella enterica</i>	(Friedman et al., 2003)
ไนไตรต์	-	จับกับกรดอะมิโน ทำให้จุลินทรีย์นำกรดอะมิโนไปใช้ไม่ได้ และทำให้สารพันธุกรรมของจุลินทรีย์เสื่อมสภาพ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>E. coli</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i>	(Majou & Christeans, 2018; Zemke et al., 2015)
พืช				
น้ำมันหอมระเหย	ออริกาน	สลายเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของสารภายในเซลล์	<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i>	(Jaber, 2012; Lambert et al., 2001)
สารสกัดเลมอน	เลมอน	สลายเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของสารภายในเซลล์	<i>Enterobacter aerogenes</i> และ <i>S. aureus</i>	(Álvarez-Ordóñez et al., 2013; Hindi & Chabuck, 2013)

ตารางที่ 2-1 สารต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ในอาหาร (ต่อ)

สารต้านจุลินทรีย์	แหล่งที่พบ	กลไกการออกฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์	จุลินทรีย์เป้าหมาย	อ้างอิง
สัตว์				
ไลโซไซม์	ไข่ขาว นม	กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะที่เพปติโดไกลแคนทำให้ผนังเซลล์เกิดรอยแยก	<i>L. monocytogenes</i> และ <i>C. botulinum</i>	(Hughey & Johnson, 1987)
ไคโตซาน	เปลือกของสัตว์ กลุ่มสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง แมลง และ จุลินทรีย์บางชนิด	จับกับผนังเซลล์แบคทีเรียทำให้สูญเสียสมบัติการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์	<i>Bacillus cereus</i> , <i>L. monocytogenes</i> E. coli และ <i>S. aureus</i>	(Goy et al., 2009; Kong et al., 2010)
จุลินทรีย์				
ไนซิน	<i>Lactococcus lactis</i>	จับกับผนังเซลล์แบคทีเรียทำให้สูญเสียสมบัติการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์	<i>Salmonella enteritidis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> , และ <i>S. aureus</i>	(Jin & Zhang, 2008; Pires et al., 2008)
นาตามัยซิน	<i>Streptomyces natalensis</i>	จับกับ ergosterol ในผนังเซลล์ของราทำให้เกิดรูรั่ว ส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของสารภายในเซลล์	<i>Aspergillus flavus</i> และ <i>A. niger</i>	(Lule et al., 2016)

เซลล์ออกมาออกเซลล์หรือสารภายนอกเซลล์สามารถเข้าไปภายในเซลล์ได้ ทำให้เซลล์ขาดสมดุล ส่งผลให้จุลินทรีย์ตายได้ หรืออาจส่งผลให้ระดับอิน หรือดีเอ็นเอ ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถแบ่งตัวได้ ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดในหัวข้อ 2.5 ต่อไป

พืชเป็นแหล่งของสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่ได้รับความนิยม เนื่องจากหาได้ง่าย และมีความหลากหลาย (Atabani et al., 2018; Hindi & Chabuck, 2013; Liu et al., 2017; Nejad et al., 2014) สารต้านจุลินทรีย์จากพืช ส่วนใหญ่เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันตนเองจากจุลินทรีย์ แมลง และสัตว์ต่างๆ โดยมีรายงานว่าฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์พืช ส่วนของพืช วิธีการสกัด ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด เป็นต้น (Afroja et al., 2017; Cowan, 1999; Elisha et al., 2017) เช่น มีรายงานของ Rezaei et al. (2015) ที่ศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเมล็ดและใบของผักชีพบว่าความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดใบผักชี คือ 40 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดเมล็ดผักชี คือ 160 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีรายงานของ Borges et al. (2020) ที่ศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *E. coli* และ *S. aureus* ของสารสกัดจากใบมะกอกที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบมะกอกที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดมีขนาดใหญ่ที่สุด คือ 16.7 และ 25.3 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งของสารสกัดจากใบมะกอกที่ใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย คือ 12.0 และ 11.3 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากงานวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ามีปัจจัยหลายปัจจัยที่อาจส่งผลต่อฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืช เช่น ส่วนที่นำมาสกัด ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ชนิด และแหล่งของพืช เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีรายงานหลายฉบับที่พบว่าผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหารยังคงมีสารประกอบสำคัญที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์หลงเหลืออยู่ จึงมีศักยภาพที่สามารถนำมาใช้เพื่อเป็นสารต้านจุลินทรีย์ได้ ดังแสดงในตารางที่ 2-2 โดย Kayaputri et al. (2020) พบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกโกโก้ ซึ่งสามารถยับยั้ง *Salmonella thyposa* *E. coli* และ *S. aureus* โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งของจุลินทรีย์เป็น 21.00 5.84 และ 4.04 มิลลิเมตร ตามลำดับ และจากรายงานของ Díaz-Hernández et al. (2022a) พบว่าสารสกัดจากกากกาแฟ สามารถยับยั้ง *E. coli* *S. aureus* โดยมีความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป็น 8 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 2 สารต้านจุลินทรีย์จากผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหารที่ใช้ในอาหาร

สารต้านจุลินทรีย์	แหล่งที่พบ	กลไกการออกฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์	จุลินทรีย์เป้าหมาย	อ้างอิง
ผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหาร				
เทอร์พินอยด์	เปลือกส้ม	จับกับผนังเซลล์	<i>A. niger</i> ,	(Edogbanya et
ซาโปนิน และ	เปลือก	แบคทีเรียทำให้	<i>P. aeruginosa</i>	al., 2019)
สารประกอบ	มะนาว และ	สูญเสียสมบัติ	<i>E. coli</i>	
ฟีนอลิก	เปลือก	การซึมผ่านของ	และ <i>S. aureus</i>	
	เลมอน	เยื่อหุ้มเซลล์		
แทนนิน และ	เปลือกเมล็ด	จับกับผนังเซลล์	<i>Sal. thyposa</i> ,	(Kayaputri et
ฟลาโวนอยด์	โกโก้	แบคทีเรียทำให้	<i>E. coli</i>	al., 2020;
		สูญเสียสมบัติ	และ <i>S. aureus</i>	Panak BalentiĆ
		การซึมผ่านของ		et al., 2018)
		เยื่อหุ้มเซลล์		
กรดคลอโรจีนิก	เปลือก	จับกับผนังเซลล์	<i>Sal. enteric</i> ,	(Cruz-
และกรดแกลลิก	ทับทิม	แบคทีเรียทำให้	<i>Sal. typhimurium</i>	Valenzuela et
		สูญเสียสมบัติ	<i>Chromobacterium</i>	al., 2022)
		การซึมผ่านของ	<i>violaceum</i> และ <i>L.</i>	
		เยื่อหุ้มเซลล์	<i>monocytogenes</i>	
กรดคลอโรจีนิก	กากกาแฟ	จับกับผนังเซลล์	<i>Sal. typhimurium</i> ,	(Díaz-
และคาเฟอีน		แบคทีเรียทำให้	<i>P. aeruginosa</i>	Hernández et
		สูญเสียสมบัติ	<i>E. coli</i>	al., 2022b;
		การซึมผ่านของ	และ <i>S. aureus</i>	Monente et al.,
		เยื่อหุ้มเซลล์		2015)

2.3 กากกาแฟ

กาแฟเป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมมากเป็นอันดับ 2 ของโลก (Ramon-Goncalves et al., 2019) ผลิตจากเมล็ดกาแฟซึ่งมีองค์ประกอบสำคัญ คือ คาเฟอีน กรดคลอโรจีนิก และกรดแทนนิน (มาลัยพร ดวงบาล, 2552) โดยนำเมล็ดกาแฟมาคั่วและบดเป็นผงจากนั้นจึงชง

(brew) โดยน้ำร้อนได้เป็นเครื่องดื่มกาแฟ กากกาแฟ (coffee ground, C) เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการชงกาแฟ คิดเป็นประมาณร้อยละ 50 ของกาแฟที่ผลิตได้ในโลก (Esquivel & Jiménez, 2012) กากกาแฟประกอบไปด้วยสารประกอบอินทรีย์ เช่น กรดไขมัน ลิกนิน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และพอลิแซ็กคาไรด์อื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2-3 (Thenepalli et al., 2017) ซึ่งปัจจุบันยังมีการนำมาใช้ประโยชน์ไม่มากนัก เช่น นำไปถมที่ (Landfill) เป็นปุ๋ยก่อให้เกิดการปลดปล่อยก๊าซมีเทน ซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของภาวะโลกร้อนส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอย่างมากเนื่องจากมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นในทุกปีตามความนิยมของผู้บริโภค (San Martin Ruiz et al., 2021) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าในกากกาแฟยังคงมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) และคาเฟอีน (caffeine) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หลายชนิดได้อีกด้วย (Bartel et al., 2015; Jaisan et al., 2015; Limungkoon et al., 2017)

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของกากกาแฟ

องค์ประกอบทางเคมีของกากกาแฟ	กรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้ง
เซลลูโลส	12.40-36.70
เฮมิเซลลูโลส	19.00-39.10
ลิกนิน	23.90-33.60
ไขมัน	9.00-15.10
เถ้า	1.20-2.20
โปรตีน	13.60-17.44
ใยอาหาร	57.10-60.40
- ไม่ละลายน้ำ	50.70-55.50
- ละลายน้ำ	1.60-9.60

ที่มา : (Ballesteros et al., 2014; Burniol-Figols et al., 2016; Daniel, 2018; Mussatto, Carneiro, et al., 2011)

2.4 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของกากกาแฟ

เมล็ดกาแฟมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างขึ้นเองตามธรรมชาติ โดยสารที่สร้างขึ้นมีความสำคัญในการป้องกันพืชจากการถูกโจมตีและถูกทำลายด้วยจุลินทรีย์ แมลง และสัตว์กินพืช (Sengul et al., 2009) โดยเมื่อนำเมล็ดกาแฟมาผ่านการบดและชง กากกาแฟที่เป็นผลิตภัณฑ์ได้จากระบวนการชงกาแฟยังคงมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในเมล็ดกาแฟหลงเหลืออยู่ โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในกากกาแฟจะประกอบไปด้วย สารประกอบฟีนอล คาเฟอีน กรดคลอโรจีนิก แทนนิน และฟลาโวนอยด์ โดยมีรายงานว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกากกาแฟมีฤทธิ์สำคัญทางชีวภาพหลายประการ เช่น มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ (Esquivel & Jiménez, 2012; Ramirez-Coronel et al., 2004) โดยปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่พบในกากกาแฟแสดงในตารางที่ 2-4

ตารางที่ 4 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของกากกาแฟ

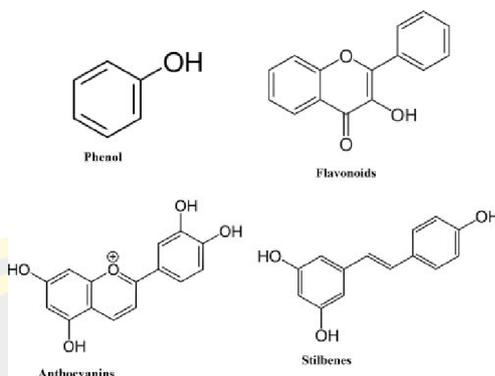
สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	ปริมาณ
สารประกอบฟีนอลิก	6.33 – 32.92 (มิลลิกรัมกรดแกลลิก/น้ำหนักแห้ง)
ฟลาโวนอยด์	2.11 - 8.29 (มิลลิกรัมเคอซิทิน/น้ำหนักแห้ง)
กรดคลอโรจีนิก	0.37 - 3.22 (มิลลิกรัม/น้ำหนักแห้ง)
คาเฟอีน	1.94 – 3.91 (มิลลิกรัม/น้ำหนักแห้ง)

ที่มา : (Andrade et al., 2022; Conde & Mussatto, 2016; Massaya et al., 2023; Mussatto, Ballesteros, et al., 2011; Panusa et al., 2013)

อย่างไรก็ตามปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกากกาแฟจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น สายพันธุ์ของกาแฟ วิธีการเตรียมเมล็ดกาแฟ วิธีการคั่วเมล็ดกาแฟ และขั้นตอนที่ใช้ในการชง (Krol et al., 2020) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีอยู่ในกากกาแฟแต่ละชนิดมีสมบัติฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.4.1 สารประกอบฟีนอล (Phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลเป็นสารที่พบได้ในพืชหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวน ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) อย่างน้อยหนึ่งหมู่ขึ้นไป ดังแสดงในภาพที่ 2-1 มีโครงสร้างหลากหลายแตกต่างกันตั้งแต่โมเลกุลไม่ซับซ้อน เช่น กรดฟีนอลิก จนถึงสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ซับซ้อน คือ พอลิฟีนอล เช่น แอนโทไซยานิน แทนนิน และฟลาโวนอยด์



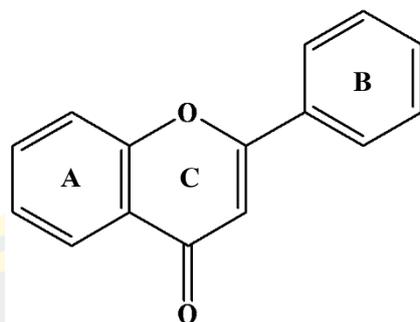
ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลบางชนิด

ที่มา : (Souza et al., 2018)

สารประกอบฟีนอลมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยสารประกอบฟีนอลสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระโดยการถ่ายโอนอะตอมไฮโดรเจนจากหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ไปยังอนุมูลอิสระเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ ที่มีอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุ (Santos Sánchez et al., 2019) นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลบางชนิดยังมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์อีกด้วย ซึ่งปัจจุบันกลไกการต้านจุลินทรีย์ของสารประกอบฟีนอลยังไม่เป็นที่แน่ชัด โดยมีรายงานว่าสารประกอบฟีนอลอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ หรือมีผลต่อการดัดแปลงผนังเซลล์ หรือเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ทำให้กลไกการทำงานของเซลล์ผิดปกติไป ทำให้จุลินทรีย์ตายได้ในที่สุด (Cushnie & Lamb, 2011; Ikigai et al., 1993; Stapleton et al., 2004; Taguri et al., 2006)

2.4.2 ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ฟลาโวนอยด์ เป็นสารที่พบได้ทั่วไปในพืช เช่น ผักและผลไม้ เป็นสารประกอบฟีนอลิกประเภทพอลิฟีนอล (polyphenol) โดยมีโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวน ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล รวมอยู่ในโมเลกุล ประกอบด้วยคาร์บอน 15 ตัว (C6-C3-C6) จัดเรียงเป็น 3 วง เรียกแทนว่า วง A, B, และ C โดย วง A และ B เป็นวงเบนซีน (benzene ring) ส่วน วง C เป็น เฮเทอโรไซคลิกไพแรน (heterocyclic pyran ring) ซึ่งอยู่ตรงกลางของโครงสร้าง ดังแสดงในภาพที่ 2-2 ฟลาโวนอยด์ส่วนใหญ่จะเกิดพันธะกับโมเลกุลของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) (ฉันทนันทน์ อยู่สถิตย์ และชญาดา กลิ่นจันทร์, 2559)



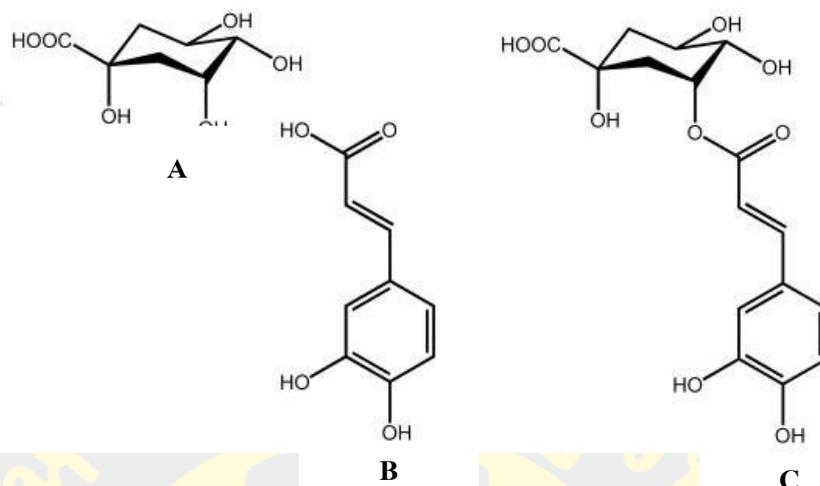
ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์

ที่มา : (Pal & Saha, 2013)

สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ส่งผลให้เกิดการชะลอหรือยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน และช่วยหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ โดยกลไกในการต้านจุลินทรีย์ของฟลาโวนอยด์ ได้แก่ ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก ยับยั้งการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ ยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึม และเปลี่ยนแปลงสมบัติการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้จุลินทรีย์ตายได้ (Yixi et al., 2015)

2.4.3 กรดคลอโรจีนิก (Chlorogenic acid)

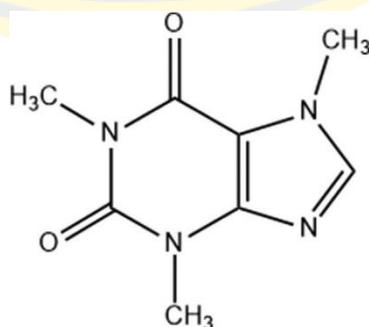
กรดคลอโรจีนิก เป็นสารประกอบฟีนอลที่เกิดจากกระบวนการเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) ของกรดควินิก (quinic acid) และกรดคาเฟอิก (caffeic acid) ดังแสดงในภาพที่ 2-3 เป็นสารที่ให้รสขมและฝาดชนิดหนึ่งในเมล็ดกาแฟ โดยกรดคลอโรจีนิก มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสามารถชะลอการปล่อยน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดหลังมื้ออาหารได้ (Farah et al., 2008) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ากรดคลอโรจีนิก มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์โดยกรดคลอโรจีนิกจะไปรบกวนการจับกันของเยื่อหุ้มชั้นนอกของเซลล์เมมเบรนส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของสารต่างๆ ภายในออกนอกเซลล์จนทำให้จุลินทรีย์ตายได้ (Lou et al., 2011)



ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของกรดควินิก (A) กรดคาเฟอิก (B) และกรดคลอโรจีนิก (C)
ที่มา : (Toyama et al., 2014)

2.4.4 คาเฟอีน (Caffeine)

คาเฟอีน เป็นสารที่พบได้ในพืชหลายชนิด มักพบในส่วนที่เป็นเมล็ดหรือใบของกาแฟและโกโก้ ทำหน้าที่ป้องกันเมล็ดและใบจากแมลง (Myers, 2007) คาเฟอีน เป็นสารอัลคาลอยด์ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสารเมทิลแซนทีน (methylxanthine) เป็นสารที่มีรสขม ไม่มีกลิ่น มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวน และไม่มีขั้ว ดังแสดงในภาพที่ 2-4 มีรายงานว่าคาเฟอีนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารได้ ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และเชื้อราได้ (Mohammed & Al-Bayati, 2009) โดยความสามารถในการต้านจุลินทรีย์นั้นมีผลมาจากคาเฟอีนและอนุพันธ์ย่อยของคาเฟอีน (xanthine theophylline และ theobromine) โดยมีรายงานว่าคาเฟอีนสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ได้ (Nonthakaew et al., 2015; Pruthviraj et al., 2011)



ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของคาเฟอีน
ที่มา : (Kwasniewska-Sip et al., 2018)

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่ากากกาแฟเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้ที่อุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย และมีรายงานว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางชนิดในกากกาแฟมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ได้ (Monente et al., 2015; Sousa et al., 2015) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำกากกาแฟซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ได้จากกระบวนการชงกาแฟมาใช้เพื่อเป็นสารต้านจุลินทรีย์ในอาหาร ซึ่งสามารถตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคในปัจจุบันที่มีความต้องการผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลิตภัณฑ์ที่มีแหล่งที่มาจากรธรรมชาติได้

2.5 กลไกการออกฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์

สารต้านจุลินทรีย์มีกลไกในการต้านจุลินทรีย์ ตั้งแต่ระดับเซลล์ จนกระทั่งระดับดีเอ็นเอ ส่งผลให้การดำเนินกิจกรรมของจุลินทรีย์ผิดปกติ หรือไม่สามารถดำเนินต่อไปได้ และทำให้จุลินทรีย์ตายได้ในที่สุด (Jaka & Liwa, 2015) โดยมีรายละเอียดดังนี้

2.5.1 ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ (Cell wall synthesis inhibitors)

ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์มีส่วนประกอบหลัก ๆ คือ เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาล และกรดอะมิโน โดยส่วนประกอบของน้ำตาลประกอบไปด้วย กรดเอนอะซีติลมูรามิก (N-acetylmuramic acid, NAM) และเอนอะซีติลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine, NAG) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (β -(1,4) glycosidic linkage) และมีเอนไซม์ทรานส์เปปติเดส (transpeptidase) ทำหน้าที่เชื่อมต่อเปปไทด์สายสั้น ๆ เข้าด้วยกันเป็นโครงสร้างร่างแหของผนังเซลล์ (Hooper, 2001) โดยสารต้านจุลินทรีย์บางชนิดที่เข้าไปทำให้บริเวณเปปติโดไกลแคนเกิดความเสียหาย โดยการตัด (hydrolyze) พันธะไกลโคซิดิกของเปปติโดไกลแคน หรือไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทรานส์เปปติเดส ทำให้เปปติโดไกลแคนไม่สามารถเชื่อมต่อกันได้ทำให้ผนังเซลล์อ่อนแอลง และสูญเสียสมบัติการเลือกผ่าน (permeability) ไป

2.5.2 ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของจุลินทรีย์ (Protein synthesis inhibitors)

สารต้านจุลินทรีย์บางชนิดอาจไปยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนในขั้นตอนต่างๆ ของจุลินทรีย์ เช่น จับกับ 30S ไรโบโซมของแบคทีเรีย และป้องกันการจับคู่กันของ aminoacyl tRNA กับ mRNA-ribosome หรืออาจจับกับส่วนประกอบของ 23S rRNA ของไรโบโซม 50S รบกวนการรวมตัวกันของหน่วยย่อย 50S และป้องกันการขนส่งหมู่เปปติดิล (peptidyl) และไม่สามารถเกิดพันธะเปปไทด์ทำให้เซลล์ไม่สามารถสร้างโปรตีนเพื่อนำไปใช้ในการดำรงอยู่ของเซลล์ได้ (Arenz & Wilson, 2016)

2.5.3 การรบกวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกของจุลินทรีย์ (Nucleic acid synthesis inhibitors)

สารต้านจุลินทรีย์บางชนิดสามารถรบกวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกของจุลินทรีย์ได้ โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรส (topoisomerase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ หรือบางชนิดทำหน้าที่ยับยั้งอาร์เอ็นเอ พอลิเมอร์เรส (RNA polymerase) ซึ่งเป็นการรบกวนการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถสังเคราะห์เซลล์ใหม่ได้ (Chen & Liu, 1994; Collin et al., 2011)

2.5.4 การยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolic pathways inhibitors)

สารต้านจุลินทรีย์บางชนิดสามารถยับยั้งการทำงานของตำแหน่งที่แอคทีฟ (active site) ของเอนไซม์ หรือขัดขวางกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ได้ เช่น ไปรบกวนกระบวนการสังเคราะห์กรดโฟลิกของจุลินทรีย์ เป็นการยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์และมีผลให้จุลินทรีย์ตายได้ (Huovinen et al., 1995; Vedantam et al., 1998)

2.5.5 การเปลี่ยนแปลงสมบัติ และความสามารถในการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ (Inhibitors of membrane function)

สารต้านจุลินทรีย์บางชนิด มีผลทำให้สมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไป เช่น สารต้านจุลินทรีย์บางชนิดสามารถจับกับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ส่งผลให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการเลือกผ่าน เกิดการรั่วไหลของสารภายในเซลล์ ทำให้องค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์เปลี่ยนแปลงและส่งผลให้จุลินทรีย์ตายได้

2.6 การประยุกต์ใช้สารต้านจุลินทรีย์ในอาหาร

การเติมสารต้านจุลินทรีย์ลงในอาหารเป็นทางเลือกหนึ่งที่เป็นที่นิยมในอุตสาหกรรมในการป้องกันการเสื่อมเสียของอาหารเนื่องจากจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามการเติมสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารโดยตรงอาจทำให้ประสิทธิภาพของสารต้านจุลินทรีย์ดังกล่าวลดลงหรือทำให้คุณภาพของอาหารเปลี่ยนแปลง เนื่องจากปฏิกิริยาระหว่างอาหารและสารต้านจุลินทรีย์ (Aloui & Khwaldia, 2016; Davidson et al., 2015; Del Nobile et al., 2012) โดยในปัจจุบันมีการพยายามใช้เทคนิคต่างๆ เพื่อป้องกันไม่ให้สารต้านจุลินทรีย์มีการสูญเสียสมบัติเนื่องจากสิ่งแวดล้อมภายนอก รวมทั้งลดปฏิกิริยาต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้น ระหว่างสารต้านจุลินทรีย์กับองค์ประกอบของอาหารที่อาจส่งผลต่อคุณภาพอาหารได้หลายวิธี (ตารางที่ 2-5) โดยมีรายละเอียดดังนี้

ตารางที่ 5 การใช้สารต้านจุลินทรีย์ในอาหารรูปแบบต่างๆ ในอาหาร

สารต้านจุลินทรีย์	วิธีการประยุกต์ใช้	ผลิตภัณฑ์	ผลการทดลอง	อ้างอิง
น้ำมันหอมระเหยออริกานโอ	บรรจุลงในซองขนาดเล็ก	ขนมปัง	ลดอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ยีสต์และราบนขนมปัง แต่การยอมรับของผู้บริโภคลดลงเนื่องจากขนมปังมีกลิ่นไม่พึงประสงค์	(Passarinho et al., 2014)
ซิงค์ออกไซด์	ทำโซล-เจลและนำไปเคลือบบนอลูมิเนียมฟอยล์	ขนมอิตาลี่และขนมปური	ลดอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในขนมอิตาลี่ และขนมปურიในระหว่างการเก็บรักษา	(Perumal et al., 2019)
คาร์วาครอล	ผสมลงในฟิล์มไคโตซานและไซโคลเดกซ์ทริน	เนื้อไก่	สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ แต่สารต้านจุลินทรีย์ทำปฏิกิริยากับเนื้อไก่ทำให้การยอมรับของผู้บริโภคลดลง	(Higuera et al., 2015)
กรดซิตริก	ผสมลงในฟิล์มสตาร์ช	เค้ก	ไม่พบเชื้อราหลังจากผ่านไป 10 วัน ในขณะที่เค้กที่ห่อด้วยกระดาษการค้ำปรากฏเชื้อราเมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 วัน	(Romainor et al., 2022)
สารสกัดโรสแมรี่	ห่อหุ้มด้วยกัมเมล็ดแมงลักและโปรตีนถั่วเหลือง	เนื้อวัว	ลดการเกิดออกซิเดชันของไขมันในเนื้อวัว และมีจำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับเนื้อวัวที่ไม่ได้ผ่านการใส่สารสกัดเอนแคปซูเลชัน	(Rashidaie Abandansarie et al., 2019)

2.6.1 การบรรจุลงในซองขนาดเล็ก (Sachet) หรือแผ่นดูดซับ (Pad)

การบรรจุสารต้านจุลินทรีย์ในซองขนาดเล็กเป็นการบรรจุสารต้านจุลินทรีย์ในซองแยกเพื่อใส่ในภาชนะบรรจุไปพร้อมกับอาหาร โดยสารต้านจุลินทรีย์ในซองจะค่อยๆ ปล่อยออกมาเป็นก๊าซในบรรจุภัณฑ์ ทำให้สามารถเข้าไปในภาชนะบรรจุอย่างทั่วถึงเป็นเทคโนโลยีที่นำมาใช้แทนการพ่นก๊าซหรือพ่นสารต้านจุลินทรีย์ลงบนพื้นผิวของอาหารโดยตรง โดยวิธีนี้มีข้อดี เช่น เป็นวิธีที่ง่าย และสามารถนำไปใช้ร่วมกับสารดูดซับความชื้นได้ แต่มีข้อเสียคือต้องเสียพื้นที่ในบรรจุภัณฑ์บางส่วนสำหรับบรรจุของหรือแผ่นที่บรรจุสารต้านจุลินทรีย์ และหากสารต้านจุลินทรีย์มีกลิ่นเฉพาะตัว กลิ่นของสารต้านจุลินทรีย์จะแพร่ลงสู่อาหารและก่อให้เกิดกลิ่นที่ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (Otoni et al., 2016; Passarinho et al., 2014)

2.6.2 เทคโนโลยีโซล-เจล (Sol-Gel technology)

โซลเจลเป็นกระบวนการที่ผลิตวัสดุนาโนจากโมเลกุลขนาดเล็ก มีการนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการสังเคราะห์วัสดุต้านจุลินทรีย์จากสารประกอบในกลุ่มโลหะ โดยเริ่มจากการเปลี่ยนแปลงสารประกอบที่อยู่ในสถานะของเหลว (sol) ซึ่งส่วนมากอยู่ในรูปของสารแขวนลอยของมอนอเมอร์ (monomer) มาทำปฏิกิริยาให้เกิดการเกาะตัวกันเป็นร่างแหอย่างไม่เป็นระเบียบจนทำให้กลายเป็นของแข็ง (gel) โดยในการเตรียมโซล-เจลจะเริ่มจากการเตรียมสารละลายตั้งต้นอัลคอกไซด์ (alkoxides) จากนั้นจึงทำให้เกิดปฏิกิริยา 3 ปฏิกิริยา คือ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ปฏิกิริยาการควบแน่นด้วยน้ำ (water condensation) และปฏิกิริยาการควบแน่นด้วยแอลกอฮอล์ (alcohol condensation) โดยมีปัจจัยที่สำคัญต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา คือ ตัวเร่งอัตราส่วนระหว่างน้ำและโลหะ ค่าพีเอช และอุณหภูมิ โดยเมื่อได้เจลแล้วจากนั้นจึงนำเจลที่ได้ไปทำการอบแห้ง เพื่อไล่น้ำออก และนำไปทำการเผาที่อุณหภูมิต่ำ ได้เป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น เส้นใย (fiber) แอโรเจล (aerogel) ซีโรเจล (xerogel) ผง และฟิล์มเคลือบ (coating film) โดยวิธีการนี้มีข้อดี คือ เป็นกระบวนการที่อุณหภูมิต่ำ แต่ข้อเสียคือวิธีการผลิตซับซ้อน และเป็นวิธีที่ใช้สำหรับสารต้านจุลินทรีย์จากสารประกอบในกลุ่มโลหะ ผู้บริโภคจึงอาจเกิดความกังวลต่อการปนเปื้อนโลหะในอาหารได้ (Kumar et al., 2015; Lantano et al., 2014)

2.6.3 การผสมสารต้านจุลินทรีย์ลงในพอลิเมอร์ที่เป็นวัสดุบรรจุภัณฑ์หรือสารเคลือบ

เป็นการผสมสารต้านจุลินทรีย์กับสารละลายพอลิเมอร์ตั้งแต่ในขั้นตอนการผลิตก่อนจะเป็นบรรจุภัณฑ์หรือสารเคลือบ หรืออาจใช้วิธีการตรึง (immobilization) สารต้านจุลินทรีย์ไว้ที่ผิวหน้าของพอลิเมอร์ โดยสารที่อยู่ในพอลิเมอร์จะแพร่ออกมาสู่อาหารเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เริ่มจากที่บริเวณผิวที่สัมผัสไปยังเนื้อในของอาหาร โดยการผสมสารต้านจุลินทรีย์ลงในวัสดุบรรจุภัณฑ์หรือสารเคลือบนี้จะส่งผลให้บรรจุภัณฑ์ที่ได้มีคุณสมบัติที่เพิ่มขึ้นนอกเหนือจาก

แค่การบรรจุเพียงอย่างเดียว จึงถือได้ว่าบรรจุภัณฑ์ที่ได้เป็นบรรจุภัณฑ์แบบแอคทีฟซึ่งจะกล่าวต่อในหัวข้อ 2.7 ต่อไป โดยวิธีนี้มีข้อดี คือ สามารถควบคุมการแพร่ของสารต้านจุลินทรีย์ลงในอาหารได้ และสามารถนำไปใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ แต่สารต้านจุลินทรีย์ที่อยู่บรรจุภัณฑ์หรือสารเคลือบยังคงสัมผัสกับอาหาร ซึ่งอาจจะส่งผลต่อคุณภาพอาหารได้เช่นกัน (Huang et al., 2019; Rocha et al., 2013; Vermeiren et al., 2002)

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการนำมาประยุกต์ใช้สารต้านจุลินทรีย์ในอาหาร คือ การผสมสารต้านจุลินทรีย์ลงในพอลิเมอร์ที่เป็นวัสดุบรรจุภัณฑ์หรือสารเคลือบ เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถควบคุมการปลดปล่อยสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้ ผลิตง่าย และเมื่อผลิตแล้วสามารถนำไปใช้เป็นบรรจุภัณฑ์อาหารเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหารจากการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ หรือปฏิกิริยาทางเคมีได้

2.7 บรรจุภัณฑ์แบบแอคทีฟ

บรรจุภัณฑ์แบบแอคทีฟ (active packaging) เป็นบรรจุภัณฑ์ ที่สามารถควบคุมให้เกิดปฏิกิริสัมพันธ์กันระหว่างอาหารที่บรรจุ และสภาพแวดล้อมทั้งภายในและภายนอกบรรจุภัณฑ์ได้ โดยจะมีผลในการรักษาคุณภาพของอาหาร ปรับปรุงคุณภาพ และสามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของอาหารได้ โดยในปัจจุบันบรรจุภัณฑ์แบบแอคทีฟสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับอาหารได้หลากหลาย เช่น ดูดซับสาร ปลดปล่อย/ควบคุมสาร ควบคุมอุณหภูมิในบรรจุภัณฑ์ ควบคุมหรือบ่งชี้คุณภาพอาหาร หรือแม้กระทั่งนำมาใช้สำหรับต้านจุลินทรีย์ในอาหาร เช่นเดียวกับที่กล่าวไปในหัวข้อ 2.6.3 เป็นต้น (Prasad & Kochhar, 2014) โดยนอกจากการนำไปใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ที่ใช้สำหรับต้านจุลินทรีย์สำหรับอาหารแล้ว ยังมีแนวทางการใช้บรรจุภัณฑ์แบบแอคทีฟกับอาหารอีกหลายแนวทาง เช่น

2.7.1 บรรจุภัณฑ์ที่ใช้สำหรับดูดซับออกซิเจน (Oxygen scavenger)

ออกซิเจนเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของอาหาร เนื่องจากออกซิเจนทำให้เกิดการออกซิเดชันส่งผลให้อาหารเกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์ นอกจากนี้ออกซิเจนยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิด และยังเป็นตัวเร่งการทำงานของเอนไซม์ในอาหารซึ่งอาจก่อให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหารได้ จึงจำเป็นที่จะต้องกำจัดออกซิเจนออกจากบรรจุภัณฑ์หรือควบคุมระดับออกซิเจนในบรรจุภัณฑ์ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม โดยจะมีการใช้วัสดุดูดซับออกซิเจน เช่น ผงเหล็กออกไซด์ (iron oxide) ร่วมกับบรรจุภัณฑ์ โดยอาจบรรจุเป็นช่องใส่ในบรรจุภัณฑ์ หรือผสมลงในพอลิเมอร์บรรจุภัณฑ์ เช่น บรรจุของผงเหล็กออกไซด์ในบรรจุภัณฑ์ โดยผง

เหล็กจะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนได้เป็นไฮดรอกไซด์ (Fe(OH)₃) (Cichello, 2015)

2.7.2 บรรจุก๊าซที่ใช้สำหรับควบคุมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide generating system)

คาร์บอนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้นมากเพียงพอ (60 - 80 %) สามารถยับยั้งการทำงานและการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิดได้ อย่างไรก็ตามก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในอาหารระหว่างการเก็บรักษา เช่น จากกระบวนการหมักอาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์และทำให้บรรจุก๊าซเสียรูปร่างได้ ดังนั้นจึงต้องทำการควบคุมคาร์บอนไดออกไซด์ให้เหมาะสมเพื่อรักษาคุณภาพของอาหารและช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของอาหาร โดยแนวทางในการควบคุมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์คือ อาจบรรจุสารดูดซับ/ปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์เป็นของใส่ในบรรจุก๊าซหรือผสมลงในบรรจุก๊าซ โดยสารที่ใช้สำหรับการดูดซับคาร์บอนไดออกไซด์ เช่น แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Ca(OH)₂) แคลเซียมออกไซด์ (CaO) และสารที่ใช้สำหรับการปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ เช่น เหล็กคาร์บอเนต (FeCO₃) (Ha et al., 2001)

2.7.3 บรรจุก๊าซที่มีวัตถุประสงค์เพื่อดูดซับเอทิลีน (Ethylene scavenger)

เอทิลีนเป็นฮอร์โมนที่พืชผลิตขึ้น มีผลต่อการสุกของผลและผลไม้ โดยหากมีเอทิลีนอยู่ในบรรจุก๊าซอาจส่งผลให้ผลและผลไม้เกิดการเสื่อมเสียคุณภาพ และมีผลทำให้อายุการเก็บรักษาลดลง จึงต้องทำการกำจัดเอทิลีนในบรรจุก๊าซ โดยอาจใช้สารดูดซับในรูปแบบของใส่ลงในบรรจุก๊าซ หรือผสมลงในบรรจุก๊าซ โดยสารที่ใช้สำหรับการดูดซับ เช่น ถ่านกัมมันต์ เบนโทไนด์ ซีโอไลต์ เป็นต้น (Terry et al., 2007)

2.7.4 บรรจุก๊าซที่ออกแบบมาเพื่อดูดซับ/ปลดปล่อยกลิ่นรสและกลิ่น (Flavor and odor absorber/releaser)

กลิ่นเป็นสมบัติที่มีผลต่อความพึงพอใจของผู้บริโภคต่ออาหาร เกิดจากสารที่ระเหยได้ (volatile compound) ในอาหาร เมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารเป็นเวลานานสารที่ระเหยได้จะค่อยๆ ระเหยไป ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรส หรือกลิ่นเปลี่ยนแปลงไป และอาจไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ดังนั้นเพื่อปรับปรุงกลิ่นของผลิตภัณฑ์ให้เป็นเช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์สดใหม่ จึงอาจต้องเติมสารที่ระเหยได้ลงในบรรจุก๊าซโดยใช้สารที่มีสมบัติดูดซับ ปล่อยกลิ่นรสดังกล่าวพร้อมกับผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาจเกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์ขึ้น ดังนั้นจึงต้องใช้วัสดุดูดซับกลิ่นไม่พึงประสงค์ดังกล่าวในบรรจุก๊าซพร้อมกับผลิตภัณฑ์อาหาร (Almenar et al., 2009)

2.7.5 บรรจุภัณฑ์ที่ใช้สำหรับต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

โดยการออกซิเดชันเป็นปฏิกิริยาอย่างหนึ่งที่น่าไปสู่การเสื่อมเสียของอาหารรองจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยการออกซิเดชันจะก่อให้เกิดกลิ่น รสชาติ และเนื้อสัมผัสของอาหารไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ทำให้อายุการเก็บรักษาของอาหารสั้นลง ดังนั้นการใช้สารต้านอนุมูลอิสระในบรรจุภัณฑ์จะช่วยป้องกันหรือชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันในอาหารได้ (Pereira de Abreu et al., 2010)

อย่างไรก็ตามพอลิเมอร์บรรจุภัณฑ์ส่วนใหญ่มักทำจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ซึ่งเป็นวัสดุที่ย่อยสลายยาก และก่อให้เกิดปัญหาขยะและส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Arancibia et al., 2014; Rubilar et al., 2013) ดังนั้นการใช้พอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติที่อาจเป็นไปได้ในรูปแบบของฟิล์มรับประทานได้ (edible film) นอกจากจะช่วยลดปัญหาขยะบรรจุภัณฑ์ได้แล้ว ยังมีรายงานว่า การใช้พอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ยังมีสมบัติอื่นที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ด้วย เช่น สารต้านจุลินทรีย์สามารถรวมตัวกับพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ เป็นต้น (Abdollahi et al., 2012; Huber & Embuscado, 2009; Rhim & Shellhammer, 2007)

2.8 ฟิล์มบริโภคได้

ฟิล์มบริโภคได้ (edible film) หมายถึง วัสดุแผ่นบางที่บริโภคได้สามารถนำมาใช้กับอาหารได้โดยการเคลือบผิวของอาหารโดยตรง หรือเตรียมเป็นแผ่นฟิล์มนำไปบรรจุอาหาร มีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกัน หรือชะลอการผ่านเข้าออกของก๊าซ ไออน้ำ ไอรระเหย สารละลาย จุลินทรีย์ หรือสารอื่นๆ โดยการเลือกใช้ฟิล์มบริโภคได้นั้น ขึ้นอยู่กับชนิดและสภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น อาหารที่มีกรดไขมันอิ่มตัวสูงมาก จำเป็นต้องใช้ฟิล์มที่มากการต้านทานการซึมผ่านออกซิเจนสูง เป็นต้น (Cerqueira et al., 2009; Vasconez et al., 2009) โดยข้อดีของฟิล์มบริโภคได้ เช่น สามารถบริโภคฟิล์มได้พร้อมกับผลิตภัณฑ์ สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ อาจช่วยส่งเสริมคุณภาพทางประสาทสัมผัส ชวนให้น่ารับประทานผลิตภัณฑ์มากขึ้น เสริมคุณค่าทางอาหาร อาจใช้สำหรับแยกหน่วยหุ้มอาหาร ใช้เป็นแผ่นกั้นอาหารระหว่างอาหารที่มีองค์ประกอบแตกต่างกันเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพ ใช้เก็บสารป้องกันจุลินทรีย์และสารกันเหิน อาจทำเป็นเม็ดแคปซูลบรรจุสารให้กลิ่นรสในอาหารอย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถใช้ร่วมกับฟิล์มพลาสติกโดยเคลือบฟิล์มบริโภคได้บนฟิล์มพลาสติกและใช้ฝั่งของฟิล์มรับประทานสัมผัสกับอาหารได้

2.8.1 ชนิดของฟิล์มบรีโกลได้

ฟิล์มบรีโกลได้แบ่งเป็น 3 ชนิดหลักๆ คือ ฟิล์มโปรตีน ฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ และฟิล์มลิพิด ดังแสดงในตารางที่ 2-6 โดยมีรายละเอียดดังนี้

1) ฟิล์มโปรตีน

ฟิล์มที่ผลิตจากโปรตีนถือเป็นฟิล์มที่ได้รับความนิยมเนื่องจากมีคุณสมบัติทางกลที่ดี มีความแข็งแรง โปร่งแสง และสามารถป้องกันการซึมผ่านของก๊าซได้ดีกว่าฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ นอกจากนี้โปรตีนยังมีความเข้ากันได้ดีกับสารที่มีขี้ และสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารเติมแต่งหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ ฟิล์มโปรตีนสามารถผลิตได้จากโปรตีนหลากหลายชนิด เช่น คอลลาเจน เจลาติน โปรตีนจากข้าวโพด โปรตีนข้าวสาลี โปรตีนถั่วเหลือง (Coltelli et al., 2016; Ozdemir & Floros, 2008)

2) ฟิล์มลิพิด

ฟิล์มที่ผลิตจากไขมันสามารถชะลอการผ่านเข้าออกของก๊าซ และน้ำได้ แต่มีสมบัติทางกลไม่ดี ดังนั้นโดยทั่วไปจึงไม่นิยมใช้ลิพิดในการขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มแต่จะใช้เป็นสารเคลือบ โดยมักใช้ในการห่อหุ้มผลิตภัณฑ์ขนมหวาน เช่น เคลือบช็อกโกแลต หรือผักผลไม้ เช่น ไข (wax) นอกจากนี้สารตึงผิว (surfactant) ยังถือว่าเป็นฟิล์มลิพิดอีกชนิดด้วย ฟิล์มลิพิดนอกจากสามารถนำมาใช้เคลือบอาหารได้แล้วยังมีวัตถุประสงค์อย่างอื่นได้อีกด้วย เช่น ลดการเสียดสีของผิวผลไม้ ระหว่างการขนส่ง หรือป้องกันการเกิดสีน้ำตาล (Koch et al., 2006)

3) ฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide film)

พอลิแซ็กคาไรด์ คือ คาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน ซึ่งประกอบไปด้วยมอโนแซ็กคาไรด์ที่เรียงต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์เป็นสายยาว มีสมบัติทางกลที่ดี และสามารถป้องกันการซึมผ่านของก๊าซได้ แต่เนื่องจากพอลิเมอร์เหล่านี้ชอบรวมตัวกับน้ำ (hydrophilic) ทำให้ฟิล์มที่ผลิตจากพอลิแซ็กคาไรด์ไม่เหมาะจะนำมาใช้ป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำ อย่างไรก็ตามพอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดมีสมบัติในการดูดความชื้นสูงจึงสามารถนำมาใช้เพื่อผลิตฟิล์มที่มีความสามารถดูดซับน้ำช่วยชะลอการสูญเสียความชื้นของอาหารได้ในช่วงอายุการเก็บสั้นๆ โดยฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์สามารถผลิตได้จากพอลิเมอร์หลากหลายชนิด เช่น แอลจินต เพกติน คาราจีแนน สตาร์ช อนุพันธ์ของเซลลูโลส และไคโตซาน เป็นต้น (Bertuzzi et al., 2007; Wittaya, 2008)

ตารางที่ 6 การประยุกต์ใช้ฟิล์มบิโพลีเมอร์ได้เป็นบรรจุภัณฑ์แบบแอคทีฟในอาหาร

ชนิดของฟิล์ม	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	ผลิตภัณฑ์	วัตถุประสงค์	ผลลัพธ์	เอกสารอ้างอิง
โปรตีน					
เจลาติน	น้ำมันหอมระเหยไทม์	สันในไก่	ต้านจุลินทรีย์	เนื้อสันในไก่ที่ห่อด้วยฟิล์ม สามารถยับยั้งการเติบโตของ <i>L. monocytogenes</i> และ <i>E. coli O157: H7</i> ในระหว่างการเก็บรักษาได้	(Lee et al., 2016)
โปรตีนถั่วเหลือง	น้ำมันหอมระเหยออริกาน	เนื้อบด	ต้านอนุมูลอิสระ	สามารถชะลอการออกซิเดชันในเนื้อสัตว์ได้	(Coskun et al., 2014)
ไขมัน					
ไขจากต้นแคนเดลิลา	กรดเอลลาจิก	อโวคาโด	ยืดอายุการเก็บรักษา	สามารถปรับปรุงคุณภาพและยืดอายุการเก็บรักษาของอโวคาโดได้	(Saucedo-Pompa et al., 2009)
พอลิแซ็กคาไรด์					
สตาร์ชมันสำปะหลัง	อบเชย	ขนมปัง	ต้านจุลินทรีย์	สามารถต้านเชื้อราในขนมปัง	(Souza et al., 2013)

ตารางที่ 2-6 การประยุกต์ใช้ฟิล์มบิโกลไคเป็นบรรจุภัณฑ์แบบแอคทีฟในอาหาร (ต่อ)

ชนิดของฟิล์ม	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	ผลิตภัณฑ์	วัตถุประสงค์	ผลลัพธ์	เอกสารอ้างอิง
พอลิแซ็กคาไรด์					
ไคโตซาน	น้ำมันหอมระเหย เมล็ดแอปเปิล ปริคอต	ขนมปัง	ต้านจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระ	สามารถต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราบนขนมปังได้	(Priyadarshi et al., 2018)

จากที่กล่าวมาจะพบว่าพอลิเมอร์หลากหลายชนิดสามารถนำมาใช้เพื่อผลิตเป็นฟิล์มและเมื่อนำสารต้านจุลินทรีย์มาผสมลงในฟิล์มจะสามารถใช้เป็นบรรจุภัณฑ์แบบแอคทีฟในอาหารได้จริงและสามารถยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรักษาได้ โดยพอลิเมอร์ที่เป็นที่นิยมนำมาใช้เป็นบรรจุภัณฑ์แบบแอคทีฟ คือ ไคโตซาน เนื่องจากหาได้ง่าย สามารถนำมาขึ้นรูปเป็นฟิล์มได้ง่าย ย่อยสลายได้ทางชีวภาพไม่เป็นพิษ และไคโตซานยังมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ซึ่งช่วยเสริมฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มผสมสารต้านจุลินทรีย์ได้อีกด้วย

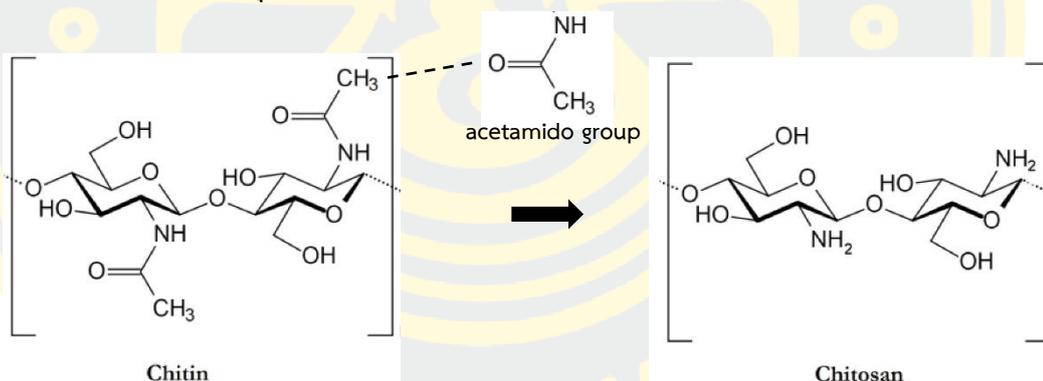
2.9 ไคโตซาน

ไคติน (Chitin) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์สายยาว โดยโมเลกุลของไคตินจะประกอบด้วยน้ำตาลหน่วยย่อย คือ เอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน (N-acetyl-D-glycosamine) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic bond) แบบ β -1,4 แต่หมู่ไฮดรอกซิล ที่ตำแหน่ง C2 จะถูกแทนที่ด้วยหมู่อะซิติลอะมิโน (-NHCOCH₃) มีโครงสร้างคล้ายกับเซลลูโลส แต่แตกต่างกันที่หมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง C2 ในโมเลกุลของไคตินจะเป็นหมู่อะซิติลอะมิโน ส่วนไคโตซาน (Chitosan) คือ อนุพันธ์ของไคติน ที่ผ่านกระบวนการดึงหมู่อะซิติลออก (deacetylation) ซึ่งเป็นกระบวนการที่กำจัดหรือลดหมู่อะซิติลที่มีอยู่บนโมเลกุลไคติน ทำให้โครงสร้างของน้ำตาลเอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน เปลี่ยนเป็นกลูโคซามีน (glucosamine) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีสมบัติย่อยสลายได้ง่าย ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ละลายได้ดีในสารละลายกรดอินทรีย์เจือจาง และจับกับไอออนของโลหะได้ดี

เป็นโครงสร้างที่ไม่เสถียร มีความเป็นขั้วสูง และพร้อมที่จะทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว (Goy et al., 2009)

2.9.1 ลักษณะทั่วไปของไคโตซาน

ไคโตซาน จัดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์และเป็นอนุพันธ์ของไคติน สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้และไม่เป็นพิษต่อร่างกาย มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ไคตินสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติโดยมากจะพบในสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น กุ้ง กั้ง ปู ตามมาด้วยแมลง และจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ และเนื่องจากสิ่งมีชีวิตเหล่านี้เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีปริมาณมาก ทำให้ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่สามารถหาได้ง่าย และมีปริมาณมากเป็นอันดับ 2 ในธรรมชาติรองจากเซลลูโลส (Elieh-Ali-Komi & Hamblin, 2016) ทั้งนี้ไคตินเป็นพอลิเมอร์ที่มีความแข็งแรงเนื่องจากความเป็นผลึกที่อยู่ภายในเส้นใยซึ่งเมื่อไคตินผ่านกระบวนการที่กำจัดหรือลดหมู่อะซิติล จะทำให้โครงสร้างของไคตินบางส่วน เปลี่ยนแปลงไป โดยมีการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่มีหมู่อะเซตามิโด (-NHCOCH₃) เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ หมู่อะมิโน (-NH₂) ที่ตำแหน่ง C2 ดังภาพที่ 2-5 ซึ่งทำให้ไคโตซานมีคุณสมบัติพิเศษที่แตกต่างจากไคติน



ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของไคติน และไคโตซาน

ที่มา : (Younes & Rinaudo, 2015)

2.9.2 สมบัติของไคโตซาน

ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่เป็นที่นิยมใช้เป็นสารละลายขึ้นรูปฟิล์มหรือผสมสารออกฤทธิ์ชนิดต่างๆ เพื่อนำไปทำเป็นบรรจุภัณฑ์สำหรับบรรจุอาหาร โดยมีสมบัติต่างๆ ดังต่อไปนี้

1) สมบัติการละลาย (Solubility) ไคโตซานไม่ละลายในน้ำรวมทั้งด่างและตัวทำละลายอินทรีย์ แต่ไคโตซานสามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นกรดอินทรีย์ที่มีค่า pH น้อยกว่า 6 ซึ่งสถานะที่เป็นกรดนี้หมู่เอมีนอิสระ (-NH₂) จะเติมโปรตอน (protonation) ไปอยู่ในรูปของหมู่เอมิโนประจุบวก (cationic Amino, -NH₃⁺) (พริม ภัคศิธรรม, 2560) นอกจากนี้ไคโตซานยังสามารถ

ละลายได้ในกรดอินทรีย์บางชนิด เช่น กรดไนตริก กรดไฮโดรคลอริก กรดเปอร์คลอริก และกรดฟอสฟอริก แต่จะละลายได้ภายใต้การคน โดยให้ความร้อน

2) ความหนืด (Viscosity) ความหนืดของสารละลายไคโตซานขึ้นอยู่กับภาวะที่ใช้ในการกำจัดหมู่อะซิติก ได้แก่ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และเวลาที่ใช้ในการกำจัดหมู่อะซิติก ซึ่งพบว่าการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นสูงและใช้เวลานาน จะทำให้ความหนืดของสารละลายไคโตซานลดลง เนื่องจากภาวะที่ใช้ในการกำจัดหมู่อะซิติกรุนแรงจะมีผลทำให้เกิดการแตกขาดของสายโซ่โมเลกุล โดยการใช้เวลานานในการกำจัดหมู่อะซิติกมีผลทำให้ความหนืดของสารละลายไคโตซานเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ความหนืดของสารละลายไคโตซานยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวทำละลาย เช่น ในกรดอะซิติกความหนืดของไคโตซานจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกรดเพิ่มขึ้น ในขณะที่ในกรดไฮโดรคลอริกความหนืดของไคโตซานจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของกรดเพิ่มขึ้น

3) ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity) ไคโตซานมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ อย่างไรก็ตามกลไกในการต้านจุลินทรีย์ของไคโตซานยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดนัก แต่มีทฤษฎีที่ได้รับการกล่าวถึงอยู่หลักๆ 2 แบบ คือ การยับยั้งภายนอกเซลล์ โดยหมู่เอมีน ($-NH_2$) ของไคโตซานอาจจับกับหมู่คาร์บอกซิล ($-COO^-$) ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ส่งผลให้สมบัติการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ลดลง และการยับยั้งภายในเซลล์ โดยไคโตซานสามารถยับยั้งการสร้างอาร์เอ็นเอของแบคทีเรียได้ (Ke et al., 2021) อย่างไรก็ตามมีปัจจัยหลายอย่างที่ส่งผลต่อฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ เช่น

(1) ค่าความเป็นกรดต่าง ไคโตซานจะมีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้นเมื่อค่า pH ของสารละลายลดลง ในขณะเดียวกันเมื่อค่าพีเอช ของไคโตซานลดลงก็จะมีผลทำให้ประจุบวกในหมู่เอมีนอิสระ ($-NH_3^+$) ของไคโตซานเพิ่มขึ้น ทำให้ความสามารถในการจับกันระหว่างโมเลกุลที่เป็นประจุบวกของไคโตซาน และประจุลบที่บริเวณผนังเซลล์ของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้สมบัติการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ลดลง จนจุลินทรีย์ตายในที่สุด (Kravanja et al., 2019)

(2) น้ำหนักโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานเป็นสิ่งที่บ่งบอกถึงขนาดของไคโตซาน โดยไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลใหญ่จะจับกับบริเวณผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ส่งผลให้สมบัติการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ลดลง ในขณะที่ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลเล็กจะสามารถแทรกซึมผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อยับยั้งการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอของจุลินทรีย์ได้ (Ke et al., 2021)

(3) ระดับการกำจัดหมู่อะซิติก (Degree of Deacetylation, % DD) การกำจัดหมู่อะซิติกเป็นกระบวนการทางเคมีที่ใช้เพื่อลดหมู่อะซิติกในไคตินให้กลายเป็นไคโตซาน โดยการกำจัด

หมู่อะซิดิลจะเป็นเพิ่มปริมาณหมู่อะมิโน (-NH₂) ของไคโตซาน ซึ่งส่งผลให้ปริมาณประจุบวกของไคโตซานเพิ่มขึ้น ดังนั้นไคโตซานที่มี % DD สูงจะมีความสามารถในการจับกับบริเวณผนังเซลล์ของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น (Foster et al., 2015)

2.10 การใช้ไคโตซานเป็นบรรจุภัณฑ์แอคทีฟ

ปัจจุบันมีรายงานการนำไคโตซานมาใช้เป็นบรรจุภัณฑ์แอคทีฟโดยจาก Kalaycioglu et al. (2017) รายงานว่าฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการต้าน *Salmonella* spp. และ *S. aureus* ที่ดี และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดขมิ้นมีแนวโน้มสำหรับการผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์อาหารได้จากรายงานของ Zivanovic et al. (2005) รายงานว่าฟิล์มไคโตซานที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหยออริกาโนสามารถลด *L. monocytogenes* ลงได้ 2 log แต่เมื่อเติมน้ำมันหอมระเหยออริกาโนลงในฟิล์มไคโตซานที่ความเข้มข้น 1% และ 2% สามารถลดจำนวน *L. monocytogenes* ลงได้ถึง 3.6 และ 4 log ตามลำดับ และทั้ง 2 ความเข้มข้นสามารถลด *E. coli* ลงได้ถึง 3 log และนอกจากนี้ยังพบว่า การเติมน้ำมันหอมระเหยออริกาโนลงในฟิล์มไคโตซานจะช่วยลดความสามารถในการซึมผ่านของไอน้ำ การเกาะตะกั่ว และความต้านทานแรงดึง แต่เพิ่มความยืดหยุ่นของฟิล์มได้ ดังนั้นฟิล์มไคโตซานที่ผสมน้ำมันหอมระเหยออริกาโนมีศักยภาพที่จะใช้เป็นฟิล์มบรรจุภัณฑ์แอคทีฟด้านจุลินทรีย์ได้

จากรายงานของ Jaisan and Punbusayakul (2016) รายงานว่าการเติมสารสกัดเนื้อผลกาแฟ (coffee pulp) ลงในฟิล์มไคโตซานทำให้ฟิล์มมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ได้ โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเนื้อผลกาแฟ ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของฟิล์มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้การเติมสารสกัดเนื้อผลกาแฟลงในฟิล์มไคโตซานยังมีผลทำให้ค่าความสามารถในการซึมผ่านไอน้ำ และความสามารถในการละลายของฟิล์มลดลงเมื่อเทียบกับฟิล์มไคโตซานที่ไม่เติมสารสกัดเนื้อผลกาแฟ ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าฟิล์มไคโตซานที่ผสมสารสกัดเนื้อผลกาแฟสามารถใช้เป็นบรรจุภัณฑ์แอคทีฟด้านจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระได้

จากที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าสามารถไคโตซานเพื่อผลิตเป็นฟิล์มแอคทีฟได้ โดยฟิล์มไคโตซานเป็นฟิล์มที่อยู่ในกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งมีคุณสมบัติทางกลที่ดี และสามารถป้องกันการซึมผ่านของก๊าซได้ แต่ก็มีข้อเสียเนื่องจากพอลิเมอร์เหล่านี้ชอบรวมตัวกับน้ำ (hydrophilic) ทำให้ฟิล์มที่ผลิตจากพอลิแซ็กคาไรด์ไม่เหมาะจะนำมาใช้ป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำ แต่มีรายงานว่า การผสมสารต้านจุลินทรีย์ลงในฟิล์มสามารถช่วยลดความสามารถในการซึมผ่านไอน้ำ และความสามารถในการละลายของฟิล์มได้ (Jaisan & Punbusayakul, 2016) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไคโตซานมีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นสารสำหรับผลิตเป็นฟิล์มแอคทีฟด้านจุลินทรีย์ได้

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าวิธีการประยุกต์ใช้สารต้านจุลินทรีย์ลงในฟิล์มบริโภคจะสามารถช่วยหลีกเลี่ยงการเติมสารต้านจุลินทรีย์ลงในอาหารโดยตรงได้ แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น การเติมสารต้านจุลินทรีย์ลงในพอลิเมอร์โดยตรงสารต้านจุลินทรีย์ยังคงสามารถแพร่เข้าสู่อาหารได้ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพของอาหาร เช่น เกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์เนื่องจากกลิ่นเฉพาะของสารต้านจุลินทรีย์เอง เป็นต้น (Gutierrez et al., 2009) และในกระบวนการผลิตฟิล์มสารต้านจุลินทรีย์อาจสูญเสียคุณภาพเนื่องมาจากความร้อนในระหว่างการผลิตได้ (Diblan & Kaya, 2018) ดังนั้นหากนำเอาวิธีการประยุกต์ใช้สารต้านจุลินทรีย์ในอาหารวิธีอื่น ๆ มาใช้ร่วมกันอาจช่วยแก้ไขหรือปรับปรุงข้อเสียหรือข้อจำกัดของวิธีการเติมสารต้านจุลินทรีย์ลงในอาหารโดยตรงเพียงวิธีเดียวได้ โดยมีรายงานว่า การผสมสารต้านจุลินทรีย์ที่ผ่านการเอนแคปซูลลงไปในพอลิเมอร์สามารถรักษาความคงตัวของสารต้านจุลินทรีย์ได้ โดยฟิล์มหรือสารเคลือบที่มีการผสมสารต้านจุลินทรีย์ที่ผ่านการเอนแคปซูลจะมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์มากกว่า เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี disc-diffusion (Mekkerdchoo et al., 2009; Nonsee et al., 2011) และเมื่อนำไปบรรจุอาหารสามารถยืดอายุการเก็บรักษาไว้ได้นานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มหรือสารเคลือบที่มีการผสมสารต้านจุลินทรีย์ที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูล (Chen et al., 2019; Zhang et al., 2019)

2.11 การเอนแคปซูลชัน

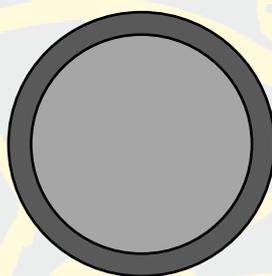
การเอนแคปซูลชัน (encapsulation) คือ เทคนิคที่สารชนิดหนึ่งหรือสารผสมถูกเคลือบหรือถูกกักเก็บไว้ในโครงสร้างของสารอีกชนิดหนึ่ง (Madene et al., 2006) โดยสารที่บรรจุอยู่ภายในอาจเป็นของแข็ง ของเหลว หรือก๊าซ สารที่บรรจุอยู่ภายในเรียกว่า แกน (core material) ส่วนสารที่ใช้ในการห่อหุ้มเรียกว่า สารเคลือบ (coating) หรือสารห่อหุ้ม (wall Material) โดยวิธีการเอนแคปซูลชันเป็นหนึ่งในวิธีที่ได้รับความนิยมในการนำมาประยุกต์ใช้กับสารต้านจุลินทรีย์ในอาหาร ซึ่งนอกจากวิธีนี้จะช่วยปกป้องสารออกฤทธิ์จากสภาพแวดล้อม ทำให้สารต้านจุลินทรีย์มีความคงตัวไม่สัมผัส ไม่ทำปฏิกิริยากับอาหารโดยตรง และให้ความคงตัวแล้ว วิธีนี้ยังสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารต้านจุลินทรีย์ และสามารถรักษาสมบัติของสารต้านจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารตลอดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้อีกด้วย แต่วิธีนี้มีข้อเสียซึ่งขึ้นอยู่กับวิธีการในการผลิตเอนแคปซูล (encapsulate) เช่น กระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยจะใช้อุณหภูมิสูงซึ่งอาจส่งผลให้สารต้านจุลินทรีย์เสื่อมเสียคุณภาพ หรือการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นวิธีที่มีต้นทุนในการผลิตสูง เป็นต้น (Desai & Jin Park, 2005; Fang & Bhandari, 2010; Gibbs et al., 1999)

2.11.1 ชนิดของเอนแคปซูลผลิตโดยใช้เทคนิคเอนแคปซูลชั้น

ชนิดเอนแคปซูลที่ผลิตได้นั้นจะแตกต่างกันออกไปตามเทคนิคที่ใช้สำหรับเอนแคปซูลชั้น โดยชนิดของเอนแคปซูลนั้นสามารถจำแนกออกได้เป็น 3 รูปแบบ (Gibbs et al., 1999) ได้แก่

1) แกนเดี่ยว (single core)

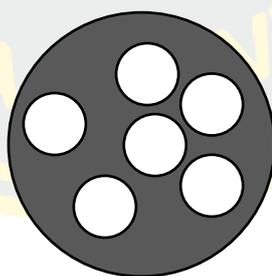
รูปแบบของแคปซูลจะเป็นลักษณะที่สารแกนกลางจะถูกห่อหุ้มด้วยสารห่อหุ้มเพียงชั้นเดียว เป็นรูปแบบของเอนแคปซูลที่ได้จากการใช้เทคนิคโคอะเคอเวชัน และเอกซ์ทรูชัน ดังแสดงในภาพที่ 2-6



ภาพที่ 6 โครงสร้างส่วนประกอบของเอนแคปซูลชนิดแกนเดี่ยว (single core)

2) หลายแกน (multi – core) หรือ เมทริกซ์เอนแคปซูลชั้น (matrix encapsulation)

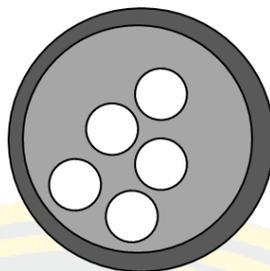
รูปแบบของแคปซูลจะเป็นลักษณะที่สารแกนกลางจะกระจายตัวอยู่เป็นขนาดเล็กๆ และถูกห่อหุ้มด้วยสารห่อหุ้ม เป็นรูปแบบของเอนแคปซูลของสารให้กลิ่นรสส่วนใหญ่ที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรม โดยใช้เทคนิคการอบแห้งแบบพ่นฝอย และการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ดังแสดงในภาพที่ 2-7



ภาพที่ 7 โครงสร้างส่วนประกอบของเอนแคปซูลชนิดหลายแกน (multi – core)

3) ผนังหลายชั้น (multi – wall)

รูปแบบของแคปซูลจะเป็นลักษณะที่สารแกนกลางจะกระจายตัวและถูกห่อหุ้มด้วยสารห่อหุ้มและมีสารห่อหุ้มมาเคลือบอีกเป็นชั้นที่ 2 เป็นรูปแบบของเอนแคปซูลของสารให้กลิ่นรสที่มีการเคลือบผิวครั้งที่สอง โดยใช้เทคนิคพูลอิด ไคส์เบด ทำให้สามารถควบคุมการปลดปล่อยสารให้กลิ่นรสในสภาวะที่ต้องการได้ ดังแสดงในภาพที่ 2-8



ภาพที่ 8 โครงสร้างส่วนประกอบของเอนแคปซูลชนิดผนังหลายชั้น (multi – wall)

2.12 ชนิดของสารห่อหุ้มที่ใช้ในกระบวนการเอนแคปซูลชั้น

พอลิเมอร์ส่วนใหญ่ที่ใช้สำหรับเป็นสารห่อหุ้มในกระบวนการเอนแคปซูลชั้น จะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ พอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน และไขมัน ที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ คือ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยพอลิเมอร์ในแต่ละกลุ่มนั้นจะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน มีรายละเอียดดังนี้

2.12.1 พอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide)

เป็นกลุ่มของพอลิเมอร์ที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในการใช้เป็นสารห่อหุ้มในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นกลุ่มที่มีหลากหลาย ความหนืดต่ำ มีความสามารถในการละลายที่ดี และมีคุณสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์ โดยพอลิเมอร์ในกลุ่มของคาร์โบไฮเดรตที่สามารถนำมาใช้ในรูปแบบของสารห่อหุ้มได้มีหลากหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น

1) สตาร์ช (Starch) เตรียมได้จากการนำส่วนที่เป็นแหล่งสะสมอาหารต่างๆ ของพืช เช่น เมล็ด พืชหัว และรากพืช มาผ่านกระบวนการสกัด เพื่อกำจัดองค์ประกอบอื่นๆที่ไม่ใช่สตาร์ชออก โดยสตาร์ชเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถหาซื้อได้ง่าย ความหนืดต่ำ และสามารถทำแห้งได้ง่าย มีคุณสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์ที่ดี และนอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การเคลือบสารด้วยสตาร์ชตัดแปรไม่เกิดกลิ่นในระหว่างการอบแห้งแบบสเปรย์ (Varavinit et al., 2001)

2) มอลโตเดกซ์ทริน (Maltodextrin) ได้จากการย่อยโมเลกุลของสตาร์ช บางส่วนให้เป็นสายสั้นๆ โดยมอลโตเดกซ์ทรินเป็นหนึ่งในพอลิเมอร์ที่ได้รับความนิยมเนื่องจาก มีต้นทุนต่ำ สามารถละลายน้ำได้ดี มีความหนืดต่ำ และมีรายงานว่าสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันของสารแกนกลางได้ (Shahidi & Han, 1993)

3) กัมอะราบิก (Gum Arabic) ได้จากการนำยางที่ได้จากต้นไม้สกุล อะคาเซีย (Acacia) มาบดเป็นผงละเอียด มีความสามารถในการละลายในน้ำได้ดี ไม่ละลายในไขมัน ความหนืดต่ำ และกักเก็บสารที่สามารถระเหยได้ได้ดี เป็นสารห่อหุ้มที่เหมาะสมกับสารที่เป็นไขมัน อย่างไรก็ตามยังเป็นพอลิเมอร์ที่ราคาแพง ดังนั้นจึงอาจส่งผลกระทบต่อการใช้งานในระดับอุตสาหกรรม (Boutboul et al., 2002)

4) ไคโตซาน (Chitosan) ผลิตได้จากการนำไคตินซึ่งเป็นโครงสร้างที่พบได้ในเปลือกของกุ้ง ปู และแมลง ไปผ่านกระบวนการกำจัดหรือลดหมู่อะซิติก ไคโตซานเป็นหนึ่งในพอลิเมอร์ที่ได้รับความนิยมเนื่องจาก หาง่าย ต้นทุนการผลิตต่ำ สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หลายชนิด (Ke et al., 2021)

2.12.2 โปรตีน (Protein)

เป็นสารที่มีคุณสมบัติทางหน้าที่ที่เหมาะสมแก่การใช้เป็นสารห่อหุ้ม เช่น มีความสามารถในการละลายที่ดี ความหนืดต่ำ มีความสามารถในการเกิดอิมัลชัน และมีคุณสมบัติในการเกิดฟิล์ม ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ได้ดีในกระบวนการเอนแคปซูเลชัน โดยมีรายงานว่าในระหว่างการทำเอนแคปซูเลชัน โปรตีนสามารถปกป้องหยดน้ำมัน ไม่ให้เกิดการรวมตัวอีกครั้งได้ ทำให้เอนแคปซูลเกิดความเสถียรทางกายภาพระหว่างกระบวนการผลิตและการเก็บรักษา (Dalgleish, 1997) ยกตัวอย่างเช่น

1) เวย์ (Whey) เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการทำเนยแข็ง เกิดจากนํานมวัว ไปแยกโปรตีนเคซีน และไขมันออก มีความสามารถในการเกิดอิมัลชัน และป้องกันการเกิดออกซิเดชันได้ (Khorshidi et al., 2021)

2) เจลาติน (Gelatin) เป็นโปรตีนที่ได้จากการไฮโดรไลซิสคอลลาเจน เป็นโปรตีนที่พบในกระดูก หนังสัตว์ และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ของสัตว์ ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ราคาไม่แพง และไม่เป็นพิษ (Chiu et al., 2007)

2.12.3 ลิพิด (Lipid)

เป็นสารที่ไม่มีขี้ขั้ว และไม่ชอบน้ำละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ นิยมใช้ในทางการแพทย์ หรือเครื่องสำอาง มีสมบัติในการป้องกันน้ำได้ดี แต่ไม่ป้องกันออกซิเจน และเหม็นหืนได้ง่าย ตัวอย่างของลิพิด ได้แก่ ไขมัน กรดไขมัน กลีเซอรอล และ ฟอสโฟลิพิด เป็นต้น (อมรรัตน์ ตั้งสกุล, 2552)

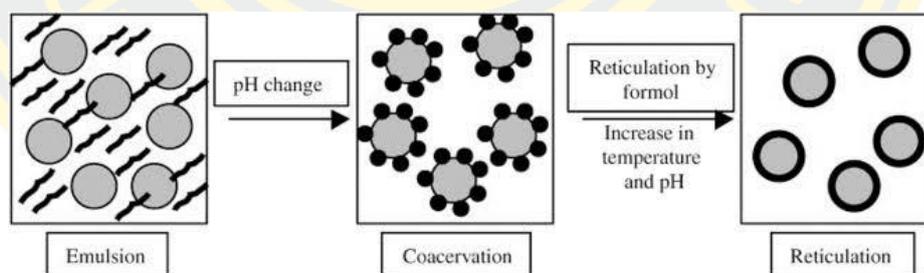
อย่างไรก็ตามในอุตสาหกรรมอาหารพบว่าการใช้พอลิเมอร์ในกลุ่มโปรตีนยังมีข้อจำกัด เนื่องจากสารที่ห่อหุ้มจากโปรตีนยังไวต่อสภาพแวดล้อม เช่น ความชื้น อุณหภูมิ ทำให้ประสิทธิภาพของสารห่อหุ้มเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนั้นพอลิเมอร์ในกลุ่มลิพิดยังเหมาะกับการห่อหุ้มสารที่ชอบน้ำเพียงอย่างเดียว ทำให้ยากต่อการนำไปประยุกต์ใช้ ดังนั้นพอลิแซ็กคาไรด์จึงเป็นพอลิเมอร์ที่น่าสนใจสำหรับนำมาเป็นสารห่อหุ้ม (Timilsena et al., 2020) โดยเฉพาะอย่างยิ่งมอลโตเดกซ์ทรินที่เป็นพอลิเมอร์ที่มีความหนืดต่ำ สามารถละลายได้ดีแม้ในความเข้มข้นสูง สามารถนำมาใช้ในกระบวนการเอนแคปซูเลชันได้ง่าย โดยมีรายงานว่ามอลโตเดกซ์ทรินสามารถป้องกันสารแกนกลางจากสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ กรด/ด่าง ได้ (Cruz-Molina et al., 2021)

อย่างไรก็ตามมอลโตเด็คซ์ตรินเป็นอิมัลซิไฟเออร์ที่ไม่ดี จึงมักใช้ร่วมกันกับสารห่อหุ้มชนิดอื่นเพื่อแก้ปัญหานี้ โดยหนึ่งในพอลิเมอร์ที่นิยมนำมาใช้ร่วมกันกับมอลโตเด็คซ์ตริน คือไคโตซาน เนื่องจาก หาได้ง่าย และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หลายชนิดซึ่งช่วยส่งเสริมฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารต้านจุลินทรีย์ที่นำมาห่อหุ้มได้ โดยจากงานวิจัยของ วิริยะ คชพงษ์ (2562) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเอนแคปซูลชันสารสกัดจากกากกาแฟโดยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยใช้สารห่อหุ้มไคโตซานร่วมกับมอลโตเด็คซ์ตริน พบว่าการเพิ่มปริมาณไคโตซานในอัตราส่วนของสารห่อหุ้มทำให้ความสามารถในการละลายน้ำมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และมีความคงตัวมากขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้ไคโตซานร่วมกับมอลโตเด็คซ์ตริน สามารถปรับปรุงสมบัติของการเอนแคปซูลชันที่ใช้มอลโตเด็คซ์ตรินเพียงชนิดเดียว

2.13 เทคนิคที่ใช้ในกระบวนการเอนแคปซูลชัน

2.13.1 โคอะเคอเวชัน (Coacervation)

เป็นการเอนแคปซูลชัน โดยวิธีทางเคมีใช้สำหรับการเอนแคปซูลเลทสารที่ละลายในไขมัน โดยเป็นการทำให้เกิดคอลลอยด์ด้วยเฟส 3 เฟส ซึ่งไม่ทำละลายต่อกันและกัน (continuous phase) การทำให้เกิดการห่อหุ้มด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่อาศัยความสามารถในการแตกตัวของประจุของพอลิเมอร์ โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดต่าง ทำให้เกิดจับกันของพอลิเมอร์ที่มีประจุแตกต่างกันด้วยแรงทางไฟฟ้า (electrostatic interaction) ดังภาพที่ 2-9

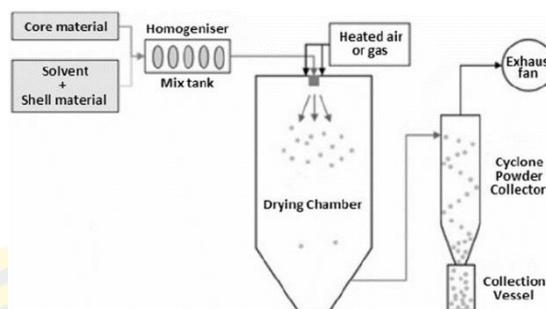


ภาพที่ 9 การเอนแคปซูลชันโดยวิธีโคอะเคอเวชัน

ที่มา: (Eghbal & Choudhary, 2018)

2.13.2 การทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray drying)

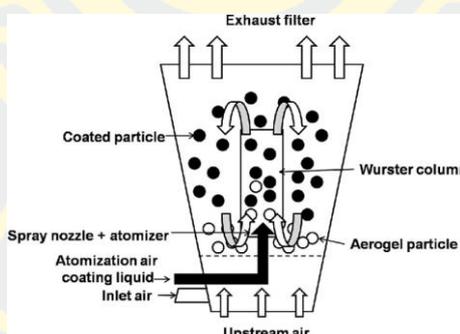
เป็นวิธีการการเอนแคปซูลชันที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย (Rigon & Zapata Noreña, 2016) โดยการทำให้แห้งแบบพ่นฝอยเป็นการนำสารที่ใช้เป็นแกนกลางละลายกับสารห่อหุ้ม แล้วฉีดพ่นออกมาผ่านหัวพ่น (atomizer) โดยมีลมร้อนที่มีอุณหภูมิ 100-160 องศาเซลเซียส ทำให้น้ำเกิดการระเหย ทำให้ได้อนุภาคขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 10-400 ไมครอน ดังภาพที่ 2-10



ภาพที่ 10 การเอนแคปซูเลชัน โดยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย
ที่มา: (Bastos & Santos, 2015)

2.13.3 ฟลูอิดไดส์เบด (Fluidized bed)

เป็นวิธีการเอนแคปซูเลชัน โดยอนุภาคที่ต้องการเคลือบจะเคลื่อนที่ไปพร้อมกับกระแสอากาศ ทำให้วัสดุลอยตัวเป็นอิสระเกิดการสัมผัสกับลมร้อนอย่างสม่ำเสมอ ทำให้มีอัตราการถ่ายเทความร้อนที่สูง สามารถลดความชื้นของวัตถุได้อย่างรวดเร็ว การเอนแคปซูเลชันโดยวิธีฟลูอิดไดส์เบดเป็นการห่อหุ้มสารที่มีอนุภาคเป็นของแข็ง โดยอนุภาคที่ต้องการเคลือบจะถูกทำให้ลอยตัวอยู่ในกระแสน้ำร้อน สารเคลือบจะถูกพ่นฝอยผ่านหัวฉีดและพ่นออกมาเป็นละออง ดังภาพที่ 2-11

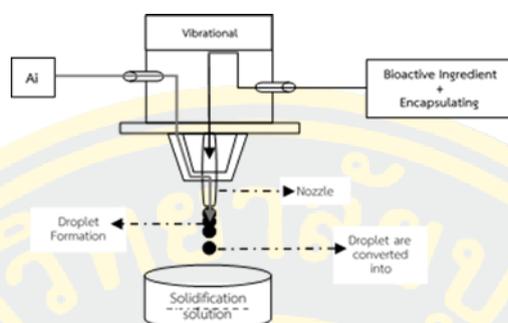


ภาพที่ 11 การเอนแคปซูเลชัน โดยวิธีฟลูอิดไดส์เบด
ที่มา: (Bastos & Santos, 2015)

2.13.4 เอกซ์ทรูชัน (Extrusion)

เป็นวิธีการเอนแคปซูเลชันแบบที่ทำให้เกิดเม็ดเจล ทำได้โดยการเตรียมสารละลายไฮโดรคอลลอยด์ เช่น สารละลายแคลเซียมแอลจีเนต แล้วจึงเติมสารที่ต้องการห่อหุ้มผสมลงไป และใช้วิธีการปล่อยสารแขวนลอยผ่านหัวเข็มฉีดยาให้มีลักษณะเป็นหยด ดังภาพที่ 2-12 ลงใน

สารละลายที่ใช้สำหรับดึงน้ำออกทำให้เจลแข็งตัว โดยทั่วไปนิยมใช้ในการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย เนื่องจากเป็นวิธีการที่ใช้สภาวะไม่รุนแรง ทำให้เซลล์แบคทีเรียมีอัตราการรอดชีวิตสูง

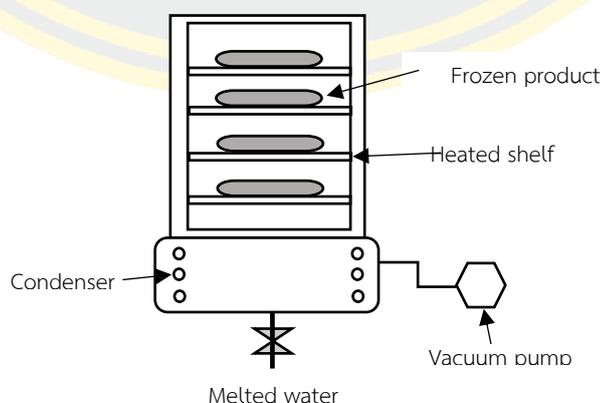


ภาพที่ 12 การเอนแคปซูเลชันโดยวิธีเอกซ์ทรูชัน

ที่มา: คัดแปลงจาก Fangmeier et al. (2019)

2.13.5 การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying) หรือไลโอไฟล์เซชัน (Lyophilization)

เป็นวิธีการเอนแคปซูเลชัน โดยการแช่เยือกแข็ง ทำให้น้ำเปลี่ยนสถานะจากของเหลว กลายเป็นน้ำแข็งที่จุดเยือกแข็งจากนั้นจึงลดความดันบรรยากาศเพื่อให้น้ำแข็งระเหิดกลายเป็นไอ ภายใต้สภาวะสูญญากาศ การทำเอนแคปซูเลชันด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ๆ คือ 1) ผสมสารแกนกลางกับสารห่อหุ้ม 2) แช่เยือกแข็งสารละลายทำให้อุณหภูมิของผนังห่อหุ้มเกิดการอิมตัวอย่างยิ่งยวด และเกิดผลึกรอบๆอนุภาคแกนกลาง 3) ทำการบดเป็นผง เนื่องจากกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นการทำแห้งแบบไม่ใช้ความร้อน วิธีการนี้จึงเหมาะสมแก่การนำไปใช้ในการเอนแคปซูเลชันสารที่ไวต่อความร้อน



ภาพที่ 13 การเอนแคปซูเลชันโดยวิธีแช่เยือกแข็ง

ที่มา: คัดแปลงจาก Fanga and Bhandaria (2012)

มีรายงานว่า การผสมสารต้านจุลินทรีย์ที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันลงในพอลิเมอร์สามารถรักษาความคงตัวของสารต้านจุลินทรีย์ได้ โดยฟิล์มหรือสารเคลือบที่มีการผสมสารต้านจุลินทรีย์ที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์มากกว่า เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี disc-diffusion (Mekkerdchoo et al., 2009; Nonsee et al., 2011) และเมื่อนำไปบรรจุอาหารสามารถยืดอายุการเก็บรักษาไว้ได้นานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มหรือสารเคลือบที่มีการผสมสารต้านจุลินทรีย์ที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (Chen et al., 2019; Zhang et al., 2019) อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่รายงานว่า การเอนแคปซูเลชันสารต้านจุลินทรีย์แล้วนำไปผสมกับพอลิเมอร์ส่งผลให้สมบัติของฟิล์มลดลง (Talón et al., 2019) ดังนั้นจึงควรคำนึงถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อสมบัติของฟิล์มหรือสารเคลือบ เช่น สมบัติการละลาย ความเข้มข้น วิธีการทำเอนแคปซูเลชัน วิธีการผลิตฟิล์ม และน้ำหนักโมเลกุลของสารต้านจุลินทรีย์ที่เอนแคปซูเลชัน

2.14 ปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มที่มีสารต้านจุลินทรีย์เอนแคปซูเลชัน

ในปัจจุบันมีการศึกษาการผสมสารต้านจุลินทรีย์ที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันลงในพอลิเมอร์ โดยฟิล์มหรือสารเคลือบที่มีการผสมสารต้านจุลินทรีย์ที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันมีประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มหรือสารเคลือบที่มีการผสมสารต้านจุลินทรีย์ที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (Mekkerdchoo et al., 2009; Nonsee et al., 2011) อย่างไรก็ตามพบว่าฟิล์มหรือสารเคลือบที่มีการผสมสารต้านจุลินทรีย์ที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันจะมีประสิทธิภาพหรือฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน อันเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆดังนี้

2.14.1 ชนิดของพอลิเมอร์ที่ใช้ทำฟิล์ม

พอลิเมอร์ที่ใช้ในการผลิตฟิล์มมีผลต่อคุณภาพ และความสามารถในการป้องกันการซึมผ่านของก๊าซที่แตกต่างกัน ซึ่งสมบัติของฟิล์มนั้นมีปัจจัยหลักจากสมบัติการชอบน้ำของพอลิเมอร์ โดยสามารถแบ่งพอลิเมอร์ที่ใช้ในการผลิตฟิล์มตามลักษณะการชอบน้ำออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ พอลิเมอร์ที่ชอบน้ำ เช่น โปรตีนถั่วเหลือง (soy protein) และเวย์โปรตีน (whey protein) และพอลิเมอร์ที่ไม่ชอบน้ำ เช่น เซอีน (zein) และขี้ผึ้ง (wax) ซึ่งพอลิเมอร์ที่ไม่ชอบน้ำเหล่านี้จะละลายได้ในสารที่ไม่มีขั้ว เช่น แอลกอฮอล์ โดยความแตกต่างของสมบัติในการชอบน้ำของวัสดุเหล่านั้นจะมีผลต่อสมบัติของฟิล์ม โดยจะมีผลทำให้ฟิล์มมีสมบัติในการป้องกันการซึมผ่านไอน้ำที่แตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลต่อความสามารถในการปลดปล่อยสารต้านจุลินทรีย์ โดยมีรายงานว่า การใช้ เซลลูโลส หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส เป็นพอลิเมอร์ในการทำฟิล์มจะทำให้ฟิล์มที่ได้มีความแข็งแรง แต่ฟิล์มที่ได้จะมีสมบัติในการป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำต่ำ (Bourtoom, 2008) โปรตีนมีสมบัติในการ

ป้องกันการซึมผ่านของก๊าซได้ดี แต่การป้องกันไอน้ำไม่ดี ในขณะที่ไขมันซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ไม่ชอบน้ำ เช่น จีพีซี กรดไขมัน เมื่อนำมาผลิตฟิล์ม ฟิล์มที่ได้จะสามารถป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำได้ดีเยี่ยม แต่สมบัติเชิงกลไม่ดี (Rhim & Shellhammer, 2005) โดยหากฟิล์มมีความสามารถในการป้องกันการซึมผ่านไอน้ำได้ต่ำ ความชื้นจะสามารถซึมผ่านเข้าสู่ฟิล์มได้มาก ซึ่งอาจส่งผลให้เอนแคปซูเลชันสารต้านจุลินทรีย์ได้รับความเสียหาย นอกจากนี้หากพอลิเมอร์ที่นำมาใช้ทำฟิล์มทำให้สมบัติทางกล หรือทางกายภาพของฟิล์มต่ำฟิล์มที่ได้ อาจไม่มีความสามารถเพียงพอที่จะกักเก็บเอนแคปซูเลชันสารต้านจุลินทรีย์ที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันไว้ได้

2.14.2 ชนิดของสารห่อหุ้ม

สารห่อหุ้มที่ใช้ในการเอนแคปซูเลชันจะต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารแกนกลาง ปกป้องสารแกนกลางจากสภาพแวดล้อม และสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ภายใต้สภาวะและช่วงเวลาที่ต้องการได้ โดยสารห่อหุ้มแต่ละชนิดจะมีสมบัติที่แตกต่างกัน เช่น สมบัติความหนืด สมบัติความชอบ/ไม่ชอบน้ำ และหมู่ฟังก์ชัน จากรายงานของ Navarro et al. (2016) รายงานว่าฟิล์มแอลจินेटที่ผสมสารต้านจุลินทรีย์น้ำมันไทม์ (thyme oil) ที่ใช้ เบต้า-ไซโคลเดกซ์ทริน (β -cyclodextrin) เป็นวัสดุห่อหุ้มเกิดบริเวณยับยั้งกว้างกว่า การใช้ทรีฮาโลส (trehalose) และทวิน 20 (tween 20) เป็นสารห่อหุ้ม ทั้งนี้เนื่องจาก เบต้า-ไซโคลเดกซ์ทริน (β -cyclodextrin) มีความสามารถในการละลายต่ำจึงสามารถป้องกันสารต้านจุลินทรีย์ที่เป็นสารแกนกลางได้ดีกว่าสารที่มีความสามารถละลายได้สูง จึงมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ที่สูงขึ้น นอกจากนี้ Chen et al. (1996) รายงานว่าการใช้ไคโตซานเป็นสารห่อหุ้มมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ได้ดีกว่าการใช้เมทิลเซลลูโลส (methylcellulose) เนื่องจากหมู่เอมีนของไคโตซานสามารถจับกับหมู่คาร์บอกซิลของสารต้านจุลินทรีย์ได้ดี จึงช่วยให้การปลดปล่อยของสารต้านจุลินทรีย์ที่ถูกห่อหุ้มเป็นไปอย่างช้าๆ ในระหว่างระยะเวลาการเก็บรักษา ในขณะที่เมทิลเซลลูโลสไม่มีประจุไฟฟ้า

2.14.3 ชนิดของสารต้านจุลินทรีย์

สารต้านจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน เนื่องจากสารต้านจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีกลไกในการต้านจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันตามแต่ละชนิดและแหล่งที่มา ดังนั้นจึงต้องคำนึงถึงชนิดและกลไกของสารต้านจุลินทรีย์เพื่อให้เหมาะกับชนิดของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ความเข้ากันได้ระหว่างสารต้านจุลินทรีย์และสารห่อหุ้มอาจมีผลต่อฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงต้องเลือกใช้สารต้านจุลินทรีย์ให้เหมาะสมกับสารห่อหุ้ม เช่น หากสารต้านจุลินทรีย์เป็นกลุ่มน้ำมัน ควรเลือกใช้สารห่อหุ้มที่มีสมบัติที่ชอบน้ำเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการกักเก็บ นอกจากนี้ขนาดของสารต้านจุลินทรีย์ก็ยังมีผลต่อฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์อีกด้วย โดยจากรายงานของ Chen et al. (2019) ซึ่งทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มเอทิลีนไวนิลแอลกอฮอล์ (EVOH) ที่มีชิทอรอล

(cital) และทราน-ซินนามัลดีไฮด์ (trans-cinnamaldehyde) โดยใช้เบต้า-ไซโคลเดกซ์ทริน (β -cyclodextrin) เป็นวัสดุห่อหุ้ม พบว่าฟิล์มเอทิลีนไวนิลแอลกอฮอล์ที่เอนแคปซูลทราน-ซินนามัลดีไฮด์มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้นมากกว่าฟิล์มที่มีชิทโรลที่ถูกเอนแคปซูลแล้ว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฟิล์มที่มีชิทโรลที่ถูกเอนแคปซูลแล้วมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์สูงกว่า ทั้งนี้เนื่องจากขนาดโมเลกุลของทราน-ซินนามัลดีไฮด์ที่ใหญ่กว่าเมื่อเทียบกับชิทโรลทำให้การปลดปล่อยสารต้านจากสารห่อหุ้มเป็นไปได้ยากกว่า

2.13.4 ความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์

ความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นเป็นผลทำให้ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น ด้วยจากรายงานของ Nonsee et al. (2011) ซึ่งทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มไฮดรอกซีโพรพิล เมทิลเซลลูโลส (HPMC) ที่มีน้ำมันกานพลูโดยใช้โคโคซานเป็นวัสดุห่อหุ้มพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่ถูกเอนแคปซูลแล้วเป็นผลให้พื้นที่การยับยั้งของ *L. monocytogenes*, *E. coli* และ *S. aureus* กว้างขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันรายงานเกี่ยวกับการผสมสารต้านจุลินทรีย์จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากอุตสาหกรรมอาหารที่ผ่านการเอนแคปซูลลงในพอลิเมอร์บรรจุภัณฑ์ที่สามารถย่อยสลายหรือบริโภคนได้ยังมีอยู่จำกัด และยังไม่มีการนำกากกาแฟซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการผลิตกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลแล้วผสมลงในพอลิเมอร์บรรจุภัณฑ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาฟิล์มต้านจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายหรือบริโภคนได้ เพื่อเป็นแนวทางสำหรับนำไปใช้เป็นบรรจุภัณฑ์อาหารต้านจุลินทรีย์ และยังเป็นการเพิ่มคุณค่าให้กากกาแฟซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากกระบวนการผลิตเครื่องดื่มกาแฟอีกด้วย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

กากกาแฟ (Coffee ground, C) ได้รับความอนุเคราะห์จากร้านกาแฟสตาร์บัคส์ (Starbucks) สาขาแหลมทอง ถนนลงหาดบางแสน อ.เมืองชลบุรี จ.ชลบุรี

3.2 สายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองได้รับมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ประเทศไทย ประกอบด้วย

- 1) *Bacillus subtilis* TISTR1984
- 2) *Escherichia coli* TISTR527
- 3) *Salmonella enterica serovar Typhimurium* TISTR2519
- 4) *Staphylococcus aureus* TISTR2329

3.3 สารเคมี

- 1) กรดแกลลิก (Gallic acid) (Sigma-Aldrich, China)
- 2) กรดคลอโรจีนิก (Chlorogenic acid) (Sigma-Aldrich, China)
- 3) กลีเซอรอล (Glycerol) (Ajex Finechem, Australia)
- 4) คาเฟอีน (Caffeine) (Sigma-Aldrich, China)
- 5) ไคโตซาน DD 90 % (Chitosan) (หจก.กฤษภูมิรงค์ , Thailand)
- 6) โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) (Ajex Finechem, Australia)
- 7) โซเดียมคาร์บอเนต แอนไฮไดรต (Sodium carbonate, anhydrous) (Ajex Finechem, Australia)
- 8) โซเดียม อะไซด์ (Sodium azide) (Labo Chemie, India)
- 9) ดีพีพีเอส (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH) (Sigma-Aldrich, Germany)
- 10) ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) (RCI Ladscan, Thailand)
- 11) ทีพีทีซี (2, 4, 6-Tripyridy-striazine; TPTZ) (Sigma, Switzerland)

- 12) โทรล็อกซ์ (Trolox) (Sigma-Aldrich, China)
- 13) เปปโตน (Peptone) (Himedia, India)
- 14) เพนนิซิลลิน (Penicillin) ยี่ห้อ A.N.B.
- 15) เฟอร์รัสซัลเฟต ไฮเดรต (Ferrous sulfate) (Ajex Finechem, Australia)
- 16) เฟอริกคลอไรด์ ไฮเดรต (Ferric chloride) (AppliChem Panreac ITW, Germany)
- 17) มอลโตเดกซ์ตริน DE 10-12 % (Maltodextrin) (Chemipan Co., Thailand)
- 18) สารละลาย Folin-Ciocalteu's reagent (Sigma-Aldrich, Germany)
- 19) อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) (RCI Ladscan, Thailand)
- 20) แอมพิซิลลิน (Ampicillin) ยี่ห้อ T.MAN

3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) รุ่น LEO 1450 VP บริษัท LEO Electron ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 2) เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) รุ่น SCANVAC Coolsafe 110-4 บริษัท LABOGENE ประเทศแคนาดา
- 3) เครื่องปั่นผสม (Homogenizer) รุ่น PT 2000 บริษัท KINEMATICA ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 4) เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator) รุ่น RC900 บริษัท KnF ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 5) เครื่องวัดสารด้วยการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometer) รุ่น GEN10S UV VIs บริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 6) เครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส (Texture analyzer) รุ่น TA-XT. plus บริษัท Charpa Techcenter ประเทศอังกฤษ
- 7) เครื่องหมุนเหวี่ยง รุ่น Z 32 K บริษัท HERMLE Labortechnik GmbH ประเทศเยอรมนี
- 8) ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น BE600 ยี่ห้อ Memmert ประเทศเยอรมนี
- 9) ตู้ปลอดเชื้อ (Biological safety cabinet) รุ่น 527042 บริษัท HOTPACK for an extra degree of control ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 10) พิมพ์ซิลิโคนขึ้นรูปฟิล์มขนาด 19 x 19 ตารางเซนติเมตร

- 11) ฟิล์มพอลิโพรพิลีน (Polypropylene film)
- 12) ไมโครมิเตอร์
- 13) หม้ออบแรงดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น H99LL บริษัท KOKUSAN ประเทศญี่ปุ่น

3.5 วิธีดำเนินการทดลอง

3.5.1 การศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH)

- 1) การเตรียมสารสกัดจากกากกาแฟ (coffee ground extract, C preparation)

เตรียมสารสกัดจากกากกาแฟตามวิธีของ Aprilia et al. (2014) โดยอบกากกาแฟที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งกากกาแฟมีปริมาณความชื้นน้อยกว่าร้อยละ 13 จากนั้นจึงนำกากกาแฟผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1: 10 ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จึงกรองด้วยผ้ามีสลิน และนำสารละลายส่วนใสไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใสไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบลดความดัน (rotary evaporator) ที่ 50 องศาเซลเซียส ความดัน 62 มิลลิบาร์ ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนได้สารที่มีลักษณะขุ่นหนืด เก็บสารดังกล่าวในขวดแก้วและปิดด้วยพาราฟิล์มเจาะรู เก็บไว้ในโถดูดความชื้นจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ หลังจากนั้นนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการทดลองต่อไป

- 2) การเตรียมฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-impregnated chitosan film, C-CH)

เตรียมฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH) ตามวิธีของ Jaisan and Punbusayakul (2016) โดยผสมผง C ในปริมาณต่างๆ กัน (0.0, 0.25, 0.5, 0.75, และ 1.0 % น้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายฟิล์ม) ลงในสารละลายกรดอะซิติก (1 % โดยปริมาตร) ปริมาณ 150 มิลลิลิตร กวนผสมเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมผงไคโตซาน (2 % น้ำหนักต่อปริมาตร) 3 กรัม และกวนผสมต่ออีกเป็นเวลา 60 นาที หรือจนกว่าส่วนผสมจะใส เติมกลีเซอรอล (30 % ของน้ำหนักไคโตซาน) 0.9 กรัม และกวนผสมต่อให้เข้ากัน 30 นาที เทสารผสมดังกล่าวปริมาณ 115 มิลลิลิตร ลงบนพิมพ์ซิลิโคนขนาด 19 x 19 ตารางเซนติเมตร นำไปทำแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำฟิล์มที่ได้ไปบ่มที่ความชื้นสัมพัทธ์ 50±5 % อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ต่อไป

3) การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มไบโโพลิเมอร์ที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน

(1) การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มในการทดลอง ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* TISTR2329 และ *Bacillus subtilis* TISTR1984 และแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* TISTR527 และ *Salmonella typhimurium* TISTR2519 เตรียมเชื้อแบคทีเรียโดยถ่ายกล้ำเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง Mueller hinton agar (MHA) โดยวิธี steak plate ให้ได้โคโลนีเดี่ยวแล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายโคโลนีเดี่ยวที่ได้ลงในสารละลายน้ำเกลือ 0.85 % ปลอดเชื้อ แล้วทำการปรับความขุ่นให้ได้ความขุ่นมาตรฐานเท่ากับ 0.5 McFarland (1.5×10^8 CFU/มิลลิลิตร) ได้สารแขวนลอยเชื้อเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ 3 วิธี ได้แก่ วิธีการแพร่บนอาหารแข็ง (Disc diffusion method) วิธีการหยดลงบนฟิล์ม (Drop test method) และวิธีการทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ในอาหารเหลว (Migration testing method)

(2) การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์โดยวิธีการแพร่บนอาหารแข็ง (Disc diffusion method)

วิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์โดยวิธีการแพร่บนอาหารแข็ง โดยดัดแปลงวิธีมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009) โดยใช้ cotton swab จุ่มลงในสารแขวนลอยของแบคทีเรียที่เตรียมไว้ (1.5×10^8 CFU/มิลลิลิตร) ในข้อ 1) มาเกลี่ยลงบนอาหาร MHA ให้ทั่ว จากนั้นนำแผ่นฟิล์มที่จะทดสอบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย UV เป็นเวลา 30 นาที วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA โดยใช้เพนนิซิลลิน (penicillin) หรือแอมพิซิลลิน (ampicillin) 10 ไมโครกรัม หยดลงบนแผ่นกระดาษกรองปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวก (positive control, P) สำหรับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ ตามลำดับ และใช้น้ำเกลือปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control, N) นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นจึงวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ในหน่วยมิลลิเมตร

(3) การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์โดยวิธีการหยดลงบนฟิล์ม (Drop test method)

วิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์โดยวิธีการหยดลงบนฟิล์ม โดยดัดแปลงวิธีของ Sun et al. (2008) โดยตัดตัวอย่างฟิล์มขนาด 1 x 1 ตารางเซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย UV เป็นเวลา 30 นาที วางลงบนแผ่นสไลด์แก้วที่อยู่ในเพลทปลอดเชื้อ จากนั้นหยดสารแขวนลอยแบคทีเรีย

(1.5×10^8 CFU/มิลลิลิตร) ในข้อ 1) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนฟิล์ม ปิดทับด้วยฟิล์มพอลิโพรพิลีน (polypropylene, PP) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย UV แล้ว และปิดฝาเฟลต นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จึงนำตัวอย่างฟิล์มใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ ที่มีสารละลายน้ำเกลือปลอดเชื้อปริมาตร 990 ไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร และเจือจางจนได้ความเจือจางที่เหมาะสม เพื่อนำไปวิเคราะห์จำนวนเชื้อโดยวิธี drop plate technique (Herigstad et al., 2001) โดยเปิดตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA 5 ตำแหน่ง ต่อระดับความเจือจาง และนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี และคำนวณจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เป็น CFU/มิลลิลิตร

(4) การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ในอาหารเหลว (Migration testing method)

วิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ในอาหารเหลว โดยดัดแปลงวิธีของ Min et al. (2010) โดยตัดตัวอย่างฟิล์มให้มีขนาด 1×1 ตารางนิ้ว ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย UV เป็นเวลา 30 นาที นำไปแช่ในสารแขวนลอยของแบคทีเรีย (1.5×10^8 CFU/มิลลิลิตร) 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองจำนวน 5 หลอด นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ 180 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 8 วัน และสุ่มตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในวันที่ 0 2 4 6 และ 8 วัน เพื่อวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ โดยเจือจางสารละลายตัวอย่างจนได้ความเจือจางที่เหมาะสม และนำไปนับจำนวนเชื้อโดยวิธี drop plate technique เช่นเดียวกับข้อ 3) และคำนวณจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เป็น CFU/มิลลิลิตร

จากนั้นจึงเลือกฟิล์มที่มีสารสกัดจากกากกาแฟ (C-CH) ที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์สูงที่สุด 3 สภาวะ เพื่อนำไปใช้ในการทดลองที่ 3.5.2 ต่อไป

3.5.2 การศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (eC-CH) เปรียบเทียบกับฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (C-CH)

1) การเอนแคปซูลชันสารสกัดจากกาแฟ (Encapsulation of coffee ground extract)

เตรียมเอนแคปซูลของสารสกัดจากกาแฟ (Encapsulated coffee ground extract, eC) ตามวิธีของ Khotchapong and Punbusayakul (2019) โดยผสมสารสกัดจากกาแฟ (C) กับสารห่อหุ้ม (wall material) ได้แก่ ไคโตซาน (chitosan) และมอลโตเดกซ์ตริน (maltodextrin) โดยกำหนดให้ ความเข้มข้นของสารห่อหุ้มไคโตซานเป็นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก (ไคโตซาน 2 กรัม ผสมกับอะซิเตทบัฟเฟอร์ (acetate buffer) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลลาร์ (pH = 4) 98 กรัม ที่อุณหภูมิห้องเป็น stock solution) และมอลโตเดกซ์ตรินความเข้มข้นร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก (มอลโตเดกซ์ตริน 12 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นเป็น stock solution) โดยผสมสารห่อหุ้มของสารละลายสารห่อหุ้มไคโตซาน

ต่อมอลโตเดกซ์ตริน เป็น 86:14 โดยน้ำหนัก จึงผสมสารละลายสารห่อหุ้มไคโตซาน/มอลโตเดกซ์ตรินต่อสารสกัดกากกาแฟ เป็น 14:86 โดยน้ำหนัก จากนั้นจึงทำให้สารผสมของสารห่อหุ้มไคโตซาน/มอลโตเดกซ์ตริน และสารสกัดกากกาแฟให้เข้ากันด้วยเครื่องโฮโมจิไนซ์เซอร์ ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำไปประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน โดยใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความดัน 62 มิลลิบาร์ ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนได้สารที่มีลักษณะขุ่นหนืด เก็บสารดังกล่าวในขวดแก้วและปิดด้วยพาราฟิล์มเจาะรู เก็บไว้ในโถดูดความชื้นจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ หลังจากนั้นนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งได้เป็นสารสกัดกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC) นำไปเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

2) การเตรียมฟิล์มและทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน

เตรียมฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.5.1 โดยผสม eC ลงในสารละลายฟิล์มแทน C ให้มีปริมาณ C เทียบเท่ากับปริมาณ C ที่ทำให้ฟิล์มมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์สูงสุด 3 สภาวะ จากนั้นจึงวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.5.1 และวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของฟิล์ม eC-CH เทียบกับ C-CH ทุกความเข้มข้น โดยมีรายละเอียดดังนี้

3) การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในฟิล์ม C-CH และ eC-CH

(1) การเตรียมสารละลายฟิล์ม

เตรียมสารละลายฟิล์ม โดยดัดแปลงวิธีของ Siripatrawan and Harte (2010) โดยตัดตัวอย่างฟิล์มให้มีน้ำหนักประมาณ 0.30 กรัม นำไปแช่ในน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้สารละลายฟิล์มสำหรับไปวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญในฟิล์ม

(2) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compounds, TPC)

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยดัดแปลงวิธีของ Singleton et al. (1999) โดยปีเปตสารละลายฟิล์มตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร จากข้อ (1) ใส่หลอดทดลอง และเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu's reagent เข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ลงไป 5 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 7.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ลงไป 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น

765 นาโนเมตร จำนวนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเป็นมิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมฟิล์ม ไคโตซาน (mg gallic acid equivalent (mg GAE)/ g film) โดยใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารละลายมาตรฐาน

(3) ปริมาณกรดคลอโรจินิกและคาเฟอีน (chlorogenic acids and caffeine compound)

วิเคราะห์ปริมาณกรดคลอโรจินิก และคาเฟอีน โดยดัดแปลงวิธีของ Belay and Gholap (2009); Belay et al. (2008) โดยนำสารละลายฟิล์มตัวอย่างจากข้อ (1) ผสมกับไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) ในอัตราส่วน 20:20 มิลลิลิตร เติมน้ำในกรวยแยกและเขย่าเป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนด้านล่างที่สกัดได้ใส่ลงในบีกเกอร์ จากนั้นเติมไดคลอโรมีเทนอีก 10 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยกอีกครั้ง และเขย่าเป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง นำสารละลายส่วนด้านล่างที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมารวมกัน แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณคาเฟอีน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 276 นาโนเมตร และนำสารละลายด้านบนที่เหลืออยู่ไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดคลอโรจินิกโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 324 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณคาเฟอีนเป็นมิลลิกรัมคาเฟอีนต่อกรัมของฟิล์ม ไคโตซาน (mg caffeine (mg CF)/ g film) และปริมาณกรดคลอโรจินิกเป็นมิลลิกรัมกรดคลอโรจินิกต่อกรัมของฟิล์ม ไคโตซาน (mg chlorogenic acid (mg CGA)/ g film)

4) การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ของฟิล์ม C-CH และ eC-CH

(1) การเตรียมสารละลายฟิล์ม

เตรียมสารละลายฟิล์มเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3) ข้อ (1) ได้สารละลายฟิล์มสำหรับไปวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ของฟิล์ม

(2) วิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH assay

วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ตามวิธีของ Brand-Williams et al. (1995) โดยปีเปตสารละลายฟิล์มตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DPPH (1 มิลลิโมลาร์ DPPH ในเมทานอล 95 %) ปริมาตร 1950 ไมโครลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอล 95 % เป็น blank และคำนวณหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยรายงานผลเป็นมิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมฟิล์ม ไคโตซาน (mg gallic acid equivalent (mg GAE)/ g film) โดยใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารละลายมาตรฐาน

(3) วิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี FRAP assay

วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP assay ตามวิธีของ Benzie and Strain (1996) เริ่มจากเตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยผสมอะซิเตตบัฟเฟอร์ (pH 3.6) ความเข้มข้น

300 มิลลิโมลาร์ กับ 2, 4, 6-Tripyridy-striazine (TPTZ) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งละลายในกรดไฮดรอกลอลริก ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 10:1:1 จะได้เป็นสารละลาย FRAP reagent สำหรับการนำไปวิเคราะห์โดยเปิดสารละลายฟิล์มตัวอย่างจากข้อ 1) 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง และเติมสารละลาย FRAP reagent ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร และใช้น้ำกลั่นเป็น Blank โดยรายงานผลเป็นกรัมสมมูลเฟอร์รัสซัลเฟตต่อ 100 กรัมฟิล์มไคโตซาน (g FeSO₄ equivalent, (FE) / 100 g film) โดยใช้เฟอร์รัสซัลเฟต (ferrous sulfate) เป็นสารละลายมาตรฐาน

จากนั้นจึงเลือกฟิล์มที่ผสมสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชันที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ สูงที่สุด 1 สภาวะไปใช้ในการศึกษาสมบัติทางกายภาพ ทางกล ทางเคมีกายภาพ และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟิล์มต่อไป

3.5.3 การศึกษาสมบัติทางกายภาพ ทางกล ทางเคมีกายภาพ และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (eC-CH)

1) การเตรียมฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน

เตรียมฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (C-CH) เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.5.2 โดยผสม eC และ C ลงในสารละลายฟิล์มให้มีปริมาณ eC เทียบเท่ากับปริมาณ C ที่ทำให้ฟิล์มมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ สูงที่สุด 1 สภาวะแล้ว จึงนำไปวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ ทางกล ทางเคมีกายภาพ และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟิล์มดังนี้

2) การศึกษาสมบัติทางกายภาพของฟิล์ม eC-CH

(1) การวัดความหนาของฟิล์ม (Film thickness)

วัดความหนาของฟิล์ม โดยตัดตัวอย่างฟิล์มขนาด 5 × 5 ตารางเซนติเมตร วัดความหนาโดยใช้ไมโครมิเตอร์ที่ตำแหน่งต่าง ๆ กัน 5 ตำแหน่ง และรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยความหนาของฟิล์ม (มิลลิเมตร)

(2) วิเคราะห์ความทึบแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Opacity)

วิเคราะห์ความทึบแสง โดยตัดแปลงจากวิธีทดสอบตามมาตรฐาน ASTM D1746-15 (2015) โดยตัดฟิล์มให้มีขนาด 1.5 x 1.5 ตารางเซนติเมตร ใส่ลงในเซลล์วัดค่าการดูดกลืนแสง

(spectrophotometer cell) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และคำนวณค่าความทึบแสงได้ตามสมการที่ (1)

$$\text{Opacity} = \left(\frac{A_{600}}{X} \right) \quad (1)$$

กำหนดให้ A_{600} = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่ 600 นาโนเมตร
 X = ความหนาของฟิล์ม (มิลลิเมตร)

3) การศึกษาสมบัติเชิงกลของฟิล์ม

วิเคราะห์สมบัติเชิงกลของฟิล์มโดยดัดแปลงวิธีมาตรฐาน ASTM D882-18 (2018) ได้แก่ ทดสอบการต้านทานแรงดึง (tensile strength: TS) และค่าการยืดตัวเมื่อขาด (elongation at break: EAB) ด้วยเครื่อง Texture Analyzer รุ่น TA-XT. plus ใช้หัวทดสอบชนิด A/TG และ load cell 5 กรัม โดยตัดฟิล์มเป็นแผ่นสี่เหลี่ยมขนาด 7 x 1 ตารางเซนติเมตร กำหนดระยะห่างหัวยึดด้านบนและด้านล่าง 5 เซนติเมตร และกำหนดความเร็วในการดึงเป็น 10 มิลลิเมตรต่อนาที

4) การศึกษาสมบัติเคมีกายภาพของฟิล์ม (Physico-chemical properties)

(1) ทดสอบความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์ม (water solubility, WS)

ทดสอบความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มดัดแปลงวิธีจาก Gontard et al. (1992) โดยตัดฟิล์มให้มีขนาด 2 x 2 ตารางเซนติเมตร นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บในโถดูดความชื้น จากนั้นนำฟิล์มไปชั่งน้ำหนักที่แน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) หลังจากนั้นใส่ฟิล์มลงไปในขวดรูปชมพู่ขนาด 25 มิลลิลิตร ที่มีโซเดียมอะซิเต้ (20 % น้ำหนักต่อปริมาตร) ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองวัทแมนเบอร์ 4 ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำกระดาษกรองไปอบ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาเวลา 24 ชั่วโมง เก็บในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) จากนั้นจึงนำมาคำนวณค่าความสามารถในการละลายน้ำ ดังสมการที่ (2) ดังนี้

$$\text{ความสามารถในการละลายน้ำ (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักฟิล์มก่อนอบ (กรัม)} - \text{น้ำหนักฟิล์มหลังอบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักฟิล์มก่อนอบ (กรัม)}} \times 100 \quad (2)$$

(2) ทดสอบอัตราการซึมผ่านไอน้ำ (water vapor transmission rate testing, WVTR)

ทดสอบอัตราการซึมผ่านไอน้ำ โดยดัดแปลงจากวิธีทดสอบตามมาตรฐาน ASTM E96 (1996) นำขวดแก้วทรงกระบอกที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางปากขวด 2 เซนติเมตร สูง 6 เซนติเมตร มาใส่ซิลิกาบีทที่อบแห้งแล้วประมาณ 5 กรัม ทาก里斯ที่ขอบปากถ้วยทดสอบ ปิดปากขวดด้วยฟิล์มตัวอย่างขนาด 5×5 ตารางเซนติเมตร แล้วรัดด้วยพาราฟิล์ม ชั่งน้ำหนักทั้งหมดด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง จากนั้นนำขวดไปวางลงในโถดูดความชื้นที่บรรจุน้ำกลั่นไว้ภายใน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงชั่งน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงทุกๆ 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 2 วัน นำค่าที่ได้ไปพลอตกราฟระหว่างน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อเวลา โดยให้เวลาเป็นแกน x และน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเป็นแกน y และนำค่าความชันมาคำนวณค่าอัตราการซึมผ่านของไอน้ำ (water vapor transmission rate, WVTR) จำนวนได้ตามสมการที่ (3)

$$\text{WVTR (g/m}^2\cdot\text{day)} = \frac{G/T}{A} = \frac{\text{Slope}}{A} \quad (3)$$

กำหนดให้ G/T = อัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักต่อเวลา หาได้จากความชันของกราฟระหว่างเวลากับน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลง

A = พื้นที่ผิวของตัวอย่าง (m^2)

5) โครงสร้างพื้นฐานวิทยา (Morphology) ของฟิล์ม eC-CH

ตรวจสอบลักษณะพื้นผิวของตัวอย่างฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด scanning electron microscope (SEM) ยี่ห้อ LEO รุ่น LEO1450VP โดยตัดตัวอย่างฟิล์มขนาดประมาณ 1×1 เซนติเมตร ติดตั้งลงบนแท่นตัวอย่าง (stub) และเคลือบด้วยทองคำก่อนนำเข้าเครื่อง SEM ทำการส่องภาพ 2 บริเวณ คือ พื้นผิวหน้าของฟิล์ม และภาพตัดขวางของฟิล์ม โดยใช้กำลังขยาย 50 และ 500 เท่า ตามลำดับ

3.5.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

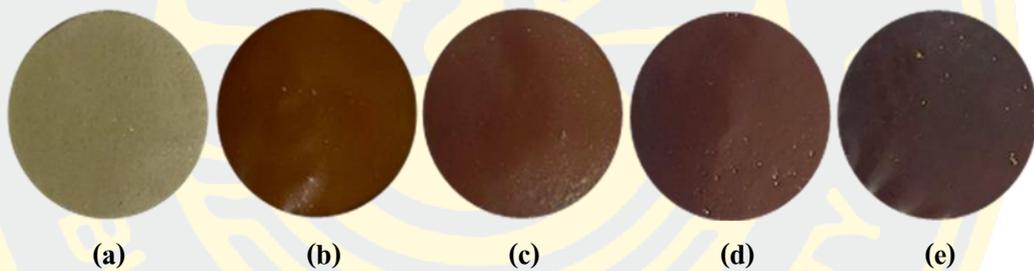
วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (analysis of variance, ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's test โดยใช้โปรแกรม Minitab version 18

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลของการศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH)

จากการทดลองสามารถสกัดสารสกัดจากกากกาแฟ (C) ตามวิธีของ Aprilia et al. (2014) ได้ปริมาณสารสกัด C อยู่ในช่วงระหว่าง 6.0 – 6.6 % ของน้ำหนักแห้งของผงกากกาแฟ และเมื่อผสม C ในสารละลายขึ้นรูปฟิล์มในปริมาณร้อยละ 0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายขึ้นรูปฟิล์ม ได้เป็นฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟ (C-CH) แสดงดังภาพที่ 4-1 โดยพบว่าเมื่อปริมาณของ C ในฟิล์มเพิ่มขึ้น ฟิล์ม C-CH มีสีน้ำตาลเข้มขึ้นตามสีของ C ที่เพิ่มขึ้น

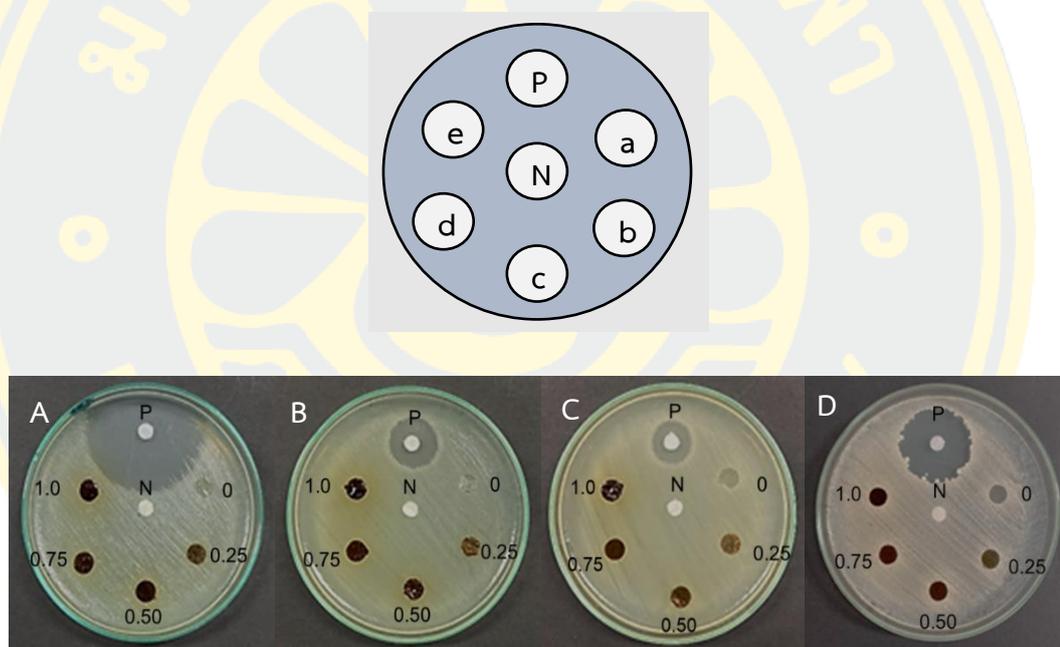


ภาพที่ 14 ฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟ (C) ในปริมาณต่าง ๆ กัน (a) 0 % (b) 0.25 % (c) 0.5 % (d) 0.75 % (e) 1.0 %

4.1.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน โดยวิธีการแพร่บนอาหารแข็ง (Disc diffusion method)

ภาพที่ 4-2 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์ม C-CH ที่มีปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) โดยวิธีการแพร่บนอาหารแข็งกับจุลินทรีย์ 4 สาย พันธุ์ ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* TISTR2329 และ *Bacillus subtilis* TISTR1984 และ แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* TISTR527 และ *Salmonella typhimurium* TISTR2519 พบว่าไม่ปรากฏโซนยับยั้งของฟิล์ม C-CH ที่มี C ในทุกระดับความเข้มข้นต่อเชื้อที่ทดสอบทุกชนิด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณของ C ที่เติมลงในสารละลายฟิล์มมีปริมาณน้อยเกินไปที่จะสามารถแพร่ไปบนอาหารแข็งและส่งผลยับยั้งจุลินทรีย์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Getachew et al. (2021) ที่ศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มเจลาตินที่มีสารสกัดของ C พบว่าต้องมี C ในฟิล์ม

ถึง 5 % จึงสามารถพบโซนยับยั้ง ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของสารประกอบฟีนอลิกใน C กับหมู่เอมีน (-NH₂) ของไคโตซานทำให้สารประกอบฟีนอลิกที่เป็นสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สำคัญของสารสกัดที่ผสมอยู่ในฟิล์มไม่สามารถแพร่ออกมาจากฟิล์มเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ได้ (Pranoto et al., 2005; Solikhin et al., 2018) อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยของ Piegat et al. (2021) ที่ศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มไคโตซานที่ผสมกรดคลิโนเลอิกพบว่าในการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion และ agar impregnation ฟิล์มไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้ แต่เมื่อทดสอบด้วยวิธี Microdilution ฟิล์มสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *E. coli* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาจพบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์ม C-CH ด้วยวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์วิธีอื่นได้



ภาพที่ 15 บริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ A) *Staphylococcus aureus* TISTR2329 B) *Bacillus subtilis* TISTR1984 C) *Escherichia coli* TISTR527 D) *Salmonella typhimurium* TISTR2519 ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟ (C) ในปริมาณต่าง ๆ กัน (a) 0 % (b) 0.25 % (c) 0.5 % (d) 0.75 % (e) 1.0 % และ (N) Negative control (P) Positive control

4.1.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูลชัน โดยวิธีการหยดลงบนฟิล์ม (Drop test method)

ในขณะที่ไม่พบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของฟิล์ม C-CH ทุกตัวอย่างเมื่อทดสอบด้วยวิธีการแพร่ แต่เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์ม C-CH โดยวิธีการหยดลงบนฟิล์ม กับ

แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ดังกล่าวพบว่า फिल्म C-CH สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบทุกสายพันธุ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) รวมทั้ง फिल्म C-CH มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเมื่อ ปริมาณของ C ใน फिल्म เพิ่มขึ้นด้วย ดังแสดงในตารางที่ 4-1 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jaisan and Punbusayakul (2016) ที่ศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของ फिल्म โคลิโดซานที่ผสมสารสกัดเนื้อผล กาแฟพบว่า फिल्म สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. Cereus* *B. subtilis* *E. coli* และ *P. fluorescense* ได้ และมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของสารสกัดเนื้อผลกาแฟใน फिल्म เพิ่มขึ้น ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากกรดคลอโรจีนิกซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในเนื้อผลกาแฟ และ C ที่มีประจุเป็น บวกสามารถละลายน้ำอยู่ในรูปของสารละลาย ประกอบด้วยหมู่เอมีนของโคลิโดซานที่เป็นประจุบวก เช่นกันสามารถจับกับไปจับกับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ซึ่งแขวนลอยอยู่ในสารละลายที่มีประจุเป็น ลบ ทำให้ผนังเซลล์จุลินทรีย์สูญเสียสมบัติการซึมผ่าน ส่งผลให้กิจกรรมที่จำเป็นในเซลล์ของ จุลินทรีย์หยุดชะงัก (Okur et al., 2021) และยังมีรายงานว่าโคลิโดซานสามารถยับยั้งการจำลองตัวเอง ของดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ทำให้จุลินทรีย์ตายได้ (Lou et al., 2011; Yilmaz Atay, 2020)

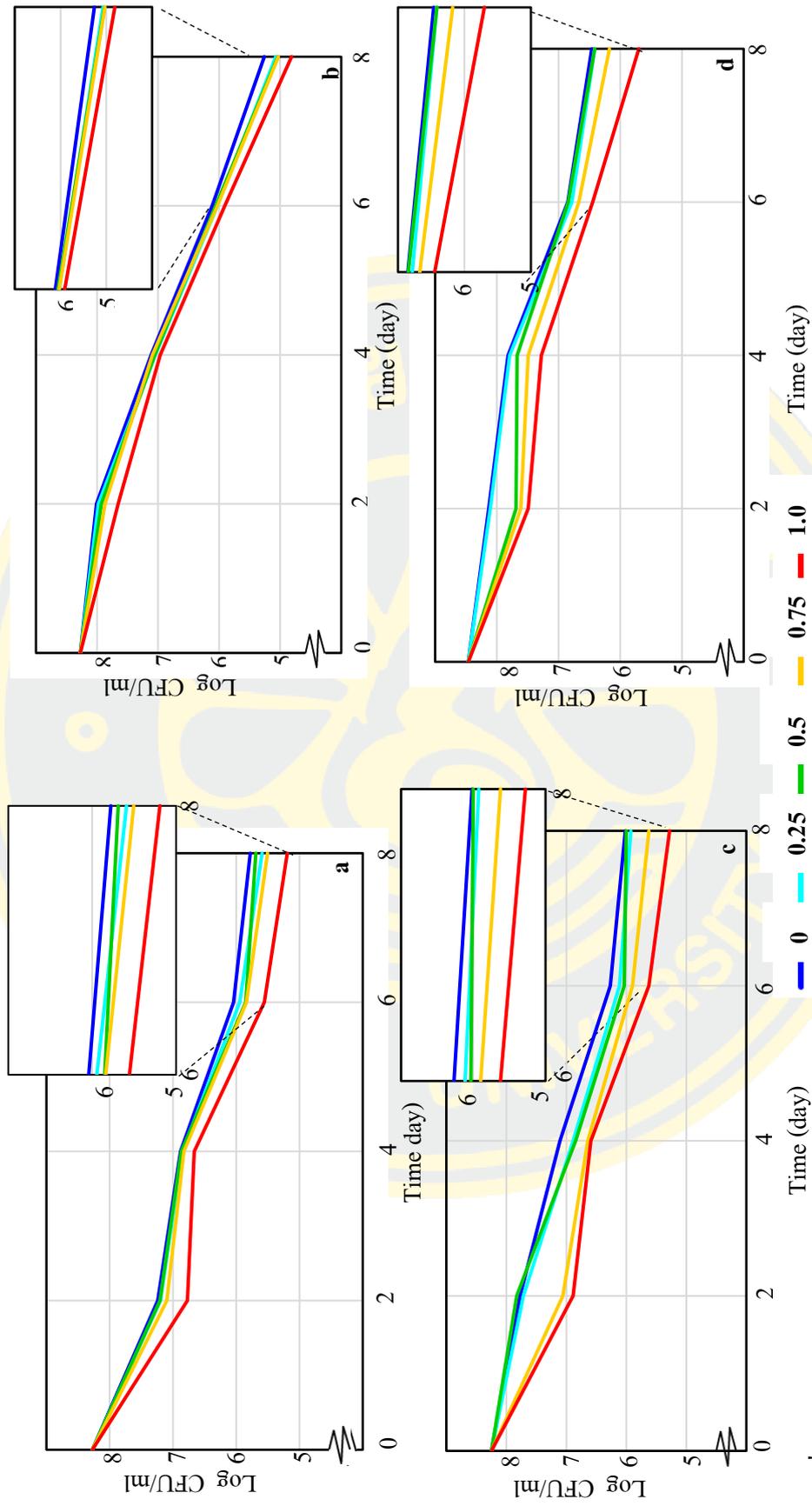
ตารางที่ 7 ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของ फिल्म C-CH ในปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี Drop test method

ความเข้มข้น	จำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิต ($\times 10^7$ CFU/ml)			
	แกรมบวก		แกรมลบ	
C (%w/v)	<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR2329	<i>Bacillus subtilis</i> TISTR1984	<i>Escherichia coli</i> TISTR527	<i>Salmonella typhimurium</i> TISTR2519
0	2.70 ± 0.14^a	1.29 ± 0.21^a	1.41 ± 0.04^a	1.49 ± 0.15^a
0.25	1.15 ± 0.33^b	1.13 ± 0.29^a	1.19 ± 0.33^a	1.27 ± 0.49^{ab}
0.50	1.00 ± 0.11^b	1.07 ± 0.18^{ab}	0.53 ± 0.01^b	0.99 ± 0.01^{ab}
0.75	0.95 ± 0.27^b	0.67 ± 0.09^{ab}	0.14 ± 0.03^b	0.81 ± 0.21^{ab}
1.0	0.74 ± 0.28^b	0.32 ± 0.11^b	0.11 ± 0.04^b	0.45 ± 0.04^b

หมายเหตุ : ^{a, b} ตัวอักษรที่แตกต่างในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.1.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันในอาหารเหลว (Migration test method)

จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ในอาหารเหลวตามภาพที่ 4-3 พบว่าฟิล์ม C-CH สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบได้ทุกสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ 4.1.2 ที่พบว่าฟิล์ม C-CH สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบทุกสายพันธุ์ และฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์ม C-CH เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของ C ในฟิล์มเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า จำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตมีจำนวนลดลงถึง 2-3 Log CFU เมื่อบ่มฟิล์มในสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวเป็นเวลา 8 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิธี migration test method เป็นวิธีที่นำตัวอย่างฟิล์มไปแช่ในสารละลายแขวนลอยเชื้อและเขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา 8 วัน ส่งผลให้ C ที่จับอยู่กับโครงสร้างฟิล์มไคโตซานค่อยๆ ถูกปลดปล่อยออกมาในสารละลายแขวนลอยเชื้อ ทำให้ C สัมผัสกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบเพิ่มขึ้น โดยสารประกอบพินอลิก เช่น กรดคลอโรจีนิกที่ละลายอยู่ในสารละลายใน C จับกับผนังของเซลล์จุลินทรีย์ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายเช่นกัน ทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์สูญเสียสมบัติการซึมผ่านของเซลล์และทำให้จุลินทรีย์ตายได้ (Lou et al., 2011) นอกจากนี้จากภาพที่ 4-3 พบว่าเมื่อใส่ฟิล์ม C-CH ที่มี C ความเข้มข้น 0 - 1.0 % ลงในสารแขวนลอยเชื้อ และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 วัน จะเห็นได้ว่า *B. subtilis* ไวต่อฟิล์ม C-CH มากที่สุด โดยพบว่ามีจำนวนแบคทีเรียรอดชีวิตจำนวนน้อยที่สุด คือ อยู่ระหว่าง $0.65 - 1.82 \times 10^5$ CFU/มิลลิลิตร รองลงมาคือ *S. aureus* ($1.56 - 6.0 \times 10^5$ CFU/มิลลิลิตร) *E. coli* ($1.9 - 10.4 \times 10^5$ CFU/มิลลิลิตร) และ *S. typhimurium* ($5.0 - 29 \times 10^5$ CFU/มิลลิลิตร) ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแกรมบวกไวต่อฟิล์ม C-CH มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ประกอบไปด้วยเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) และไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบหนากว่าแบคทีเรียแกรมบวก (Singh Arora et al., 2009)

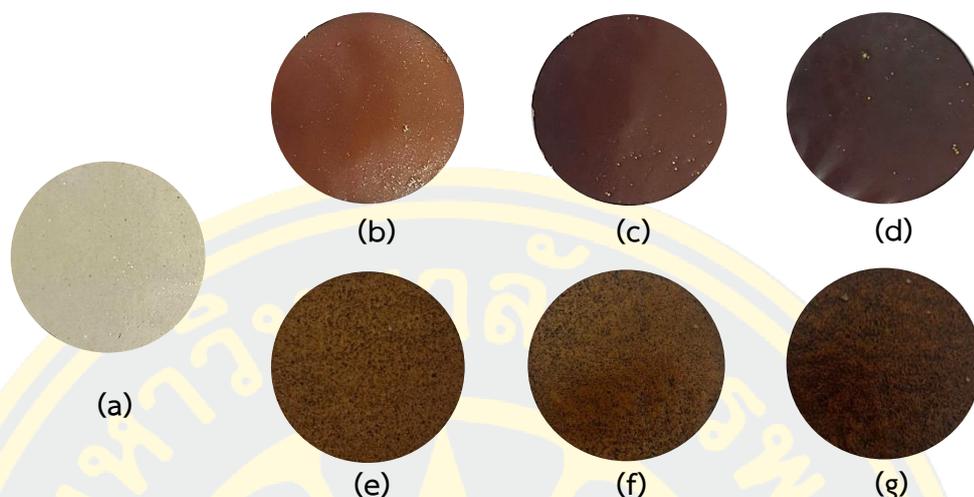


ภาพที่ 16 จำนวนการรอดชีวิตของ a) *Staphylococcus aureus* TISTR2329 b) *Bacillus subtilis* TISTR1984 c) *Escherichia coli* TISTR527 d) *Salmonella typhimurium* TISTR2519 ในสารแขวนลอยเชื้อที่มีปริมาณ โค โคลานที่มีสารสกัดจากกากาโอที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันในปริมาณ C ต่างๆกัน (0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 8 วัน

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าฟิล์ม C-CH ที่มี C ในทุกระดับความเข้มข้น ไม่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ทุกชนิดที่ทดสอบ โดยเห็นได้จากการไม่ปรากฏโซนยับยั้งเมื่อทดสอบโดยวิธี disc diffusion method แต่เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์โดยวิธี drop test method และ migration test method พบว่าฟิล์ม C-CH สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบได้ทุกสายพันธุ์ โดยฟิล์ม C-CH มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ C ในฟิล์ม C-CH เพิ่มขึ้น จึงเลือกฟิล์ม C-CH ที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์สูงสุด 3 สภาวะได้แก่ ฟิล์ม C-CH 0.5 C-CH 0.75 และ C-CH 1.0 ที่มี C ในฟิล์ม 0.50 0.75 และ 1.0 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายขึ้นรูปฟิล์ม ตามลำดับ เพื่อนำไปศึกษาในการทดลองที่ 4.2 ต่อไป

4.2 ผลของการศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (eC-CH) เปรียบเทียบกับฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (C-CH)

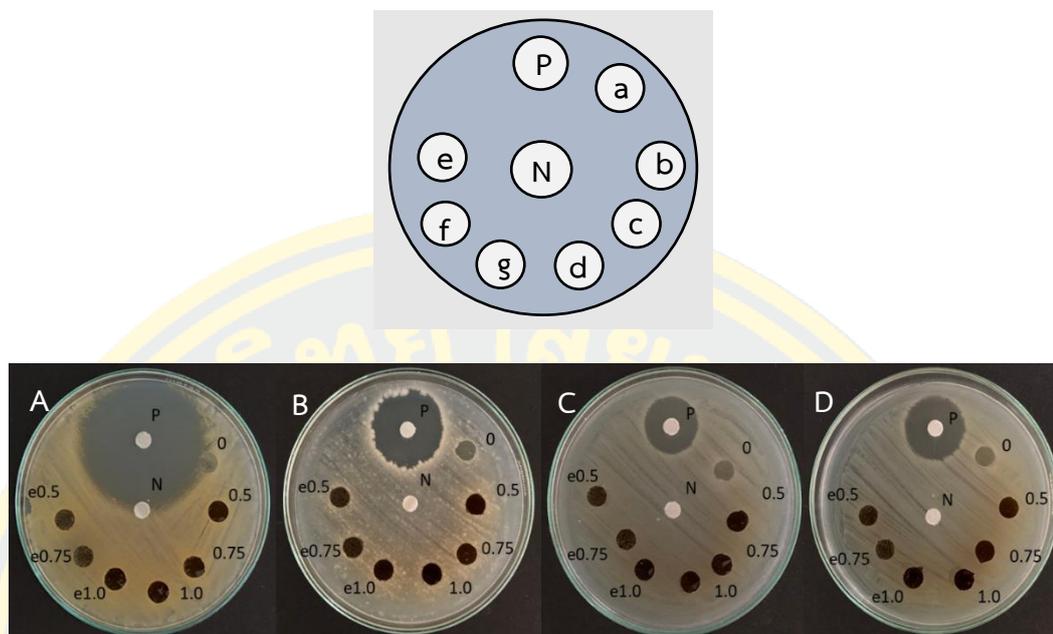
เมื่อเตรียมสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (eC) ตามวิธีของ Khotchapong and Punbusayakul (2019) พบว่าปริมาณ สารสกัด eC ที่ได้อยู่ในช่วงระหว่าง 10 - 12 % ของน้ำหนักแห้งของผงกาแฟ จากนั้นจึงนำ eC มาผสมลงในสารละลายขึ้นรูปฟิล์ม ได้เป็นฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (eC-CH) ในปริมาณร้อยละ 0.50 0.75 และ 1.0 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แสดงดังภาพที่ 4-4 โดยพบว่าฟิล์มที่ได้มีสีน้ำตาลตามสีของ C โดยเมื่อความเข้มข้นของ C ในฟิล์มเพิ่มขึ้น ฟิล์มมีสีน้ำตาลเพิ่มขึ้น และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (eC-CH) จะปรากฏวง eC กระจายทั่วฟิล์มในทุกระดับความเข้มข้น



ภาพที่ 17 फिल्मไคโตซานที่มีสารสกัดจากกาแฟ (C) ในปริมาณต่าง ๆ กัน (a) 0 % (b) 0.50 % (c) 0.75 % (d) 1.0 % และสารสกัดจากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (eC) ในปริมาณต่าง ๆ กัน (e) 0.50 % (f) 0.75 % และ (g) 1.0 %

4.2.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูลชัน โดยวิธีการแพร่บนอาหารแข็ง (Disc diffusion method)

จากภาพที่ 4-5 ไม่พบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์ม C-CH เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์ม eC-CH ที่มีปริมาณ C หรือ eC ในปริมาณต่าง ๆ กัน คือ 0 0.50 0.75 และ 1.0 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายขึ้นรูปฟิล์มเมื่อทดสอบด้วยวิธีการแพร่บนอาหารแข็ง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ 4.1.1 เนื่องจากปริมาณของ C และ eC ที่เติมลงในสารละลายฟิล์มมีปริมาณน้อยเกินไปโดยปริมาณเท่ากับที่มีในฟิล์มที่ทดสอบในการทดลองที่ 4.1.1 หรืออาจเกิดจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของสารประกอบฟีนอลิกใน C กับหมู่เอมีนของไคโตซานทำให้สารประกอบฟีนอลิกใน C ที่ผสมอยู่ในฟิล์มไม่สามารถแพร่ออกมาจากฟิล์มเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ได้



ภาพที่ 18 บริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ A) *Staphylococcus aureus* TISTR2329 B) *Bacillus subtilis* TISTR1984 C) *Escherichia coli* TISTR527 D) *Salmonella typhimurium* TISTR2519 ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟ (C) ในปริมาณต่าง ๆ กัน (a) 0 % (b) 0.50 % (c) 0.75 % (d) 1.0 % และสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC) ในปริมาณต่าง ๆ กัน (e) 0.50 % (f) 0.75 % (g) 1.0 % และ (N) Negative control (P) Positive control

4.2.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน โดยวิธีการหยดลงบนฟิล์ม (Drop test method)

จากตารางที่ 4-2 พบว่าฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบทุกสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และพบว่าฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของ C และ eC ในฟิล์มเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง 4.1.2 นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อ *S. aureus* ($0.78 - 1.44 \times 10^7$ CFU/มิลลิลิตร) *B. subtilis* ($0.24 - 0.34 \times 10^7$ CFU/มิลลิลิตร) และ *S. typhimurium* ($0.70 - 1.00 \times 10^7$ CFU/มิลลิลิตร) สัมผัสกับฟิล์ม eC-CH ที่มี eC ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.75 ขึ้นไป มีจำนวนที่รอดชีวิตน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์ดังกล่าวที่รอดชีวิตเมื่อสัมผัสกับฟิล์ม C-CH ที่มี C ในปริมาณเท่ากัน ($p \leq 0.05$) ในขณะที่จำนวนการรอดชีวิตของ *E. coli* เมื่อสัมผัสกับฟิล์มทั้งสองชนิดมีจำนวนแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH สามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ลงได้ประมาณ 1

Log CFU เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mohsenabadi et al. (2018) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มสตาร์ชผสมน้ำมันหอมระเหย โรสแมรี่ที่ห่อหุ้มด้วยไคโตซานร่วมกับกรดเบนโซอิก โดยจากการทดสอบด้วยวิธี MIC (ความเข้มข้นในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์) พบว่าค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยโรสแมรี่เพียงอย่างเดียว คือ 200 $\mu\text{g/ml}$ ในขณะที่ค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยโรสแมรี่ที่ผ่านการเอนแคป คือ 40 $\mu\text{g/ml}$ จากผลการทดลองดังกล่าวอาจเป็นผลเนื่องมาจากการเอนแคปซูลชันสามารถช่วยปกป้อง C จากสภาพแวดล้อมในระหว่างการทำแห้งฟิล์มหรือการเก็บรักษาฟิล์ม ทำให้ฟิล์ม eC-CH ยังคงมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์มากกว่า ฟิล์ม C-CH นอกจากนี้ eC มีไคโตซานและมอลโตเดกซ์ตรินเป็นสารห่อหุ้ม โดยไคโตซานมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ด้วยตัวเอง ดังนั้นเมื่อนำมาเป็นสารห่อหุ้มจึงสามารถช่วยเสริมฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของ C ที่เป็นสารแกนกลาง ส่งผลให้ฟิล์ม eC-CH มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์มากกว่าฟิล์ม C-CH ดังกล่าว (Huma et al., 2022)

ตารางที่ 8 ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี Drop test method

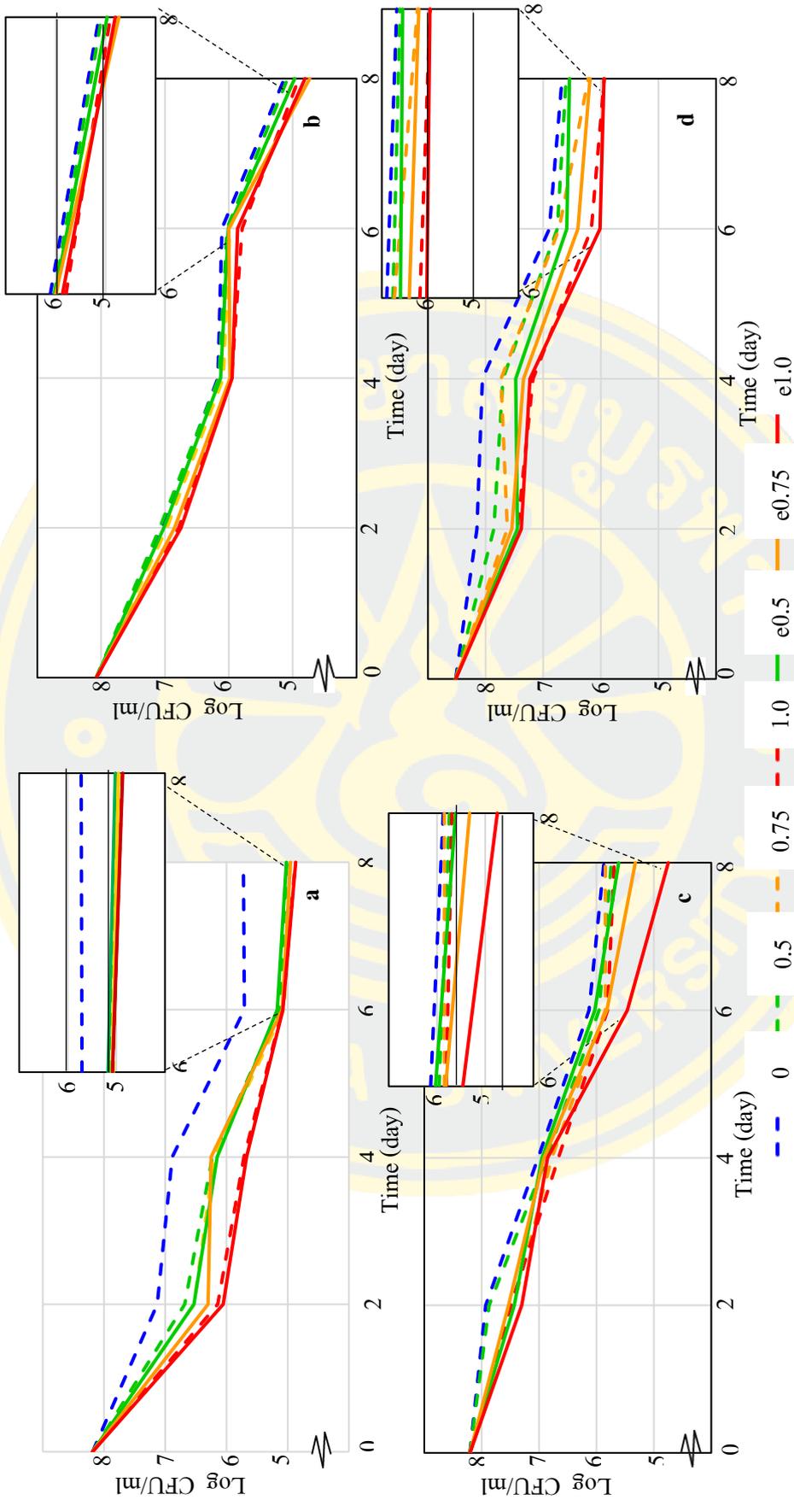
ตัวอย่างฟิล์ม	จำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิต ($\times 10^7$ CFU/ml)			
	<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR2329	<i>Bacillus subtilis</i> TISTR1984	<i>Escherichai coli</i> TISTR527	<i>Salmonella typhimurium</i> TISTR2519
C 0 (Control)	6.00 \pm 1.41 ^a	1.38 \pm 0.20 ^a	8.40 \pm 0.56 ^a	10.30 \pm 0.14 ^a
C 0.5	5.00 \pm 0.28 ^a	1.15 \pm 0.04 ^a	2.90 \pm 0.14 ^b	4.70 \pm 0.14 ^b
C 0.75	4.50 \pm 0.71 ^a	0.79 \pm 0.04 ^b	1.35 \pm 0.07 ^c	4.50 \pm 0.14 ^b
C 1.0	0.92 \pm 0.08 ^b	0.71 \pm 0.04 ^b	0.80 \pm 0.06 ^c	1.60 \pm 0.21 ^c
eC 0.5	6.40 \pm 1.13 ^a	0.78 \pm 0.08 ^b	2.50 \pm 0.14 ^b	1.10 \pm 0.10 ^{cb}
eC 0.75	1.44 \pm 0.14 ^b	0.34 \pm 0.00 ^c	1.35 \pm 0.01 ^c	1.00 \pm 0.01 ^d
eC 1.0	0.78 \pm 0.11 ^b	0.24 \pm 0.03 ^c	1.10 \pm 0.06 ^c	0.70 \pm 0.17 ^d

หมายเหตุ : ^{a, b} ตัวอักษรที่แตกต่างในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.2.3 การศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน ในอาหารเหลว (Migration test method)

จากภาพที่ 4-6 พบว่าฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบทุกสายพันธุ์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของ C และ eC ในฟิล์มเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันกับการทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มดังกล่าวด้วยวิธี drop test method โดยเมื่อใส่ฟิล์ม eC-CH ที่มี C ความเข้มข้น 0 - 1.0 % ลงในสารแขวนลอยเชื้อ และบ่มไว้ในที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 วัน จำนวนการรอดชีวิตของ *S. aureus* เมื่อทดสอบกับฟิล์มที่มี eC (0 - 1.0 %) อยู่ในช่วง $0.74 - 1.05 \times 10^5$ CFU/มิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับจำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตเมื่อมีฟิล์ม C-CH อยู่ในสารละลาย ($0.75 - 1.03 \times 10^5$ CFU/มิลลิลิตร) ส่วนจำนวนการรอดชีวิตของ *B. subtilis* เมื่อบ่มไว้ในสารละลายที่มีฟิล์ม eC-CH อยู่ในช่วง $0.64 - 0.93 \times 10^5$ CFU/มิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าจำนวนการรอดชีวิตของ *B. subtilis* เมื่อบ่มไว้ในสารละลายที่มีฟิล์ม C-CH ($0.80 - 1.20 \times 10^5$ CFU/มิลลิลิตร)

ในขณะที่จำนวนการรอดชีวิตของ *E. coli* เมื่อบ่มไว้ในสารละลายที่มีฟิล์ม eC-CH อยู่ในช่วง $0.56 - 4.10 \times 10^5$ CFU/มิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าจำนวนการรอดชีวิตของ *E. coli* เมื่อบ่มไว้ในสารละลายที่มีฟิล์ม C-CH ถึง 1 Log คืออยู่ในช่วง $4.90 - 7.00 \times 10^5$ CFU/มิลลิลิตร และเมื่อบ่มเชื้อ *S. typhimurium* ไว้ในสารละลายที่มีฟิล์ม eC-CH มีจำนวนการรอดชีวิตของ *S. typhimurium* อยู่ในช่วง $0.88 - 3.50 \times 10^6$ CFU/มิลลิลิตร ซึ่งไม่แตกต่างกับจำนวนการรอดชีวิตของ *S. typhimurium* เมื่อบ่มไว้ในสารละลายที่มีฟิล์ม C-CH ($0.87 - 4.00 \times 10^6$ CFU/มิลลิลิตร) จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าจำนวนจุลินทรีย์ *S. aureus* *B. subtilis* และ *E. coli* ที่รอดชีวิตในวันที่ 8 เมื่อบ่มไว้ในสารละลายที่มีฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH ลดลง 3 log เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ในขณะที่จำนวน *S. typhimurium* ที่รอดชีวิต เมื่อบ่มไว้ในสารละลายที่มีฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH ในวันที่ 8 ลดลงเพียง 2 log เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง 4.2.2 เนื่องจากการเสริมฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารห่อหุ้มไคโตซานในฟิล์ม eC-CH ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว



ภาพที่ 19 จำนวนการรอดชีวิตของ a) *Staphylococcus aureus* TISTR2329 b) *Bacillus subtilis* TISTR1984 c) *Escherichia coli* TISTR527 d) *Salmonella*

typhimurium TISTR2519 ในสารแขวนลอยที่มีฟิล์มไบโโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการอบแห้งและฟیل์มไบโโตซานที่มีสารสกัดจากกาก

กาแฟที่ไม่ผ่านการอบแห้งในปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 8 วัน

4.2.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในฟิล์ม โคลโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลแล้ว และฟิล์ม โคลโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูลแล้ว

จากตารางที่ 4-3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าเมื่อปริมาณ C และ eC ในฟิล์มเพิ่มขึ้น ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Siripatrawan and Harte (2010) ที่วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของฟิล์ม โคลโตซานที่เติมสารสกัดจากชาเขียว (GTE) พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของฟิล์มเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณ GTE ที่เติมลงในฟิล์มเพิ่มขึ้น เนื่องจากสารฟีนอลิกที่สำคัญใน GTE ได้แก่ กรดคาเฟอิก และกรดคลอโรจีนิก ซึ่งเป็นสารสำคัญที่มีอยู่ใน C เช่นกัน (Okur et al., 2021) โดยฟิล์ม โคลโตซานที่เติม C 0.50 0.75 และ 1.0 % w/v มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด คือ 276.77 336.51 และ 383.68 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัม และฟิล์ม โคลโตซานที่เติม eC 0.50 0.75 และ 1.0 % w/v มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด คือ 269.01 343.22 และ 392.39 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัม ตามลำดับ โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH ที่มีระดับความเข้มข้นเดียวกันแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ ($p > 0.05$) ฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH ที่มีระดับความเข้มข้นเดียวกัน (0.50 0.75 และ 1.0 % w/v) มีปริมาณ C ที่ใส่ลงในฟิล์มเท่ากัน ดังนั้นฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH จึงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากัน

จากตารางที่ 4-3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดคลอโรจีนิก และคาเฟอีนในฟิล์ม พบว่าเมื่อปริมาณ C และ eC ในฟิล์มเพิ่มขึ้น ปริมาณกรดคลอโรจีนิก และคาเฟอีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เช่นเดียวกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในฟิล์ม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Drago et al. (2022) ที่วิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนของฟิล์มจากโปรตีนข้าวโพดที่ผสม C พบว่าเมื่อปริมาณ C ในฟิล์มเพิ่มขึ้นปริมาณคาเฟอีนในฟิล์มเพิ่มขึ้น โดยฟิล์ม โคลโตซานที่เติม C 0.50 0.75 และ 1.0 % w/v มีปริมาณกรดคลอโรจีนิกเป็น 199.27 254.13 และ 291.02 มิลลิกรัมกรดคลอโรจีนิกต่อกรัม และฟิล์ม โคลโตซานที่เติม eC 0.50 0.75 และ 1.0 % w/v มีปริมาณกรดคลอโรจีนิกเป็น 188.62 244.43 และ 268.31 มิลลิกรัมกรดคลอโรจีนิกต่อกรัม ตามลำดับ และพบว่าฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH ในปริมาณที่เท่ากันมีปริมาณกรดคลอโรจีนิกแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) อย่างไรก็ตามฟิล์ม โคลโตซานที่เติม C 0.50 0.75 และ 1.0 % w/v มีปริมาณคาเฟอีนเป็น 113.79 158.08 และ 186.31 มิลลิกรัมคาเฟอีนต่อกรัม และฟิล์ม โคลโตซานที่เติม eC 0.50 0.75 และ 1.0 % w/v มีปริมาณคาเฟอีนเป็น 105.37 1901.19 และ 207.93 มิลลิกรัมคาเฟอีนต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งพบว่าฟิล์ม C-CH มีปริมาณคาเฟอีนน้อยกว่าฟิล์ม eC-CH อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ที่เป็นเช่นนี้

อาจมาเนื่องมาจากสารที่ใช้ห่อหุ้ม (ไคโตซาน/มอลโต) ใน eC จับและห่อหุ้มคาเฟอีน ไว้ภายในเอนแคปซูลได้ (Seyedabadi et al., 2021) ทำให้ไม่เกิดการสูญเสียคาเฟอีนไปในระหว่างขั้นตอนการขึ้นรูปฟิล์ม ทำให้ฟิล์ม eC-CH มีปริมาณคาเฟอีนมากกว่าเมื่อเทียบกับฟิล์ม C-CH

ตารางที่ 9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด กรดคลอโรจินิก และคาเฟอีนของฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %)

ตัวอย่างฟิล์ม	TPC (mg GA eq/g chitosan film)	Chlorogenic acid (mg CGA /100 g chitosan film)	Caffeine (mg CF /g chitosan film)
C 0 (Control)	2.86 ± 0.30 ^a	16.63 ± 0.43 ^a	2.11 ± 0.19 ^a
C 0.5	276.77 ± 4.40 ^b	199.27 ± 9.35 ^b	113.79 ± 5.58 ^b
C 0.75	336.51 ± 4.64 ^c	254.13 ± 10.97 ^{cd}	158.08 ± 4.07 ^c
C 1.0	383.68 ± 4.79 ^d	291.02 ± 7.86 ^c	186.31 ± 3.83 ^d
eC 0.5	269.01 ± 6.50 ^b	188.62 ± 9.64 ^b	105.37 ± 2.15 ^b
eC 0.75	343.22 ± 4.89 ^c	244.43 ± 9.93 ^c	190.19 ± 5.78 ^d
eC 1.0	392.39 ± 8.55 ^d	268.31 ± 4.09 ^{dc}	207.93 ± 2.57 ^c

หมายเหตุ : ^{a, b} ตัวอักษรที่แตกต่างในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.2.5 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลแล้ว และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูลแล้ว

จากตารางที่ 4-4 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ของฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH โดยวิธี DPPH assay พบว่าเมื่อปริมาณของ C และ eC ในฟิล์มเพิ่มขึ้นความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอชเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยฟิล์มไคโตซานที่เติม C 0.50 0.75 และ 1.0 % w/v มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอชเป็น 85.64 120.76 และ 145.55 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัม ตามลำดับ และฟิล์มไคโตซานที่เติม eC 0.50 0.75 และ 1.0 % w/v มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอชเป็น 68.89 117.56 และ 139.41 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jaisan and Punbusayakul (2016) ที่ทำการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดจากเนื้อผลกาแฟโดยวิธี DPPH

assay พบว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ของฟิล์มเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณสารสกัดเนื้อผลกาเฟที่เติมลงในฟิล์มเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องมาจากการเพิ่มปริมาณ C ลงในฟิล์มเป็นการเพิ่มปริมาณกรดคลอโรจีนิกและคาเฟอีน ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระทำให้เมื่อปริมาณ C ในฟิล์มเพิ่มขึ้นฟิล์มจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เพิ่มขึ้น (Okur et al., 2021) และพบว่าฟิล์ม C-CH ที่มี C 0.5 % สามารถกำจัดอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอชมากกว่าฟิล์ม eC-CH ที่มี C เทียบเท่ากัน แต่เมื่อมีปริมาณ C เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 0.75 % ขึ้นไป พบว่าฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH สามารถกำจัดอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอชใกล้เคียงกัน ($p>0.05$) ทั้งนี้เนื่องมาจากฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันมีปริมาณ C ในฟิล์มเท่ากันทำให้ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอชของฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH ใกล้เคียงกัน

จากผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ของฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH โดยวิธี FRAP assay ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารจากความสามารถในการให้อิเล็กตรอนไปรีดิวซ์กับสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{3+} กับ TPTZ จากตารางที่ 4-4 พบว่าเมื่อปริมาณของ C และ eC ในฟิล์มเพิ่มขึ้นความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq 0.05$) โดยฟิล์มโคโคซานที่เติม C 0.50 0.75 และ 1.0 % w/v มีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกเป็น 6,018.52 7557.21 และ 8,402.14 มิลลิกรัมสมมูลเฟอร์ริซัลเฟตต่อกรัม ตามลำดับ และฟิล์มโคโคซานที่เติม eC 0.50 0.75 และ 1.0 % w/v มีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกเป็น 6,055.77 7,630.33 และ 8,574.64 มิลลิกรัมสมมูลเฟอร์ริซัลเฟตต่อกรัม ตามลำดับ และพบว่าฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH ที่ปริมาณ C เทียบเท่ากันสามารถรีดิวซ์เฟอร์ริกใกล้เคียงกัน ($p>0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอชของฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH ทั้งนี้เนื่องมาจากการเพิ่มปริมาณ C ลงในฟิล์มเป็นการเพิ่มปริมาณกรดคลอโรจีนิกและคาเฟอีน ทำให้ฟิล์มมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่าที่ปริมาณ C และ eC ในฟิล์มโคโคซานเท่ากันฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ทั้ง 2 วิธีแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลอง 4.2.4 ส่งผลให้เมื่อทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH จึงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 10 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %)

ตัวอย่างฟิล์ม	DPPH	FRAP
	(mg GA eq/g chitosan film)	(mg FeSO ₄ eq/g chitosan film)
C 0 (Control)	ND	296.15 ± 23.79 ^a
C 0.5	85.64 ± 3.94 ^b	6,018.52 ± 5.58 ^b
C 0.75	120.76 ± 5.19 ^c	7,557.21 ± 157.04 ^c
C 1.0	145.55 ± 4.98 ^d	8,402.14 ± 98.39 ^d
eC 0.5	68.89 ± 2.15 ^a	6,055.77 ± 98.58 ^b
eC 0.75	117.56 ± 4.53 ^c	7,630.33 ± 106.48 ^c
eC 1.0	139.41 ± 2.37 ^d	8,574.64 ± 124.33 ^d

หมายเหตุ : ^{a, b} ตัวอักษรที่แตกต่างในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากการทดลองพบว่าฟิล์ม ไคโตซานที่เติมสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลเลชัน (eC-CH) มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยเมื่อปริมาณ eC ในฟิล์มเพิ่มขึ้นฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ของฟิล์มเพิ่มขึ้น โดยสภาวะที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ สูงสุด ได้แก่ eC 1.0 ดังนั้นจึงเลือกฟิล์มสภาวะนี้ไปศึกษาสมบัติทางกายภาพ ทางกล ทางเคมีกายภาพ และลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่อไป

4.3 ผลของการศึกษาสมบัติทางกายภาพ ทางกล ทางเคมีกายภาพ และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลเลชัน (eC-CH)

4.3.1 สมบัติทางกายภาพ และทางกลของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลเลชัน

1) ความหนา (Thickness)

ตารางที่ 4-5 แสดงความหนาของฟิล์มไคโตซาน ฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลเลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่าน

การเอนแคปซูลชัน (C-CH) พบว่าฟิล์ม C-CH 1.0 และฟิล์ม eC-CH 1.0 มีความหนาเท่ากัน แต่มีความหนามากกว่าฟิล์มไคโตซานอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Talón et al. (2019) ที่ทำการวิเคราะห์ความหนาของฟิล์มสตาร์ชผสมยูจีนอล (Eugenol) ที่ห่อหุ้มด้วยเวย์โปรตีนหรือเลซิดิน พบว่าความหนาของฟิล์มที่ผสมยูจีนอล และฟิล์มที่ผสมยูจีนอลที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน มีค่ามากกว่าฟิล์มสตาร์ช ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการผสม C หรือ eC เป็นการเพิ่มปริมาณของแข็งลงในฟิล์ม โดย C หรือ eC จะเข้าไปแทรกตัวอยู่ระหว่างโครงข่ายไคโตซานทำให้ฟิล์ม C-CH และฟิล์ม eC-CH มีความหนาเพิ่มขึ้น (Souza et al., 2019)

2) ความทึบแสง (Opacity)

จากตารางที่ 4-5 แสดงความทึบแสงของฟิล์ม โดยหากค่าที่วัดได้มีค่ามากแสดงว่าฟิล์มนั้นมีความทึบแสงมาก พบว่าเมื่อเปรียบเทียบฟิล์มที่ทดสอบทั้ง 3 ตัวอย่าง ฟิล์มที่มีค่าความทึบแสงสูงสุดคือฟิล์ม C-CH 1.0 (8.10) สูงที่สุด รองลงมา คือฟิล์ม eC-CH 1.0 (6.83) และ ฟิล์มไคโตซาน (C 0) (1.05) ตามลำดับ ซึ่งคล้ายคลึงกับรายงานของ Rajapaksha and Shimizu (2021) ซึ่งพัฒนาฟิล์มแป้งมันสำปะหลังที่ผสมสารสกัดจากชาดำที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน โดยรายงานว่าฟิล์มมีความทึบแสงเพิ่มขึ้นเมื่อผสมสารสกัดจากชาดำลงในฟิล์ม และฟิล์มที่ผสมสารสกัดจากชาดำที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูลชันมีความทึบแสงมากกว่าฟิล์มที่ผสมสารสกัดจากชาดำที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในขั้นตอนการเตรียม eC เกิดอันตรกิริยากันระหว่างสารที่ใช้ห่อหุ้มกับ C จึงทำให้เมื่อนำ eC มาผสมลงในสารละลายฟิล์ม eC-CH จึงมีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล eC กระจายอยู่ทั่วแผ่นฟิล์ม ซึ่งแตกต่างกับฟิล์ม C-CH ที่มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มสีน้ำตาลทั่วทั้งแผ่น ดังแสดงในภาพที่ 4-4 จึงส่งผลให้ฟิล์ม C-CH มีความทึบแสงมากกว่าฟิล์ม eC-CH

3) สมบัติเชิงกล (Mechanical properties)

จากตารางที่ 4-5 ผลการทดสอบสมบัติเชิงกลของฟิล์ม โดยเครื่อง Texture Analyzer พบว่าเมื่อเปรียบเทียบฟิล์มที่ทดสอบทั้ง 3 ตัวอย่าง ค่า TS และ EAB ของฟิล์ม C-CH 1.0 และฟิล์ม eC-CH 1.0 น้อยกว่าฟิล์มไคโตซานอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sun et al. (2017) ที่ทดสอบการต้านทานแรงดึง และค่าการยืดตัวเมื่อขาดของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดจากแอปเปิล พบว่าค่า TS และ EAB ของฟิล์มที่เติมสารสกัดลดลงเมื่อปริมาณสารสกัดจากแอปเปิลในฟิล์มเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก C และ eC เข้าไปแทรกตัวอยู่ระหว่างโครงข่ายไคโตซานและไปรบกวนการเกิดโครงสร้างผลึกของไคโตซาน ทำให้สมบัติเชิงกลของฟิล์มลดลง และนอกจากนี้ พบว่าค่า TS และ EAB ของฟิล์ม C-CH 1.0 และฟิล์ม eC-CH 1.0 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rajapaksha and Shimizu (2021) ที่ทดสอบการต้านทานแรงดึงของฟิล์มมันสำปะหลังที่ผสมสารสกัดจากชาดำที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน และไม่ผ่านการ

เอนแคปซูลเลชัน โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากันฟิล์มที่ผสมสารสกัดที่ผ่านการเอนแคปซูลเลชัน และไม่ผ่านการเอนแคปซูลเลชันมีค่า TS แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) อาจเนื่องมาจากทั้ง C และ eC อาจเพียงเข้าไปแทรกตัวอยู่ระหว่างโครงข่ายโพลีโธซานทำให้คุณสมบัติเชิงกลของฟิล์มไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งแสดงว่าการผสม eC ลงในฟิล์มไม่มีผลในการปรับปรุงหรือลดคุณสมบัติเชิงกลของฟิล์มเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์ม C-CH

ตารางที่ 11 ความหนา ความทึบแสง และสมบัติเชิงกลของฟิล์มโพลีโธซาน ฟิล์ม eC-CH และฟิล์ม C-CH

ฟิล์มโพลีโธซาน	Thickness (mm)	Opacity	Tensile strength (MPa)	Elongation at break (%)
C 0 (Control)	0.08 ± 0.01^a	1.05 ± 0.08^a	27.49 ± 2.75^a	153.22 ± 7.47^a
C 1.0	0.11 ± 0.00^b	8.10 ± 0.44^c	17.00 ± 5.79^b	143.00 ± 11.47^{ab}
eC 1.0	0.12 ± 0.00^b	6.83 ± 0.37^b	16.74 ± 2.30^b	133.02 ± 5.77^b

หมายเหตุ : ^{a, b} ตัวอักษรที่แตกต่างในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.3.2 สมบัติทางเคมีกายภาพของฟิล์มโพลีโธซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลเลชัน

1) การละลายน้ำ (Water solubility, WS)

จากตารางที่ 4-6 แสดงค่าการละลายน้ำของฟิล์มโพลีโธซาน (C 0), ฟิล์ม C-CH 1.0 และฟิล์ม eC-CH 1.0 พบว่า ค่า WS ของฟิล์ม C-CH 1.0 (29.19) และฟิล์ม eC-CH 1.0 (28.58) สูงกว่าฟิล์มโพลีโธซาน (23.90) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zaman et al. (2018) ที่ทดสอบการละลายน้ำของฟิล์มโพลีโธซานผสมสารสกัดส้มแขกโดยพบว่าฟิล์มโพลีโธซานสามารถละลายน้ำได้เพิ่มขึ้นเมื่อมีสารสกัดส้มแขกในฟิล์ม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากใน C อุดมไปด้วยสารประกอบที่มีหมู่ชอบน้ำ เช่น กรดคาเฟอิลควินิก กรดไดคาเฟอิลควินิก คาเฟอีน และ เมลานอยดิน ทำให้เมื่อปริมาณ C ในฟิล์มเพิ่มขึ้นฟิล์มจึงมีคุณสมบัติที่ชอบน้ำมากขึ้น (Bravo et al., 2012) นอกจากนี้อาจเนื่องมาจากหมู่ไฮดรอกซิลของสารประกอบฟีนอลิกใน C จับกับหมู่เอมีนของโพลีโธซาน ส่งผลให้ฟิล์มมีหมู่ที่มีขั้วเพิ่มขึ้นและทำอันตรกิริยากับโมเลกุลของน้ำทำให้ฟิล์มละลายน้ำได้เพิ่มขึ้น (Bourtoom, 2008) และพบว่าค่า WS ของฟิล์ม C-CH 1.0 และฟิล์ม eC-CH 1.0

แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ซึ่งแสดงว่าการผสม C หรือ eC ลงในฟิล์มไม่มีผลในการปรับปรุงหรือลดคุณสมบัติการละลายน้ำของฟิล์ม

2) อัตราการซึมผ่านของไอน้ำ (Water vapor transmission rate, WVTR)

จากตารางที่ 4-6 แสดงค่าการซึมผ่านของไอน้ำของฟิล์มไคโตซาน (C 0), ฟิล์ม C-CH 1.0 และฟิล์ม eC-CH 1.0 พบว่า ค่า WVTR ของฟิล์มไคโตซาน ฟิล์ม C-CH 1.0 และ ฟิล์ม eC-CH 1.0 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Talón et al. (2019) ที่ทำการวิเคราะห์การซึมผ่านไอน้ำของฟิล์มสตาร์ชผสมยูจินอลที่ห่อหุ้มด้วยเวย์โปรตีนหรือเลซิติน พบว่าฟิล์มสตาร์ช ฟิล์มสตาร์ชที่ผสมยูจินอล และฟิล์มสตาร์ชผสมยูจินอลที่ผ่านการเอนแคปซูลชันด้วยเลซิติน มีค่า WVP แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ซึ่งแสดงว่าการผสม C หรือ eC ลงในฟิล์มไม่มีผลในการปรับปรุงหรือลดคุณสมบัติการซึมผ่านของไอน้ำของฟิล์ม

ตารางที่ 12 สมบัติทางเคมีกายภาพของฟิล์มไคโตซาน ฟิล์ม eC-CH และ C-CH

ฟิล์มไคโตซาน	การละลายน้ำ (%)	อัตราการซึมผ่านไอน้ำ (g /m ² .day) ^{ns}
C 0 (Control)	23.90 ± 0.74 ^a	1.898 ± 0.027
C 1.0	29.19 ± 1.07 ^b	1.714 ± 0.096
eC 1.0	28.58 ± 0.39 ^b	1.587 ± 0.048

หมายเหตุ : ^{a, b} ตัวอักษรที่แตกต่างในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq 0.05$)

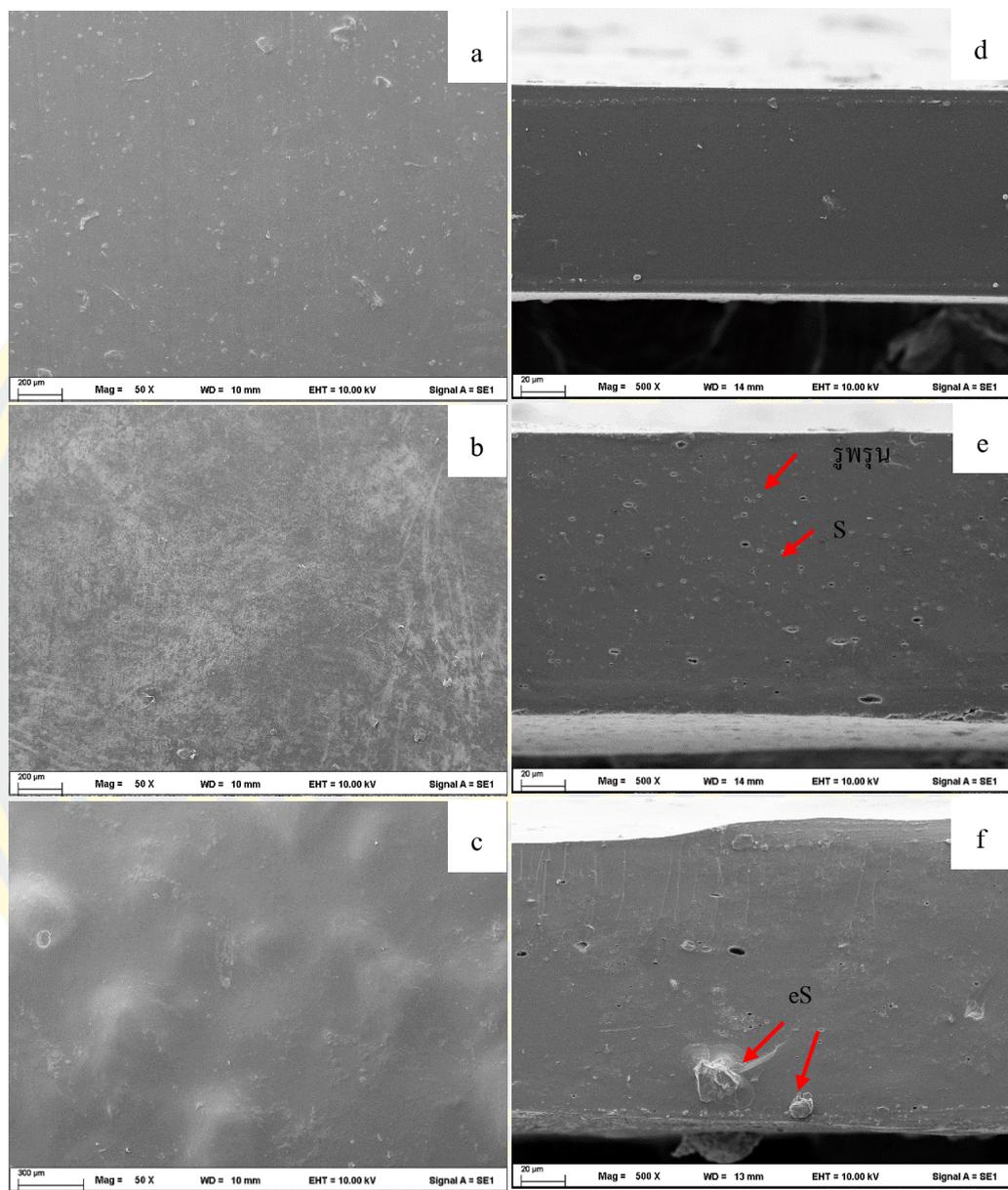
^{ns} แสดงความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

4.3.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electronmicroscope; SEM) โดยการส่องที่บริเวณพื้นผิวของฟิล์มที่กำลังขยาย 50 เท่า และส่องที่พื้นผิวดัดขวางของฟิล์มที่กำลังขยาย 500 เท่าจะเห็นได้ว่าที่ผิวหน้าของฟิล์ม eC-CH (ภาพที่ 4-7c) มีลักษณะขรุขระพื้นผิวที่ไม่สม่ำเสมอ เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มไคโตซาน และฟิล์ม C-CH (ภาพที่ 4-7a และภาพที่ 4-7b) ภาพตัดขวางภายในฟิล์ม จะเห็นได้ว่าฟิล์มไคโตซาน (ภาพที่ 4-7d) มีลักษณะสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน ในขณะที่ฟิล์ม C-CH (ภาพที่ 4-7e) พบว่ามี C กระจายอยู่ทั่ว

ภายในฟิล์มอย่างเห็นได้ชัด และเกิดรูพรุนที่บริเวณภาพตัดขวางจากการหลุดของ C ในขั้นตอนการ
หักฟิล์มสำหรับการส่องด้วย SEM และฟิล์ม eC-CH (ภาพที่ 4-7f) พบว่ามี eC กระจายอยู่ทั่วภายใน
ฟิล์มหลากหลายขนาด โดยจะเห็น eC ที่กระจายอยู่ภายในฟิล์มเกิดการผสมผสานร่วมกับเนื้อภายใน
ฟิล์ม ซึ่งแตกต่างกับฟิล์ม C-CH ที่ C เพียงแทรกตัวอยู่ภายในเนื้อฟิล์ม





ภาพที่ 20 ภาพผิวหน้าของ (a) फिल्मไคโตซาน (b) फिल्म C-CH (c) फिल्म eC-CH ที่กำลังขยาย 50 เท่า และภาพตัดขวางของ (d) फिल्मไคโตซาน (e) फिल्म C-CH และ (f) फिल्म eC-CH ที่กำลังขยาย 500 เท่า

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ พบว่าฟิล์ม C-CH สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบทุกสายพันธุ์ โดยมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของ C ในฟิล์มเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) ฟิล์ม C-CH ที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์สูงสุด 3 สภาวะ ได้แก่ ฟิล์ม C-CH 0.5 C-CH 0.75 และ C-CH 1.0

การทดลองที่ 2 จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ พบว่าฟิล์ม eC-CH มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์มากกว่าเมื่อเทียบกับฟิล์ม C-CH ($p \leq 0.05$) จากการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าฟิล์ม eC-CH มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) กรดคลอโรจีนิก (CGA) คาเฟอีน (CF) และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณ eC ในฟิล์มเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) และที่ปริมาณ C ในฟิล์มเทียบเท่ากัน ปริมาณ TPC CGA และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ฟิล์ม eC-CH ที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ สูงสุด ได้แก่ ฟิล์ม eC-CH 1.0

การทดลองที่ 3 พบว่าฟิล์ม C-CH 1.0 และฟิล์ม eC-CH 1.0 มีค่าการต้านทานแรงดึง (TS) และค่าการยืดตัวเมื่อขาด (EAB) น้อยกว่าฟิล์มไคโตซาน (CH) มีค่าความหนาและความสามารถในการละลายน้ำ (WS) มากกว่าฟิล์ม CH ($p \leq 0.05$) และมีค่าอัตราการซึมผ่านไอน้ำ (WVTR) ไม่แตกต่างกับฟิล์ม CH ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามพบว่าฟิล์ม C-CH และ eC-CH มีค่า ความหนา TS EAB WS และ WVTR แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

จากการทดลองดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่า ฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH) โดยการเอนแคปซูเลชันไม่ส่งผลกระทบต่อสมบัติทางกายภาพ ทางกล และทางเคมีกายภาพของฟิล์ม ฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) จึงมีศักยภาพที่สามารถนำไปใช้เพื่อเป็นบรรจุภัณฑ์ต้านจุลินทรีย์ได้

บรรณานุกรม

- ณัฐนนท์ อยู่สถิตย์ และชญาดา กลิ่นจันทร์. (7-9, สิงหาคม, 2559). การวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ในใบสะระแหน่ ใบทับทิม และใบว่านเร่งคอดำเพื่อแปรรูปเป็นชาสมุนไพร [Poster presentation]. การประชุมวิชาการระดับชาติ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ครั้งที่ 3, มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร, กำแพงเพชร, ประเทศไทย.
- พริม ภัคดีธรรม. (2560). การเตรียมไลโคซาน/พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ไฮโดรเจล [วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต]. Chulalongkorn University Intellectual Repository. <https://cuir.car.chula.ac.th/dspace/bitstream/123456789/59641/1/5872403223.pdf>
- มาลัยพร ดวงบาล. (2552). การผลิตสารต้านอนุมูลอิสระกรดแกลลิกจากกากกาแฟสดที่เหลือใช้โดยเอนไซม์แทนเนส. มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์.
- วิริยา คชพงษ์. (2562). สภาวะที่เหมาะสมของการเอนแคปซูเลชันสารสกัดกากกาแฟ [วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ไม่ได้ตีพิมพ์]. มหาวิทยาลัยบูรพา.
- สุดสาย ตีรวานิช และวราภา มหากาญจนกุล. (2555). การนำเสียของอาหาร. วิชาสอนของ อ. เจริญ (ajarncharoen.wordpress). <https://ajarncharoen.wordpress.com/2012/02/02/food-degrad/>
- อมรรัตน์ ตั้งสกุล. (2552). การผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสจากดอสีโอเรจินหอมหัวใหญ่ชนิดผงโดยการเอนแคปซูเลชัน [วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต]. สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ. https://doi.nrct.go.th/ListDoi/listDetail?Resolve_Doi=10.14457/KMUTT.the.2007.350
- Abdollahi, M., Rezaei, M., & Farzi, G. (2012). A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. *Journal of Food Engineering*, 111(2), 343-350. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.02.012>
- Afroja, S., Falgunee, F. N., Jahan, M. M., Akanda, K. M., Mehjabin, S., & Parvez, G. M. M. (2017). Antibacterial activity of different citrus fruits. *Journal of medical research and health science*, 2(1), 25-32.
- Agourram, A., Ghirardello, D., Rantsiou, K., Zeppa, G., Belviso, S., Romane, A., Oufdou, K., & Giordano, M. (2013). Phenolic content, antioxidant potential, and antimicrobial activities of fruit and vegetable by-product extracts. *International Journal of Food Properties*, 16(5), 1092-1104. <http://doi.org/10.1080/10942912.2011.576446>
- Almenar, E., Catala, R., Hernandez-Muñoz, P., & Gavara, R. (2009). Optimization of an active package for wild strawberries based on the release of 2-nonanone. *LWT*, 42(2), 587-593.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.09.009>

- Aloui, H., & Khwaldia, K. (2016). Natural Antimicrobial Edible Coatings for Microbial Safety and Food Quality Enhancement. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15. <http://doi.org/10.1111/1541-4337.12226>
- Álvarez-Ordóñez, A., Carvajal, A., Arguello, H., Martínez-Lobo, F. J., Naharro, G., & Rubio, P. (2013). Antibacterial activity and mode of action of a commercial citrus fruit extract. *Journal of Applied Microbiology*, 115(1), 50-60. <http://doi.org/10.1111/jam.12216>
- Andrade, C., Perestrelo, R., & Câmara, J. S. (2022). Bioactive compounds and antioxidant activity from spent coffee grounds as a powerful approach for its valorization. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(21), 7504. <http://doi.org/10.3390/molecules27217504>
- Aprilia, A., Jaisan, C., & Punbusayakul, N. (2014). Antimicrobial and antioxidant activities of microwave-assisted extracts from coffee ground residue. In K. Mahattanatawee & A. Rimando (Eds.), *1st Joint ACS AGFD-ACS ICSCS Symposium on Agricultural and Food Chemistry* (pp. 292-298).
- Arancibia, M., Gimenez, B., Caballero, M. E. L., Guillen, M. C. G., & Montero, P. (2014). Release of cinnamon essential oil from polysaccharide bilayer films and its use for microbial growth inhibition in chilled shrimps. *LWT*, 59(2, Part 1), 989-995. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.031>
- Arenz, S., & Wilson, D. N. (2016). Bacterial protein synthesis as a target for antibiotic inhibition. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(9), a025361. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a025361>
- ASTM D882-18. (2018). *Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting*. ASTM International.
- ASTM D1746-15. (2015). *Standard test method for transparency of plastic sheeting*. ASTM International.
- ASTM E96. (1996). *Standard test method for water vapor transmission of materials*. ASTM International.
- Atabani, A. E., Mercimek, S. M., Arvindnarayan, S., Shobana, S., Kumar, G., Cadir, M., & Al-Muhatseb, A. H. (2018). Valorization of spent coffee grounds recycling as a potential alternative fuel resource in Turkey: An experimental study. *Journal of the Air & Waste*

- Management Association*, 68(3), 196-214. <http://doi.org/10.1080/10962247.2017.1367738>
- Azmi, S. N. A., Mohamad, C. W. S. R., & Kasim, K. F. (2019). Encapsulation of *C. odorata* extracts for antimicrobial activity. *Journal of Physics: Conference Series*, 1372, 012046. <http://doi.org/10.1088/1742-6596/1372/1/012046>
- Ballesteros, L., Teixeira, J., & Mussatto, S. (2014). Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 3493–3503. <http://doi.org/10.1007/s11947-014-1349-z>
- Bansal, S., Choudhary, S., Sharma, M., Kumar, S. S., Lohan, S., Bhardwaj, V., Syan, N., & Jyoti, S. (2013). Tea: A native source of antimicrobial agents. *Food Research International*, 53(2), 568-584. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.032>
- Bartel, C., Mesias, M., & Morales, F. J. (2015). Investigation on the extractability of melanoidins in portioned espresso coffee. *Food Research International*, 67, 356-365. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.053>
- Bastos, F., & Santos, L. (2015). Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application – a review. *Journal of Microencapsulation*, 33, 1-17. <http://doi.org/10.3109/02652048.2015.1115900>
- Belay, A., & Gholap, A. (2009). Characterization and determination of chlorogenic acid (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 3, 234-240. <http://doi.org/10.5897/AJPAC>
- Belay, A., Ture, K., Redi, M., & Asfaw, A. (2008). Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. *Food Chemistry*, 108(1), 310-315. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.024>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bertuzzi, M. A., Castro Vidaurre, E. F., Armada, M., & Gottifredi, J. C. (2007). Water vapor permeability of edible starch based films. *Journal of Food Engineering*, 80(3), 972-978. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.07.016>
- Blinova, L., Pastierova, A., & Sirotiak, M. (2017). Biodiesel production from spent coffee grounds. *Research papers faculty of materials science and technology slovak university of*

- technology*, 25, 113-121. <http://doi.org/10.1515/rput-2017-0013>
- Borges, A., José, H., Homem, V., & Simões, M. (2020). Comparison of techniques and solvents on the antimicrobial and antioxidant potential of extracts from acacia dealbata and olea europaea. *Antibiotics (Basel)*, 9(2). <http://doi.org/10.3390/antibiotics9020048>
- Bourtoom, T. (2008). Review Article : Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3), 237-248.
- Boutboul, A., Giampaoli, P., Feigenbaum, A., & Ducruet, V. (2002). Influence of the nature and treatment of starch on aroma retention. *Carbohydrate Polymers*, 47(1), 73-82. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00160-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00160-6)
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT*, 28(1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Bravo, J., Juárez, I., Monente, C., Caemmerer, B., Kroh, L. W., De Peña, M. P., & Cid, C. (2012). Evaluation of spent coffee obtained from the most common coffeemakers as a source of hydrophilic bioactive compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(51), 12565-12573. <http://doi.org/10.1021/jf3040594>
- Buratti, C., Barbanera, M., Lascaro, E., & Cotana, F. (2018). Optimization of torrefaction conditions of coffee industry residues using desirability function approach. *Waste Management*, 73, 523-534. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.04.012>
- Burniol-Figols, A., Cenian, K., Skiadas, I. V., & Gavala, H. N. (2016). Integration of chlorogenic acid recovery and bioethanol production from spent coffee grounds. *Biochemical Engineering Journal*, 116, 54-64. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.04.025>
- Cerqueira, M. A., Lima, Á. M., Teixeira, J. A., Moreira, R. A., & Vicente, A. A. (2009). Suitability of novel galactomannans as edible coatings for tropical fruits. *Journal of Food Engineering*, 94(3), 372-378. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.04.003>
- Cervera, A., Pastoriza, S., Rufian Henares, J., Parraga, J., Martín, G. J. M., & Delgado, G. (2017). Impact of spent coffee grounds as organic amendment on soil fertility and lettuce growth in two Mediterranean agricultural soils. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 64(6), 790-804. <http://doi.org/10.1080/03650340.2017.1387651>
- Chacon, P. A., Buffo, R. A., & Holley, R. A. (2006). Inhibitory effects of microencapsulated allyl isothiocyanate (AIT) against *Escherichia coli* O157:H7 in refrigerated, nitrogen packed,

- finely chopped beef. *International Journal of Food Microbiology*, 107(3), 231-237.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.030>
- Chen, A. Y., & Liu, L. F. (1994). DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 34(1), 191-218.
<http://doi.org/10.1146/annurev.pa.34.040194.001203>
- Chen, H., Li, L., Ma, Y., McDonald, T. P., & Wang, Y. (2019). Development of active packaging film containing bioactive components encapsulated in β -cyclodextrin and its application. *Food Hydrocolloids*, 90, 360-366. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.043>
- Chen, M. C., Yeh, G. H. C., & Chiang, B. H. (1996). Antimicrobial and physicochemical properties of methycellulose and chitosan film containing a preservative. *Journal of Food Processing and Preservation*, 20(5), 379-390. <http://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1996.tb00754.x>
- Chiu, Y. T., Chiu, C. P., Chien, J. T., Ho, G. H., Yang, J., & Chen, B. H. (2007). Encapsulation of lycopene extract from tomato pulp waste with gelatin and poly(γ -glutamic acid) as carrier. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5123-5130.
<http://doi.org/10.1021/jf0700069>
- Chotanakoon, K., & Naradisorn, M. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of spent coffee residues. In C. Hale & P. Jitareerat (Eds.), *Proceedings of the International Conference on Postharvest Pest and Disease Management in Exporting Horticultural Crops : PPDM2012* (pp. 187-192). Acta Horticulturae 973.
- Cichello, S. A. (2015). Oxygen absorbers in food preservation: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 1889-1895. <http://doi.org/10.1007/s13197-014-1265-2>
- CLSI. (2009). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard-ninth edition*. Clinical lab standards institute.
- Collin, F., Karkare, S., & Maxwell, A. (2011). Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(3), 479-497.
<http://doi.org/10.1007/s00253-011-3557-z>
- Coltelli, M.-B., Wild, F., Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lindner, M., Schmid, M., Weckel, V., Müller, K., Rodriguez, P., Staebler, A., Rodríguez-Turiénzo, L., & Lazzeri, A. (2016). State of the art in the development and properties of protein-based films and coatings and their applicability to cellulose based products: an extensive review. *Coatings*, 6(1).

<http://doi.org/10.3390/coatings6010001>

- Conde, T., & Mussatto, S. I. (2016). Isolation of polyphenols from spent coffee grounds and silverskin by mild hydrothermal pretreatment. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 46(4), 406-409. <http://doi.org/10.1080/10826068.2015.1084514>
- Coskun, B., Calikoglu, E., Emiroglu, Z., & Candogan, K. (2014). Antioxidant active packaging with soy edible films and oregano or thyme essential oils for oxidative stability of ground beef patties. *Journal of Food Quality*, 37, 203-212. <http://doi.org/10.1111/jfq.12089>
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582. <http://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>
- Cruz-Molina, A. V. D. L., Ayala Zavala, J. F., Bernal Mercado, A. T., Cruz Valenzuela, M. R., González-Aguilar, G. A., Lizardi-Mendoza, J., Brown-Bojorquez, F., & Silva-Espinoza, B. A. (2021). Maltodextrin encapsulation improves thermal and pH stability of green tea extract catechins. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(9), e15729. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15729>
- Cruz-Valenzuela, M. R., Ayala-Soto, R. E., Ayala-Zavala, J. F., Espinoza-Silva, B. A., González-Aguilar, G. A., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., Nazzaro, F., Fratianni, F., Tapia-Rodríguez, M. R., & Bernal-Mercado, A. T. (2022). Pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extracts as antimicrobial and antioxidant additives used in alfalfa sprouts. *Foods*, 11(17), 2588. <http://doi.org/10.3390/foods11172588>
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38(2), 99-107. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014>
- Dalgleish, D. G. (1997). Adsorption of protein and the stability of emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 8(1), 1-6. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01001-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01001-7)
- Daniel, T. (2018). *Use of spent coffee ground (SCG) as ingredient in bread formulation* [Master's thesis]. Addis Ababa University. <http://etd.aau.edu.et/bitstream/handle/123456789/18766/Teshome%20Daniel%20%20%202018.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Davidson, P. M., Cekmer, H. B., Monu, E. A., & Techathuvanan, C. (2015). 1 - The use of natural antimicrobials in food: An overview. In T. M. Taylor (Ed.), *Handbook of Natural*

Antimicrobials for Food Safety and Quality (pp. 1-27). Woodhead Publishing.

Del Nobile, M. A., Lucera, A., Costa, C., & Conte, A. (2012). Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*, 3(287), 1-13.

<http://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00287>

Desai, K. G. H., & Jin Park, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361-1394. <http://doi.org/10.1081/DRT-200063478>

Dhumal, C. V., Pal, K., & Sarkar, P. (2019). Characterization of tri-phasic edible films from chitosan, guar gum, and whey protein isolate loaded with plant-based antimicrobial compounds. *Polymer-Plastics Technology and Materials*, 58(3), 255-269.

<http://doi.org/10.1080/03602559.2018.1466179>

Díaz-Hernández, G. C., Alvarez-Fitz, P., Maldonado-Astudillo, Y. I., Jiménez-Hernández, J., Parra-Rojas, I., Flores-Alfaro, E., Salazar, R., & Ramírez, M. (2022a). Antibacterial, antiradical and antiproliferative potential of green, roasted, and spent coffee extracts. *Applied Sciences*, 12(4), 1938. <http://doi.org/10.3390/app12041938>

Díaz-Hernández, G. C., Alvarez-Fitz, P., Maldonado-Astudillo, Y. I., Jiménez-Hernández, J., Parra-Rojas, I., Flores-Alfaro, E., Salazar, R., & Ramírez, M. (2022b). Antibacterial, Antiradical and Antiproliferative Potential of Green, Roasted, and Spent Coffee Extracts. *Applied Sciences*, 12(4). Retrieved from [doi:10.3390/app12041938](https://doi.org/10.3390/app12041938)

Diblan, S., & Kaya, S. (2018). Antimicrobials used in active packaging films. *Food and Health*, 4, 63-79. <http://doi.org/10.3153/JFHS18007>

Drago, E., Pettinato, M., Campardelli, R., Firpo, G., Lertora, E., & Perego, P. (2022). Zein and spent coffee grounds extract as a green combination for sustainable food active packaging production: an investigation on the effects of the production processes. *Applied Sciences*, 12(22), 11311. <http://doi.org/10.3390/app122211311>

Edogbanya, P., Suleiman, M., Olorunmola, J., & Oijagbe, I. (2019). Comparative study on the antimicrobial effects of essential oils from peels of three citrus fruits. *Biology and Medicine*, 4(2), 49-54.

Eghbal, N., & Choudhary, R. (2018). Complex coacervation: Encapsulation and controlled release of active agents in food systems. *LWT*, 90, 254-264.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.036>

- Elieh-Ali-Komi, D., & Hamblin, M. R. (2016). Chitin and chitosan: production and application of versatile biomedical nanomaterials. *International journal of advanced research*, 4(3), 411-427.
- Elisha, I. L., Botha, F. S., McGaw, L. J., & Eloff, J. N. (2017). The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 133-133. <http://doi.org/10.1186/s12906-017-1645-z>
- Embuscado, M. E., & Huber, K. C. (2009). *Edible films and coatings for food applications*. Springer.
- Esquivel, P., & Jiménez, V. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46, 488-495. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.028>
- Faleiro, M. L. (2011). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Formatex research center.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510-523. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>
- Fanga, Z., & Bhandaria, B. (2012). *Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals*. Woodhead Publishing.
- Fangmeier, M., Lehn, D. N., Maciel, M. J., & Volken de Souza, C. F. (2019). Encapsulation of bioactive ingredients by extrusion with vibrating technology: advantages and challenges. *Food and Bioprocess Technology*, 12(9), 1472-1486. <http://doi.org/10.1007/s11947-019-02326-7>
- FAO. (2011). *Global food losses and food waste*. Interpack2011.
- Farah, A., Monteiro, M., Donangelo, C. M., & Lafay, S. (2008). Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *Journal of Nutrition*, 138(12), 2309-2315. <http://doi.org/10.3945/jn.108.095554>
- Forcina, A., Petrillo, A., Travaglioni, M., di Chiara, S., & De Felice, F. (2023). A comparative life cycle assessment of different spent coffee ground reuse strategies and a sensitivity analysis for verifying the environmental convenience based on the location of sites. *Journal of Cleaner Production*, 385, 135727. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135727>
- Foster, L. J. R., Ho, S., Hook, J., Basuki, M., & Marçal, H. (2015). Chitosan as a biomaterial:

- influence of degree of deacetylation on its physiochemical, material and biological properties. *PLOS ONE*, *10*(8), e0135153. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0135153>
- Friedman, M., Henika, P. R., & Mandrell, R. E. (2003). Antibacterial activities of phenolic benzaldehydes and benzoic acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, *66*(10), 1811-1821. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.10.1811>
- Getachew, A. T., Ahmad, R., Park, J.-S., & Chun, B.-S. (2021). Fish skin gelatin based packaging films functionalized by subcritical water extract from spent coffee ground. *Food Packaging and Shelf Life*, *29*, 100735. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100735>
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., & Mulligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *50*(3), 213-224. <http://doi.org/10.1080/096374899101256>
- Gontard, N., Guilbert, S., & Cuq, J.-L. (1992). Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science*, *57*(1), 190-195. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05453.x>
- Goy, R., Britto, D., & Assis, O. (2009). A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. *Polimeros-ciencia E Tecnologia - POLIMEROS*, *19*. <http://doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>
- Gutierrez, L., Escudero, A., Batlle, R., & Nerín, C. (2009). Effect of mixed antimicrobial agents and flavors in active packaging films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(18), 8564-8571. <http://doi.org/10.1021/jf901459e>
- Ha, J.-U., Kim, Y.-M., & Lee, D.-S. (2001). Multilayered antimicrobial polyethylene films applied to the packaging of ground beef. *Packaging Technology and Science*, *14*(2), 55-62. <http://doi.org/10.1002/pts.537>
- Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, *44*(2), 121-129. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00241-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00241-4)
- Higuera, L., López-Carballo, G., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2015). Incorporation of hydroxypropyl- β -cyclodextrins into chitosan films to tailor loading capacity for active aroma compound carvacrol. *Food Hydrocolloids*, *43*, 603-611.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.017>

Hindi, N., & Chabuck, Z. (2013). Antimicrobial activity of different aqueous lemon extracts.

Journal of Applied Pharmaceutical Science, 3, 74-78.

<http://doi.org/10.7324/JAPS.2013.3611>

Hooper, D. C. (2001). Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 32, S9-S15. <http://doi.org/10.1086/319370>

Huang, T., Qian, Y., Wei, J., & Zhou, C. (2019). Polymeric antimicrobial food packaging and its applications. *Polymers*, 11, 1-18. <http://doi.org/10.3390/polym11030560>

Huber, K., & Embuscado, M. (2009). *Edible films and coatings for food applications*. Springer.

Hughey, V. L., & Johnson, E. A. (1987). Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. *Applied and environmental microbiology*, 53(9), 2165-2170. <http://doi.org/10.1128/AEM.53.9.2165-2170.1987>

Huma, T., Rehman, A., Kishwar, F., & Raza, Z. A. (2022). Citric acid cross-linking of chitosan encapsulated spearmint oil for antibacterial cellulosic fabric. *Polymer science*, 64(5), 456-466. <http://doi.org/10.1134/s0965545x22700158>

Huovinen, P., Sundström, L., Swedberg, G., & Sköld, O. (1995). Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(2), 279-289. <http://doi.org/10.1128/aac.39.2.279>

ICO. (2020). *Historical data on the global coffee trade*.

http://www.ico.org/new_historical.asp?section=Statistics

Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y., & Shimamura, T. (1993). Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1147(1), 132-136.

[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(93\)90323-R](https://doi.org/10.1016/0005-2736(93)90323-R)

Jaber, N. (2012). Antimicrobial efficacy of oregano extracts. *Basrah Journal of Veterinary Research*, 11, 23-31. <http://doi.org/10.33762/bvetr.2012.54749>

Jaisan, C., Chase, S., & Punbusayakul, N. (2015). Antioxidant and antimicrobial activities of various solvents extracts of arabica coffee pulp. *Journal on processing and energy in agriculture*, 19(5), 224-227.

Jaisan, C., & Punbusayakul, N. (2016). Development of coffee pulp extract-incorporated chitosan film and its antimicrobial and antioxidant activities. *KKU Research Journal*, 21(14), 140-

149. <http://doi.org/10.14456/kkurj.2016.17>

- Jaka, H., & Liwa, A. (2015). Antimicrobial resistance: Mechanisms of action of antimicrobial agents. In A. Méndez-Vilas (Ed.), *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs* (pp. 876-885). Formatex research center
- Jin, T., & Zhang, H. (2008). Biodegradable polylactic acid polymer with nisin for use in antimicrobial food packaging. *Journal of Food Science*, 73(3), M127-134.
<http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00681.x>
- Kalaycioglu, Z., Torlak, E., Akın-Evingür, G., Ozen, İ., & Erim, F. B. (2017). Antimicrobial and physical properties of chitosan films incorporated with turmeric extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 882-888.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.174>
- Karel, M., & Lund, D. B. (2003). *Physical principles of food preservation: revised and expanded*. CRC Press.
- Kayaputri, I., Djali, M., Sukri, N., & Fazaryasti, R. (2020, 03/26). The antimicrobial effectiveness of cacao shell and cacao husk combination on inhibition of pathogenic bacteria in food products. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (pp. 012077). IOP Publishing.
- Ke, C.-L., Deng, F.-S., Chuang, C.-Y., & Lin, C.-H. (2021). Antimicrobial actions and applications of chitosan. *Polymers*, 13(6), 904. <http://doi.org/10.3390/polym13060904>
- Khorshidi, M., Heshmati, A., Taheri, M., Karami, M., & Mahjub, R. (2021). Effect of whey protein- and xanthan-based coating on the viability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and physiochemical, textural, and sensorial properties of yogurt. *Food science & nutrition*, 9(7), 3942-3953. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2398>
- Khotchapong, W., & Punbusayakul, N. (2019). Optimization of the infeed formula for spent coffee ground extract encapsulation using the response surface methodology. *Journal on processing and energy in agriculture*, 23(3), 108-112.
- Koch, K., Hartmann, K., Schreiber, L., Barthlott, W., & Neinhuis, C. (2006). Influences of air humidity during the cultivation of plants on wax chemical composition, morphology and leaf surface wettability. *Environmental and Experimental Botany*, 56, 1-9.

<http://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.09.013>

- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, *144*(1), 51-63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>
- Kovalcik, A., Obruca, S., & Marova, I. (2018). Valorization of spent coffee grounds: A review. *Food and Bioproducts Processing*, *110*, 104-119. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.05.002>
- Kravanja, G., Primožič, M., Knez, Ž., & Leitgeb, M. (2019). Chitosan-based (Nano) materials for novel biomedical applications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(10), 1960. <http://doi.org/10.3390/molecules24101960>
- Krol, K., Gantner, M., Tatarak, A., & Hallmann, E. (2020). The content of polyphenols in coffee beans as roasting, origin and storage effect. *European Food Research and Technology*, *246*(1), 33-39. <http://doi.org/10.1007/s00217-019-03388-9>
- Kumar, A., Yadav, N., Bhatt, M., Mishra, N., Chaudhary, P., & Singh, R. (2015). Sol-gel derived nanomaterials and its applications: A review. *Research Journal of Chemical Sciences*, *5*, 1-6.
- Kwasniewska-Sip, P., Cofta, G., & Nowak, P. (2018). Resistance of fungal growth on Scots pine treated with caffeine. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *132*, 178-184. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.03.007>
- Lambert, R. J., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, *91*(3), 453-462. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
- Lantano, C., Alfieri, I., Cavazza, A., Corradini, C., Lorenzi, A., Zucchetto, N., & Montenero, A. (2014). Natamycin based sol-gel antimicrobial coatings on polylactic acid films for food packaging. *Food Chemistry*, *165*, 342-347. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.066>
- Lee, H. S., & Chang, J. (2017). Antimicrobial ceramic hybrid polyethylene films with chamomile extracts for food packaging. *Journal of the Korean Ceramic Society*, *54*, 228-234. <http://doi.org/10.4191/kcers.2017.54.3.06>
- Lee, K.-Y., Lee, J.-H., Yang, H.-J., & Song, K. B. (2016). Production and characterisation of skate skin gelatin films incorporated with thyme essential oil and their application in chicken

- tenderloin packaging. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(6), 1465-1472. <http://doi.org/10.1111/ijfs.13119>
- Lei, Y., Wu, H., Jiao, C., Jiang, Y., Liu, R., Xiao, D., Lu, J., Zhang, Z., Shen, G., & Li, S. (2019). Investigation of the structural and physical properties, antioxidant and antimicrobial activity of pectin-konjac glucomannan composite edible films incorporated with tea polyphenol. *Food Hydrocolloids*, 94, 128-135. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.011>
- Limungkoon, K., Duanghom, V., & Punbusayakul, N. (2017). Effect of drying temperature on antioxidant and antimicrobial activities of coffee pulp extract. *Journal of Applied Science*, 16, 55-60. <http://doi.org/10.14416/j.appsci.2017.10.S08>
- Liolios, C. C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., & Chinou, I. (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 112(1), 77-83. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.060>
- Liu, Q., Meng, X., Li, Y., Zhao, C. N., Tang, G. Y., & Li, H. B. (2017). Antibacterial and antifungal activities of spices. *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1283. <http://doi.org/10.3390/ijms18061283>
- Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Ma, C., & Wang, Z. (2011). Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *Journal of Food Science*, 76(6), M398-M403. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02213.x>
- Lule, V., Garg, S., Gosewade, S., & Khedkar, C. (2016). Natamycin. In B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of food and health* (pp. 56–62). Academic Press.
- Macdonald, R., & Reitmeier, C. (2017). *Understanding Food Systems*. Academic Press.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 41(1), 1-21. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x>
- Majou, D., & Christieans, S. (2018). Mechanisms of the bactericidal effects of nitrate and nitrite in cured meats. *Meat Science*, 145, 273-284. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.013>
- Malavi, D. N., Muzhingi, T., & Abong, G. O. (2018). Good Manufacturing Practices and Microbial Contamination Sources in Orange Fleshed Sweet Potato Puree Processing Plant in Kenya. *International Journal of Food Science*, 2018, 4093161.

- Mandalari, G., Bennett, R. N., Bisignano, G., Trombetta, D., Saija, A., Faulds, C. B., Gasson, M. J., & Narbad, A. (2007). Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(6), 2056-2064. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03456.x>
- Massaya, J., Chan, K. H., Mills-Lamprey, B., & Chuck, C. J. (2023). Developing a biorefinery from spent coffee grounds using subcritical water and hydrothermal carbonisation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *13*(2), 1279-1295. <http://doi.org/10.1007/s13399-020-01231-w>
- Mekkerdchoo, O., Patipasena, P., & Borompichaichartkul, C. (2009). Liposome encapsulation of antimicrobial extracts in pectin film for inhibition of food spoilage microorganisms. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, *2*(4), 817-838.
- Min, B., Han, I., & Dawson, P. (2010). Antimicrobial gelatin films reduce *Listeria monocytogenes* on turkey bologna. *Poultry science*, *89*, 1307-1314. <http://doi.org/10.3382/ps.2009-00451>
- Mohammed, M., & Al-Bayati, F. A. Y. (2009). Isolation, identification and purification of caffeine from *Coffea arabica* L. and *Camellia sinensis* L.: A combination antibacterial study. *International Journal of Green Pharmacy*, *3*, 52-57. <http://doi.org/10.4103/0973-8258.49375>
- Mohsenabadi, N., Rajaei, A., Tabatabaei, M., & Mohsenifar, A. (2018). Physical and antimicrobial properties of starch-carboxy methyl cellulose film containing rosemary essential oils encapsulated in chitosan nanogel. *International Journal of Biological Macromolecules*, *112*, 148-155. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.034>
- Monente, C., Bravo, J., Vitas, A. I., Arbillaga, L., De Peña, M. P., & Cid, C. (2015). Coffee and spent coffee extracts protect against cell mutagens and inhibit growth of food-borne pathogen microorganisms. *Journal of Functional Foods*, *12*, 365-374. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.006>
- Montero-Garcia, M. P., Gomez-Guillen, M. C., Lopez-Caballero, M. E., & Barbosa-Canovas, G. V. (2017). *Edible films and coatings: fundamentals and applications*. CRC Press.
- Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, *83*, 173-179. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.09.036>
- Mussatto, S. I., Carneiro, L. M., Silva, J. P. A., Roberto, I. C., & Teixeira, J. A. (2011). A study on

- chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 368-374. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.063>
- Myers, R. L. (2007). *The 100 most important chemical compounds : a reference guide*. Greenwood.
- Naidu, A. S. (2000). *Natural food antimicrobial systems*. CRC Press.
- Navarro, R., Arancibia, C., Herrera, M. L., & Matiacevich, S. (2016). Effect of type of encapsulating agent on physical properties of edible films based on alginate and thyme oil. *Food and Bioproducts Processing*, 97, 63-75. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.11.001>
- Nejad, M. A. S., Shabani, S., Bayat, M., & Hosseini, S. E. (2014). Antibacterial effect of garlic aqueous extract on staphylococcus aureus in hamburger. *Jundishapur journal of microbiology*, 7(11), e13134-e13134. <http://doi.org/10.5812/jjm.13134>
- Nonsee, K., Supitchaya, C., & Thawien, W. (2011). Antimicrobial activity and the properties of edible hydroxypropyl methylcellulose based films incorporated with encapsulated clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) oil. *International Food Research Journal*, 18, 1531-1541.
- Nonthakaew, A., Matan, N., & Aewsiri, T. (2015). Caffeine in foods and its antimicrobial activity. *International Food Research Journal*, 22, 9-14.
- Noudoost, B., Noori, N., Abedini, G., Gandomi, H., Akhondzadeh Basti, A., Ashkan, J., & Ghadami, F. (2015). Encapsulation of green tea extract in nanoliposomes and evaluation of its antibacterial, antioxidant and prebiotic properties. *Journal of Medicinal Plants*, 14, 66-78.
- Okur, I., Soyler, B., Sezer, P., Oztop, M. H., & Alpas, H. (2021). Improving the recovery of phenolic compounds from spent coffee grounds (SCG) by environmentally friendly extraction techniques. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(3), 613. <http://doi.org/10.3390/molecules26030613>
- Otoni, C. G., Espitia, P. J. P., Avena-Bustillos, R. J., & McHugh, T. H. (2016). Trends in antimicrobial food packaging systems: Emitting sachets and absorbent pads. *Food Research International*, 83, 60-73. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.02.018>
- Ozdemir, M., & Floros, J. (2008). Optimization of edible whey protein films containing preservatives for water vapor permeability, water solubility and sensory characteristics. *Journal of Food Engineering*, 86, 215-224. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.09.028>
- Pal, S., & Saha, C. (2013). A review on structure–affinity relationship of dietary flavonoids with

- serum albumins. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 32, 1132-1147.
<http://doi.org/10.1080/07391102.2013.811700>
- Panak Balentić, J., Ačkar, Đ., Jokić, S., Jozinović, A., Babić, J., Miličević, B., Šubarić, D., & Pavlović, N. (2018). Cocoa shell: A by-product with great potential for wide application. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(6). <http://doi.org/10.3390/molecules23061404>
- Panusa, A., Zuorro, A., Lavecchia, R., Marrosu, G., & Petrucci, R. (2013). Recovery of natural antioxidants from spent coffee grounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(17), 4162-4168. <http://doi.org/10.1021/jf4005719>
- Passarinho, A., Dias, N., Camilloto, G., Cruz, R., Otoni, C., Moraes, A. R., & Soares, N. (2014). Sliced bread preservation through oregano essential oil-containing sachet. *Journal of Food Process Engineering*, 37, 53-62. <http://doi.org/10.1111/jfpe.12059>
- Pereira de Abreu, D. A., Losada, P. P., Maroto, J., & Cruz, J. M. (2010). Evaluation of the effectiveness of a new active packaging film containing natural antioxidants (from barley husks) that retard lipid damage in frozen Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Food Research International*, 43(5), 1277-1282. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.019>
- Perumal, V., Sunder, R., Elayaraja, S., Jebasingh, S., Sudhakar, S., & Kalyanaraman, S. (2019). Antimicrobial and toxicity study of zinc oxide sol-gel solution for food preservation applications. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 11, 1023-1030.
<http://doi.org/10.1166/asem.2019.2449>
- Piegatek, A., zywicka, A., Niemczyk, A., & Goszczynska, A. (2021). Antibacterial activity of N,O-acylated chitosan derivative. *Polymers*, 13(1), 107. <http://doi.org/10.3390/polym13010107>
- Pires, A. C., Soares, N., Andrade, N., Mendes da Silva, L., Camilloto, G., & Bernardes, P. (2008). Development and evaluation of active packaging for sliced mozzarella preservation. *Packaging Technology and Science*, 21, 375-383. <http://doi.org/10.1002/pts.815>
- Potter, N. N., & Hotchkiss, J. H. (1995). *Food deterioration and its control*. Springer US.
- Pranoto, Y., Rakshit, S. K., & Salokhe, V. M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT*, 38(8), 859-865.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.09.014>
- Prasad, P., & Kochhar, A. (2014). Active packaging in food industry: A review. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8, 01-07.

<http://doi.org/10.9790/2402-08530107>

- Priyadarshi, R., Sauraj, Kumar, B., Deebea, F., Kulshreshtha, A., & Negi, Y. S. (2018). Chitosan films incorporated with Apricot (*Prunus armeniaca*) kernel essential oil as active food packaging material. *Food Hydrocolloids*, 85, 158-166.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.003>
- Pruthviraj, P., Suchita, B., Shital, K., & Shilpa, K. (2011). Evaluation of antibacterial activity of caffeine. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 2, 1354-1357.
- Punbusayakul, N., Samart, K., & Sudmee, W. (2018). Antimicrobial activity of pineapple peel extract. In *The innovation of functional foods in Asia: IFFA 2018* (pp. 141-149). University of Phayao.
- Rachtanapun, P., Sattayarak, T., & Ketsamak, N. (2012). Correlation of density and properties of particleboard from coffee waste with urea-formaldehyde and polymeric methylene diphenyl diisocyanates. *Journal of Composite Materials*, 46(15), 1839-1850.
<https://doi.org/10.1177/0021998311426624>
- Rajapaksha, S. W., & Shimizu, N. (2021). Development and characterization of functional starch-based films incorporating free or microencapsulated spent black tea extract. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(13), 3898. <http://doi.org/10.3390/molecules26133898>
- Ramirez-Coronel, A., Marnet, N., Kolli, V., Roussos, S., Guyot, S., & Augur, C. (2004). Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*Coffea, arabica*) by thiolysis-high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1344-1349. <http://doi.org/10.1021/jf035208t>
- Ramon-Goncalves, M., Gomez-Mejia, E., Rosales-Conrado, N., Leon-Gonzalez, M., & Madrid, Y. (2019). Extraction, identification and quantification of polyphenols from spent coffee grounds by chromatographic methods and chemometric analyses. *Waste Management*, 96, 15-24. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.07.009>
- Rashidaie Abandansarie, S. S., Ariaii, P., & Charmchian Langerodi, M. (2019). Effects of encapsulated rosemary extract on oxidative and microbiological stability of beef meat during refrigerated storage. *Food science & nutrition*, 7(12), 3969-3978.
<https://doi.org/10.1002/fsn3.1258>
- Rezaei, M., Karimi, F., Shariatifar, N., Mohammadpourfard, I., & Shiri Malekabad, E. (2015).

Antimicrobial activity of the essential oil from the leaves and seeds of coriandrum sativum toward food-borne pathogens. *West indian medical journal*, 65(1), 8-12.

<http://doi.org/10.7727/wimj.2014.162>

Rhim, J.-W., & Shellhammer, T. H. (2005). *Innovations in food packaging*. Academic Press.

Rhim, J. W., & Shellhammer, T. H. (2007). Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(4), 411-433.

<http://doi.org/10.1080/10408390600846366>

Rigon, R. T., & Zapata Noreña, C. P. (2016). Microencapsulation by spray-drying of bioactive compounds extracted from blackberry (*rubus fruticosus*). *Journal of Food Science and Technology*, 53(3), 1515-1524. <http://doi.org/10.1007/s13197-015-2111-x>

Rocha, M., Ferreira, F. A., Souza, M. M., & Prentice, C. (2013). Antimicrobial films: a review. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, 1, 23-31.

Romainor, A. N., Chin, S. F., & Lihan, S. (2022). Antimicrobial starch-based film for food packaging application. *Starch - Stärke*, 74(3-4), 2100207.

<https://doi.org/10.1002/star.202100207>

Rosas-Burgos, E., Burgos-Hernandez, A., Noguera-Artiaga, L., Kacaniova, M., Hernandez, F., Cardenas-Lopez, J., & Carbonell-Barrachina, A. (2016). Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts as affected by cultivar. *Journal of the science of food and agriculture*, 97(3), 802-810. <http://doi.org/10.1002/jsfa.7799>

Rubilar, J. F., Cruz, R. M. S., Silva, H. D., Vicente, A. A., Khmelinskii, I., & Vieira, M. C. (2013). Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. *Journal of Food Engineering*, 115(4), 466-474.

<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.07.009>

Ruiz-Gonzalez, N., Lopez-Malo, A., Palou, E., Ramirez-Corona, N., & Jimenez-Munguia, M. T. (2019). Antimicrobial activity and physicochemical characterization of oregano, thyme and clove leaf essential oils, nonencapsulated and nanoencapsulated, using emulsification. *Applied food biotechnology*, 6(4), 237-246.

Saeed, F., Afzaal, M., Tufail, T., & Ahmad, A. (2019). *Active antimicrobial food packaging*. Intechopen limited.

- Saini, A., Panesar, P. S., & Bera, M. B. (2019). Valorization of fruits and vegetables waste through green extraction of bioactive compounds and their nanoemulsions-based delivery system. *Bioresources and Bioprocessing*, 6(1), 26. <http://doi.org/10.1186/s40643-019-0261-9>
- San Martin Ruiz, M., Reiser, M., & Kranert, M. (2021). Composting and methane emissions of coffee by-products. *Atmosphere*, 12(9), 1153. <http://doi.org/10.3390/atmos12091153>
- Santos Sánchez, N., Salas-Coronado, R., Villanueva, C., & Hernandez-Carlos, B. (2019). *Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism*.
- Saucedo-Pompa, S., Rojas-Molina, R., Aguilera-Carbó, A. F., Saenz-Galindo, A., Garza, H. d. L., Jasso-Cantú, D., & Aguilar, C. N. (2009). Edible film based on candelilla wax to improve the shelf life and quality of avocado. *Food Research International*, 42(4), 511-515. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.017>
- Sengul, M., Yildiz, H., Gungor, N., Cetin, B., & Eser, Z. (2009). Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 22, 102-106.
- Seyedabadi, M. M., Rostami, H., Jafari, S. M., & Fathi, M. (2021). Development and characterization of chitosan-coated nanoliposomes for encapsulation of caffeine. *Food Bioscience*, 40, 100857. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100857>
- Shahidi, F., & Han, X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(6), 501-547. <http://doi.org/10.1080/10408399309527645>
- Singh Arora, D., Jeet Kaur, G., & Kaur, H. (2009). Antibacterial activity of tea and coffee: their extracts and preparations. *International Journal of Food Properties*, 12(2), 286-294. <http://doi.org/10.1080/10942910701675928>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In L. Packer (Ed.), *Methods in enzymology* (pp. 152-178). Academic Press.
- Siripatrawan, U., & Harte, B. R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24(8), 770-775. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.04.003>
- Skibsted, L. H., Risbo, J., & Andersen, M. L. (2010). *Chemical deterioration and physical instability of food and beverages*. Woodhead publishing.

- Smith, J. S., & Hui, Y. H. (2004). *Food processing principles and applications*. Wiley-Blackwell.
- Solikhin, A., Hermawan, B., Octaviani, E. A., Prabuningrum, D. S., Nurmadi, Gazali, I., Mangurai, S. U. N. M., Murayama, K., & Saad, S. (2018). Morphological, chemical, and thermal characteristics of chitosan nanocomposite films reinforced with steam-exploded microfibrillated cellulose. *Journal of the Indian Academy of Wood Science*, 15(1), 68-79. <http://doi.org/10.1007/s13196-018-0210-9>
- Sousa, C., Gabriel, C., Cerqueira, F., Manso, M. C., & Vinha, A. (2015). *The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs*. Formatex research center.
- Souza, A. C., Goto, G. E. O., Mainardi, J. A., Coelho, A. C. V., & Tadini, C. C. (2013). Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil: Antimicrobial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. *LWT*, 54(2), 346-352. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.017>
- Souza, E., Albuquerque, T., Santos, A., Massa, N., & Alves, J. (2018). Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health-promoting properties and food functionalities – A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, 1-15. <http://doi.org/10.1080/10408398.2018.1425285>
- Souza, V., Pires, J., Rodrigues, C., Rodrigues, P., Lopes, A., Silva, R. J. C., Caldeira, J., Duarte, M., Braz Fernandes, F., Coelho, I., & Fernando, A. (2019). Physical and morphological characterization of chitosan/montmorillonite films incorporated with ginger essential oil. *Coatings*, 9, 700. <http://doi.org/10.3390/coatings9110700>
- Stapleton, P., Shah, S., Hamilton-Miller, J., Hara, Y., Nagaoka, Y., Kumagai, A., Uesato, S., & Taylor, P. (2004). Anti-Staphylococcus aureus activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-O-acyl-catechins. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24, 374-380. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.03.024>
- Sun, L., Sun, J., Chen, L., Niu, P., Yang, X., & Guo, Y. (2017). Preparation and characterization of chitosan film incorporated with thinned young apple polyphenols as an active packaging material. *Carbohydrate Polymers*, 163, 81-91. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.016>
- Sun, S. Q., Sun, B., Zhang, W., & Wang, D. (2008). Preparation and antibacterial activity of Ag-

- TiO₂ composite film by liquid phase deposition (LPD) method. *Bulletin of Materials Science*, 31(1), 61-66. <http://doi.org/10.1007/s12034-008-0011-7>
- Taguri, T., Tanaka, T., & Kouno, I. (2006). Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 29, 2226-2235. <http://doi.org/10.1248/bpb.29.2226>
- Talón, E., Vargas, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2019). Antioxidant starch-based films with encapsulated eugenol. Application to sunflower oil preservation. *LWT*, 113, 108290. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108290>
- Terry, L. A., Ilkenhans, T., Poulston, S., Rowsell, L., & Smith, A. W. J. (2007). Development of new palladium-promoted ethylene scavenger. *Postharvest Biology and Technology*, 45(2), 214-220. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.11.020>
- Thenepalli, T., Chilakala, R., & Ahn, J.-W. (2017). Environmental effect of the coffee waste and anti-microbial property of oyster shell waste treatment. *Journal of Energy Engineering*, 26, 39-49. <http://doi.org/10.5855/ENERGY.2017.26.2.097>
- Timilsena, Y., Haque, M. A., & Adhikari, B. (2020). Encapsulation in the food industry: a brief historical overview to recent developments. *Food and Nutrition Sciences*, 11(06), 481-508. <http://doi.org/10.4236/fns.2020.116035>
- Toyama, D., Ferreira, M., Romoff, P., Fávero, O., Gaeta, H., & Toyama, M. (2014). Effect of chlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid) isolated from *Baccharis oxyodonta* on the structure and pharmacological activities of secretory phospholipase A2 from *Crotalus durissus terrificus*. *BioMed research international*, 2014, 726585. <http://doi.org/10.1155/2014/726585>
- Varavinit, S., Chaokasem, N., & Shobsngob, S. (2001). Studies of flavor encapsulation by agents produced from modified sago and tapioca starches. *Starch - Stärke*, 53(6), 281-287. [http://doi.org/10.1002/1521-379X\(200106\)53:6<281::AID-STAR281>3.0.CO;2-R](http://doi.org/10.1002/1521-379X(200106)53:6<281::AID-STAR281>3.0.CO;2-R)
- Vasconez, M. B., Flores, S. K., Campos, C. A., Alvarado, J., & Gerschenson, L. N. (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, 42(7), 762-769. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.026>
- Vedantam, G., Guay, G. G., Austria, N. E., Doktor, S. Z., & Nichols, B. P. (1998). Characterization

- of mutations contributing to sulfathiazole resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(1), 88-93. <http://doi.org/10.1128/AAC.42.1.88>
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., & Debevere, J. (2002). Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. *Food Additives & Contaminants*, 19(1), 163-171. <http://doi.org/10.1080/02652030110104852>
- WHO. (2019). *Food safety*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Wittaya, T. (2008). Edible films and coatings: Characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3).
- Yilmaz Atay, H. (2020). Antibacterial activity of chitosan-based systems. In S. Jana & S. Jana (Eds.), *Functional chitosan* (pp. 457-489). Springer.
- Yixi, X., Weijie, Y., Fen, T., Xiaoqing, C., & Licheng, R. (2015). Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. *Current Medicinal Chemistry*, 22(1), 132-149. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867321666140916113443>
- Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. structure, properties and applications. *Marine Drugs*, 13, 1133-1174. <https://doi.org/10.3390/md13031133>
- Zaman, N., Nyam, K., & Pui, L. P. (2018). Chitosan film incorporated with *Garcinia atroviridis* for the packaging of Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*). *Ciência e Agrotecnologia*, 42(6), 666-675. <https://doi.org/10.1590/1413-70542018426019918>
- Zemke, A., C., Gladwin, M., T., & Bomberger, J., M. (2015). Sodium nitrite blocks the activity of aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(6), 3329-3334. <https://doi.org/10.1128/AAC.00546-15>
- Zhang, H., Li, X., & Kang, H. (2019). Chitosan coatings incorporated with free or nano-encapsulated *Paulownia Tomentosa* essential oil to improve shelf-life of ready-to-cook pork chops. *LWT*, 116, 108580. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108580>
- Zivanovic, S., Chi, S., & Draughon, A. F. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science*, 70(1), M45-M51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09045.x>





ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์

ก-1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar (MHA)

สารเคมี

1. Muller Hinton Broth (MHB)
2. ฐัน (Agar)
3. น้ำกลั่น

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อผงตำเร็จรูป MHB 21 กรัม ผสมกับผงฐัน 15 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มแล้วคนให้เข้ากันจนละลาย นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดัน (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ได้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 20 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ และตั้งทิ้งไว้ให้เย็นจนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA แข็ง

2) การเตรียมสารละลายน้ำเกลือ 0.85 %

สารเคมี

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
2. น้ำกลั่น

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดัน (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก-2 การเตรียม 0.5 McFarland standard

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)
2. แบเรียมคลอไรด์ ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$)
3. น้ำกลั่น

1) การเตรียมกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร (H_2SO_4)

ปีเปตกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตร โดยใช้ น้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน เก็บในขวดแก้วที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถเก็บไว้ได้นาน 1 ปี

2) การเตรียมแบเรียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1.175 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

ชั่งแบเรียมคลอไรด์ 1.175 กรัม ละลายโดยใช้น้ำกลั่น ลงในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรโดยใช้น้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน เก็บในขวดแก้วที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถเก็บไว้ได้นาน 1 ปี

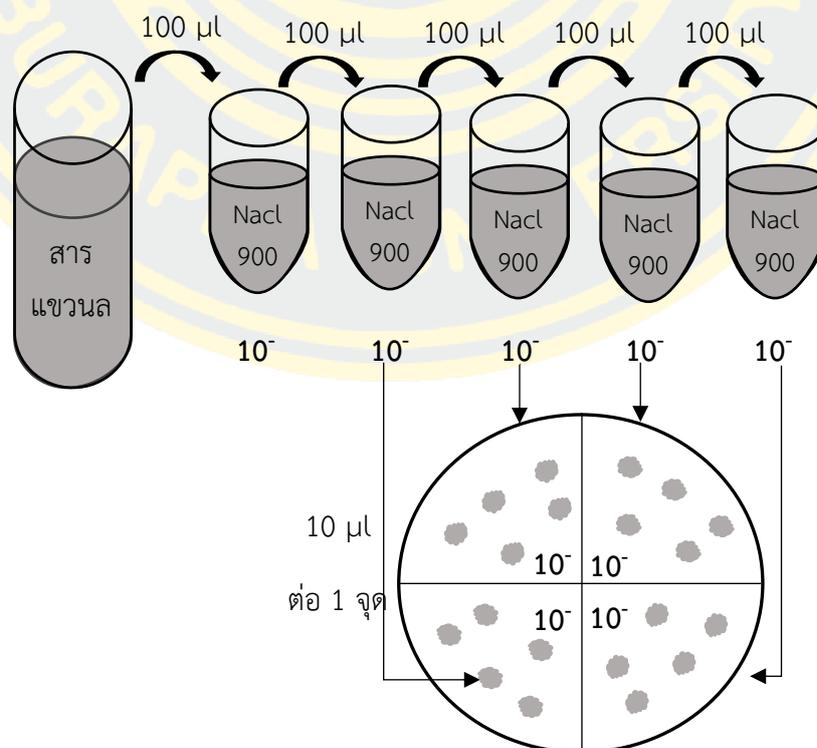
ก-3 วิเคราะห์จำนวนเชื้อโดยวิธี drop plate technique (Herigstad, Hamilton, & Heersink, 2001)

สารเคมี

1. Mueller Hinton agar (MHA)
2. สารละลายน้ำเกลือ 0.85 %

วิธีการทดลอง

นำสารแขวนลอยแบคทีเรียตัวอย่างมาเจือจางเป็นลำดับ จนได้ความเจือจางที่เหมาะสม โดยใช้สารละลายน้ำเกลือ 0.85 % (85 % normal saline) ทำการเปิดสารแขวนลอยแบคทีเรียที่ระดับการเจือจางที่ต้องการ 10 ไมโครลิตร แต่ละความเจือจางหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA บนเพลท 5 ครั้ง จำนวน 5 ตำแหน่ง (ภาพผนวก ก-1) และนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี และคำนวณจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เป็น CFU/มิลลิลิตร



ภาพผนวก ก-1 การเจือจางสารแขวนลอยแบคทีเรีย และหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพและทางเคมี

ข-1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compounds, TPC)

การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

สารเคมี

1. Folin-Ciocalteu reagent
2. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)
3. กรดแกลลิก (gallic acid)

1) เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent 10%

เปิด Folin-Ciocalteu reagent 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ปิดฝาแล้วเขย่าให้เข้ากัน

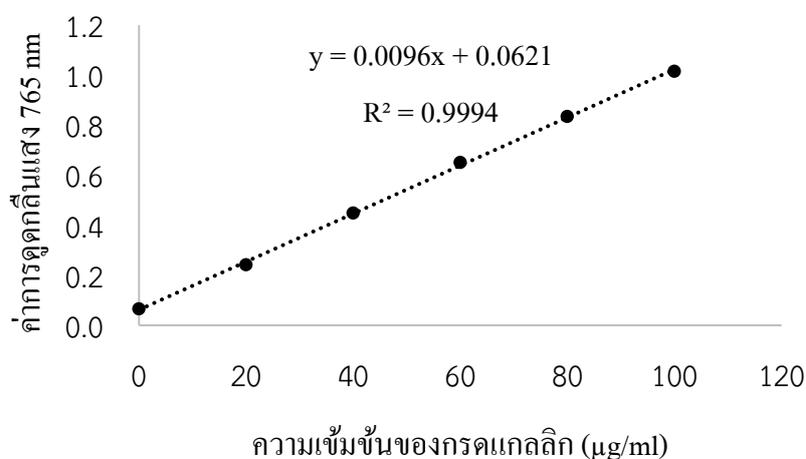
2) เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 7.5%

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ปิดฝาแล้วเขย่าให้เข้ากัน (เตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อทำการทดลอง) 3)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

ชั่งกรดแกลลิก 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ปิดฝาแล้วเขย่าให้เข้ากัน (เตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อทำการทดลอง)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 3.5.2.3 โดยใช้สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน (0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และนำมาพลอตกราฟระหว่าง ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก และค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ดังแสดงในภาพผนวก ข-1



ภาพผนวก ข-1 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ข-2 วิเคราะห์ปริมาณกรดคลอโรจินิก และคาเฟอีน (chlorogenic acids and caffeine compound)

การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดคลอโรจินิก และคาเฟอีน

สารเคมี

1. ไคลคลอโรมีเทน (dichloromethane)
2. กรดคลอโรจินิก (chlorogenic acid)
3. คาเฟอีน (caffeine)

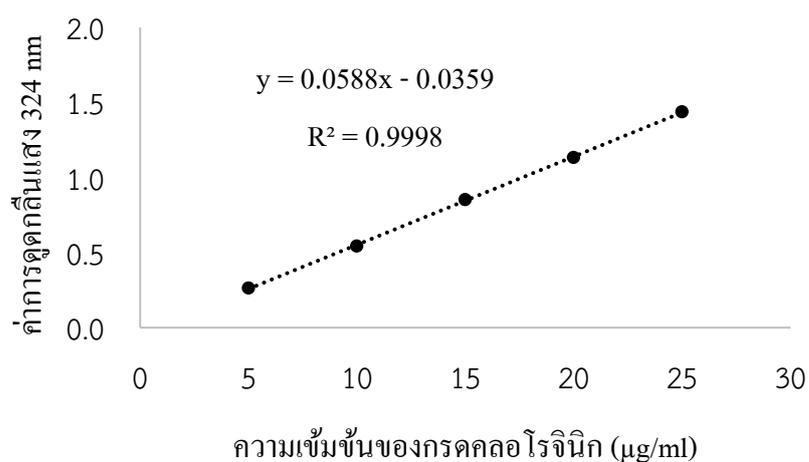
1) เตรียมสารละลายกรดคลอโรจินิก

ชั่งกรดคลอโรจินิก 0.0100 กรัม ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ปิดฝาแล้วเขย่าให้เข้ากัน

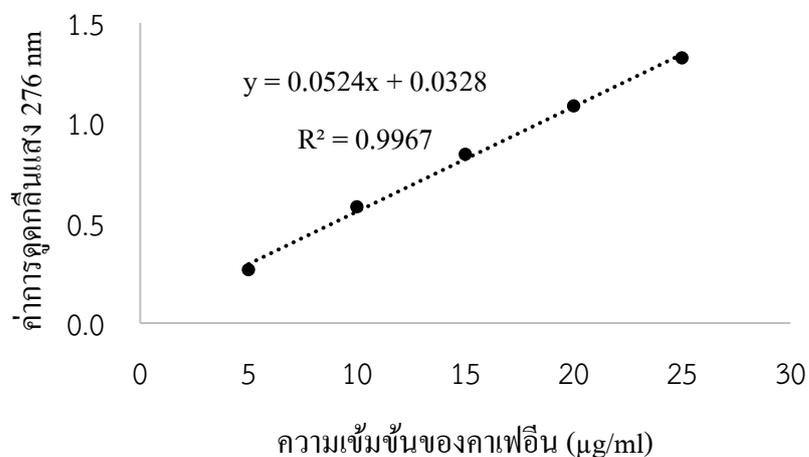
2) เตรียมสารละลายคาเฟอีน

ชั่งคาเฟอีน 0.0100 กรัม ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยไคลคลอโรมีเทน ปิดฝาแล้วเขย่าให้เข้ากัน

ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดคลอโรจินิก และคาเฟอีน เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 3.5.2.3 โดยใช้สารละลายมาตรฐานกรดคลอโรจินิก และคาเฟอีนความเข้มข้นต่างๆ กัน (5 10 15 20 25 และ 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และนำมาพลอตกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดคลอโรจินิก และคาเฟอีน และค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ดังแสดงในภาพผนวก ข-2 และ ข-3 ตามลำดับ



ภาพผนวก ข-2 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณกรดคลอโรจินิก



ภาพผนวก ข-3 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีน

ข-3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH assay

การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH assay

สารเคมี

1. กรดแกลลิก (gallic acid)
2. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
3. เมทานอล (methanol)

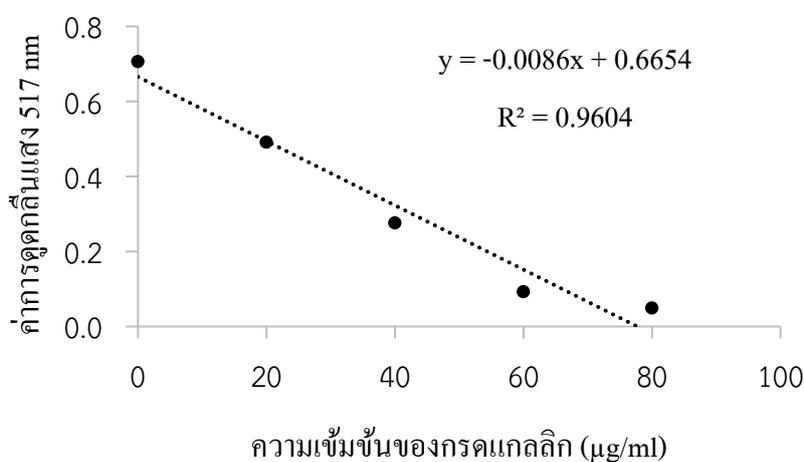
1) การเตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 1 mM

ซึ่ง DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 0.0024 กรัม ละลายในเมทานอล ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล ปิดฝาแล้วเขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืด (เตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อทำการทดลอง)

2) การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

ซึ่งกรดแกลลิก 0.0100 กรัม ละลายในเมทานอล ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล ปิดฝาแล้วเขย่าให้เข้ากัน (เตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อทำการทดลอง)

ทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH assay เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 3.5.2.34 โดยใช้สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน (0 20 40 60 และ 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และนำมาพลอตกราฟระหว่าง ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก และค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ดังแสดงในภาพผนวก ข-4



ภาพผนวก ข-4 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH assay

ข-4 การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี FRAP assay

การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี FRAP assay

สารเคมี

1. โซเดียมอะซิเตท (sodium Acetate)
2. กรดอะซิติก (acetic acid)
3. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid)
4. TPTZ (2, 4, 6-tripyridyl-striazine)
5. เฟอริกคลอไรด์ (ferric chloride)
6. เฟอรัสซัลเฟต (ferrous sulfate)

- 1) เตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 40 mM

นำกรดไฮโดรคลอริกมา 0.33 มิลลิลิตร ใสลงในขวดปรับปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

- 2) เตรียมสารมาตรฐาน TPTZ ความเข้มข้น 10 mM

ชั่ง TPTZ มา 0.3123 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริก 40 mM ก่อนใสลงในขวดปรับปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยกรดไฮโดรคลอริก

- 3) เตรียมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 20 mM

ซังเฟอริกคลอไรด์ 0.5406 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ใส่งในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

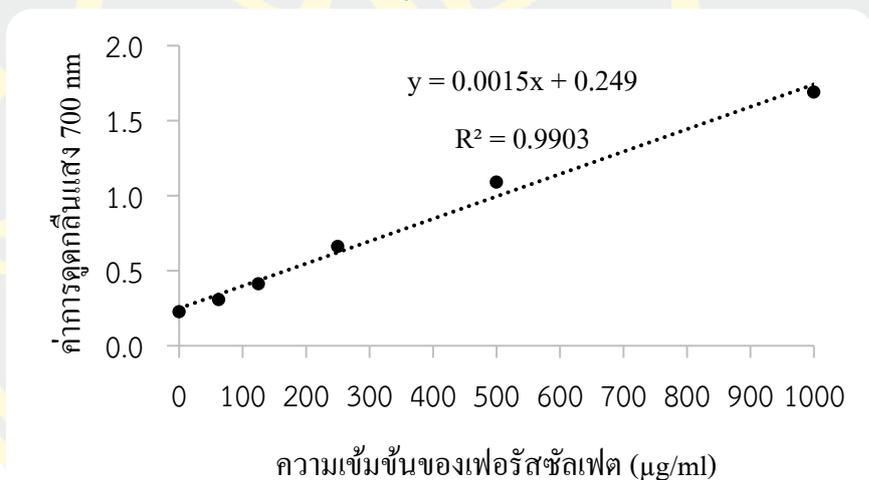
4) เตรียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 300 mM

ซังโซเดียมอะซิเตท 3.1000 กรัม ผสมกับกรดอะซิติก 16 มิลลิลิตร ใส่งในขวดปรับปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

5) เตรียมเฟอร์ริซัลเฟต ความเข้มข้น 1 mM

ซังสารมาตรฐานเฟอร์ริซัลเฟต 0.0139 กรัม ใส่งในขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

ทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี FRAP assay เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 3.5.2.34 โดยใช้สารละลายมาตรฐานเฟอร์ริซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน (0 62.5 125 250 500 และ 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และนำมาพลอตกราฟระหว่าง ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเฟอร์ริซัลเฟตและค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ดังแสดงในภาพผนวก ข-5



ภาพผนวก ข-5 กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี FRAP assay



ภาคผนวก ค

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางผนวก ค-1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* TISTR2329 ของฟิล์มไบโอดีซันที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันในปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี drop test method

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	4.9802	1.24056	21.41	0.002 ^{sig}
Error	5	0.2908	0.05816		
Total	9	5.2710			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* TISTR1984 ของฟิล์มไบโอดีซันที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันในปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี drop test method

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	1.2462	0.31156	8.22	0.020 ^{sig}
Error	5	0.1896	0.03792		
Total	9	1.4358			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Escherichia coli* TISTR527 ของฟิล์มไบโอดีซันที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันในปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี drop test method

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	2.8746	0.71865	32.42	0.001 ^{sig}
Error	5	0.1108	0.02217		
Total	9	2.9854			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Salmonella typhimurium* TISTR2519 ของฟิล์มไบโอดีซันที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันในปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี drop test method

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	1.3034	0.32584	5.15	0.051 ^{sig}
Error	5	0.3162	0.06324		
Total	9	1.6196			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* TISTR2329 ของฟิล์มไบโอดีซันที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันในปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 2

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	1.71016	0.42754	35.39	0.001 ^{sig}
Error	5	0.06040	0.01208		
Total	9	1.77056			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* TISTR2329 ของฟิล์มไบโอดีซันที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันในปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 4

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	11.736	2.9340	5.47	0.045 ^{sig}
Error	5	2.680	0.5360		
Total	9	14.416			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* TISTR2329 ของฟิล์มไบโโคซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันในปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 6

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	0.59336	0.14834	10.48	0.012 ^{sig}
Error	5	0.07080	0.01416		
Total	9	0.66416			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* TISTR2329 ของฟิล์มไบโโคซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันในปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 8

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	0.22750	0.05687	4.47	0.066 ^{ns}
Error	5	0.06363	0.01273		
Total	9	0.29113			

^{ns} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* TISTR1984 ของฟิล์มไบโโคซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันในปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 2

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	0.3990	0.09974	2.32	0.190 ^{ns}
Error	5	0.2150	0.04300		
Total	9	0.6140			

^{ns} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-10 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* TISTR1984 ของฟิล์มไบโอดีเซลที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน ในปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 4

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	0.1700	0.04250	1.45	0.342 ^{ns}
Error	5	0.1468	0.02936		
Total	9	0.3168			

^{ns} หมายถึง แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางผนวก ค-11 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* TISTR1984 ของฟิล์มไบโอดีเซลที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน ในปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 6

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	0.25016	0.06254	4.26	0.072 ^{sig}
Error	5	0.07340	0.01468		
Total	9	0.32356			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-12 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* TISTR1984 ของฟิล์มไบโอดีเซลที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน ในปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 8

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	1.41816	0.354540	49.52	0.000 ^{sig}
Error	5	0.03580	0.007160		
Total	9	1.45396			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-13 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Escherichia coli* TISTR527 ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันในปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 2

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	61.871	15.468	15.12	0.005 ^{sig}
Error	5	5.114	1.023		
Total	9	66.985			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-14 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Escherichia coli* TISTR527 ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันในปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 4

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	1.0074	0.25186	11.97	0.009 ^{sig}
Error	5	0.1052	0.02104		
Total	9	1.1126			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-15 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Escherichia coli* TISTR527 ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันในปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 6

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	2.3214	0.58034	23.18	0.002 ^{sig}
Error	5	0.1252	0.02504		
Total	9	2.4466			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-16 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Escherichia coli* TISTR527 ของฟิล์มไบโตะซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันในปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 8

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	1.11640	0.279100	43.07	0.000 ^{sig}
Error	5	0.03240	0.006480		
Total	9	1.14880			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-17 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Salmonella typhimurium* TISTR2519 ของฟิล์มไบโตะซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันในปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 2

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	2.0698	0.51745	22.27	0.002 ^{sig}
Error	5	0.1162	0.02324		
Total	9	2.1860			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-18 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Salmonella typhimurium* TISTR2519 ของฟิล์มไบโตะซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันในปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 4

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	32.120	8.0300	9.70	0.014 ^{sig}
Error	5	4.140	0.8280		
Total	9	36.260			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-19 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Salmonella typhimurium* TISTR2519 ของฟิล์มไบโโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันในปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 6

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	66.309	16.5771	33.69	0.001 ^{sig}
Error	5	2.460	0.4920		
Total	9	68.769			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-20 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Salmonella typhimurium* TISTR2519 ของฟิล์มไบโโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันในปริมาณ C ต่างๆกัน (0.0 0.25 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 8

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	7.4254	1.8564	17.71	0.004 ^{sig}
Error	5	0.5242	0.1048		
Total	9	7.9496			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-21 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* TISTR2329 ของฟิล์มไบโโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) และฟิล์มไบโโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี drop test method

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	72.333	12.0556	21.64	0.000 ^{sig}
Error	7	3.900	0.5571		
Total	13	76.233			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-22 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* TISTR1984 ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี drop test method

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	1.97280	0.328800	43.76	0.000 ^{sig}
Error	7	0.05260	0.007514		
Total	13	2.02540			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-23 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Escherichai coli* TISTR527 ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี drop test method

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	84.6986	14.1164	265.92	0.000 ^{sig}
Error	7	0.3716	0.0531		
Total	13	85.0702			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-24 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Salmonella typhimurium* TISTR2519 ของฟิล์มไบโตะซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) และฟิล์มไบโตะซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี drop test method

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	144.469	24.0781	1172.09	0.000 ^{sig}
Error	7	0.144	0.0205		
Total	13	144.613			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-25 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* TISTR2329 ของฟิล์มไบโตะซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) และฟิล์มไบโตะซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 2

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	2.20568	0.367614	92.23	0.000 ^{sig}
Error	7	0.02790	0.003986		
Total	13	2.23358			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-26 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* TISTR2329 ของฟิล์มไบโโตนานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (eC-CH) และฟิล์มไบโตนานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 4

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	81.666	13.6111	25.62	0.000 ^{sig}
Error	7	3.719	0.5312		
Total	13	85.385			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-27 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* TISTR2329 ของฟิล์มไบโตนานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (eC-CH) และฟิล์มไบโตนานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 6

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	25.263	4.2105	27.45	0.000 ^{sig}
Error	7	1.074	0.1534		
Total	13	26.337			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-28 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* TISTR2329 ของฟิล์มไบโโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (eC-CH) และฟิล์มไบโโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 8

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	33.414	5.5690	38.13	0.000 ^{sig}
Error	7	1.022	0.1461		
Total	13	34.436			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-28 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* TISTR1984 ของฟิล์มไบโโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (eC-CH) และฟิล์มไบโโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 2

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	0.79749	0.13291	10.87	0.003 ^{sig}
Error	7	0.08560	0.01223		
Total	13	0.88309			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-28 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* TISTR1984 ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 4

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	0.7992	0.13320	4.28	0.039 ^{ns}
Error	7	0.2176	0.03109		
Total	13	1.0168			

^{ns} หมายถึง แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางผนวก ค-28 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* TISTR1984 ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 6

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	0.5763	0.09606	3.19	0.078 ^{ns}
Error	7	0.2110	0.03014		
Total	13	0.7873			

^{ns} หมายถึง แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางผนวก ค-28 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* TISTR1984 ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 8

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	0.98698	0.164496	35.26	0.000 ^{sig}
Error	7	0.03266	0.004665		
Total	13	1.01963			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-29 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Escherichai coli* TISTR527 ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 2

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	79.189	13.1981	13.63	0.002 ^{sig}
Error	7	6.780	0.9686		
Total	13	85.969			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-30 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Escherichai coli* TISTR527 ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 4

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	0.4338	0.07230	4.07	0.044 ^{sig}
Error	7	0.1244	0.01777		
Total	13	0.5582			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-31 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Escherichai coli* TISTR527 ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 6

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	1.4369	0.23949	14.65	0.001 ^{sig}
Error	7	0.1144	0.01634		
Total	13	1.5513			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-32 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Escherichai coli* TISTR527 ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 8

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	74.526	12.4210	18.95	0.001 ^{sig}
Error	7	4.589	0.6555		
Total	13	79.115			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-33 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Salmonella typhimurium* TISTR2519 ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 2

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	2.12817	0.354695	45.98	0.000 ^{sig}
Error	7	0.05400	0.007714		
Total	13	2.18217			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-34 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Salmonella typhimurium* TISTR2519 ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 4

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	1.42800	0.238000	24.87	0.000 ^{sig}
Error	7	0.06700	0.009571		
Total	13	1.49500			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-35 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Salmonella typhimurium* TISTR2519 ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 6

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	73.08	12.180	7.34	0.009 ^{sig}
Error	7	11.62	1.660		
Total	13	84.70			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-36 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ *Salmonella typhimurium* TISTR2519 ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %) ด้วยวิธี migration test method ณ วันที่ 8

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	33.7558	5.62596	352.25	0.000 ^{sig}
Error	7	0.1118	0.01597		
Total	13	33.8676			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-37 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	321583	53597.2	1808.14	0.000 ^{sig}
Error	14	415	29.6		
Total	20	321998			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-38 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดคลอโรจินิกของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	153161	25526.9	373.67	0.000 ^{sig}
Error	14	956	68.3		
Total	20	154118			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-39 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณคาเฟอีนของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	91400.8	15233.5	995.73	0.000 ^{sig}
Error	14	214.2	15.3		
Total	20	91615.0			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-40 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	46246.6	7707.76	550.79	0.000 ^{sig}
Error	14	195.9	13.99		
Total	20	46442.5			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-41 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP assay ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH) ที่มีปริมาณ C และ eC ต่างๆกัน (0 0.50 0.75 และ 1.0 %)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	6	147304755	24550793	1860.45	0.000 ^{sig}
Error	14	184746	13196		
Total	20	147489501			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-42 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความหนาของฟิล์มไคโตซาน ฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	2	0.001977	0.000988	42.77	0.000 ^{sig}
Error	6	0.000139	0.000023		
Total	8	0.002116			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-43 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความทึบแสงของฟิล์มโคโตซาน ฟิล์มโคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (eC-CH) และฟิล์มโคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (C-CH)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	2	84.7566	42.3783	379.02	0.000 ^{sig}
Error	6	0.6709	0.1118		
Total	8	85.4275			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-44 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการต้านทานแรงดึงของฟิล์มโคโตซาน ฟิล์มโคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (eC-CH) และฟิล์มโคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (C-CH)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	2	522.5	261.27	16.88	0.000 ^{sig}
Error	18	278.55	15.47		
Total	20	801.1			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-45 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าการยืดตัวเมื่อขาดของฟิล์มโคโตซาน ฟิล์มโคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (eC-CH) และฟิล์มโคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูลชัน (C-CH)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	2	1368	683.96	9.44	0.002 ^{sig}
Error	18	1304	72.42		
Total	20	2671			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-46 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าการละลายน้ำของฟิล์มไคโตซาน ฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	2	50.243	25.1216	40.90	0.000 ^{sig}
Error	6	3.685	0.6142		
Total	8	53.928			

^{sig} หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวก ค-47 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์มไคโตซาน ฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (eC-CH) และฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน (C-CH)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	2	0.1462	0.07309	2.52	0.161 ^{ns}
Error	6	0.1743	0.02905		
Total	8	0.3205			

^{ns} หมายถึง แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นายสิรพัฒน์ มหาผล
วัน เดือน ปี เกิด	2 กรกฎาคม 2540
สถานที่เกิด	ชลบุรี, ประเทศไทย
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	16/20 หมู่.3 ตำบลบ้านสวน อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2562 - ปัจจุบัน กำลังศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา พ.ศ. 2558 - พ.ศ. 2562 จบการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
รางวัลหรือทุนการศึกษา	ตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน สิรพัฒน์ มหาผล, ภรณ์ ศรีปรีชาศักดิ์, และนิรมล ปัญญาบุษกุล. (2564). ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากกากกาแฟ. ใน การ ประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 18 (หน้า. 2322-2330). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางแสน.