



คุณลักษณะของกระดาษเคลือบที่มีสมบัติต่อต้านแบคทีเรีย

**Characterization of Antibacterial Coated Paper**

กิตติมา เจริญสุข

**Kittima Charoensuk**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีบรรจุภัณฑ์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of  
Master of Science in Packaging Technology**

**Prince of Songkla University**

**2552**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์

คุณลักษณะของกระดาษเคลือบที่มีสมบัติต่อต้านแบคทีเรีย

ผู้เขียน

นางสาวกิตติมา เจริญสุข

สาขาวิชา

เทคโนโลยีบรรจุภัณฑ์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....

.....ประธานกรรมการ

(ดร.ศุภชัย ภิสิทธิ์เพ็ญ)

(ดร.วรัญญา ศรีเดช)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุวัฒน์ สรรพกุล)

.....

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพิชญา จันทะชุม)

(ดร.ศุภชัย ภิสิทธิ์เพ็ญ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีบรรจุภัณฑ์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์   คุณลักษณะของกระดาษเคลือบที่มีสมบัติต่อต้านแบคทีเรีย  
ผู้เขียน           นางสาวกิตติมา เจริญสุข  
สาขาวิชา       เทคโนโลยีบรรจุภัณฑ์  
ปีการศึกษา       2551

## บทคัดย่อ

กระดาษเคลือบที่มีสมบัติต่อต้านแบคทีเรียได้ผ่านการเตรียมด้วยการเคลือบผิวกระดาษด้วยสารเคลือบที่ประกอบด้วยตัวประสานเป็น Ethylene acrylic acid และสารต่อต้านจุลินทรีย์คือ Triclosan หรือ Silver-zeolite ที่ระดับความเข้มข้น 3, 5 และ 10% โดยน้ำหนัก และได้ทำการศึกษาผลของการเคลือบแบบ Precoating ต่อประสิทธิภาพการต่อต้านแบคทีเรีย การศึกษาประสิทธิภาพการต่อต้านแบคทีเรียของกระดาษเคลือบโดยวิธี Agar diffusion assay พบว่ากระดาษเคลือบด้วยสารเคลือบที่ประกอบด้วย Triclosan เท่านั้นที่มีประสิทธิภาพในการต่อต้านแบคทีเรียเป้าหมาย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ความสามารถในการต่อต้านแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ Triclosan เพิ่มขึ้น โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้กระดาษเคลือบแบบ Precoating มีประสิทธิภาพในการต่อต้าน *E. coli* และ *S. aureus* ได้ต่ำกว่ากระดาษเคลือบแบบ No-precoating และกระดาษเคลือบด้วยสารเคลือบที่ประกอบด้วย Triclosan มีประสิทธิภาพในการต่อต้าน *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่า *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และจากการศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษากระดาษเคลือบต่อประสิทธิภาพการต่อต้านแบคทีเรียพบว่ากระดาษเคลือบยังคงมีประสิทธิภาพในการต่อต้าน *E. coli* และ *S. aureus* ได้ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อทำการเก็บรักษากระดาษเป็นระยะเวลา 2 เดือน และจากการทดสอบการดูดซึมน้ำ ความสามารถในการต้านแรงดันทะลุ และความต้านทานแรงกดตามแนวตั้งของกระดาษเคลือบ พบว่ากระดาษที่เคลือบด้วย 5% Triclosan ไม่ส่งผลกระทบต่อสมบัติดังกล่าวและการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและลักษณะพื้นฐานวิทยาของกระดาษเคลือบโดยใช้ Fourier Transform Infrared Spectrometry และ Scanning Electron Microscopy ช่วยยืนยันการมี Triclosan ในชั้นสารเคลือบ การศึกษาการแพร่กระจายของ Triclosan ลงสู่สารละลายตัวแทนอาหาร 3 ชนิด แสดงให้เห็นว่า Triclosan สามารถแพร่ลงสู่สารละลาย *n-heptane* ได้ดีกว่าสารละลาย 50% Ethanol แต่ไม่พบการแพร่กระจายของ Triclosan ลงสู่น้ำ และเมื่อศึกษาการประยุกต์ใช้กระดาษเคลือบด้วย 5% Triclosan กับวุ้นจำลองอาหาร โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง พบว่ากระดาษเคลือบด้วย Triclosan สามารถยืดอายุการเก็บรักษาวุ้นจำลองอาหารได้นานถึง 4 วัน ในการทดสอบการเตรียมในเชิงอุตสาหกรรมพบว่าการใช้ Roller coating ในกระบวนการประกบกระดาษปะหน้ากระดาษ

ลูกฟูก และการใช้ระบบพิมพ์กระดาษลูกฟูกแบบ Flexography ในการเคลือบสารต่อต้านแบคทีเรีย  
ยังจำเป็นต้องปรับปรุงเพื่อให้สามารถเตรียมกระดาษเคลือบสารต่อต้านแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ  
เทียบเคียงกับในการเตรียมระดับห้องปฏิบัติการ

<b>Thesis Title</b>	Characterization of Antibacterial Coated Paper
<b>Author</b>	Miss Kittima Charoensuk
<b>Major Program</b>	Packaging Technology
<b>Academic Year</b>	2008

## ABSTRACT

Antibacterial coated papers were prepared by coated paper with coating solutions, ethylene acrylic acid containing triclosan or silver-zeolite. The coating solutions were prepared from each antimicrobial agents in different concentration 3, 5 and 10% w/w, and coating solution were applied to provide the antimicrobial layers. The effect of precoating prior to apply the antimicrobial layer was also studied. Bacterial inhibition by the coated papers was evaluated using an agar diffusion assay. It was found that only treatments of paper coated with triclosan clearly showed the effectiveness in inhibition of *E. coli* and *S. aureus*. Moreover, the precoating layer showed significantly smaller inhibition zone than the no-precoating layer which indicated less inhibition effect when using precoating layer. It was found that higher triclosan concentration in antibacterial coating higher antibacterial activity but there was no statistically significant difference when compared to treatment of 3, 5 and 10 % w/w. In addition, the inhibition against the Gram-positive bacterium: *S. aureus* was found more effective than the Gram-negative bacterium: *E. coli*. During 2-month storage test, the antimicrobial coated papers containing 5% triclosan could retain their inhibitory activity over the test period which indicated the consistent efficacy of the coating containing triclosan. The results suggested that triclosan had good potential as an antimicrobial agent in paper coating to inhibit pathogenic and spoilage organisms in foods. From the Cobb test, Bursting strength and Edge Crust Test, the paper coated with 5% triclosan did not significantly affect on these properties. Fourier Transform Infrared Spectrometry and Scanning Electron Microscopy confirmed that triclosan contained in a coating layer. The migration tested of triclosan into food simulating solvents indicated that triclosan was found more release into *n-heptane* than was in 50% ethanol solution but it was not observed in distilled water. The antibacterial coated paper applied as a food contact material packaging, was tested on food simulant agar. It was found that the coated paper effectively inhibited the growth of *E.coli* and *S. aureus* and the shelf life of food simulant agar was extended up to 4 days. The roller coating

and flexography printing processes were used to prepare the antibacterial coated paper in pilot scale. It was found that the improvement on both coating processes was needed in order to obtain the properties of coated paper comparable to the coated paper prepared in lab scale.

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ.....	(8)
LIST OF TABLES.....	(9)
LIST OF FIGURES.....	(10)
ABBREVIATIONS AND SYMBOLS.....	(11)
บทที่	
1 บทนำ.....	1
บทนำตั้งเรื่อง.....	1
การตรวจเอกสาร.....	2
วัตถุประสงค์.....	34
2 วิธีการวิจัย.....	35
วิธีดำเนินการ.....	35
วัสดุและอุปกรณ์.....	40
3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	43
4 บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....	60
เอกสารอ้างอิง.....	62
ภาคผนวก ก.....	72
ภาคผนวก ข.....	77
ประวัติผู้เขียน.....	80

## LIST OF TABLES

Table	Page
1. Examples of antimicrobial agents for potential use in food packaging materials....	4
2. Selected commercial antimicrobial packaging available for food applications.....	9
3. Commercialized antimicrobial materials.....	11
4. Minimum inhibitory concentration of Irgasan DP 300 in vitro (Agar Incorporation Method) .....	15
5. Minimum inhibitory concentration (MIC) of Zeomic : General bacteria.....	22
6. Traditional and naturally occurring food antimicrobials approved by the Food and Drug Administration.....	30
7. List of permitted food additives that could be used as antimicrobial agents in packaging materials.....	32
8. Inhibition zone and antimicrobial index of antibacterial coated paper and control paper using agar diffusion assay.....	46
9. Effectiveness of storage time on Inhibition zone of coated paper coating with binder containing triclosan.....	47
10. Migration of triclosan from coated paper into food simulating solvents at control temperature 40°C.....	55
11. Microbial count of <i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i> of the food simulant agar contacted antimicrobial coated paper compared to uncoated paper and control paper at ambient temperature in different storage times.....	58
12. Coating weight (mg/cm <sup>2</sup> ) of coated paper prepared to study the effect of type and concentration of antimicrobial agents and precoating on antimicrobial activity....	77
13. Coating weight (mg/cm <sup>2</sup> ) of no-precoating triclosan coated paper prepared to study the effect of storage time on antimicrobial activity.....	78
14. Coating weight (mg/cm <sup>2</sup> ) of 5% triclosan no-precoating paper prepared to study the mechanical, chemical composition, morphology, antimicrobial agents releasing and application of coated paper.....	79



## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Molecular structure of triclosan.....	15
2. Scanning electron micrograph of Zeomic <sup>®</sup> AJ 10N.....	23
3. The antimicrobial activity of a nano-structured calcium silicate silver composite containing 10 mg/kg silver (as AgNO <sub>3</sub> ) following leaching in water, against <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923).....	25
4. Antibacterial activity of Ag-doped PhTEOS coatings against planktonic <i>Staphylococcus epidermidis</i> (CSF 41498).....	25
5. Profile of a packaging film containing an antimicrobial coating.....	27
6. Effect of antimicrobial plastic film on <i>Aspergillus niger</i> .....	28
7. Diffusion cell for migration test of antimicrobial agents from coated paper.....	38
8. Pasteurized agar food stimulant.....	39
9. The antibacterial coated paper contacted with the food simulant agar at ambient temperature storage.....	39
10. Inhibition zone of <i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i> around antimicrobial coated paper using agar diffusion assay.....	45
11. Water absorption of uncoated paper, paper coated with binder (SVU) and paper coated with binder containing 5% triclosan .....	48
12. Bursting strength of uncoated paper, paper coated with binder and paper coated with 5% triclosan.....	49
13. Edge crust test of uncoated paper, paper coated with binder (SVU) and paper coated with binder containing with 5% triclosan.....	50
14. FTIR spectra from three types of coated paper.....	51
15. Scanning electron micrograph of coated paper.....	53
16. Chromatogram from HPLC technique of triclosan from standard solution and released triclosan into food simulating solvents.....	55
17. Preparing coated paper by roller coating.....	74
18. Preparing coated paper by printing process.....	75

## ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

ATCC	=	American type culture collection
ATP	=	Adenosine triphosphate
B-P	=	Baird-Parker Agar
CFSAN	=	Center for Food Safety and Applied Nutrition
CFU	=	Colony forming unit
CTA	=	Cellulose triacetate
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
EC	=	European commission
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
EMB agar	=	Eosin methylene blue lactose sucrose agar
FDA	=	Food and Drug Administration
FSS	=	Food simulating solvents
GRAS	=	Substances generally recognised as safe
LDPE	=	Low-density polyethylene
MIC	=	Minimum inhibitory concentration
NA	=	Nutrient agar
NB	=	Nutrient broth
NCS-Ag	=	Nano-structure calcium silicate-silver composite
PA	=	Polyamide
PEMA	=	Polyethylene-co-methacrylate
PET	=	Polyethylene terephthalate
PhTEOS	=	Phenyltrithoxysilane
PS	=	Polystyrene
PVOH	=	Polyvinyl alcohol
SCF	=	Scientific Committee on Food
TIP	=	Triclosan incorporated plastic
TISTR	=	Thailand Institute of Scientific and Technological Research
RNA	=	Ribonucleic acid

### **ABBREVIATIONS AND SYMBOLS (Cont.)**

ROS	=	Reactive oxygen species
UK	=	United Kingdom
USA	=	United States of America
WPI	=	Whey protein isolate

# บทที่ 1

## บทนำ

### บทนำต้นเรื่อง

บรรจุภัณฑ์ต่อต้านจุลินทรีย์จัดเป็นบรรจุภัณฑ์แบบแอคทีฟ (Active packaging) ที่สามารถควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารที่เกิดจากการสัมผัสกับวัสดุบรรจุภัณฑ์โดยตรง (Vartiainen *et al.*, 2004) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริเวณผิวหน้าอาหาร ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหารหรือทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ดังนั้นบรรจุภัณฑ์ต่อต้านจุลินทรีย์จึงสามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของอาหารได้ (Lee *et al.*, 2004; Weng and Chen, 1997) การผลิตบรรจุภัณฑ์โดยการผสมสารต่อต้านจุลินทรีย์ในวัสดุบรรจุภัณฑ์ในกระบวนการผลิตขั้นสุดท้ายเป็นวิธีที่เหมาะสมในการแก้ปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ผิวหน้าบรรจุภัณฑ์ (Weng and Chen, 1997) ทั้งนี้การผลิตวัสดุบรรจุภัณฑ์อาหารที่มีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์นั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น เติมสารต่อต้านจุลินทรีย์ในวัสดุบรรจุภัณฑ์หรือเคลือบบนวัสดุบรรจุภัณฑ์ เช่น พลาสติกหรือกระดาษ (Appendini and Hotchkiss, 2002; Vermeiren *et al.*, 1999) สารต่อต้านจุลินทรีย์ที่มีการนำมาประยุกต์ใช้กับบรรจุภัณฑ์อาหาร เช่น Organic acids, Anhydrides, Fungicides, Bacteriocins, Enzyme, Ag ions, Plant extracts และ Inorganic gases ( Lee *et al.*, 2003)

ในปัจจุบันการวิจัยและพัฒนาวัสดุที่มีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์สำหรับบรรจุภัณฑ์อาหารและวัสดุสัมผัสอาหารได้รับความสนใจมากขึ้น ทั้งในภาคอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์ ทั้งนี้เนื่องจากผู้บริโภคมีความต้องการอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปอาหารขั้นต่ำ ต้องการผลิตภัณฑ์อาหารที่พร้อมบริโภค และความต้องการอาหารที่ปราศจากสารถนอมอาหารมีเพิ่มมากขึ้น และประกอบกับในปัจจุบันปัญหาโรคอาหารเป็นพิษจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจมากยิ่งขึ้น ทำให้มีการค้นคว้าวิจัยเพื่อพัฒนาวิวัฒนาการและหาแนวทางเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร ที่ยังคงสามารถรักษาคุณภาพ ความสด และทำให้อาหารมีความปลอดภัยมากยิ่งขึ้น ทางเลือกหนึ่งคือการใช้บรรจุภัณฑ์ที่มีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นแนวทางที่ได้เปรียบกว่าการใช้สารถนอมอาหารโดยตรง คือมีการควบคุมการปลดปล่อยสารต่อต้านจุลินทรีย์จากบรรจุภัณฑ์ในปริมาณที่น้อยกว่าการเติมในอาหารโดยตรง และนอกจากนี้ยังสามารถออกฤทธิ์โดยตรงที่บริเวณผิวหน้าอาหารได้อีกด้วย (Appendini and Hotchkiss, 2002)

กระดาษเคลือบที่มีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial coated paper) จัดเป็นกลุ่มวัสดุบรรจุภัณฑ์แบบแอคทีฟ (Active packaging materials) ที่มีความสามารถต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์บริเวณผิวหน้าของอาหารที่สัมผัสกับบรรจุภัณฑ์ (Lee *et al.*, 2003) ซึ่งการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์บริเวณผิวหน้าอาหารเป็นกุญแจสำคัญที่บ่งบอกถึงความปลอดภัยหรือการเสื่อมเสียของอาหารหลายชนิด (Limjaroen *et al.*, 2003) โดยทั่วไปกระดาษที่มีสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์สามารถผลิตโดยการเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์บนแผ่นกระดาษ เพื่อให้มีสมบัติในการต่อต้านการเจริญของแบคทีเรีย หรือเชื้อราบนผิวกระดาษได้ (Intili and Lewisville, 1985) กระดาษเคลือบที่มีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์สามารถป้องกันโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร รักษาคุณภาพ ป้องกันการเสื่อมเสียและช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของอาหารได้ ดังนั้นการเคลือบกระดาษด้วยสารเคลือบที่มีส่วนผสมของสารต่อต้านจุลินทรีย์เป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนากระดาษเคลือบที่มีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์ (Lee *et al.*, 2003)

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายในการศึกษาคุณลักษณะของกระดาษเคลือบสารที่มีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์โดยใช้สารต่อต้านจุลินทรีย์ได้แก่ ไตรโคลซาน (Triclosan) และ ซิลเวอร์ซีโอไลท์ (Silver-zeolite) โดยผสมกับสารเคลือบหรือตัวประสาน (Binder) และทดสอบประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์บางชนิดที่ทำให้เกิดโรคและทำให้เกิดการเสื่อมเสียในอาหาร ศึกษาสมบัติเชิงกลบางประการรวมทั้งศึกษาการประยุกต์ใช้กระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์กับตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหาร

## การตรวจเอกสาร

### 1. กระดาษเคลือบที่มีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial coated paper)

กระดาษคราฟท์ (Kraft paper) เป็นกระดาษที่มีความแข็งแรง เยื่อกระดาษประเภทนี้มักผลิตโดยกระบวนการซัลเฟต (Sulfate process) กระดาษคราฟท์นิยมใช้เป็นบรรจุภัณฑ์กระดาษสำหรับห่อหุ้มและใช้ผลิตเป็นกล่องบรรจุภัณฑ์เพื่อการขนส่ง รวมทั้งใช้เป็นกระดาษห่อเครื่องมือหรืออุปกรณ์ในการผ่าตัดและผลิตภัณฑ์ที่ต้องการความปลอดภัย กระดาษคราฟท์ที่เคลือบด้วยสารต่อต้านจุลินทรีย์สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และป้องกันการปนเปื้อนของสินค้าจากเชื้อจุลินทรีย์จากภายนอกบรรจุภัณฑ์ได้ ปัญหาของกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์คือสารเคลือบอาจเสื่อมสภาพ ถูกทำลายจากการจัดเก็บและการขนส่งที่ไม่เหมาะสม ทำให้ความสามารถในการป้องกันเชื้อจุลินทรีย์และความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ลดลงหรือหมดไป การผสมสารเติมแต่งที่มีคุณสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์กับตัวประสานในการผลิตสารเคลือบกระดาษ

นั้นสารต่อต้านจุลินทรีย์จะแพร่จากตัวประสานลงสู่เส้นใยกระดาษและสามารถกำจัดหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่บนกระดาษได้ และเนื่องจากในอดีตการผลิตกระดาษกราฟท์เพื่อให้มีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์ทำโดยการเติมตัวประสานหรือตัวเติมอื่นๆในกระบวนการเตรียมเยื่อเพื่อลดช่องว่างระหว่างเส้นใย เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากภายนอกสู่ภายในบรรจุภัณฑ์ และการเพิ่มประสิทธิภาพในการต่อต้านจุลินทรีย์โดยการเพิ่มปริมาณตัวประสานในกระบวนการเตรียมเยื่อนั้นทำให้ความสามารถในการรับหมักพิมพ์ของกระดาษได้น้อยลง และวิธีดังกล่าวทำให้มีต้นทุนการผลิตสูงขึ้นและมีโอกาสในการสูญเสียมาก ดังนั้นการเคลือบด้วยตัวประสานที่ประกอบด้วยสารต่อต้านจุลินทรีย์นอกจากลดต้นทุนการผลิตแล้วยังสามารถเพิ่มคุณสมบัติในการการพิมพ์อีกด้วย เนื่องจากลดปริมาณตัวเติมหรือตัวประสานในกระบวนการเตรียมเยื่อ สำหรับสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ผสมในตัวประสานอาจใช้หนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิดก็ได้ ขึ้นอยู่กับข้อกำหนดในการใช้งาน ต้นทุนการผลิต เป็นต้น (Intili and Lewisville, 1985)

Lee และคณะ (2003) พบว่ากระดาษเคลือบด้วยสารเคลือบ Vinyl acetate-ethylene co-polymer ที่มีส่วนผสมของสารต่อต้านจุลินทรีย์ Nisin และ Chitosan ที่ความเข้มข้น 3% สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ โดยกระดาษเคลือบด้วยสารเคลือบที่ประกอบด้วย Nisin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่ากระดาษเคลือบด้วยสารเคลือบที่ประกอบด้วย Chitosan ในขณะที่กระดาษเคลือบด้วยสารเคลือบที่ประกอบด้วย Chitosan มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่ากระดาษเคลือบด้วยสารเคลือบที่ประกอบด้วย Nisin และกระดาษเคลือบสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบได้เมื่อเคลือบกระดาษด้วยสารเคลือบที่ผสมทั้ง Nisin และ Chitosan ทั้งนี้เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ในน้ำส้มและนมพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ในน้ำส้ม แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในนมที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10°C นอกจากนี้มีรายงานว่ากระดาษเคลือบด้วย Styrene-acrylate copolymer ที่มีส่วนผสมของ Propyl paraben สามารถยับยั้งการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* ได้ (Chung *et al.*, 2001a, 2001b) และเมื่อใช้ Triclosan แทน Propyl paraben ผสมใน Styrene-acrylate copolymer ที่ความเข้มข้น  $87 \pm 9$  mg/ml กระดาษเคลือบที่ได้จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Enterococcus faecalis* ได้ (Chung *et al.*, 2003) นอกจากนี้การใช้สารเคลือบที่มีส่วนผสม Chitosan ยังสามารถช่วยเพิ่มความมันวาวและสมบัติการป้องกันการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนของกระดาษดีซี้น และส่งผลให้คุณสมบัติเชิงกลของกระดาษดีซี้นแต่ไม่เด่นชัด (Variainen *et al.*, 2004)

โดยทั่วไปในการเพิ่มประสิทธิภาพในการต่อต้านจุลินทรีย์ของกระดาษเคลือบสามารถทำโดยเพิ่มปริมาณของตัวประสาน (เช่น ลาเทกซ์ ซิลิโคน หรือ อะคริลิก) เพื่อลดช่องว่าง

ระหว่างเส้นใยส่งผลให้ความสามารถในการซึมผ่านของเชื้อจุลินทรีย์ลดลง อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณตัวประสานดังกล่าวจะส่งผลให้ต้นทุนของการผลิตเพิ่มขึ้นและยังส่งผลให้ความสามารถในการพิมพ์ลดลง ทั้งนี้สามารถลดปัญหาต้นทุนที่เพิ่มขึ้นและปัญหาการพิมพ์ได้โดยการใช้สารต่อต้านจุลินทรีย์กับผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้าย โดยการเติมสารต่อต้านจุลินทรีย์ในตัวประสานที่ใช้สำหรับเคลือบผลิตภัณฑ์กระดาษ โดยสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่เลือกใช้ต้องมีสมบัติความเข้ากันได้กับตัวประสานและการเติมสารต่อต้านจุลินทรีย์ในตัวประสานอาจใช้เพียงหนึ่งชนิดหรือผสมกับสารแอกทีฟอื่นๆ ซึ่งปริมาณสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตไม่มีกำหนดแน่นอนขึ้นอยู่กับความเฉพาะเจาะจงในการใช้งานและราคา แต่ปริมาณที่ใช้โดยทั่วไปเป็น 0.1%-0.5% โดยน้ำหนักของผลิตภัณฑ์กระดาษขั้นสุดท้าย (Intili and Lewisville, 1985)

## 2. สารต่อต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial agent)

สารต่อต้านจุลินทรีย์ที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้กับบรรจุภัณฑ์อาหาร ได้แก่ Organic acid, Anhydrides, Enzyme, Ag ion, Plants extract, Inorganic gases, Bacteriocins, Spice extracts, Thiosulphinates, Isothiocyanates, Proteins, Antibiotics, Fungicides, Parabens, Metals, Potassium sorbate, Imazalil, Hexamethylenetetramine, Chitosan (Vartiainen *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2003; Cutter, 1999) ซึ่งสามารถแสดงตามกลุ่มสารได้ดัง Table 1.

Table1. Examples of antimicrobial agents for potential use in food packaging materials.

Class	Examples	References
Acid Anhydride	Benzoic anhydride	Weng and Hotchkiss (1993), Huang and others (1997), Dobias and others (2000)
	Sorbic anhydride	Weng and Chen (1997)
Alcohol	Ethanol	Luck and Jager (1997)
Amine	Hexamethylenetetramine (HMT)	Luck Jager (1997), Devlieghere and others (2000b)
Ammonium Compound	Silicon quaternary ammonium salt	
Antibiotic	Natamycin	Luck Jager (1997)
Antimicrobial	Attacin	Dillon (1994)
Peptide	Cecropin	Dillon (1994)

Table 1. (Cont.)

Class	Examples	References
Antioxidant	Defensin	Dillon (1994)
	Magainin	Abler and others (1995)
	Butylated hydroxyanisole (BHA)	Hotchkiss (1997)
	Butylated hydroxytoluene (BHT)	Hotchkiss (1997)
	Tertiary butylhydroquinone (TBHQ)	Hotchkiss (1997)
Bacteriocin	Bavaricin	Nettles and Barefoot (1993)
	Brevicin	Nettles and Barefoot (1993)
	Carnocin	Nettles and Barefoot (1993)
	Lacticin	Nettles and Barefoot (1993), An and others (2000), Scannell and others (2000)
	Mesenterocin	Nettles and Barefoot (1993)
	Nisin	Luck and Jager (1997), An and others (2000), Natrajan and Sheldon (2000a, b), Scannell and others(2000)
	Pediocin	Barnby-Smith (1992), Nettles and Barefoot (1993)
	Sakacin	Nettles and Barefoot (1993)
	Subtilin	Barnby-Smith (1992)
	Chelator	Citrate
Conalbumin		Cornner (1993)
EDTA		Luck and Jager (1997), Rodrigues and Han (2000)
Lactoferrin		Cornner (1993)
Polyphosphate		Shelef and Seiter (1993)



Table 1. (Cont.)

Class	Examples	References
Enzyme	Chitinase	Fuglsang and others (1995)
	Ethanol oxidase	Fuglsang and others (1995)
	$\beta$ -Glucanase	Fuglsang and others (1995)
	Glucose oxidase	Fuglsang and others (1995)
	Lactoperoxidase	Cornner (1993), Fuglsang and others (1995)
	Lysozyme	Cornner (1993), Fuglsang and others (1995), Appendini and Hotchkiss (1997), Luck and Jager (1997), Rodrigues and Han (2000)
	Myeloperoxidase	Fuglsang and others (1995)
Fatty Acid	Lauric acid	Ouattara and others (1997;2000b)
	Palmitoleic acid	Ouattara and others (1997)
Fatty Acid Ester	Monolaurin (lauricidin <sup>®</sup> )	Luck and Jager (1997)
Fungicide	Benomyl	Helek and Garg (1989)
	Imazalil	Hale and others (1986), Weng and Hotchkiss (1992)
	Sulfur dioxide	Thomas and others (1995), Christie and others (1997), Luck and Jager (1997), Opperman and others (1999)
Inorganic Acid	Phosphoric acid	Hotchkiss (1997)
Metal	Copper	Ishitani (1995)
	Silver	Ishitani (1995), Luck and Jager (1997), An and others (1998), Chung and others (1998)
Miscellaneous	Reuterin	Helander and others (1997)
Natural Phenol	Catechin	Walker (1994)
	<i>p</i> -Cresol	Hotchkiss (1997)

Table 1. (Cont.)

Class	Examples	References
	Hydroquinones	Hotchkiss (1997)
Oligosaccharide	Chitooligosaccharide	Cho and others (2000), hong and others (2000)
Organic Acid	Acetic acid	Doores (1993), Ouattara and others (2000a, b), Luck and Jager (1997)
	Benzoic acid	Luck and Jager (1997), Weng and others (1997), Chen and others (1999), Weng and others (1999)
	Citric acid	Doores (1993), Luck and Jager (1997)
	Lactic acid	Doores (1993), Luck and Jager (1997)
	Malic acid	Doores (1993)
	Propionic acid	Doores (1993), Ouattara and others (2000a, b), Luck and Jager (1997)
	Sorbic acid	Luck and Jager (1997), Weng and others (1999)
	Succinic acid	Doores (1993)
	Tartaric acid	Doores (1993)
	Organic Acid Salt	Potassium sorbate
Paraben	Sodium benzoate	Chen and others (1996)
	Ethyl paraben	Davidson (1993), Luck and Jager (1997), Dobias and others (2000)
	Methyl paraben	Davidson (1993), Luck and Jager (1997)

Table 1. (Cont.)

Class	Examples	References
Plant-Volatile Component	Propyl paraben	Davidson (1993), Luck and Jager (1997), Dobias and others (2000)
	Allyl isothiocyanate (AIT)	Isshiki and others (1992), Luck and Jager (1997), Brody and others (2001)
	Carvacrol	Ouattara and others (1997), Scora and Scora (1998)
	Cineole	Lis-Balchin and others (1997), Scora and Scora (1998)
	Cinnamaldehyde	Ouattara and others (1997; 2000b)
	Citral	Lis-Balchin and others (1998), Scora and Scora (1998)
	<i>p</i> -Cymene	Scora and Scora (1998)
	Estragole (methyl chavicol)	Scora and Scora (1998), Suppakul and others (2002)
	Eugenol	Ouattara and others (1997), Scora and Scora (1998)
	Geraniol	Fallik and Grinberg (1992), Brody and others (2001)
	Hinokitiol ( $\beta$ -thujaplicin)	(2001)
	Linalool	Lis-Balchin and others (1998), Scora and Scora (1998), Suppakul and others (2002)
Terpineol	Scora and Scora (1998)	
Thymol	Ouattara and others (1997), Scora and Scora (1998)	
Polysaccharide	Chitosan	Sudarshan and others (1992), Begin and Calsteren (1999), Hong and others (2000)
	Konjac glucomannan	Xiao and others (2000)

ที่มา : Suppakul และคณะ (2003)

อย่างไรก็ตามสารต่อต้านจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถพัฒนาใช้ได้ ในเชิงพาณิชย์ ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดในคุณสมบัติของสารต่อต้านจุลินทรีย์เองและข้อจำกัดทางกฎหมายที่เกี่ยวกับการนำสารต่อต้านจุลินทรีย์ไปใช้ ตัวอย่างสารต่อต้านจุลินทรีย์เชิงพาณิชย์และการนำไปใช้ในบรรจุภัณฑ์อาหาร แสดงดังตารางที่ 2 และ 3

Table 2. Selected commercial antimicrobial packaging available for food applications.

Antimicrobial compound	Tradename	Product Company	Packaging forms for food applications	Reference
Silver substituted zeolite	AgIon™	AgIon Technologies LLC	Bulk food storage containers, paperboards cartons, plastic or paper food wraps milk containers	<a href="http://www.healthshield.com/index1.html">http://www.healthshield.com/index1.html</a> Last accessed:01/25/02
	Novaron®	Toagosei, Co.LTD	Many (Japan)	Toagosei, Co.LTD Brochure
Triclosan	Microban®	Microban Products	Deliwrap, Reheatable food containers (UK)	Sherman (1998), Rice (1995)
Allyisothiocyanate	WasaOuro	Lintes Corporation	Pressure sensitive labels, sheets (Japan)	<a href="http://www.lintec.co.jp/index-e.html">http://www.lintec.co.jp/index-e.html</a> Last accessed:01/25/02

Table 2 (Cont.)

Antimicrobial compound	Tradename	Product Company	Packaging forms for food applications	Reference
Chlorine dioxide	Microsphere™	Dry	Sachets	Anon (1995)
		Compapny LTD, Bernard Technologies Inc.	Strong bags for produce, paperboard coating, rigid containers, pressure sensitive labels	Gray (2000)
Carbon dioxide	Freshpax™	Multisorb Technologies	Sachets	Smith <i>et al.</i> , (1995)
	Varifrais	SARL Codimer	Sachets (France)	Smith <i>et al.</i> , (1995)
Ethanol vapor	Ethicap®	Freund	Sachets	Smith <i>et al.</i> , (1995)
	Negamold®			Rice (1989)
	Fretek®		Sachets	Smith <i>et al.</i> , (1995)
	Oitech™	Nippon Kayaku	Sachets (Japan)	
	Bioka	Bioka LTD	Sachets (Finland)	<a href="http://www.lintec.co.jp/index-e.html">http://www.lintec.co.jp/index-e.html</a> Last accessed:01/25/02
Glucose oxide (hydrogen peroxide)				

Table 3. Commercialized antimicrobial agents.

Company	Trade name	Active compound	Application
Sanitized AG, Switzerland	Smitized <sup>®</sup> Actigard <sup>®</sup> Saniprot <sup>®</sup>	Triclosan and others	Textile, plastic, leather and paper home textile and PU- foams films and in- can preservation
DuPont, USA	MicroFree <sup>®</sup>	Ag, copper oxide and zinc silicate	Textile and carpet fibres, paints, packaging film, etc.
Milliken Co., USA	Novaron <sup>®</sup>	Ag-substituted zirconium phosphate	Many
Microban Products, UK	Microban <sup>®</sup>	Triclosan	Many
Thomson Research Associates, Cannanda	Ultra-Fresh <sup>®</sup>	Triclosan and others	Polymers, adhesives, latexes, plastics, foams, etc.
Surfacine Development Company, USA	Surfacine <sup>®</sup>	Ag-halide/polymer complex	Many
Ishizuka Glass Co., Japan	Ionpure	Ag/glass	Many

ที่มา : Vermeiren และคณะ (2002)

### 3. การใช้สารต่อต้านจุลินทรีย์กับบรรจุภัณฑ์อาหาร

มีรายงานว่าฟิล์มพอลิเอทิลีนความหนาแน่นต่ำ (Low-density polyethylene; LDPE) ที่ผลิตโดยผสมสารต่อต้านจุลินทรีย์ Benzoic anhydride สามารถแสดงการต่อต้านการเจริญของเชื้อรา *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium* spp. และ *Aspergillus toxacarius* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อและในเนยแข็งได้ (Weng and Hotchkiss, 1993) นอกจากนี้การผสม Triclosan ในฟิล์ม LDPE

ทำให้ฟิล์มมีสมบัติต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร ได้แก่ *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* และ *Escherichia coli* O157:H7 และสามารถต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเสื่อมเสียได้แก่ *Brochothrix thermosphacta* ทั้งนี้การผสมสารต่อต้านจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตฟิล์มมีข้อจำกัดของอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการผลิต ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาและพัฒนาสารเคลือบวัสดุบรรจุภัณฑ์หลังจากขึ้นรูป เพื่อลดปัญหาข้อจำกัดของอุณหภูมิใช้งาน (Appendini and Hotchkiss, 2002) และในการสังเคราะห์ฟิล์มบรรจุภัณฑ์ เช่น พอลิเอทิลีนความหนาแน่นต่ำ (LDPE) พอลิสไตรีน (Polystyrene; PS) และพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเรท (Polyethylene terephthalate; PET) ที่มีส่วนผสมของ โซเดียมเบนโซเอต (Sodium benzoate) โซเดียมไนไตรท์ (Sodium nitrite) โพแทสเซียมซอร์เบท (Potassium sorbate) และ โซเดียมแลคเตท (Sodium lactate) พบว่าฟิล์มพลาสติกที่ประกอบด้วย 15% Sodium nitrite สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus niger* และ *Bacillus subtilis* ได้ และฟิล์มที่ผสมด้วย Sodium benzoate และ Potassium sorbate ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ได้ ในขณะที่ตัวอย่างฟิล์มพลาสติกที่มี Sodium lactate เป็นส่วนประกอบไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ใดเลย และการผลิตฟิล์ม Polyethylene-co-methacrylate acid (PEMA) ที่ผสมกับ Benzoic acid และ Sorbic acid พบว่าฟิล์ม PEMA สามารถดูดซึม Benzoic acid และ Sorbic acid เข้าไปในโครงสร้าง ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. niger* และ *Penicillium* spp. ได้ นอกจากนี้การผสม Lysozyme ในเม็ดพลาสติกเพื่อผลิตฟิล์ม Polyvinyl alcohol (PVOH), Polyamide 6/6 (PA 6/6) และฟิล์ม Cellulose triacetate (CTA) พบว่าฟิล์ม PVOH และ PA 6/6 มีประสิทธิภาพในการต่อต้านการเจริญของ *Micrococcus lysodeikticus* ได้น้อยกว่าฟิล์ม CTA (Vartiainen *et al.*, 2003) มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการผลิตบรรจุภัณฑ์กระดาษที่มีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์ โดยการเคลือบกระดาษด้วยสารเคลือบที่ประกอบด้วยสารต่อต้านจุลินทรีย์ Nisin หรือสารต่อต้านการเกิดออกซิเดชัน (Oxidation)  $\alpha$ -tocopherol ที่ความเข้มข้นของสารดังกล่าวเป็น 3% ในตัวประสาน Vinyl acetate-ethylene copolymer เพื่อพัฒนาเป็นบรรจุภัณฑ์อาหาร และทำการศึกษาศักยภาพในการต่อต้านจุลินทรีย์และความสามารถในการต่อต้านการเกิด Oxidation ในอาหารทดสอบซึ่งเป็น นมและสารอิมัลชันที่ประกอบด้วยน้ำ Paraffin และสาร Emulsifier ในอัตราส่วนผสมเป็น 66%, 32% และ 2% ตามลำดับ พบว่ากระดาษเคลือบด้วย Nisin สามารถแสดงการต่อต้านการเจริญของ *Micrococcus flavus* ได้ ในขณะที่กระดาษเคลือบด้วย  $\alpha$ -tocopherol สามารถลดการเกิด Oxidation ของไขมันได้ และการผสมทั้ง Nisin และ  $\alpha$ -tocopherol ในสารเคลือบทำให้กระดาษเคลือบมีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์และต่อต้านการเกิด Oxidation ได้ และประยุกต์ใช้งานกระดาษเคลือบชนิดนี้ไป เช่น ใช้เป็นบรรจุภัณฑ์เพื่อยืดอายุในการเก็บรักษาของอาหารที่มีโอกาสเกิดการเสื่อมเสียได้ง่าย เป็นต้น (Lee *et al.*, 2004)

การศึกษาสมบัติการต่อต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มโปรตีนจากหางนม (Whey protein isolate; WPI) ที่ผสมด้วยสารสกัดจากเครื่องเทศ 3 ชนิด ได้แก่ Oregano, Rosemary และ Garlic โดยวิธีการวัด Inhibition zone พบว่าฟิล์ม WPI ที่ผสมสารสกัดจาก Oregano ที่ระดับความเข้มข้น 2% (w/v) สามารถออกฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งได้แก่ *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 35218), *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Listeria monocytogenes* (NCTC 2167) และ *Lactobacillus plantarum* (DSM 20174) ในขณะที่ฟิล์ม WPI ที่ผสมสารสกัดจาก Garlic สามารถออกฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียข้างต้นได้ที่ระดับความเข้มข้น 3% และ 4% และฟิล์ม WPI ที่ผสมสารสกัดจาก Rosemary ไม่สามารถออกฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียทดสอบทุกชนิด (Seydim and Sarikus, 2006) นอกจากนี้มีรายงานว่าฟิล์ม LDPE ที่เคลือบด้วยสารละลาย Polyamide ที่ผสมสารต่อต้านจุลินทรีย์ได้แก่ Sorbic acid, Carvacrol, Trans-cinnamaldehyde, Thymol และ Rosemary oleoresin และนำฟิล์มที่ได้ทำการฉายรังสีที่ระดับ 1-3 kGy โดยใช้อิเล็กตรอนพลังงาน 10 MeV จากเครื่องเร่งอนุภาคแนวตรง เมื่อทำการศึกษาสมบัติการต่อต้านจุลินทรีย์โดยวิธี Agar diffusion test และใช้จุลินทรีย์ทดสอบเป็น *Listeria innocua* ATCC 33090 และ *Escherichia coli* ATCC 884 พบว่าสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบเมื่อผ่านการฉายรังสีที่ระดับ 1-3 kGy ยังคงสามารถรักษาประสิทธิภาพในการต่อต้านจุลินทรีย์ได้ นอกจากนี้ฟิล์มที่ได้ยังมีความเหนียวและมีความสามารถในการป้องกันการซึมผ่านไอน้ำเพิ่มขึ้นอีกด้วย ดังนั้นฟิล์ม LDPE ที่เคลือบด้วยสารละลาย Polyamide ที่ผสมสารต่อต้านจุลินทรีย์ Sorbic acid, Carvacrol, Trans-cinnamaldehyde, Thymol และ Rosemary oleoresin สามารถพัฒนาเป็นบรรจุภัณฑ์แอคทีฟที่มีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์และสามารถใช้ร่วมกับการฉายแสงอาหารซึ่งเป็นกระบวนการหนึ่งที่ใช้ในการถนอมอาหาร (Han *et al.*, 2007) มีรายงานว่าฟิล์มที่มีสมบัติต่อต้านแบคทีเรียที่เตรียมโดยการผสมระหว่างแป้งจากหัวบุก (Konjac glucomannan) และ Poly (diallyldimethylammonium chloride) พบว่าฟิล์มที่ได้สามารถแสดงการต่อต้าน *B. subtilis* และ *S. aureus* แต่ไม่สามารถต่อต้าน *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *Saccharomyces* และฟิล์มมีสมบัติทนต่อการยืดดึงและมีค่ายืดดึงเมื่อขาดเพิ่มขึ้นโดยมีค่ายืดดึงเมื่อขาดเพิ่มขึ้นสูงสุด และค่าความสามารถในการซึมผ่านไอน้ำต่ำสุด เมื่อฟิล์มผสมด้วย Poly (diallyldimethylammonium chloride) ที่ระดับความเข้มข้น 20% (Lu *et al.*, 2008) ฟิล์ม Whey protein isolate (WPI) ที่มีสมบัติต่อต้านแบคทีเรีย สามารถผลิตโดยผสมด้วย Cloisite30B ซึ่งเป็นอนุภาคนาโนเคลย์ (Nano-clays) ชนิดหนึ่ง พบว่าฟิล์มผสมที่ได้สามารถต่อต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *L. monocytogenes* ได้ และมีค่าการซึมผ่านไอน้ำลดลง โดยที่สมบัติทางกลอื่นๆ ของฟิล์มไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่ไม่มีการเติม Cloisite30B ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าฟิล์มผสม WPI/Nano-clay สามารถพัฒนาเป็นบรรจุภัณฑ์อาหารเพื่อยืดอายุการเก็บรักษารวมทั้ง

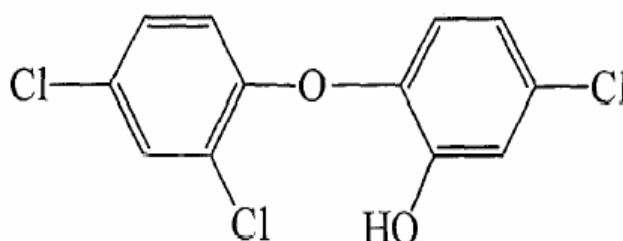


เพื่อปรับปรุงคุณภาพและรักษาความปลอดภัยของอาหารได้ นอกจากนี้สามารถนำฟิล์มชนิดนี้ไปประยุกต์ใช้เป็นบรรจุภัณฑ์สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารได้หลายชนิด เช่น เนื้อ ปลา ไก่ กล้วย ฝรั่ง เนยแข็ง ผักและผลไม้ เป็นต้น (Sothornvit *et al.*, 2009) กระดาษที่มีสมบัติต่อต้านเชื้อราชนิดที่ทำให้กระดาษเกิดการเสื่อมเสีย สามารถเตรียมได้โดยการจุ่มกระดาษในสารละลายผสมระหว่าง 0.5 % Methyl paraben, 1% Propyl paraben และสารละลาย 85% Ethanol พบว่ากระดาษที่ได้แสดงการต่อต้านเชื้อรา ได้แก่ *Cladosporium* sp. และ *Penicillium corylophilum* แต่ทั้งนี้จะมีสีเหลืองและมีความต้านทานแรงดึง (Tensile strength) ลดลงเล็กน้อย (Neves *et al.*, 2009)

#### 4. ไตรโคลซาน (Triclosan)

Triclosan (2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether) เป็นสารประเภท Phenolic compound ชนิดหนึ่ง มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่นและรส จุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง  $57^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  มีน้ำหนักโมเลกุล 289.5 มีสูตรโครงสร้างแสดงดัง Figure 1. Triclosan มีความไม่ไวไฟสูงจึงละลายน้ำได้ยาก แต่สามารถละลายได้บ้างในสารละลายต่างและละลายได้ดีในสารละลายอินทรีย์ไม่มีขี้ผึ้ง Triclosan สามารถทนต่อความร้อนได้ถึง  $150^{\circ}\text{C}$  หรือ  $200^{\circ}\text{C}$  (ในกรณีที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิดังกล่าวไม่เกิน 2 ชั่วโมง) ตัวอย่างชื่อทางการค้าของ Triclosan ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดช่องปาก เช่น Irgasan DP 300 และ Irgacare MP (Bhargava and Leonard, 1996) โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดในการต่อต้านจุลินทรีย์แสดงดัง Table 4. (Vischer and Regos, 1974) Triclosan มีสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Bacteriostatic) ที่ความเข้มข้นต่ำและมีสมบัติทำลายแบคทีเรีย (Bactericidal) ที่ความเข้มข้นสูง สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และราบางชนิดได้ กลไกในการยับยั้งแบคทีเรียคือ เมื่อ Triclosan แพร่สู่ผนังเซลล์จุลินทรีย์และทำลายเยื่อเมมเบรนของไซโทพลาสซึม จะส่งผลยับยั้งการสังเคราะห์ไขมันและการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์แบคทีเรีย ทำให้สามารถต่อต้านหรือทำลายจุลินทรีย์ได้ (Russell, 2004; Jones *et al.*, 2000) เป้าหมายหลักในการออกฤทธิ์ของ Triclosan ต่อเซลล์แบคทีเรีย คือ Enoyl reductase enzyme ซึ่งส่งผลยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมันของเซลล์ (Iconomopoulou *et al.*, 2005) ทำให้มีผลต่อการเจริญของเซลล์ (Jones *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังส่งผลต่อการซ่อมแซมหรือสร้างเยื่อเมมเบรนของเซลล์ (Heath *et al.*, 1999) มีผลต่อการสังเคราะห์ RNA และการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย แต่ไม่มีผลต่อ DNA พบว่าปริมาณที่ใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียใช้ในปริมาณน้อยมาก ตัวอย่างเช่นใช้ Triclosan เพียง 3-10 mg/l เพื่อยับยั้ง *E. faecalis* ใน Brain-heart infusion agar (Bhargava and Leonard, 1996) และในการออกฤทธิ์แบบทำลายเซลล์แบคทีเรีย Triclosan จะเหนี่ยวนำให้เกิดการรั่วไหลของ  $\text{K}^+$  ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นถึงการเสียหายของเยื่อเมมเบรน (Suller and

Russell, 2000) ตัวอย่างการนำ Triclosan ไปใช้งานในทางการค้า เช่น ใช้ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด ใส่อคร่างกาย ได้แก่ สบู่ล้างมือ สบู่เหลวอาบน้ำ น้ำยาบ้วนปาก ยาสีฟัน เป็นต้น (Cutter, 1999) ใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง (Russell, 2004) ใช้ในผลิตภัณฑ์บรรจุภัณฑ์ที่มีชื่อทางการค้า เช่น Microban (Bhargava and Leonard, 1996) และใช้ในผลิตภัณฑ์ทำลายเชื้อโรค ซึ่งแสดงความเป็นพิษต่ำ (Mandel, 1994) จากสมบัติความสามารถในการต่อต้านแบคทีเรียในช่วงกว้าง และมีความเป็นพิษต่ำดังกล่าว ทำให้มีการวิจัยและพัฒนาการใช้ Triclosan เพื่อพัฒนาวัสดุบรรจุภัณฑ์ที่มีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น (Chung *et al.*, 2003)



#### MOLECULAR WEIGHT - 289.5

Figure 1. Molecular structure of triclosan

ที่มา : Bhargava และ Leonard (1996)

Table 4. Minimum inhibitory concentration of Irgasan DP 300 in vitro (Agar Incorporation Method).

Microorganism	Origin and strain no.		Medium MIC (ppm)	
Gram-positive bacteria				
<i>Bacillus subtilis</i>	NCTC	8236	NA	0.1
<i>Bacillus megaterium</i>	A		NA	3
<i>Bacillus cereus</i>	A		NA	3
<i>B. cereus var. mycoides</i>	NCTC		NA	3
<i>Clostridium botulinum</i>	NCTC	3805	EA	3
<i>Clostridium tetani</i>	NCTC	9571	EA	3

Table 4. (Cont.)

Microorganism	Origin and strain no.		Medium MIC (ppm)	
<i>C. acnes (Propionibacterium acnes)</i>	ATCC	6919	BHI-A	3
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	ATCC	6917	-	3
<i>C. diphtheriae</i>	NCTC	3984	BHI-A	3
<i>C. diphtheriae</i>	A		BHI-A	3
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	ATCC	6501	-	5
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	NCTC	7465	BHI-A	3
<i>Lactobacillus arabinosus</i>	CITM	706	MACA	33
<i>L. arabinosus</i>	ATCC	8014	MACA	33
<i>Lactobacillus fermenti</i>	CITM	707	MACA	33
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC	15313	-	1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	A		YA	100
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	NCTC	8152	BHI-A	1
<i>Mycobacterium phlei</i>	A		BHI-A	0.3
<i>Sarcina lutea</i>	NCTC	196	BHI-A	3
<i>Sarcina ureae</i>	ATCC	6473	BHI-A	0.1
<i>S. aureus</i>	NCTC	7447	NA	0.01
<i>S. aureus</i>	NCTC	4163	NA	0.01
<i>S. aureus</i>	NCTC	6571	NA	0.03
<i>S. aureus</i>	NCTC	6966	NA	0.1
<i>S. aureus</i>	ATCC	13709	NA	0.01
<i>S. aureus</i>	ATCC	6538	NA	0.01
<i>S. aureus</i>	NCTC	7292	NA	0.1
<i>Staphylococcus albus</i>	C-G		NA	0.03
<i>Staphylococcus agalactiae</i>	NCTC	8181	BHI-A	3
<i>Staphylococcus haemolyticus A</i>	A		BHI-A	1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	A		BHI-A	3
<i>Staphylococcus faecalis</i>	NCTC	8619	BHI-A	10

Table 4. (Cont.)

Microorganism	Origin and strain no.		Medium MIC (ppm)	
<i>S. faecalis</i>	ATCC	10541	BHI-A	3
<i>Staphylococcus pyogenes</i>	NCTC	8322	BHI-A	3
Gram-negative bacteria				
<i>Aerobacter aerogenes</i>	CITM	413	NA	1
<i>A. aerogenes</i>	CITM	812	NA	1.3
<i>Alcaligenes faecalis</i>	A		NA	>100
<i>Brucella intermedia</i>	A		Br.A.A.	0.1
<i>Brucella abortus</i>	NCTC	8226	Br.A.A.	0.1
<i>Brucella melitensis</i>	A		Br.A.A.	0.1
<i>Brucella suis</i>	A		Br.A.A.	0.03
<i>Cloaca cloacae</i>	NCTC	8155	NA	0.3
<i>E. coli</i>	NCTC	86	NA	0.1
<i>E. coli</i>	A		NA	0.3
<i>Haemophilus influenzae</i>	A		BA	33
<i>K. edwardsii</i>	NCTC	7242	NA	0.3
<i>K. aerogenes</i>	NCTC	8172	NA	0.3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC	4352(isolate)	NA	0.3
<i>Legionella pneumoniae</i>				10
<i>Loefflerella mallei</i>	NCTC	9674	NA	0.3
<i>Loefflerella pseudomallei</i>	NCIB	10230	NA	1
<i>Moraxella duplex</i>	A		NA	0.01
<i>Moraxella glucidolytica</i>	A		NA	0.3
<i>Moraxella iwoffi</i>	A		NA	0.1
<i>Neisseria catarrhalis</i>	NCTC	3622	BA	33
<i>Pseudomonas capacia</i>	C-175			256
<i>Pasteurella septica</i>	NCTC	948	NA	0.1
<i>Pasteurella pseudotuberculosis</i>	C.G.		NA	10

Table 4. (Cont.)

Microorganism	Origin and strain no.		Medium MIC (ppm)	
<i>Proteus vulgaris</i>	NCTC	8313	NA	0.1
<i>P. vulgaris</i>	NCTC	4636	NA	0.3
<i>P. vulgaris</i> (Neotype)	NCTC	4175	NA	0.01
<i>Proteus mirabilis</i>	A	NA		0.3
<i>P. mirabilis</i>	NCTC	8309	NA	0.3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC	1999	NA	>100
<i>P. aeruginosa</i>	NCTC	12055	NA	>1000
<i>P. aeruginosa</i>	NCTC	8060	NA	>1000
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NCTC	4755	NA	>100
<i>Salmonella enteritidis</i>	A		NA	0.1
<i>S. enteritidis</i>	A		NA	0.3
<i>Salmonella typhimurium</i>	NCTC	5710	NA	0.3
<i>Salmonella typhi</i>	NCTC	8384	NA	0.3
<i>S. typhi</i>	NCTC	786	NA	0.3
<i>S. typhi</i>	A		NA	0.1
<i>Salmonella paratyphi A</i>	NCTC	5322	NA	0.3
<i>S. paratyphi B</i>	NCTC	3176	NA	0.3
<i>S. paratyphi B</i>	NCTC	5704	NA	0.1
<i>S. paratyphi B</i>	A		NA	0.1
<i>Salmonella pollorum</i>	ATCC	9120	NA	0.3
<i>Serratia marcescens</i>	A		NA	>100
<i>Shigella flexneri</i>	NCTC	8192	NA	0.3
<i>S. flexneri</i>	NCTC	8204	NA	0.1
<i>S. flexneri</i>	NCTC	8205	NA	0.1
<i>Shigella sonnei</i>	NCTC	7240	NA	0.1
<i>Shigella dysenteriae</i>	NCTC	2249	NA	0.1
<i>Vibrio cholerae</i>	A		NA	10
<i>Vibrio eltor</i>	NCTC	8457	NA	10

Table 4. (Cont.)

Microorganism	Origin and strain no.		Medium MIC (ppm)	
Fungi and yeasts				
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC	6257	M	30
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC	9197	SMA	10
<i>Candida albicans</i>	A		NA	3
<i>C. albicans</i>	ATCC	10259	M	3
<i>Epidermophyton floccosum</i>	ATCC	10227	SMA	1-10
<i>Keratinomyces ajelloi</i>	A		SMA	10
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	ATCC	9533	SMA	1
<i>Trichophyton rubrum</i>	A		SMA	10
<i>Trichophyton tonsurans</i>	A		SMA	10

NCTC, National collection of type cultures; NA, Nutrient agar; A, Bacterologic or veterinary Institutes; EA, Eugon agar; ATCC, American type culture collection; BHI-A, brain-heart infusion agar; CITM, Official; MACA, microassay culture agar; YA, Youmans agar; C-G, Ciba-Geigy; BA, Blood agar; M, Microphil agar; SMA, Sabouraud maltose agar.

ที่มา : Vischer และ Regos (1974)

#### 4.1 สมบัติการต่อต้านจุลินทรีย์ของ Triclosan ในการประยุกต์ใช้กับบรรจุภัณฑ์

เนื่องจาก Triclosan มีสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ในช่วงกว้าง ดังนั้นจึงได้มีการนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตวัสดุบรรจุภัณฑ์ที่มีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์ ในผลิตภัณฑ์พลาสติก Triclosan สามารถใช้ในกระบวนการอัดรีด (Extrusion) (Vartiainen *et al.*, 2003) Triclosan ในผลิตภัณฑ์พลาสติกช่วยป้องกันการเจริญและการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ และป้องกันการเกิดกลิ่นที่ผิดปกติในพอลิเมอร์ ดังนั้นจึงช่วยยืดอายุของพอลิเมอร์ได้ ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงได้มีการศึกษาเพื่อพัฒนาบรรจุภัณฑ์พลาสติกที่เติมแต่งด้วย Triclosan เป็นวัสดุบรรจุภัณฑ์สำหรับบรรจุอาหาร (Chung *et al.*, 2003; Cutter, 1999) แต่ทั้งนี้มียุทธศาสตร์ว่าประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์ของ Triclosan จะลดลงเมื่อบรรจุภัณฑ์สัมผัสกับอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ (Cooksey, 2001)

Cutter (1999) พบว่าพลาสติก (Triclosan incorporated plastic; TIP) ที่ผสมด้วย Triclosan 1,500 ppm สามารถต่อต้านแบคทีเรียก่อโรคประเภทที่พบบริเวณผิวหนังของผลิตภัณฑ์เนื้อได้ดี ได้แก่ *Brochothrix thermosphacta* ATCC 11509, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028,

*Staphylococcus aureus* ATCC 12598, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Escherichia coli* ATCC 25922, และ *Escherichia coli* O157:H7 บางชนิด ซึ่งทดสอบความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์โดยวิธี Plate overlay assays แต่ทั้งนี้ TIP ไม่สามารถลดจำนวนแบคทีเรียบริเวณผิวหนังของเนื้อที่แช่เย็นและมีการบรรจุแบบคัดแปลงบรรยากาศ

มีรายงานว่ากระดาษที่เคลือบด้วย Styrene-acrylate copolymer และมี Triclosan เป็นองค์ประกอบ 10 % w/w สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. faecalis* ได้ (Chung *et al.*, 2003) และจากการศึกษาของ Vermeiren และคณะ (2002) พบว่าฟิล์ม LDPE ที่มี Triclosan เป็นส่วนผสม 500 และ 1,000 mg/kg สามารถต่อต้านการเจริญของ *L. monocytogene*, *S. aureus*, *S. Enteritidis*, *E. coli* O157:H7 และ *Br. thermosphacta* ได้ สังเกตได้จากการปรากฏบริเวณใส (Inhibition zone) รอบแผ่นฟิล์มที่ทดสอบโดยเทคนิค Agar diffusion assay และศึกษาประสิทธิภาพการต่อต้าน *L. monocytogene* ของฟิล์มที่ผสมด้วย Triclosan 1,000 mg/kg โดยวางฟิล์มบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งที่มี *L. monocytogene* เจริญอยู่ และบรรจุแบบสุญญากาศ พบว่าฟิล์มดังกล่าวสามารถต่อต้านการเจริญของ *L. monocytogene* ได้ แต่ทั้งนี้เมื่อศึกษาประสิทธิภาพการต่อต้าน *L. monocytogene* ในสถานะการบรรจุแบบสุญญากาศเช่นเดียวกันกับชิ้นไก่ในถุง LDPE ที่ผลิตโดยผสม Triclosan ความเข้มข้น 1,000 mg/kg และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 7°C ฟิล์มดังกล่าวไม่สามารถต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเสื่อมเสีย เช่น Aerobic bacteria, Anaerobic bacteria, Lactic acid bacteria, *Enterobacteriaceae*, Yeast และ *L. monocytogene*

Braid และ Wale (2002) รายงานว่ากล่องพลาสติกสำหรับบรรจุอาหารที่มีส่วนผสมของ Triclosan สามารถต่อต้าน *E. coli* ในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 30°C และ 22°C แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. coli* ในอาหารที่เก็บรักษา ณ อุณหภูมิ 4 °C นอกจากนี้ Chung และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของกระดาษเคลือบด้วยสารเคลือบที่ประกอบด้วยตัวประสานเป็น Styrene-acrylate copolymer และ Triclosan ที่ความเข้มข้น 10% โดยวิธี Agar diffusion test และ Liquid culture test พบว่ากระดาษเคลือบดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. faecalis* ได้ ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าวพบได้ในผลิตภัณฑ์เนื้อ ชีส บริเวณผิวหนังของน้ำ และพบได้ในผัก เป็นต้น

เนื่องจากมีการศึกษาถึงความเป็นพิษของ Triclosan และมีรายงานว่า Triclosan ไม่แสดงความเป็นพิษร้ายแรงเมื่อใช้กับผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดช่องปากหรือไม่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคมะเร็ง ในประเทศแคนาดาและประเทศในทวีปยุโรปจึงได้อนุญาตให้ใช้ Triclosan ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดช่องปาก (Bhargava and Leonard, 1996) นอกจากนี้ European Commission (EC) ได้อนุญาตให้ใช้ Triclosan เป็นสารเติมแต่งในบรรจุภัณฑ์ได้ (Kane, 1999) และ

เมื่อไม่นานมานี้ คณะกรรมการวิชาการวิทยาศาสตร์ทางด้านอาหาร (Scientific Committee on Food; SCF) ได้อนุญาตให้ใช้ Triclosan กับวัสดุสัมผัสอาหารได้ โดยกำหนดปริมาณ Triclosan ที่แพร่ (Migration) จากบรรจุภัณฑ์ลงสู่อาหารได้ไม่เกิน 5 mg/kg ของอาหาร (SCF, 2000) ตัวอย่าง Triclosan ทางการค้าที่อนุญาตให้ใช้และมีใช้ในปัจจุบัน เช่น Microban<sup>®</sup> ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากประเทศสหรัฐอเมริกา

### 5. ซิลเวอร์ซีโอไลต์ (Silver-zeolite)

Silver-zeolite เป็นผลึกของอะลูมิเนียมซิลิเกต (Aluminosilicate) ซึ่งสามารถผลิตได้โดยวิธีการแลกเปลี่ยนไอออน (Ion-exchange) ด้วยการแทนที่ไอออนบวกบางตำแหน่งในผลึกอะลูมิเนียมซิลิเกตด้วย  $Ag^+$  ซึ่งเป็นไอออนของโลหะที่มีประสิทธิภาพในการต่อต้านจุลินทรีย์ที่ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับไอออนของโลหะชนิดอื่น Silver-zeolite มีกลไกการยับยั้งแบคทีเรีย 2 ขั้นตอน คือขั้นตอนแรก  $Ag^+$  จะถูกปลดปล่อยออกจาก Zeolite หลังจากนั้น  $Ag^+$  จะเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียทำให้ Lipopolysaccharides ที่เป็นองค์ประกอบของเมมเบรนเกิดความเสียหาย ทำให้ความสามารถในการซึมผ่านของสารเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียได้ดีขึ้น (Sondi and Salopek-Sondi, 2004) นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิด Reactive oxygen species (ROS) ทำให้ Silver-zeolite มีประสิทธิภาพการออกฤทธิ์แบบทำลายแบคทีเรีย (Bactericidal activity) (Matsumura *et al.*, 2003) พบว่า  $Ag^+$  สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์โดยทำปฏิกิริยากับ Thiol group ในเอนไซม์และยังส่งผลต่อการจำลอง DNA (Li *et al.*, 2008; Appendini and Hotchkiss, 2002; Slawson *et al.*, 1992) นอกจากนี้  $Ag^+$  มีผลต่อไรโบโซมและยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนที่ใช้ในการสังเคราะห์ Adenosinetriphosphate (ATP) (Yamanaka *et al.*, 2005) และยังทำปฏิกิริยากับกลุ่มให้อิเล็กตรอน โดยเฉพาะ Sulfhydryl group (Slawson *et al.*, 1992) รบกวนการส่งผ่านอิเล็กตรอนของเซลล์ (Cowan *et al.*, 2003)  $Ag^+$  สามารถทำปฏิกิริยากับประจุลบที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียส่งผลต่อการซึมผ่านสารของผนังเซลล์ ทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ ทำให้เซลล์แตกและตาย (Lin *et al.*, 1996) มีรายงานว่า  $Ag^+$  มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมี Murein บางกว่า จึงส่งผลให้การดูดซึม  $Ag^+$  เข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่า (Schierholz *et al.*, 1998)  $Ag^+$  สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ได้ (Richards, 1984) ในยีสต์และพบว่า  $Ag^+$  รบกวนการสังเคราะห์ผนังเซลล์ทำให้เกิดการสูญเสียสารอาหารที่จำเป็น (Wells *et al.*, 1995) การรบกวนกิจกรรมเมทาบอลิซึมของเซลล์โดย  $Ag^+$  ทำให้เซลล์ตายได้ (Dibrov *et al.*, 2002) นอกจากนี้ Kelly และคณะ (2007) อ้างโดย Johnston และคณะ (2008) กล่าวว่า การรวมตัวกันระหว่าง  $Ag^+$  กับ DNA ของแบคทีเรียทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการขนส่งสารที่



จำเป็น เช่น ยับยั้งกระบวนการนำ Phosphate และ Succinate เข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้  $Ag^+$  ยังสามารถทำปฏิกิริยากับกระบวนการออกซิเดชันและกระบวนการหายใจของเซลล์ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นทำให้ Silver-zeolite มีความเหมาะสมในการพัฒนาและประยุกต์ใช้กับบรรจุภัณฑ์อาหาร (Koontz, 2006) ตัวอย่าง Silver-zeolite ที่ใช้ในทางการค้า เช่น Zeomic<sup>®</sup> และ Bactekiller (Vermeiren *et al.*, 2002) Figure 2. เป็นภาพจากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของ Zeomic<sup>®</sup> AJ 10N และ Table 5. แสดงตัวอย่างความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของ Zeomic ที่สามารถออกฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียได้ จากตารางจะเห็นได้ว่า Zeomic สามารถต่อต้านจุลินทรีย์ได้ในช่วงกว้าง ได้แก่ แบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* และแบคทีเรีย แกรมบวก เช่น *Aspergillus niger* และ *Penicillium nigricans*

Table 5. Minimum inhibitory concentration (MIC) of Zeomic : General bacteria.

Tested microorganism strain	MIC(ppm)
<i>Bacillus cereus var mycoides</i> ATCC11778 (spore)	125
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633 (spore)	250
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> IFO 12711	62.5
<i>Salmonella gallinarum gallinarum</i> IFO3163	125
<i>Enterobacter aerogenes</i> IFO13534	125
<i>Escherichia coli</i> IFO3301	62.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IID P-1	62.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538P	250
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC8043	125
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC7468	250
<i>Escherichia coli</i> O-157 : H7 (Laboratory isolated strain)	125

ที่มา : Sinanen Zeomic Co.,Ltd (2008)

การประยุกต์ใช้ Silver-zeolite ในการผลิตวัสดุบรรจุภัณฑ์ที่มีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์ เช่น ใช้ในการผลิตฟิล์มพลาสติกหลายชั้น แต่ทั้งนี้พบว่า Silver-zeolite มีผลต่อความแข็งแรงของรอยปิดผนึกและความใสของฟิล์มบรรจุภัณฑ์ (Vartiainen *et al.*, 2003) ในประเทศญี่ปุ่นพบว่ามีการใช้ Silver-zeolite กันอย่างกว้างขวางโดยใช้เป็นสารเติมแต่งในบรรจุภัณฑ์อาหารประเภทบรรจุภัณฑ์พลาสติก เช่น ผสม Silver-zeolite ในพอลิเมอร์กลุ่ม Polyethylene,

Polypropylene, Polyamides เพื่อให้มีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียและรา ปริมาณของ Silver-zeolite ที่ใช้ในการผลิตบรรจุภัณฑ์อยู่ในช่วง 1% ถึง 3% (Brody *et al.*, 2001) และเนื่องจาก Silver-zeolite มีคุณสมบัติทนอุณหภูมิสูงได้ถึง 800°C ดังนั้นจึงเหมาะสมต่อกระบวนการขึ้นรูปบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ความร้อนสูง เช่น กระบวนการขึ้นรูปแบบอัดรีด (Extrusion) และกระบวนการฉีด (Injection) (Radheshkumar and Münstedt, 2006) และที่สำคัญ  $Ag^+$  มีความปลอดภัยต่อมนุษย์เมื่อเปรียบเทียบกับไอออนโลหะชนิดอื่นๆ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า Silver-zeolite เป็นสารที่เหมาะสมในการพัฒนาเป็นสารต่อต้านจุลินทรีย์ในการผลิตวัสดุที่มีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์ (Vermeiren *et al.*, 2002)

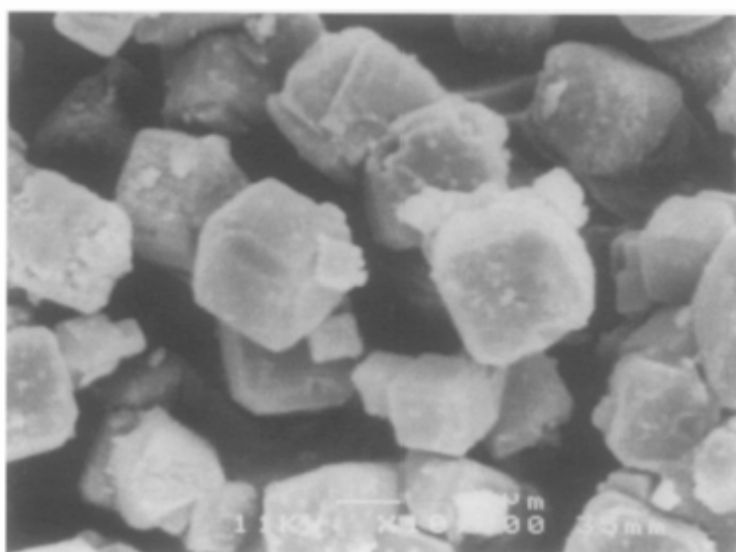


Figure 2. Scanning electron micrograph of Zeomic<sup>®</sup> AJ 10N. Bar scale represents 1  $\mu$ m.

ที่มา : Matsuura และคณะ (1997)

### 5.1 สมบัติการต่อต้านจุลินทรีย์ของ Silver ion ( $Ag^+$ ) ในการประยุกต์ใช้กับบรรจุภัณฑ์

การประยุกต์ใช้  $Ag^+$  ในการผลิตวัสดุบรรจุภัณฑ์ เช่น ในประเทศญี่ปุ่นมีการผสม Silver-zeolite ในบรรจุภัณฑ์พลาสติก เพื่อผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์อาหารที่มีสมบัติต่อต้านแบคทีเรีย (Appendini and Hotchkiss, 2002) แต่เนื่องจาก Silver-zeolite มีราคาแพง จึงได้มีการพัฒนาเพื่อลดต้นทุนการผลิตโดยผสมในฟิล์มแผ่นบางที่มีความหนาประมาณ 2  $\mu$ m เพื่อใช้เป็นฟิล์มสำหรับประกบในขั้นตอนการ Lamination อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณของ Silver-zeolite ที่มากเกินไปจะส่งผลต่อความแข็งแรงของรอยปิดผนึกและคุณสมบัติกายภาพอื่นๆ ของฟิล์ม เช่น ความใสของฟิล์ม เป็นต้น ปริมาณการใช้ Silver-zeolite โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 1%-3% w/w (Vartiainen *et al.*, 2003) นอกจากนี้มีการใช้ Silver-zeolite ผสมในพอลิเมอร์ชนิดอื่นๆ เช่น Polyethylene, Nylon และ

Butadiene styrene เป็นต้น (Brody *et al.*, 2001) ตัวอย่างสมบัติการต่อต้านจุลินทรีย์ของบรรจุภัณฑ์แบบแอคทีฟประเภทนี้ เช่น ฟิล์ม Polyethylene ที่มีส่วนประกอบของ  $Ag^+$  สามารถยับยั้งการเจริญ *Alicyclobacillus acidoterrestris* และจากการทดสอบความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มที่เคลือบด้วย  $Ag^+$  กับอาหาร 2 ชนิด คือ Acidified malt extract broth และ Apple juice พบว่าฟิล์มดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของ *Alicyclobacillus acidoterrestris* ได้ (Nobile *et al.*, 2006)  $Ag^+$  ทางการค้าส่วนใหญ่อยู่ในรูปวัสดุประกอบ Silver-zeolite มีชื่อทางการค้า เช่น Zeomic<sup>®</sup>, Apacider<sup>®</sup>, AgIon, Bactekiller และ Novaron (Appendini and Hotchkiss, 2002) Silver-zeolite มีการผลิตโดยวิธี Ion-exchange (การแทนที่บริเวณผิวหน้าของ Zeolite ด้วย  $Ag^+$ ) และเนื่องจากเชื่อว่าวัสดุ Ceramic มีสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์ และเป็นสารเติมแต่งที่ใช้เพื่อยืดระยะเวลาของอาหารที่แสดงความเป็นพิษต่อมนุษย์ต่ำ มีความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ได้เป็นระยะเวลานาน สำหรับในประเทศญี่ปุ่นนิยมใช้ Silver-zeolite และ Silver zirconium phosphate (Vermeiren *et al.*, 2002) โดยเฉพาะ Silver-zeolite ใช้เป็นสารต่อต้านจุลินทรีย์ในบรรจุภัณฑ์พลาสติก เช่น ใช้ในการผลิตฟิล์มประกบสำหรับบรรจุภัณฑ์อาหารเพื่อลดต้นทุนการผลิต (Suppakul *et al.*, 2003; Vermeiren *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังใช้เป็นส่วนผสมในอุปกรณ์ทางการแพทย์อีกด้วย และจากการศึกษาวัสดุผสมที่มีโครงสร้างระดับนาโน (Nano-structured calcium silicate-silver composite; NCS-Ag) และทดสอบสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์ โดยวางเกล็ดของวัสดุผสมแต่ละชนิดบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 เจริญอยู่ จาก Figure 3. แสดง Inhibition zone รอบตัวอย่างซึ่งบ่งชี้ถึงการต่อต้านหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งขนาดของ Inhibition zone ของ NCS-Ag ที่ประกอบด้วย  $Ag^+$  ปริมาณ 10 และ 2,000 mg/kg (ในรูป  $AgNO_3$ ) มีขนาดเป็น 1 และ 6 mm ตามลำดับ และจากการจำลองการชะล้างโดยการกวนวัสดุผสมในน้ำเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าวัสดุผสม NCS-Ag ที่ประกอบด้วย  $Ag^+$  10 mg/kg (ในรูป  $AgNO_3$ ) ยังคงมีความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นกล่าวได้ว่าวัสดุผสม NCS-Ag สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารเติม (Filler) ในผลิตภัณฑ์พลาสติกหรือในผลิตภัณฑ์อื่นๆ เพื่อให้มีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์ได้ (Johnson *et al.*, 2008) จากการศึกษากของ Stobie และคณะ (2007) พบว่า  $Ag^+$  ที่ปลดปล่อยจากฟิล์ม Phenyltriethoxysilane (PhTEOS) ที่เคลือบด้วย Silver โดยวิธี Sol gel สามารถป้องกันการเกิดสารเมือกจาก *Staphylococcus epidermidis* ได้ และสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. epidermidis* ได้ แสดงดัง Figure 4.

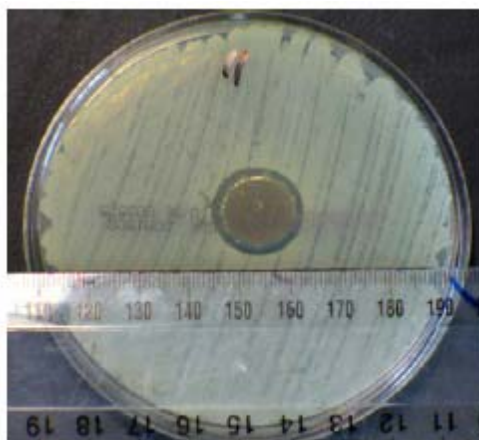


Figure 3. The antimicrobial activity of a nano-structured calcium silicate silver composite containing 10 mg/kg silver (as  $\text{AgNO}_3$ ) following leaching in water, against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

ที่มา : Johnson และคณะ (2008)

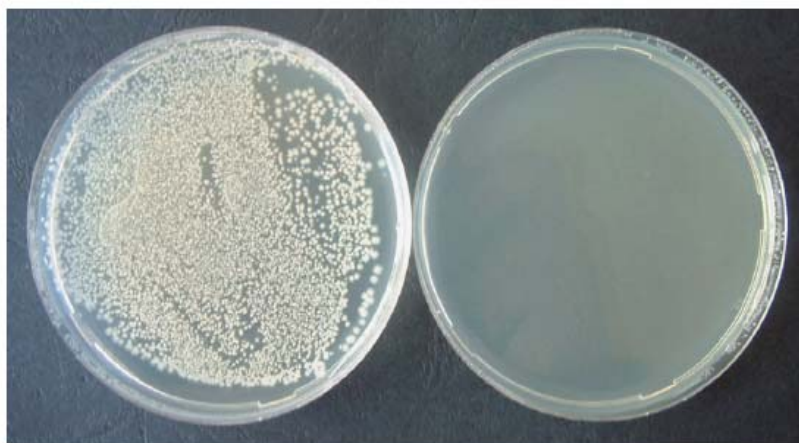


Figure 4. Antibacterial activity of Ag-doped PhTEOS coatings against planktonic *S. epidermidis* (CSF 41498) after 24 h.

ที่มา : Stobie และคณะ (2007)

สำหรับการประยุกต์ใช้  $\text{Ag}^+$  ในวัสดุบรรจุภัณฑ์ ส่วนใหญ่มีการใช้  $\text{Ag}^+$  ที่อยู่ในรูปสารประกอบทั้งที่เป็น Colloidal form และสารประกอบที่  $\text{Ag}^+$  อยู่ในวัสดุตัวพา ตัวอย่างสารประกอบที่  $\text{Ag}^+$  อยู่ในวัสดุตัวพา เช่น Silver-zeolite ซึ่งใช้ผสมในพอลิเมอร์หลายชนิด ได้แก่ Polyethylene, Polypropylene, Polyamide แต่ทั้งนี้การเลือกชนิดพอลิเมอร์จำเป็นต้องพิจารณาถึง

ลักษณะความเป็น Hydrophilicity ของพอลิเมอร์ด้วย การใช้ Silver-zeolite ในกระบวนการผลิตบรรจุภัณฑ์ พบว่าสามารถใช้ในกระบวนการผลิตแบบหลอม (Melt blending) หรือโดยอาศัยตัวทำละลาย ทั้งนี้เนื่องจากสามารถทนต่อความร้อนได้ถึง 800°C จึงสามารถใช้ได้ทั้งในการขึ้นรูปแบบ Extrusion และ Injection molding แต่ในปัจจุบันนิยมใช้วิธีการเคลือบผิวแทนเนื่องจากเกรงว่าความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์จะลดลงเมื่อใช้ในกระบวนการผลิตที่ใช้อุณหภูมิสูง การเคลือบผิวนั้นต้องคำนึงถึงลักษณะทางพื้นผิวของวัสดุ เนื่องจากการเคลือบต้องอาศัยแรงดึงดูดระหว่างพอลิเมอร์และสารเคลือบเป็นสำคัญ และสำหรับการผลิตโดยใช้เทคนิค Surface immobilization นั้นต้องคำนึงถึงหมู่ฟังก์ชันของสารต่อต้านจุลินทรีย์และพอลิเมอร์เป็นสำคัญ (Radheshkumar and Münstedt, 2006) นอกจากนี้เนื่องจาก  $Ag^+$  สามารถออกฤทธิ์ได้ระยะเวลายาวนาน มีสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์และมีความเป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อมนุษย์ต่ำ ดังนั้นจากคุณสมบัติเด่นข้างต้นจึงใช้ในการผสมลงในวัสดุหลายชนิดเพื่อทำให้มีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์ได้ในช่วงกว้าง โดยมีความปลอดภัยต่อมนุษย์เมื่อเปรียบเทียบกับไอออนโลหะชนิดอื่นๆ จึงกล่าวได้ว่า  $Ag^+$  เป็นสารที่เหมาะสมในการพัฒนาเป็นสารต่อต้านจุลินทรีย์ (Vermeiren, 2002)

ในปี 2005 องค์การความปลอดภัยของอาหารแห่งยุโรป (European Food Safety Authority) ได้อนุญาตให้ใช้ AgIon<sup>TM</sup> และ Zeomic<sup>®</sup> เป็นสารเติมแต่งที่สัมผัสอาหารได้ โดยกำหนดให้มีการเติม  $Ag^+$  ได้ถึง 10% (European Food Safety Authority, 2005) ในปี 2005 องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration; FDA) ได้อนุญาตให้ใช้ AgIon ในวัสดุสัมผัสอาหารได้ และเมื่อไม่นานมานี้สหภาพยุโรปอนุญาตให้ใช้ Masterbatch ที่ประกอบด้วย Silver-substituted zirconium phosphate ceramics ( $Ag_xH_{1-x}Zr_2(PO_4)_3$ ) ซึ่งมีชื่อทางการค้าเป็น Novaron<sup>®</sup> เพื่อเป็นสารให้สีในอาหาร แต่ทั้งนี้อนุญาตให้ใช้ได้ปริมาณที่น้อยมาก (Vermeiren *et al.*, 2002)

## 6. การแพร่ของสารต่อต้านจุลินทรีย์จากสารเคลือบ

สารเคลือบที่ใช้สำหรับเคลือบบรรจุภัณฑ์ต่อต้านจุลินทรีย์นั้นต้องมีสมบัติในการเป็นตัวพาและสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารต่อต้านจุลินทรีย์ลงสู่อาหารได้ โดยปริมาณที่ปลดปล่อยต้องอยู่ในระดับที่สามารถต่อต้านจุลินทรีย์เป้าหมายได้ ดังนั้นความเข้มข้นของสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่ผิวเคลือบต้องมีค่าสูงกว่าระดับต่ำสุดที่สามารถต่อต้านแบคทีเรียเป้าหมายได้ (Appendini and Hotchkiss, 2002) ลักษณะการปลดปล่อยของสารต่อต้านจุลินทรีย์จากสารเคลือบสู่ผิวหน้าอาหารที่บรรจุอยู่ภายในบรรจุภัณฑ์ แสดงดัง Figure 5. ทั้งนี้อัตราการปลดปล่อยสาร

ต่อต้านจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับลักษณะของอาหาร แรงกระทำระหว่างสารต่อต้านจุลินทรีย์และสารเคลือบ และชนิดจุลินทรีย์เป้าหมาย (Cooskey, 2001)

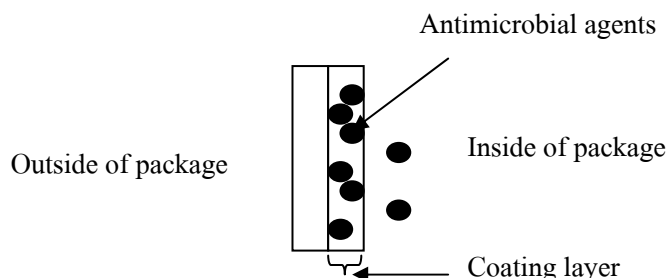


Figure 5. Profile of a packaging film containing an antimicrobial coating

ที่มา : Cooskey (2001)

การศึกษาการแพร่สารต่อต้านจุลินทรีย์ลงสู่ผลิตภัณฑ์อาหารโดยวิธีการจำลองชนิดอาหารเป็นวิธีที่นิยมใช้กันเป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะการจำลองในรูปอาหารเหลว (García *et al.*, 2006) เนื่องจากการใช้ผลิตภัณฑ์อาหารจริงเพื่อทดสอบนั้นมีข้อจำกัดเรื่องความซับซ้อนขององค์ประกอบในอาหารแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น ศึกษาการแพร่ของ Triclosan จากกระดาษเคลือบที่เคลือบด้วยสารเคลือบที่ประกอบด้วยตัวประสานเป็น Styrene-acrylate copolymer ผสมด้วย Triclosan ที่ระดับความเข้มข้น 10% โดยมีสารละลายตัวแทนอาหารเป็น 10% Ethanol แทนอาหารเหลวที่มีฤทธิ์เป็นกรด และใช้ *n*-heptane แทนอาหารที่มีไขมัน เป็นองค์ประกอบพบว่า Triclosan สามารถแพร่ลงสู่สารละลาย 10% Ethanol และ *n*-heptane ได้ โดยมีสัมประสิทธิ์การแบ่งภาค (Partition coefficient) เป็น  $1.7 \times 10^{-5}$  และ  $5.5 \times 10^{-2}$  ตามลำดับ (Chung *et al.*, 2003)

## 7. กลไกการต่อต้านจุลินทรีย์

กลไกการต่อต้านจุลินทรีย์แบ่งได้เป็น 2 ลักษณะ คือการต่อต้านจุลินทรีย์โดยอาศัยการปลดปล่อยหรือการแพร่ (Migrating) ของสารต่อต้านจุลินทรีย์ลงสู่ผิวหน้าอาหารหรือแพร่ลงไปในส่วนช่องว่างในอาหาร และการต่อต้านจุลินทรีย์โดยไม่มีการแพร่ (Non migrating) ซึ่งจะออกฤทธิ์ต่อต้านจุลินทรีย์เมื่อจุลินทรีย์สัมผัสกับผิวของวัสดุที่ผสมสารต่อต้านจุลินทรีย์ และการต่อต้านจุลินทรีย์เกิดโดยการปลดปล่อยสารต่อต้านจุลินทรีย์อย่างช้าๆ (Chung *et al.*, 2003) ซึ่งช่วยยืดระยะเวลาการปรับตัวก่อนการเจริญของจุลินทรีย์ (Lag phase) ทำให้อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ลดลง (Weng and Hotchkiss, 1992; Rico-Pena and Torres, 1991; Vojdani and Torres, 1990) และ

พบว่า การปล่อยสารต่อต้านจุลินทรีย์อย่างช้าๆ ทำให้ความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ดีขึ้นเรื่อยๆ ใดๆก็ตาม อัตราการปลดปล่อยขึ้นอยู่กับชนิดของปฏิกิริยาระหว่างสารต่อต้านจุลินทรีย์กับสารเคลือบ ชนิดจุลินทรีย์เป้าหมาย และชนิดของผลิตภัณฑ์อาหารที่สัมผัส (Cooksey, 2001)

#### 8. การทดสอบประสิทธิภาพของกระดาษเคลือบที่มีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์โดยวิธี Agar diffusion assay

เทคนิค Agar diffusion assay เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์ของกระดาษเคลือบ ซึ่งสามารถทำได้โดยวางแผ่นตัวอย่างที่ต้องการทดสอบประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์บนฐานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (Solid agar medium) ที่มีเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบอยู่ บ่มจนเลี้ยงเชื้อจนสามารถมองเห็นเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญและบริเวณที่ปราศจากการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (Inhibition zone/Clear zone) โดย Inhibition zone จะปรากฏรอบๆ บริเวณแผ่นตัวอย่างที่มีสารต่อต้านจุลินทรีย์และสามารถออกฤทธิ์ต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้ นอกจากนี้ Inhibition zone แสดงให้เห็นถึงการแพร่ของสารต่อต้านจุลินทรีย์จากแผ่นตัวอย่างและส่งผลให้สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ ดัง Figure 6. แสดงบริเวณ Inhibition zone ของสารต่อต้านจุลินทรีย์ในฟิล์มพลาสติกที่สามารถต่อต้านการเจริญของ *A. niger* โดยประสิทธิภาพในการต่อต้านจุลินทรีย์สามารถวิเคราะห์ได้จากขนาดของ Inhibition zone รอบบริเวณแผ่นตัวอย่าง (Appendini and Hotchkiss, 2002)

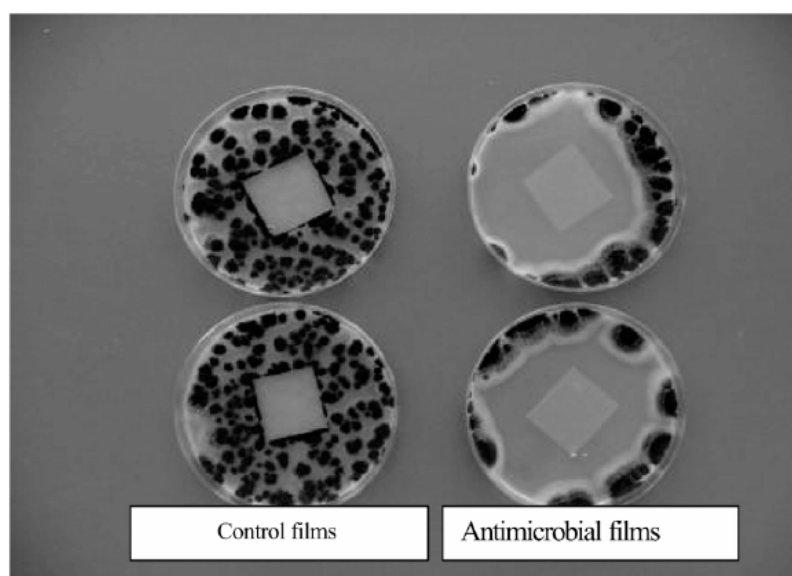


Figure 6. Effect of antimicrobial plastic film on *Aspergillus niger*

ที่มา : Appendini และ Hotchkiss (2002)

## 9. ปัจจัยในการพิจารณาสำหรับการผลิตวัสดุบรรจุภัณฑ์ที่มีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์

การเลือกใช้สารต่อต้านจุลินทรีย์และวัสดุบรรจุภัณฑ์ในการผลิตและพัฒนาระบบบรรจุภัณฑ์ที่มีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์เป็นสิ่งสำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากการเติมสารต่อต้านจุลินทรีย์ในวัสดุบรรจุภัณฑ์ส่งผลต่อสมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมี ตัวอย่างปัจจัยในการพิจารณาในการผลิตฟิล์มที่มีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์ มีดังนี้

1. สภาวะกระบวนการผลิตและประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย

ความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ของสารต่อต้านจุลินทรีย์อาจลดลงหรือถูกทำให้หมดไประหว่างกระบวนการผลิต การจัดเก็บ และการขนส่ง (Han, 2000) ความคงทนต่อสารเคมีของสารต่อต้านจุลินทรีย์อาจได้รับผลกระทบจากสภาวะการอัดรีดที่ใช้อุณหภูมิ แรงเฉือน และความดันในการผลิต (Han and Floros, 1999) ในการกำจัดปัญหานี้อาจทำได้โดยการใช้สารต่อต้านจุลินทรีย์ในรูปแบบของ Master batch นอกจากนี้กระบวนการ Lamination กระบวนการพิมพ์ และการทำแห้งซึ่งมีการใช้สารเคมี อาจส่งผลต่อความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ของบรรจุภัณฑ์อีกด้วย (Han, 2000)

2. คุณลักษณะของสารต่อต้านจุลินทรีย์และอาหาร

ความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ของสารต่อต้านจุลินทรีย์แต่ละชนิดให้ผลแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณลักษณะของสารต่อต้านจุลินทรีย์และคุณลักษณะของอาหารแต่ละชนิดที่มีลักษณะทางเคมีและชีวภาพและการจัดเก็บในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน (Han, 2000)

3. ปฏิกิริยาเคมีของสารต่อต้านจุลินทรีย์กับวัสดุบรรจุภัณฑ์

ในการเติมสารต่อต้านจุลินทรีย์ลงในพอลิเมอร์ ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงคือสมบัติความมีขี้วและน้ำหนักโมเลกุลของสารต่อต้านจุลินทรีย์ เนื่องจากเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการละลายและการแพร่ซึ่งส่งผลต่อความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ (Cooksey, 2000)

4. อุณหภูมิในการเก็บรักษา

มีรายงานการวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิสูงสามารถทำลายความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิมิมีผลต่อการแพร่และความเข้มข้นของสารต่อต้านจุลินทรีย์ในพอลิเมอร์ (Vojdani and Torres, 1989 a,b; Wong *et al.*, 1996)



### 5. สัมประสิทธิ์และรูปแบบการถ่ายโอนมวล

รูปแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของกระบวนการแพร่สามารถทำนายรูปแบบและระยะเวลาในการปลดปล่อยสารต่อต้านจุลินทรีย์ได้ (Han, 2000)

### 6. สมบัติทางกายภาพของวัสดุบรรจุภัณฑ์

สารต่อต้านจุลินทรีย์อาจส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติทางกายภาพ ความสามารถในการผลิตและคุณสมบัติทางเคมีของวัสดุบรรจุภัณฑ์ Han และ Floros (1997) พบว่าฟิล์ม LDPE ที่มีส่วนผสมของ Potassium sorbate มีความใสลดลงเมื่อความเข้มข้นของ Sorbate เพิ่มขึ้น

### 7. ต้นทุนการผลิต

การใช้สารต่อต้านจุลินทรีย์เพื่อผลิตฟิล์มที่มีสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์ ส่งผลให้มีต้นทุนการผลิตสูงขึ้นเมื่อเทียบกับฟิล์มที่ไม่มีการเติมสารต่อต้านจุลินทรีย์ ดังนั้นการนำไปใช้งานจึงควรนำไปใช้กับผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง (Cooksey, 2000)

### 8. กฎหมายและการอนุญาตใช้วัสดุที่สามารถสัมผัสกับอาหารได้

ข้อกำหนดเกี่ยวกับบรรจุภัณฑ์แบบแอคทีฟ บรรจุภัณฑ์ต่อต้านจุลินทรีย์และการพัฒนาบรรจุภัณฑ์ เช่น กฎหมายเกี่ยวกับวัสดุสัมผัสอาหารที่อนุญาตให้ใช้ได้ ในสหภาพยุโรป ซึ่งออกโดย European Commission และสำหรับในสหรัฐอเมริกา มีรายงานว่ายังไม่มีข้อกำหนดเฉพาะเจาะจงสำหรับบรรจุภัณฑ์แบบแอคทีฟ แต่มีการกำหนดมาตรฐานปริมาณสารเติมแต่งอาหารที่สามารถแพร่จากบรรจุภัณฑ์สู่อาหารและกำหนดรูปแบบบรรจุภัณฑ์ ในปัจจุบัน FDA เท่านั้นที่เป็นผู้ตรวจและประกาศยอมรับวัสดุที่สัมผัสกับอาหารได้ และเมื่อไม่นานมานี้ FDA ได้อนุญาตให้ใช้ Silver-zeolite เช่น AgIon™ และ Zeomic® เป็นวัสดุสัมผัสอาหารได้ (Brody *et al.*, 2001) สารต่อต้านจุลินทรีย์ที่อนุญาตให้ใช้ได้ ในสหรัฐอเมริกาแสดงดัง Table 6. และสารเติมแต่งในอาหารที่ได้รับการอนุญาตให้ใช้เป็นสารต่อต้านจุลินทรีย์ในวัสดุบรรจุภัณฑ์อาหารแสดงดัง Table 7.

Table 6. Traditional and naturally occurring food antimicrobials approved by the Food and Drug Administration.

Compound (s)	Microbial target	Primary food application	Title 21 CFR designation <sup>a</sup>
Acetic acid, acetates, diacetates, dehydroacetic acid	Yeasts, bacteria	Baked goods, condiments, confections, dairy products, fats/oils, meats, sauces	184.1005, 182.6197, 184.754, 184.1185, 184.1721, 172.130

Table 6. (Cont.)

Compound (s)	Microbial target	Primary food application	Title 21 CFR designation <sup>a</sup>
Benzoic acid, benzoates	Yeasts, molds	Beverages, fruit products, margarine	184.1021, 184.1733
Dimethyl dicarbonate	Yeasts	Beverages	172.133
Lactic acid, lactates	Bacteria	Meats, fermented food	184.1061, 184.1207, 184.1639, 184.1768
Lactoferrin	Bacteria	Meats	- <sup>b</sup>
Lysozyme	<i>Clostridium botulinum</i> , other bacteria	Cheese, frankfurters, cooked meat and poultry products	184.1538 <sup>c</sup>
Natamycin	Molds	Cheese	172.155
Nisin	<i>Clostridium botulinum</i> , other bacteria	Cheese, other products	184.1538 <sup>d</sup>
Nitrite, nitrate	<i>Clostridium botulinum</i>	Cured meats	172.160, 172.170, 172.175, 172.177
Parabens (alkyl esters, propyl, methyl, heptyl) of <i>p</i> -hydroxybenzoic acid	Yeasts, molds, bacteria (Gram-positive)	Beverages, baked goods, syrups	184.1490, 184.1670, 172.145
Propionic acid, propionate	Molds	Bakery products, dairy products	184.1081, 184.1221, 184.1784

Table 6. (Cont.)

Compound (s)	Microbial target	Primary food application	Title 21 CFR designation <sup>a</sup>
Sorbic acid, sorbates	Yeasts, molds, bacteria	Most food, beverages, wines	182.3089,182.3225, 182.3640,180.3795
Sulfites	Yeasts, molds	Fruits, fruit products, potato products, wines,	Various

<sup>a</sup>These are the food and drug Administration's in Title 21 of the *Code of Federal Regulations*. Food antimicrobials approved by the U.S. Dept. of Agriculture's Food Safety and Inspection Service for use in meat products are listed in Sections 424.21 and 424.22 of Title 9 of the CFR.

<sup>b</sup>FDA/CFSAN (2001a)

<sup>c</sup>FDA/CFSAN (2001b)

<sup>d</sup>FDA/CFSAN (2001c)

<sup>e</sup>ที่มา : Davidson และ Harrison (2002)

Table 7. List of permitted food additives that could be used as antimicrobial agents in packaging materials.

Additive	Code Assigned by Legislative Authority		
	Australia/New Zeland <sup>1</sup>	Europe <sup>2</sup>	U.S.A. <sup>3</sup>
Acetic acid	260	E260	GRAS
Benzoic acid	210	E210	GRAS
Butylated hydroxyanisole (BHA)	320	E320	GRAS
Butylated hydroxytoluene (BHT)	321	E321	GRAS
Carvarcol			FA
Citral			GRAS
Citric acid	330	E330	GRAS
<i>p</i> -Cresol			FA
EDTA			FA

Table 7. (Cont.)

Additive	Code Assigned by Legislative Authority		
	Australia/New Zealand <sup>1</sup>	Europe <sup>2</sup>	U.S.A. <sup>3</sup>
Estragole (methyl chavicol)			GRAS
Ethanol		E1510	GRAS
Ethyl paraben		E214	GRAS
Eugenol			GRAS
Geraniol			GRAS
Glucose oxidase	1102		GRAS
Hexamethylenetetramine (HMT)		E239	
Konjac glucomannan		E425	GRAS
Lactic acid	270	E270	GRAS
Lauric acid			FA
Linalool			GRAS
Lysozyme	1105	E1105	GRAS
Malic	296	E296	GRAS
Methyl paraben	218	E218	
Natamysin	235	E235	FA
Nisin	234	E234	GRAS
Phosphoric acid	338	E338	GRAS
Polyphosphate		E452	GRAS
Potassium sorbate	202	E202	GRAS
Propionic acid	280	E280	GRAS
Propyl paraben	216	E216	GRAS
Sodium benzoate	211	E211	GRAS
Sorbic acid	200	E200	GRAS
Succinic		E363	GRAS
Sulfur dioxide	220	E220	GRAS

Table 7. (Cont.)

Additive	Code Assigned by Legislative Authority		
	Australia/New Zealand <sup>1</sup>	Europe <sup>2</sup>	U.S.A. <sup>3</sup>
Tartaric acid	334	E334	GRAS
Tertiary butylhydroquinone (TBHQ)	319		FA
$\alpha$ -Terpineol			FA
Thymol			FA

1 Assignment of a number signifies that additive is approved by the Australian and New Zealand Food Authority (ANZFA) and The Australian New Zealand Food Standards Council (ANZFS) as being safe for food use.

2 Assignment of an “E” number signifies that additive has been approved by the European Communities (EC) Scientific Committee on Food (SCF).

3 Classification in accordance with Food and Drug Administration (FDA). Title 21 of the Code of Federal Regulations 21 (21 CFR) wherein substance intended for use in the manufacture of foodstuffs for human consumption are classified into 3 categories (FA), prior – sanctioned food ingredients and substances generally recognised as safe (GRAS).

ที่มา : Suppakul และคณะ (2003)

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของชนิด ความเข้มข้นของสารต่อต้านจุลินทรีย์และการ Precoating กระดาษ ต่อสมบัติการต่อต้านจุลินทรีย์ *E. coli* และ *S. aureus*
2. เพื่อศึกษาสมบัติเชิงกลบางประการ องค์ประกอบทางเคมีและลักษณะปรากฏของกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์
3. เพื่อศึกษาการแพร่กระจายของสารต่อต้านจุลินทรีย์จากสารเคลือบสู่สารละลายตัวแทนอาหาร
4. เพื่อศึกษาผลของการประยุกต์ใช้กระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์กับตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหาร
5. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่เตรียมทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและในระดับการผลิตเชิงอุตสาหกรรมต่อสมบัติการต่อต้านจุลินทรีย์ *E. coli* และ *S. aureus*

## บทที่ 2

### วิธีการวิจัย

#### 1. การศึกษาประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์โดยวิธี Agar diffusion assay

การศึกษาประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์ของกระดาษเคลือบ โดยวิธี Agar diffusion assay และจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบคือ *E. coli* และ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกตามลำดับ โดยทำการบ่ม *E. coli* และ *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °C เมื่อครบเวลาทำการถ่ายเชื้อจากอาหารเหลว NB ปริมาตร 1 ml ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ปริมาตร 9 ml อีกครั้งและทำการบ่มอีก 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียที่แข็งแรง โดยจำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ที่ได้จะมีจำนวน  $10^8$  CFU/ml หลังจากนั้นทำการเจือจางเชื้อ (Serial dilution) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ให้ได้ปริมาณเชื้อ  $10^5$  CFU/ml นำตัวอย่างกระดาษที่ต้องการทดสอบประสิทธิภาพในการต่อต้านแบคทีเรีย มาตัดให้มีขนาด  $2 \times 2$  cm<sup>2</sup> นำไปฉายแสง UV ในตู้ Laminar air flow เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นวางแผ่นกระดาษบนจานทดสอบที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง NA ที่มีเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบปริมาตร 1 ml (มีปริมาณเชื้อประมาณ  $10^5$  CFU/ml) โดยวางแผ่นกระดาษด้านที่มีสารเคลือบคว่ำลงให้สัมผัสกับผิววุ้น (จำนวน 2 แผ่นต่อจานเพาะเชื้อ 1 จาน) บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนสามารถมองเห็นเชื้อที่เจริญและบริเวณที่ปราศจากการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (Inhibition zone/Clear zone) โดย Inhibition zone จะปรากฏเป็นบริเวณใสรอบๆแผ่นกระดาษตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพในการต่อต้านแบคทีเรีย ซึ่งบริเวณ Inhibition zone แสดงให้เห็นว่ามีการแพร่ของสารต่อต้านจุลินทรีย์จากแผ่นกระดาษตัวอย่างและสามารถต่อต้านแบคทีเรียได้ และสามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต่อต้านแบคทีเรียเพื่อคัดเลือกชนิดสารหรือความเข้มข้นของสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่ให้ประสิทธิภาพในการต่อต้านแบคทีเรียที่ดีที่สุด จากการเปรียบเทียบขนาดพื้นที่ Inhibition zone โดยวัดความกว้างและยาวของ Inhibition zone ที่เกิดขึ้น และคำนวณค่า Antimicrobial index ดังอธิบายในภาคผนวก ก

## 2. การเตรียมกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์

### 2.1 การเตรียมสารละลายผสมสารเคลือบและสารต่อต้านจุลินทรีย์

เตรียมสารเคลือบที่มีส่วนผสมสารต่อต้านจุลินทรีย์ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ Triclosan หรือ Silver-zeolite (Zeomic AW10N หรือ Zeomic AJ10N) ผสมในตัวประสาน Cartaseal SVU liquid โดยเตรียมสารเคลือบที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับ (3%, 5% และ 10% w/w) ทำการกวนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันเป็นเวลา 20 นาที

### 2.2 การเตรียมกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์สำหรับศึกษาผลของการ Precoating

#### 2.2.1 การเตรียมกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์แบบ Precoating

เตรียมผิวหน้ากระดาษให้สะอาด เทสารเคลือบ Cartaseal SVU liquid เพียง 1 ด้าน เพื่อเป็นชั้น Precoating โดยใช้เกรียงยางรีดสารเคลือบให้เต็มผิวหน้ากระดาษอย่างสม่ำเสมอ ควบคุมน้ำหนักสารเคลือบเป็น  $4 \text{ mg/cm}^2$  ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น นำสารละลายผสมที่เตรียมในข้อ 2.1 เคลือบทับชั้น Precoating โดยควบคุมน้ำหนักสารเคลือบเป็น  $4 \text{ mg/cm}^2$  เช่นกัน หลังจากนั้นทำให้แห้งโดยลมร้อนอุณหภูมิ  $200^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 1 นาที

#### 2.2.2 การเตรียมกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์แบบ No-precoating

เคลือบกระดาษตามวิธี 2.2.1 โดยใช้สารผสมที่เตรียมในข้อ 2.1 เพียงชนิดเดียว

#### 2.2.3 การเตรียมตัวอย่างกระดาษชุดควบคุม

เคลือบกระดาษตามวิธี 2.2.1 โดยใช้สารเคลือบ Cartaseal SVU liquid เพียงชนิดเดียว

## 3. การศึกษาคุณลักษณะการต่อต้านจุลินทรีย์ของกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์

โดยมีปัจจัยในการศึกษาดังนี้

3.1 ศึกษาผลของชนิดสารต่อต้านจุลินทรีย์ (Triclosan และ Silver-zeolite) ต่อประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์

3.2 ศึกษาผลของการ Precoating ต่อประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์ของกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน (3%, 5% และ 10% w/w)

3.3 ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของสารต่อต้านจุลินทรีย์ (3%, 5% และ 10% w/w) ต่อประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์

3.4 ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษากระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์ต่อประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์ โดยเก็บกระดาษที่สภาวะอุณหภูมิห้อง และตรวจสอบประสิทธิภาพ

การต่อต้านจุลินทรีย์ของกระดาษเคลือบที่ระยะเวลาการเก็บ 0, 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ (จำลองระยะเวลาในการเก็บรักษากล่องกระดาษหลังจากผลิตจนถึงก่อนการนำไปบรรจุสินค้า)

โดยที่ทุกปัจจัยในการศึกษาความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ใช้วิธีทดสอบ Agar diffusion assay ที่อธิบายในข้อ 1

#### 4. การศึกษาคุณสมบัติเชิงกล องค์ประกอบเคมีและลักษณะปรากฏของกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์

นำตัวอย่างกระดาษเคลือบที่มีประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์ที่ดีที่สุดจากการทดสอบข้อ 3 ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 23 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 50% (ASTM D 685-93) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วนำมาศึกษาคุณสมบัติเชิงกล ได้แก่ ความสามารถในการดูดซึมน้ำ (Cobb test; TAPPI T 441. om-90), ความสามารถด้านแรงดันทะลุ (Bursting strength; TAPPI T 810. om-85) และความต้านทานแรงกดตามแนวตั้ง (Edge Crust Test; TAPPI T 811. om-95) นอกจากนี้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์โดยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกระดาษเคลือบโดยวิธี Scanning Electron Microscopy (SEM)

#### 5. การเตรียมสารละลายตัวแทนอาหาร (Food simulating solvents; FSS) และการศึกษาการแพร่กระจายของสารต่อต้านจุลินทรีย์จากกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์

##### 5.1 การเตรียมสารละลายตัวแทนอาหาร (Food simulating solvents; FSS)

เตรียมสารละลายตัวแทนอาหารโดยใช้สารละลาย 50% Ethanol (FDA, 2002) และ *n*-heptane (Baner *et al*, 1994) สำหรับเป็นตัวแทนอาหารเหลวที่มีแอลกอฮอล์ และอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบตามลำดับ และใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลายมาตรฐาน และเป็นตัวแทนอาหารที่มีความเป็นกรดต่างกัน 5 ทั้งนี้เนื่องจากน้ำเป็นส่วนประกอบหลักของอาหารเหลวส่วนใหญ่อีกด้วย (Limn and Holifield, 1995; Goydan *et al.*, 1990)

##### 5.2 ศึกษาการแพร่กระจายของสารต่อต้านจุลินทรีย์จากกระดาษเคลือบ

นำตัวอย่างกระดาษเคลือบที่มีประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์ที่ดีที่สุดจากการทดสอบจากข้อ 3 ศึกษาการแพร่กระจายของสารต่อต้านจุลินทรีย์โดยใช้ Diffusion Cell ซึ่งมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกและมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเป็น 5.5 cm (Figure 7.) ภายในบรรจุสารละลายตัวแทนอาหาร ซึ่งในแต่ละ Cell บรรจุสารละลาย 50% Ethanol, *n*-heptane และน้ำกลั่น ปริมาตร 100 ml โดยที่ฐานด้านล่างรองรับด้วยกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์โดยให้



ด้านที่มีสารเคลือบสัมผัสกับสารละลายที่เป็นตัวแทนอาหาร (Chung *et al.*, 2001b) รักษาอุณหภูมิของสารละลายใน Diffusion Cell เป็น  $40^{\circ}\text{C}$  โดยการแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) คูดตัวอย่างสารละลายจาก Diffusion Cell ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง (European Commission, 1982; FDA, 2002) เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณของสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่แพร่ลงสู่สารละลายตัวแทนอาหาร โดยเครื่อง HPLC และใช้เทคนิคทดสอบแบบ Reverse phase high performance liquid chromatography คอลัมน์ที่ใช้เป็น C8 (Zorbax Eclipse XDB C8; 4.6x150 mm; 5  $\mu\text{m}$ ) ใช้ UV detector วัดความยาวคลื่นที่ 254 nm และใช้ Mobile phase เป็น Acetonitrile ต่อ น้ำ ในอัตราส่วน 60 ต่อ 40 มีอัตราการไหลของ Mobile phase เท่ากับ 1 ml/min



Figure 7. Diffusion cell for migration test of antimicrobial agents from coated paper

## 6. การศึกษาการประยุกต์ใช้กระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์กับตัวอย่างอาหาร

นำตัวอย่างกระดาษเคลือบที่มีประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์ที่ดีที่สุดจากการทดสอบข้อ 3 ใช้เป็นแผ่นวุ้นจำลองอาหารที่ต้องการทดสอบ โดยขั้นตอนการทดสอบมีดังนี้

6.1 เตรียมตัวอย่างวุ้น ที่มีส่วนประกอบเป็น ผงวุ้น 2% , น้ำตาล 15%, น้ำ 83 % w/w ทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ  $121^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที

6.2 เทวุ้นใส่ภาชนะที่ปราศจากเชื้อ ทิ้งให้วุ้นแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องในตู้ Laminar flow (Figure 8.)

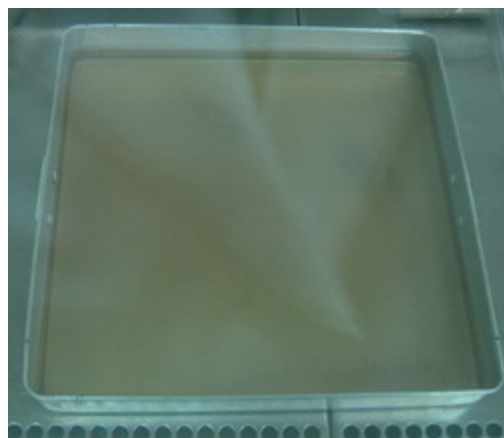


Figure 8. Pasteurized agar food stimulant.

6.3 ตัดชิ้นวุ้นให้มีขนาด กว้าง x ยาว x สูง เป็น 4.5 x 5 x 1 cm และควบคุมน้ำหนักชิ้นวุ้นเป็น 25 g/ชิ้น

6.4 เติมเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $10^5$  CFU/ml บนผิวกระดาษที่ต้องการทดสอบ

6.5 วางชิ้นวุ้นบนกระดาษที่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์และเก็บในภาชนะปิดที่ปราศจากเชื้อ

6.6 เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (Figure 9.) และทำการตรวจนับจำนวนเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ที่เจริญบนชิ้นวุ้นที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2, 4, 6, 8 วันหรือจนชิ้นวุ้นอยู่ในสภาพที่ไม่สามารถยอมรับได้ เปรียบเทียบกับชิ้นวุ้นที่วางบนกระดาษเคลือบด้วยตัวประสานที่ไม่มีส่วนผสมของสารต่อต้านจุลินทรีย์ และกระดาษที่ไม่ผ่านการเคลือบที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเท่ากัน

6.7 สำหรับตัวอย่างชุดควบคุมทำการทดสอบเช่นเดียวกัน แต่วางชิ้นวุ้นบนกระดาษที่ไม่เติมเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus*

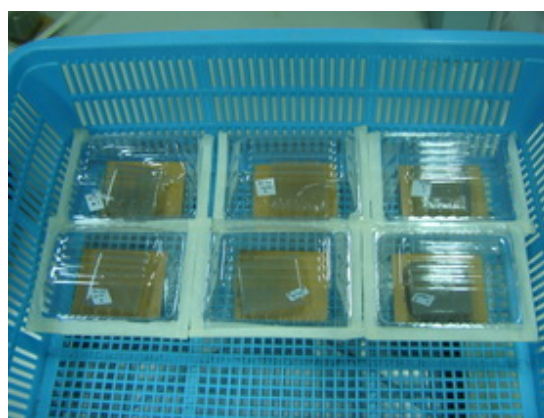


Figure 9. The antibacterial coated paper contacted with the food simulant agar at ambient temperature storage.

## 7. การศึกษาการเตรียมกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์ในเชิงอุตสาหกรรม

จากผลการศึกษากระดาษเคลือบที่มีประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์ที่ดีที่สุดจากการทดสอบในข้อ 3 จะถูกใช้เตรียมกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์ในระดับการผลิตเชิงอุตสาหกรรม ดังนี้

7.1 การเตรียมกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์ในขั้นตอนการเคลือบกระดาษปะหน้าของเครื่องผลิตกระดาษลูกฟูกด้วยกระบวนการ Roller Coating

เตรียมโดยการเคลือบผิวหน้ากระดาษปะหน้าด้วยสารเคลือบที่มีส่วนผสมของสารต่อต้านจุลินทรีย์ก่อนที่จะประกบกระดาษลูกฟูก

7.2 การเตรียมกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์ในกระบวนการพิมพ์

เตรียมโดยใช้เครื่องพิมพ์กระดาษลูกฟูกซึ่งเป็นระบบการพิมพ์แบบ Flexography และใช้สารเคลือบที่มีส่วนผสมของสารต่อต้านจุลินทรีย์แทนการใช้สี

7.3 นำกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่เตรียมในข้อ 7.1 และ 7.2 ศึกษาประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์ตามวิธีข้อ 1

## 8. การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design เพื่อทำการศึกษาผลของชนิด และผลของความเข้มข้นของสารต่อต้านจุลินทรีย์ ผลของการ Precoating และผลของระยะเวลาการเก็บรักษาประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์ของกระดาษเคลือบต่อประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์ โดยทำการทดลอง 3 ครั้งในแต่ละชุดการทดลอง

## วัสดุและอุปกรณ์

### วัสดุ

#### 1. สารต่อต้านจุลินทรีย์

- Triclosan (White powder; Melting point 57°C; บริษัท สงฮวด จำกัด)
  - Silver-zeolite (บริษัท Siam material)
    - Zeomic AJ10N;  $\text{MX}_{2n}\text{O} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{YSiO}_2 \cdot \text{ZH}_2\text{O}$  (M: Ag, Zn)
    - Zeomic AW10N;  $\text{M}_{2n}\text{O} \cdot \text{Na}_2\text{O} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$  (M: Ag, Zn,  $\text{NH}_3$ )
- (X, Y และ Z แทนเศษส่วนโมล)

## 2. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

- Cartaseal SVU liquid (Anionic water based emulsion of ethylene acrylic acid; colorless to white liquid; solid content 29-31%; pH 7.5-8.5; บริษัท Clarint chemicals (Thailand))
- เอทานอล (Absolute 99.9% , J.T. Baker solusorb<sup>®</sup> (Malaysia) )
- สารละลาย *n*-heptane (J.T. Baker solusorb<sup>®</sup> (Malaysia))
- น้ำกลั่น
- Acetonitrile (HPLC Grade, Labscan Asia Co.,Ltd. (Thailand))
- Potassium tellurite Hydrate (Fluka; Puram:≥95.0%; RT, Calc, On dry substance)
- โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ปลอดเชื้อ (บริษัท เมอร์ค (ประเทศไทย) จำกัด)
- 0.1% Peptone water (บริษัท เมอร์ค (ประเทศไทย) จำกัด)
- ไข่แดง
- Nutrient Broth (NB) (บริษัท เมอร์ค (ประเทศไทย) จำกัด)
- Nutrient Agar (NA) (บริษัท เมอร์ค (ประเทศไทย) จำกัด)
- Plate Count Agar (PCA) (บริษัท เมอร์ค (ประเทศไทย) จำกัด)
- Eosin Methylene-blue Lactose Sucrose Agar (EMB agar)  
(บริษัท เมอร์ค (ประเทศไทย) จำกัด)
- Baird Parker Agar (B-P) (บริษัท เมอร์ค (ประเทศไทย) จำกัด)

## 3. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

- *Escherichia coli* **TISTR 780** (Gram-negative bacteria) (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)
- *Staphylococcus aureus* **TISTR 118** (Gram-positive bacteria) (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

## 4. กระดาษลูกฟูกเกรด KS170/CA125/KA185 ลอน C ขนาด 13x15 cm<sup>2</sup>

(บริษัทสยามบรรจุภัณฑ์ สงขลา (1994) จำกัด)

## 5. กล่องพลาสติกมีฝาปิด

## อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าศนิยม 2 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ Mettler/PG 5002 (Switzerland))
2. เครื่องปั่นผสม (Model G-560E, Scientific Industries, Inc.)
3. เครื่องวัด pH (ยี่ห้อ Cyberscan/Eu Tech Instrument pH 510)

4. เครื่องยาง (สำหรับเคลือบกระดาษด้วยมือ)
5. เครื่องเป่าลมร้อน (No.882, Hakko Corporation)
6. Laminar air flow (Holten รุ่น Safe/Maxi Safe 2010)
7. ตู้บ่มเชื้อตั้งอุณหภูมิที่ 37°C (Memmert TV 40b; 220V; 600W)
8. เครื่องตีปั่น (Stomacher) (ยี่ห้อ Seward รุ่น 400CIR)
9. ตู้เย็นปรับอุณหภูมิ 4°C
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (รุ่น WB7-45, Memmert)
11. ปิเปตต์ ปริมาตร 1 และ 10 ml
12. Autopipette (L-1000 pipet-Lite LTS 100-1000  $\mu$ L, Rainin)
13. ปากคีบ (Forcep)
14. ชุดอุปกรณ์ทดสอบความแข็งแรงของวัสดุ ยี่ห้อ LLOYD รุ่น LR 30K
15. ชุดอุปกรณ์ทดสอบการดูดซึมน้ำของกระดาษ (Cobb tester)
16. เครื่องทดสอบความต้านทานแรงดันทะลุ (Bursting strength)
17. เครื่อง Scanning Electron Microscopy (SEM) (รุ่น JSM-5800LV, JEOL)
18. เซลล์ทดสอบการแพร่ (Diffusion Cell)
19. เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) (รุ่น Agilent 1100)
20. เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) (รุ่น EQUINOX 55, Bruker)

### บทที่ 3

#### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ของกระดาษเคลือบเบื้องต้น โดยวิธี Agar diffusion assay พบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของ Triclosan ในสารเคลือบที่สามารถแสดงการต่อต้าน *E. coli* และ *S. aureus* ได้ เป็น 3% w/w และกระดาษหูดควบคุม (กระดาษเคลือบด้วยตัวประสาน) ไม่มีประสิทธิภาพต่อต้านทั้ง *E. coli* และ *S. aureus* ทั้งนี้มีรายงานว่าความเข้มข้นในการใช้งานของ Silver-zeolite คือ 1%-3% w/w (Vartiainen *et al.*, 2003)

#### 1. การศึกษาผลของชนิดสารต่อต้านจุลินทรีย์ (Triclosan และ Silver-zeolite) ผลของการ Precoating และผลของระดับความเข้มข้นของสารต่อต้านจุลินทรีย์ต่อประสิทธิภาพการต่อต้าน *E. coli* และ *S. aureus*

จากการศึกษาประสิทธิภาพการต่อต้าน *E. coli* และ *S. aureus* ของกระดาษทดสอบ โดยวิธี Agar diffusion assay โดยกระดาษทดสอบที่แสดงความสามารถในการต่อต้าน *E. coli* และ *S. aureus* จะปรากฏ Inhibition zone รอบกระดาษทดสอบ (Figure 10.) และสามารถคำนวณค่าดัชนีชี้วัดความสามารถการต่อต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial index) แสดงดัง Table 8. จากตารางแสดงให้เห็นว่า กระดาษเคลือบด้วยตัวประสานที่มีส่วนผสมของ Triclosan ที่ทุกระดับความเข้มข้นมีประสิทธิภาพในการต่อต้าน *E. coli* และ *S. aureus* ได้ ทั้งที่เคลือบแบบ Precoating และแบบ No-Precoating และพบว่าเมื่อความเข้มข้นของ Triclosan เพิ่มขึ้น ค่า Inhibition zone และ Antimicrobial index เพิ่มขึ้นโดยไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และสถานะการเคลือบที่มีประสิทธิภาพในการต่อต้าน *E. coli* และ *S. aureus* ได้ดีที่สุดคือการเคลือบด้วยตัวประสานที่ประกอบด้วย 10% Triclosan และเคลือบแบบ No-precoating ซึ่งให้ค่า Inhibition zone และค่า Antimicrobial index สูงสุด โดยมีค่า Inhibition zone สำหรับ *E. coli* และ *S. aureus* เป็น  $8.97 \pm 0.87 \text{ cm}^2$  และ  $13.68 \pm 0.25 \text{ cm}^2$  และมีค่า Antimicrobial index เท่ากับ 2.243 และ 3.420 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างค่า Inhibition zone และค่า Antimicrobial index กับความเข้มข้นของ Triclosan จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้น Triclosan เพิ่มขึ้นสองเท่าคือที่ความเข้มข้น 5% และ 10% ค่า Inhibition zone และ Antimicrobial index กลับเพิ่มขึ้นแบบไม่แปรผันตรงกับ ความเข้มข้นของ Triclosan ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันทั้งใน *E. coli* และ *S. aureus* ทั้งที่เคลือบแบบ Precoating และแบบ No-precoating นอกจากนี้การเคลือบกระดาษแบบ Precoating ส่งผลให้

ประสิทธิภาพในการต่อต้านทั้ง *E. coli* และ *S. aureus* ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ การเคลือบแบบ No-Precoating ที่ทุกระดับความเข้มข้นของ Triclosan ซึ่งเห็นได้จากค่า Inhibition zone และค่า Antimicrobial index ที่มีค่าลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตัวประสานที่ใช้ในการ Precoating ปิดช่องว่างระหว่างเส้นใยของกระดาษ ทำให้ Triclosan ซึ่งเป็นองค์ประกอบในสารเคลือบที่ใช้เคลือบทับเป็น ชั้นที่สองเกาะติดกับกระดาษได้น้อยลง จึงแสดงความสามารถในการต่อต้านแบคทีเรียเป้าหมายได้น้อยกว่ากระดาษที่เคลือบแบบ No-Precoating ซึ่งมีปริมาณ Triclosan ในชั้นสารเคลือบมากกว่า นอกจากนี้กระดาษเคลือบด้วยตัวประสานที่มีส่วนผสมของ Triclosan มีประสิทธิภาพในการต่อต้าน *S. aureus* ได้ดีกว่า *E. coli* ที่ทุกระดับความเข้มข้น ทั้งที่เคลือบแบบ Precoating และแบบ No-Precoating อาจเนื่องจากโดยทั่วไปแบคทีเรียแกรมลบมีความสามารถในการต้านทานต่อการออกฤทธิ์ของสารต่อต้านจุลินทรีย์ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (Salton, 1994) และที่บริเวณผิวของแบคทีเรียแกรมลบมีสมบัติเป็น Hydrophilicity ทำให้มีคุณสมบัติป้องกันความสามารถในการซึมผ่านของ Triclosan ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำได้ (Nikaido and Vaara, 1985) และที่บริเวณผิวของแบคทีเรียแกรมลบมีพันธะ Divalent ของสารประจุบวกทำให้การเชื่อมต่อระหว่าง Lipopolysaccharide ที่เป็นองค์ประกอบภายในเมมเบรนแข็งแรงขึ้นทำให้ความสามารถในการป้องกันการแพร่ของสารผ่าน Cytoplasmic membrane เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียดีขึ้น (Russel, 1991) จากการทดสอบประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์ของกระดาษโดยวิธี Agar diffusion assay ซึ่งให้เห็นว่าการที่กระดาษเคลือบด้วยตัวประสานที่มี Triclosan เป็นองค์ประกอบสามารถต่อต้าน *E. coli* และ *S. aureus* ที่เจริญบนผิวหน้าของวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อได้นั้น เนื่องจากการปลดปล่อย Triclosan จากชั้นสารเคลือบลงสู่ผิวหน้าวุ้นอาหาร ส่งผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและปรากฏ Inhibition zone รอบกระดาษทดสอบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเป้าหมายในบริเวณดังกล่าว อย่างไรก็ตามมีข้อสังเกตว่าแม้ Triclosan มีคุณสมบัติไม่ละลายในน้ำบริสุทธิ์แต่ทั้งนี้สามารถละลายได้เล็กน้อยในน้ำที่เป็นส่วนประกอบในวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจากในวุ้นมีองค์ประกอบของสารที่ไม่ชอบน้ำอยู่บ้าง (Chung *et al.*, 2003) จึงทำให้ Triclosan สามารถแพร่จากชั้นผิวเคลือบกระดาษสู่ผิวหน้าของวุ้นและแสดงการต่อต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ ในขณะที่เดียวกันกระดาษเคลือบด้วยตัวประสานที่มีส่วนผสมของ Silver-zeolite ที่ทุกระดับความเข้มข้นทั้งที่เคลือบแบบ Precoating และ แบบ No-Precoating รวมทั้งกระดาษชุบควบคุม ไม่สามารถแสดงการต่อต้านทั้ง *E. coli* และ *S. aureus* สังเกตได้จากไม่ปรากฏ Inhibition zone ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ Silver-zeolite ในตัวประสานไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการต่อต้าน *E. coli* และ *S. aureus* ได้ ทั้งนี้การที่กระดาษเคลือบ Silver-zeolite ไม่สามารถแสดงความสามารถในการต่อต้านแบคทีเรียเป้าหมายได้อาจเนื่องจากปริมาณ  $Ag^+$  อิสระที่เกิดจาก

การปลดปล่อยมีปริมาณน้อยและอยู่ในระดับที่ไม่สามารถต่อต้านการเจริญ *E. coli* และ *S. aureus* ได้ ซึ่งปริมาณความเข้มข้นของ  $Ag^+$  อิสระที่ปลดปล่อยโดยการแลกเปลี่ยนไอออนในสารประกอบ Zeolite ขึ้นอยู่กับปริมาณไอออนของโลหะอื่นๆ ในสถานะแวดล้อมด้วย (Fiori *et al.*, 2009; Kumar and Münstedt, 2005; Dowling *et al.*, 2003) ดังนั้นหากปริมาณ  $Ag^+$  ที่ใน Silver-zeolite ที่ใช้ในการทดลองมีปริมาณต่ำ และในสถานะแวดล้อมมีปริมาณไอออนที่สามารถแทนที่  $Ag^+$  ใน Zeolite ต่ำ ย่อมทำให้  $Ag^+$  อิสระที่สามารถแพร่จากชั้นสารเคลือบและดูดซึมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียมีปริมาณต่ำ จึงไม่สามารถต่อต้านการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายได้

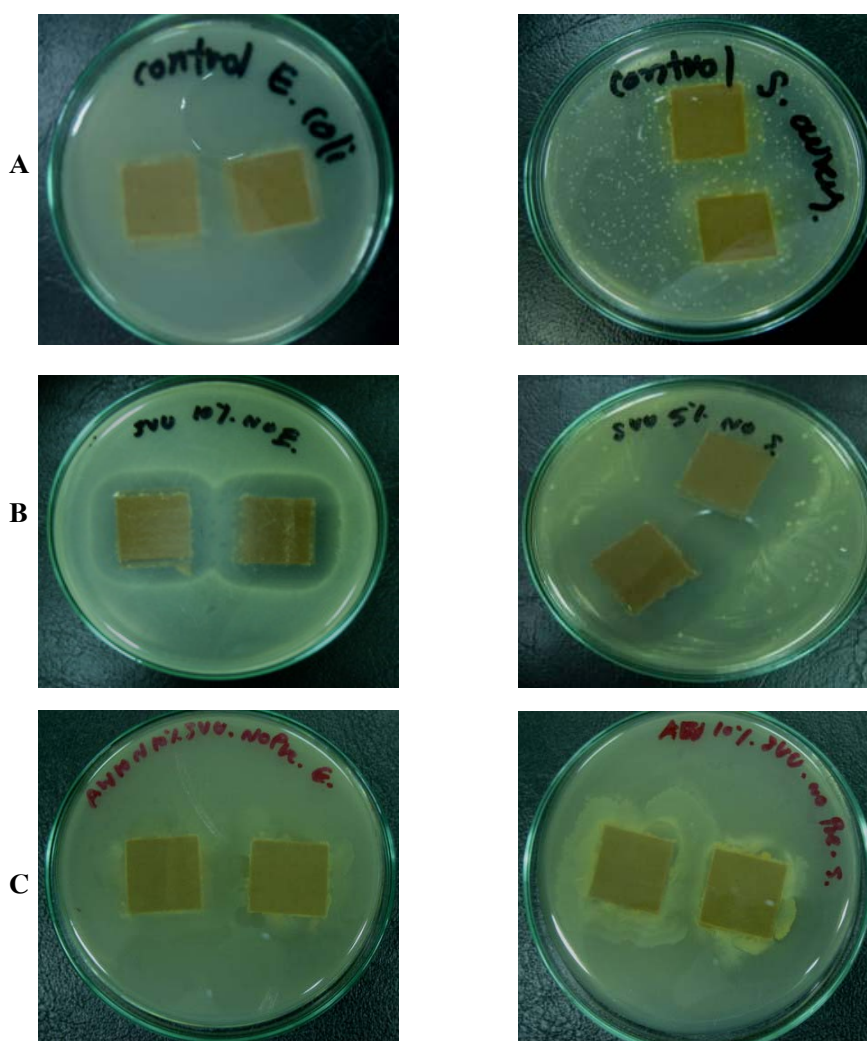


Figure 10. Inhibition zone of *E. coli* and *S. aureus* around antibacterial coated paper using Agar diffusion assay (after incubation at 37°C, 24 h.). A: Control paper; B: Coated paper with antimicrobial coating (Triclosan 10% (w/w)) and No-precoating; C: Coated paper with antimicrobial coating (Zeomic 10% (w/w)) and No-precoating.



ทั้งนี้การทดสอบประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์ของกระดาษเคลือบโดยวิธี Agar diffusion assay อาจกล่าวได้ว่าเป็นการจำลองการบรรจุอาหาร โดยการห่อหุ้มหรือการบรรจุอาหารที่บรรจุภัณฑ์มีการสัมผัสกับผลิตภัณฑ์อาหารโดยตรง โดยเฉพาะอาหารที่มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่บริเวณผิวหนังและเกิดการแพร่กระจายของสารต่อต้านจุลินทรีย์จากชั้นสารเคลือบสู่ผิวหนังอาหารส่งผลให้มีการต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Appendini and Hotchkiss, 2002)

Table 8. Inhibition zone and antimicrobial index of antibacterial coated paper and control paper using agar diffusion assay.

Coating treatment	Precoating	Inhibition zone <sup>a</sup>		Antimicrobial index <sup>b</sup>	
		(cm <sup>2</sup> )±SD		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Cartaseal SVU liquid	×	7.57±0.20	12.82±0.28	1.893	3.205
containing 3% w/w triclosan	√	5.00±0.28	7.91±0.65	1.250	1.978
Cartaseal SVU liquid	×	8.25±0.22	12.82±0.46	2.063	3.205
containing 5% w/w triclosan	√	6.54±0.28	10.13±0.67	1.635	2.533
Cartaseal SVU liquid	×	8.97±0.87	13.68±0.25	2.243	3.420
containing 10% w/w triclosan	√	6.57±0.28	10.13±0.59	1.643	2.533
Cartaseal SVU liquid containing	×	0	0	0.000	0.000
3, 5 and 10% w/w AJ 10 N	√	0	0	0.000	0.000
Cartaseal SVU liquid containing	×	0	0	0.000	0.000
3, 5 and 10% w/w AW 10 N	√	0	0	0.000	0.000
Control paper (Cartaseal SVU	×	0	0	0.000	0.000
liquid no triclosan added)	√	0	0	0.000	0.000

<sup>a</sup>Area of inhibition zone excluded coated paper area (4 cm<sup>2</sup>); each value represents the average mean. (n=4)

<sup>b</sup>Antimicrobial index=(Inhibition zone-area of coated paper)/area of coated paper

(Adapted from Villaseñor *et al.* , 2004)

## 2. ผลของระยะเวลาการเก็บรักษากระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์ต่อประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์

จากผลการทดลองในข้อ 1. แสดงให้เห็นว่ากระดาษเคลือบด้วย Triclosan เท่านั้นที่แสดงความสามารถในการต่อต้าน *E. coli* และ *S. aureus* ดังนั้นจึงเลือกสภาวะกระดาษเคลือบด้วย Triclosan เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษากระดาษเคลือบต่อประสิทธิภาพการต่อต้านแบคทีเรียเป้าหมาย จากการทดลองพบว่าที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 8 สัปดาห์ (2 เดือน) กระดาษเคลือบด้วยตัวประสานที่มี Triclosan เป็นองค์ประกอบที่ทุกระดับความเข้มข้น ยังคงมีประสิทธิภาพในการต่อต้าน *E. coli* และ *S. aureus* ได้ ซึ่งแสดงค่า Inhibition zone ดัง Table 9. ซึ่งให้เห็นว่ากระดาษเคลือบด้วยตัวประสานที่มี Triclosan เป็นองค์ประกอบ ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2 เดือน มีประสิทธิภาพในการต่อต้าน *E. coli* และ *S. aureus* ได้ไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งการเก็บรักษากระดาษเคลือบเป็นระยะเวลา 2 เดือน ดังกล่าวเป็นการจำลองระยะเวลาการเก็บกล่องกระดาษนับจากวันผลิตจนถึงวันที่ใช้กล่องดังกล่าวบรรจุอาหาร ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่ากล่องที่มีระยะเวลาการเก็บเป็นระยะเวลา 2 เดือนที่อุณหภูมิห้องมีความปลอดภัยจากการปนเปื้อนจาก *E. coli* และ *S. aureus* ซึ่งเป็นการเพิ่มความมั่นใจในความปลอดภัยให้กับผู้ผลิตและผู้บริโภคในส่วนของบรรจุภัณฑ์ คือบรรจุภัณฑ์ที่ผลิตด้วยกระดาษเคลือบด้วยสารเคลือบที่มี Triclosan เป็นองค์ประกอบสามารถลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อน *E. coli* และ *S. aureus* จากบรรจุภัณฑ์สู่ผลิตภัณฑ์อาหารได้

Table 9. Effectiveness of storage time on Inhibition zone (cm<sup>2</sup>) of coated paper coating with binder containing triclosan.

Test bacteria	Triclosan concentration (w/w)	Inhibition zone (cm <sup>2</sup> )					
		Storage time (week)					
		0	1	2	4	6	8
<i>E. coli</i>	3%	7.57	6.89	7.57	7.22	7.57	7.23
	5%	8.25	7.56	8.25	8.25	8.25	8.25
	10%	8.97	8.25	8.43	8.79	8.79	8.61
<i>S. aureus</i>	3%	12.82	11.22	12.00	12.00	12.47	11.22
	5%	12.82	12.00	12.82	13.68	13.25	12.00
	10%	13.68	14.49	13.25	14.49	13.25	14.13

### 3. การศึกษาคุณสมบัติเชิงกล องค์ประกอบเคมีและลักษณะปรากฏของกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์

จากการทดสอบความสามารถในการดูดซึมน้ำ (Cobb test) ของกระดาษทดสอบผลแสดงดัง Figure 11. พบว่ากระดาษที่เคลือบด้วยสารเคลือบที่มี 5% Triclosan มีค่าการดูดซึมน้ำน้อยที่สุด แสดงให้เห็นว่ามีความสามารถในการป้องกันการซึมผ่านของน้ำได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตามค่าการดูดซึมน้ำของกระดาษที่เคลือบด้วยสารเคลือบที่มี 5% Triclosan ไม่มีมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าการดูดซึมน้ำของกระดาษที่เคลือบด้วยตัวประสานเพียงอย่างเดียว และกระดาษที่เคลือบแบบมีหรือไม่มี Triclosan มีความสามารถในการป้องกันการซึมผ่านของน้ำได้ดีกว่ากระดาษที่ไม่ผ่านการเคลือบ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ระดับความเชื่อมั่น 0.05) ทั้งนี้อาจเนื่องจากตัวประสานส่งผลต่อการลดช่องว่างระหว่างเส้นใย ช่วยปิดรูพรุนของกระดาษส่งผลให้กระดาษเคลือบมีความสามารถในการป้องกันการซึมผ่านของน้ำได้ดีขึ้น สำหรับกระดาษที่เคลือบด้วย Triclosan ความสามารถป้องกันการซึมผ่านของน้ำเพิ่มขึ้นอาจเนื่องจาก Triclosan มีคุณสมบัติไม่มีขั้ว จึงส่งผลให้ความสามารถป้องกันการซึมผ่านน้ำของกระดาษดียิ่งขึ้น

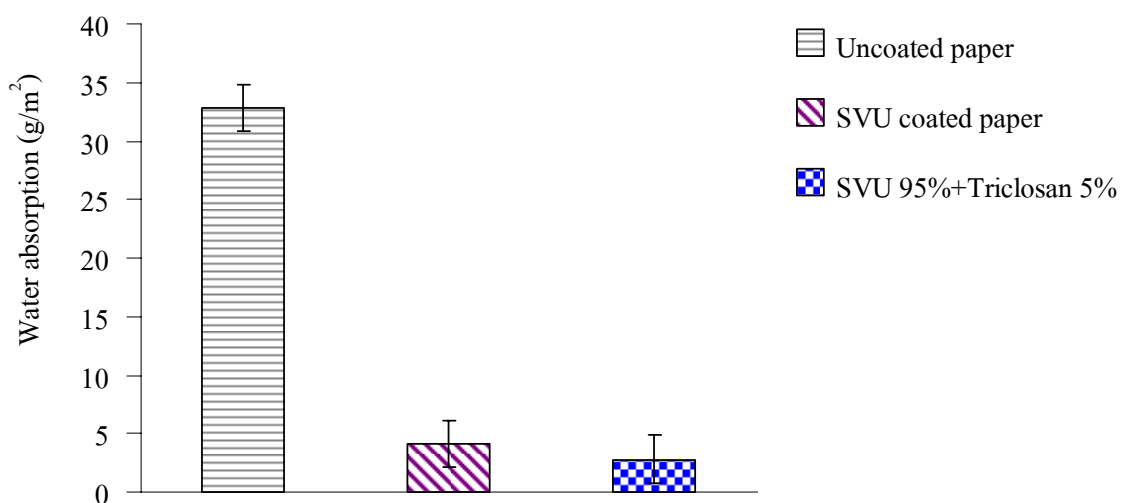


Figure 11. Water absorption of uncoated paper, paper coated with binder (SVU) and paper coated with binder containing 5% triclosan.

สำหรับการทดสอบความสามารถในการต้านแรงดันทะลุของกระดาษ (Bursting strength) ผลการทดลองแสดงดัง Figure 12. พบว่ากระดาษที่เคลือบด้วยตัวประสานที่มี 5% Triclosan มีประสิทธิภาพในการต้านแรงดันทะลุได้ดีกว่ากระดาษเคลือบด้วยสารเคลือบที่ไม่มี Triclosan เป็นองค์ประกอบ โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อทำการ

เปรียบเทียบกับกระดาษที่ไม่ผ่านการเคลือบ พบว่ากระดาษที่เคลือบด้วยตัวประสานทั้งที่มี Triclosan และไม่มี Triclosan เป็นองค์ประกอบ สามารถต้านแรงฉีกขาดได้ดีกว่ากระดาษที่ไม่ผ่านการเคลือบ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ระดับนัยสำคัญ 0.05) จะเห็นได้ว่า Triclosan ไม่ส่งผลต่อความสามารถในการต้านแรงฉีกขาดของกระดาษ มีเพียงตัวประสานเท่านั้นที่ส่งผลต่อความสามารถในการต้านแรงฉีกขาด อาจเนื่องมาจากตัวประสานช่วยในการประสานเส้นใยจึงทำให้กระดาษมีความแข็งแรงและสามารถต้านแรงฉีกขาดได้ดีขึ้น

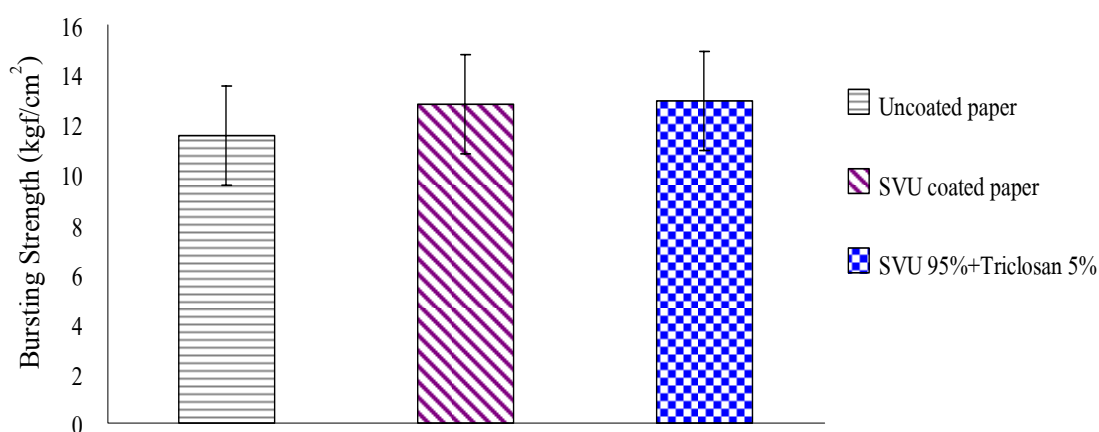


Figure 12. Bursting strength (kgf/cm<sup>2</sup>) of uncoated paper, paper coated with binder (SVU) and paper coated with binder containing with 5% (w/w) triclosan.

สำหรับการทดสอบ Edge Crust Test (ECT) เพื่อทดสอบความต้านทานแรงกดตามแนวตั้งของกระดาษลูกฟูก (Figure 13.) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกระดาษที่ไม่ผ่านการเคลือบ กระดาษเคลือบด้วยตัวประสาน และกระดาษเคลือบด้วยตัวประสานที่มี Triclosan เป็นองค์ประกอบ 5% โดยมีค่าเป็น 634.35 N, 650.92N และ 637.16 N ตามลำดับ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่ากระดาษเคลือบด้วยสารเคลือบที่มี Triclosan เป็นองค์ประกอบไม่ส่งผลต่อค่า ECT ของกระดาษลูกฟูก ทั้งนี้ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อค่าความสามารถในการต้านทานแรงกดตามแนวตั้งของกระดาษลูกฟูก คือจำนวนและชนิดของลอนลูกฟูก ซึ่งในการทดลองครั้งนี้เป็นการเคลือบที่ผิวกระดาษ (Liner) เท่านั้นจึงไม่ส่งผลต่อสมบัติดังกล่าว

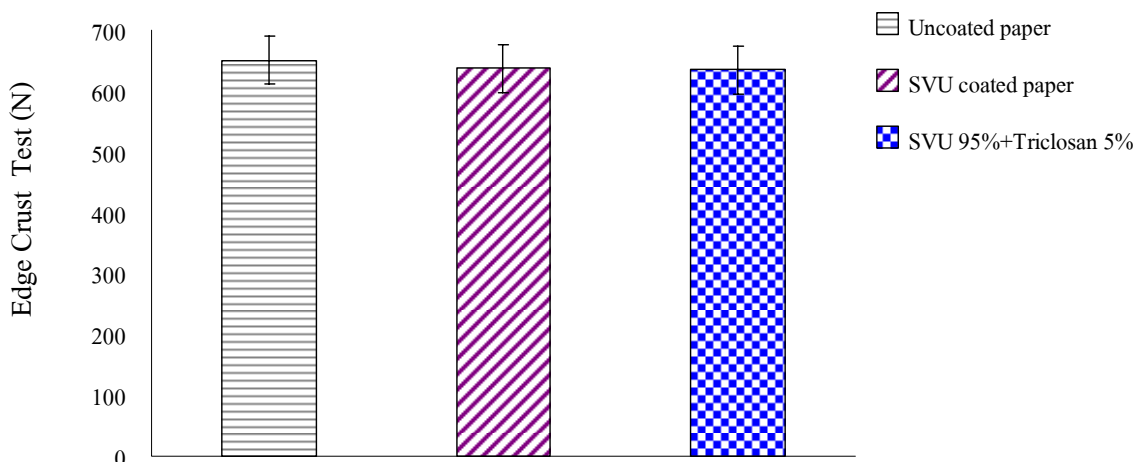
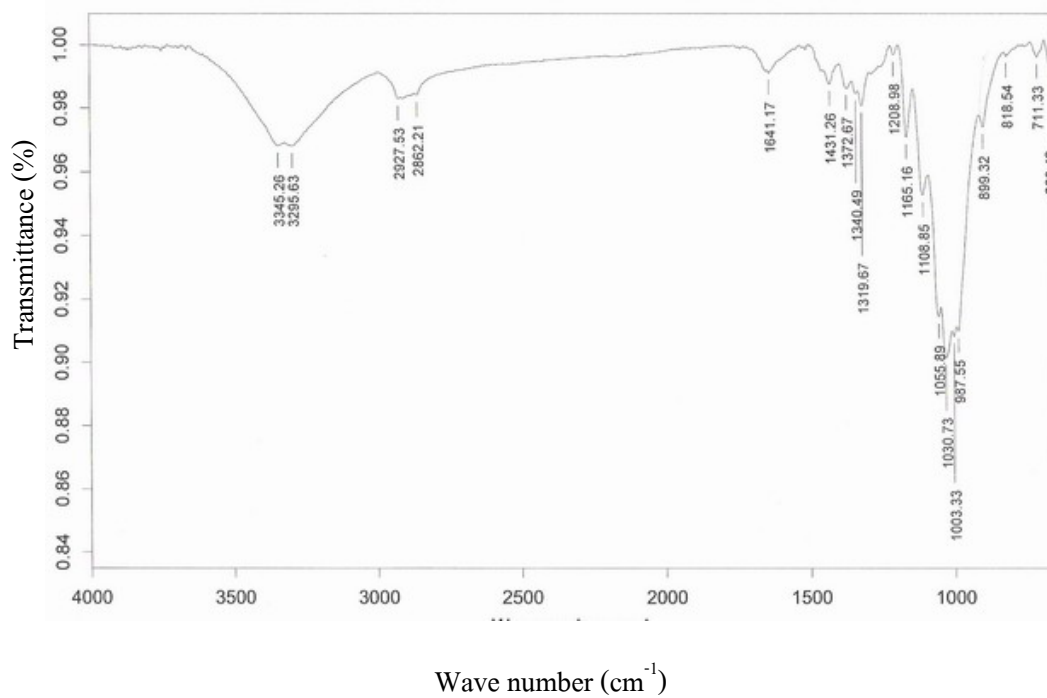


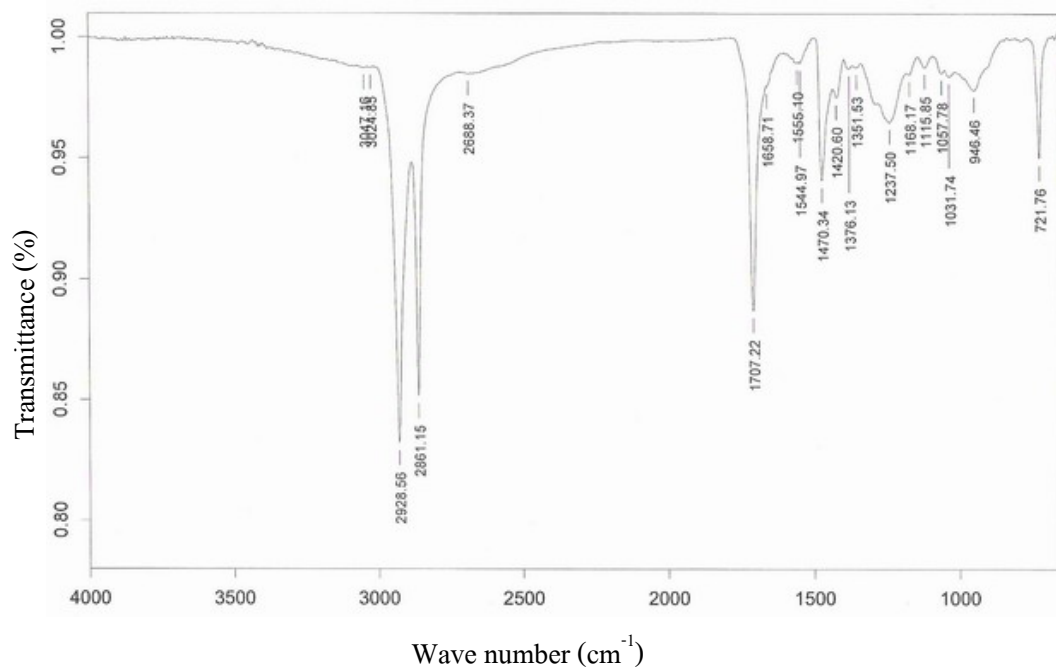
Figure 13. Edge crust test of uncoated paper, paper coated with binder (SVU) and paper coated with binder containing with 5% triclosan.

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์โดยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) โดยใช้เทคนิคการทดสอบแบบ Attenuated total reflectance (ATR) เส้นสเปกตรัมที่ได้แสดงดัง Figure 14. เมื่อทำการเปรียบเทียบเส้นสเปกตรัมของกระดาษที่ไม่ผ่านการเคลือบ กระดาษที่เคลือบด้วยตัวประสานเพียงอย่างเดียว และกระดาษที่เคลือบด้วยตัวประสานที่มี 5% Triclosan พบว่ากระดาษที่เคลือบด้วยตัวประสานที่มี 5% Triclosan จะมีลักษณะเส้นสเปกตรัมแตกต่างจากเส้นสเปกตรัมที่ได้จากกระดาษที่ไม่ผ่านการเคลือบและกระดาษที่เคลือบด้วยตัวประสานเพียงอย่างเดียว โดยสามารถสังเกตเห็นความแตกต่างของเส้นสเปกตรัมซึ่งแสดงถึงแถบการดูดกลืนและการสั่นของพันธะที่สำคัญของ Triclosan จำนวน 3 พันธะ คือ แถบการดูดกลืนที่เลขคลื่น  $1603.45 \text{ cm}^{-1}$  และ  $1510.72 \text{ cm}^{-1}$  แสดงให้เห็นถึงการสั่นของพันธะ C=C ของวงแหวนอะโรมาติก (Aromatic ring) แถบการดูดกลืนที่เลขคลื่น  $1186.49 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1105.60 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1088.37 \text{ cm}^{-1}$  และ  $1060.75 \text{ cm}^{-1}$  แสดงให้เห็นถึงการยึดของพันธะ C-O และแถบการดูดกลืนที่เลขคลื่น  $864.76 \text{ cm}^{-1}$ ,  $826.68 \text{ cm}^{-1}$ ,  $812.38 \text{ cm}^{-1}$ ,  $796.23 \text{ cm}^{-1}$  และ  $753.62 \text{ cm}^{-1}$  แสดงให้เห็นถึงการสั่นของพันธะ C-H สำหรับวงแหวนฟีนิล (Phenyl ring) (พิมพ์จิต ตามพวรรณ และ วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุลม, 2548) และจากรายงานของ Jordan และคณะ (1996) พบว่าการวิเคราะห์ Triclosan ในยาสีฟันโดยใช้เทคนิค FTIR เส้น Spectrum ที่ได้ สามารถบ่งชี้ Triclosan อย่างชัดเจนอยู่ในช่วงเลขคลื่น 1400 ถึง  $1000 \text{ cm}^{-1}$  ซึ่งจากงานวิจัยในครั้งนี้สังเกตได้ว่าในช่วงการดูดกลืนที่แถบเลขคลื่นดังกล่าวคือแถบเลขคลื่นที่แสดงถึงการยึดของพันธะ C-O ในโครงสร้างของ Triclosan นั้นเอง

(A)



(B)



(C)

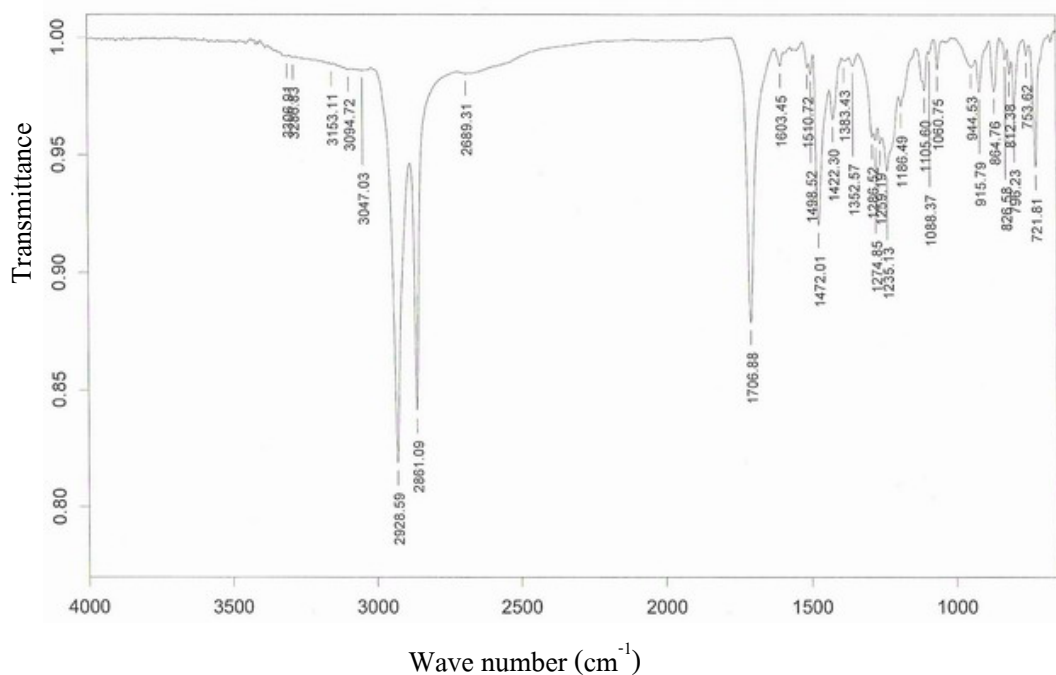


Figure 14. FTIR spectra from three types of coated paper

- (A) Uncoated paper
- (B) Paper coated with binder
- (C) Paper coated with binder containing 5 % (w/w) triclosan

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของชั้นสารเคลือบบนกระดาษโดยเทคนิค Scanning Electron Microscopy (SEM) ผลแสดงดัง Figure 15. ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างกระดาษที่เคลือบด้วยตัวประสานที่มีและไม่มี Triclosan เป็นองค์ประกอบเมื่อวิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวด้านบน (Top view) แต่เมื่อวิเคราะห์ตามแนวภาคตัดขวาง (Cross section) ของกระดาษเคลือบสามารถสังเกตเห็นความแตกต่างของชั้นสารเคลือบระหว่างกระดาษเคลือบทั้งสองคือ สามารถสังเกตเห็นผลึกของ Triclosan ในชั้นสารเคลือบซึ่งมีลักษณะการกระจายตัวไม่สม่ำเสมอ ซึ่งผลึกที่ปรากฏนั้นอาจเป็นผลึกของ Triclosan ที่ไม่สามารถละลายได้หมดในตัวประสาน ทั้งนี้เนื่องจากตัวประสานที่ใช้ในการทดลองมีสมบัติเป็นสารอิมัลชันที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นจึงส่งผลต่อความสามารถในการละลายได้ของ Triclosan ในตัวประสานได้

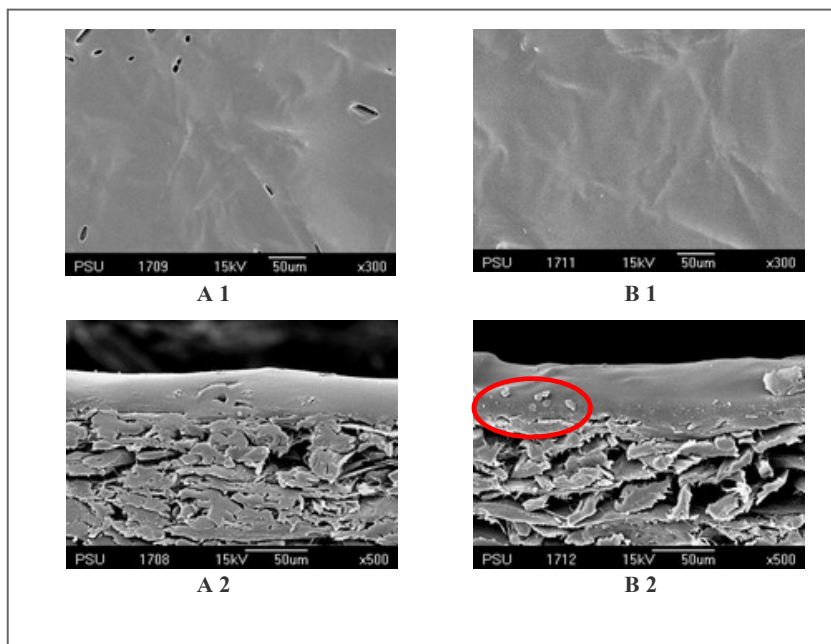


Figure 15. Scanning electron micrograph of coated paper; (A1) surface of paper coated with binder (A2) cross section morphology of paper coated with binder (B1) surface of paper coated with binder containing 5% triclosan and no-precoating (B2) cross section morphology of paper coated with binder containing 5% triclosan and no-precoating

#### 4. การเตรียมสารละลายที่เป็นตัวแทนอาหาร (Food simulating solvents: FSS) และการศึกษาการแพร่กระจายของสารต่อต้านจุลินทรีย์จากกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์

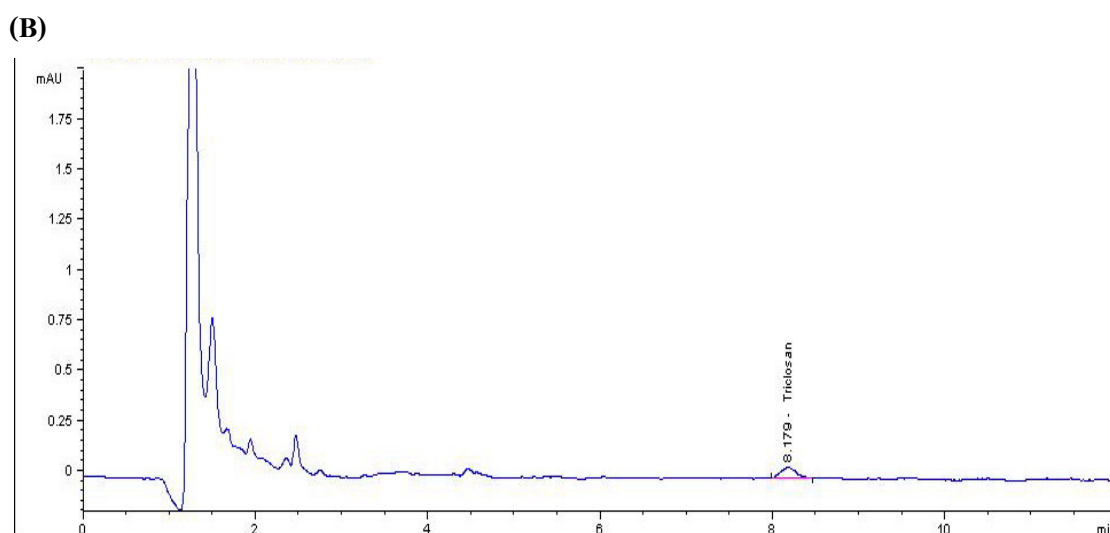
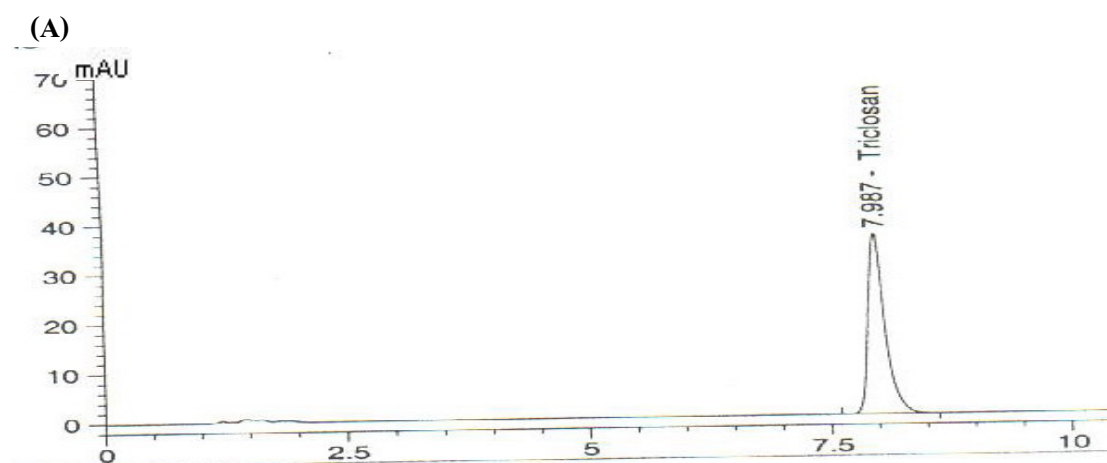
การศึกษาการแพร่กระจายของสารต่อต้านจุลินทรีย์ในครั้งนี้ได้ทำการคัดเลือกกระดาษเคลือบที่มีสภาวะการเคลือบประกอบด้วยตัวประสานที่มี Triclosan 5% (w/w) เป็นองค์ประกอบ และทำการทดสอบการแพร่กระจายของ Triclosan จากชั้นสารเคลือบลงสู่สารละลายตัวแทนอาหาร โดยควบคุมอุณหภูมิของสารละลายตัวแทนอาหารเป็น 40°C และทำการวิเคราะห์ปริมาณ Triclosan ที่ปลดปล่อยลงสู่สารละลายตัวแทนอาหารที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง โดยเทคนิค HPLC ดัง Figure 16. แสดงตัวอย่างโครมาโทแกรมที่แสดงค่า Retention time ของ Triclosan จากสารมาตรฐานและ Triclosan ที่แพร่จากชั้นสารเคลือบสู่สารละลายตัวแทนอาหารชนิดต่างๆ ซึ่งสารละลาย Triclosan มาตรฐานได้จากการละลาย Triclosan ในเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ซึ่งใช้ Acetonitrile ต่อน้ำ ในอัตราส่วน 60 ต่อ 40 โดยอัตราการไหลของ Mobile phase เป็น 1 ml/min จากตัวอย่างโครมาโทแกรมที่ได้สามารถสังเกตเห็นพีคของ Triclosan ได้ชัดเจนเมื่อใช้



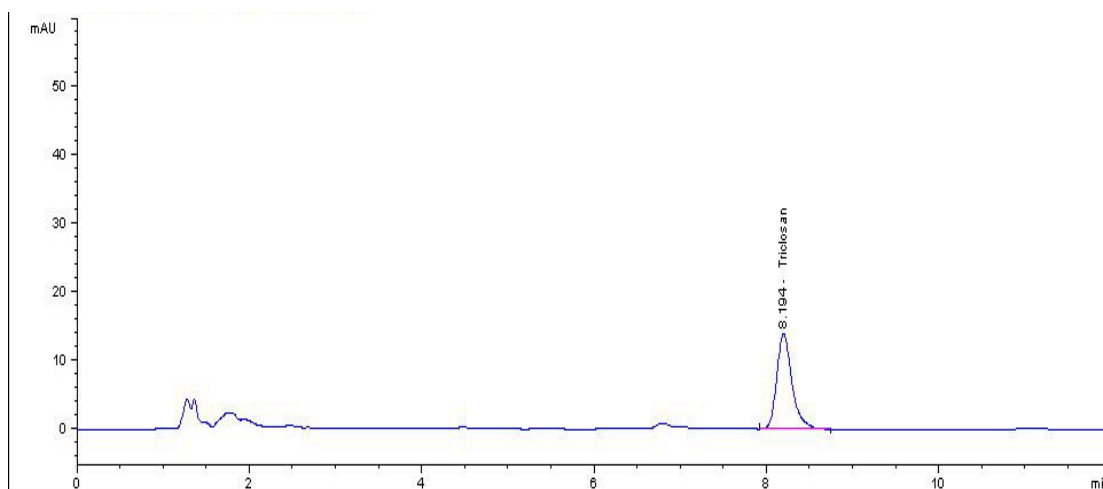
สารละลายตัวแทนอาหารเป็นสารละลาย Ethanol 50% และ *n-heptane* โดยมีค่า Retention time ของ Triclosan เฉลี่ยเป็น 8.2183 นาที และ 8.0053 นาทีตามลำดับ และสามารถวิเคราะห์ปริมาณ Triclosan ที่เกิดจากการปลดปล่อยได้จากพื้นที่ใต้พีค พบว่าพื้นที่ใต้พีคของ Triclosan ที่ได้จาก โครมาโทแกรมที่ใช้สารละลายตัวแทนอาหารเป็นสารละลาย Ethanol 50% มีค่าน้อยกว่าพื้นที่ใต้พีค ที่ได้จากโครมาโทแกรมที่ใช้สารละลายตัวแทนอาหารเป็น *n-heptane* และพื้นที่ใต้พีคมีค่าน้อยที่สุด เมื่อใช้สารละลายตัวแทนอาหารเป็นน้ำ และปริมาณ Triclosan ที่แพร่ลงสู่สารละลายตัวแทนอาหาร ชนิดต่างๆ แสดงดัง Table 10. จากตารางแสดงให้เห็นว่าเมื่อนำน้ำเป็นสารละลายตัวแทนอาหาร ไม่พบ Triclosan ในน้ำ ทั้งนี้เนื่องจาก Triclosan มีสมบัติไม่ละลายน้ำ (ความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่อง HPLC สามารถวิเคราะห์ได้ เป็น 0.05 mg/l) ขณะเดียวกันพบว่า Triclosan สามารถแพร่จากชั้นสาร เคลือบกระดาษลงสู่สารละลายตัวแทนอาหาร Ethanol 50% และ *n-heptane* เป็น 39.19 ppm และ 66.83 ppm ตามลำดับ การที่ Triclosan จากชั้นสารเคลือบกระดาษสามารถแพร่ลงสู่สารละลาย Ethanol 50% และสารละลาย *n-heptane* ได้ในปริมาณสูงเนื่องจาก Triclosan มีสมบัติละลายได้ใน สารละลาย Ethanol และละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (*n-heptane*) ทั้งนี้ปริมาณ Triclosan ที่แพร่กระจายลงสู่สารละลาย Ethanol 50% และสารละลาย *n-heptane* มีค่าสูงกว่าค่าที่อนุญาตให้มี ได้ในอาหารคือ 5 mg/kg ของอาหาร (Scientific Committee on Food, 2000) จากการทดลองจึง กล่าวได้ว่า Triclosan ไม่สามารถแพร่ลงสู่น้ำ แต่สามารถแพร่กระจายลงสู่อาหารชนิดที่มี แอลกอฮอล์ และอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบได้ จึงกล่าวได้ว่า Triclosan สามารถแพร่กระจาย ลงสู่อาหารเหลวที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบได้ดีกว่าอาหารเหลวที่มีแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นการประยุกต์ใช้บรรจุภัณฑ์กระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่มี Triclosan เป็น องค์ประกอบกับอาหารประเภทไขมันจึงควรให้ความสำคัญต่อการแพร่กระจายของสารซึ่งมีโอกาส ที่จะปนเปื้อนไปสู่อาหารเกินกว่าข้อกำหนด เช่นเดียวกับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโต ของจุลินทรีย์ในอาหารกลุ่มนี้ อย่างไรก็ตามมีข้อสังเกตว่าการทดลองการแพร่กระจายที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40°C ความสามารถในการปลดปล่อย Triclosan ย่อมน้อยลง และการศึกษาการแพร่กระจาย เพื่อนำบรรจุภัณฑ์ชนิดนี้ไปประยุกต์ใช้งานควรคำนึงถึงชนิดตัวแทนอาหารที่ใช้ในการทดสอบเป็น สิ่งสำคัญ ตัวแทนอาหารที่ใช้ควรมีคุณลักษณะใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการนำไปประยุกต์ใช้ มากที่สุด นอกจากนี้ควรคำนึงถึงสถานะที่ใช้ในกระบวนการบรรจุและเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ อาหาร เพื่อให้ได้ปริมาณของสารที่เกิดจากการแพร่ใกล้เคียงกับปริมาณที่แท้จริงมากที่สุด

Table 10. Migration of triclosan from coating layer of coated paper into food simulating solvents, control temperature at 40°C

Food simulating solvents	Triclosan (mg/1000 ml)
Water	< 0.05
50% Ethanol	39.19
<i>n</i> -Heptane	66.83



(C)



(D)

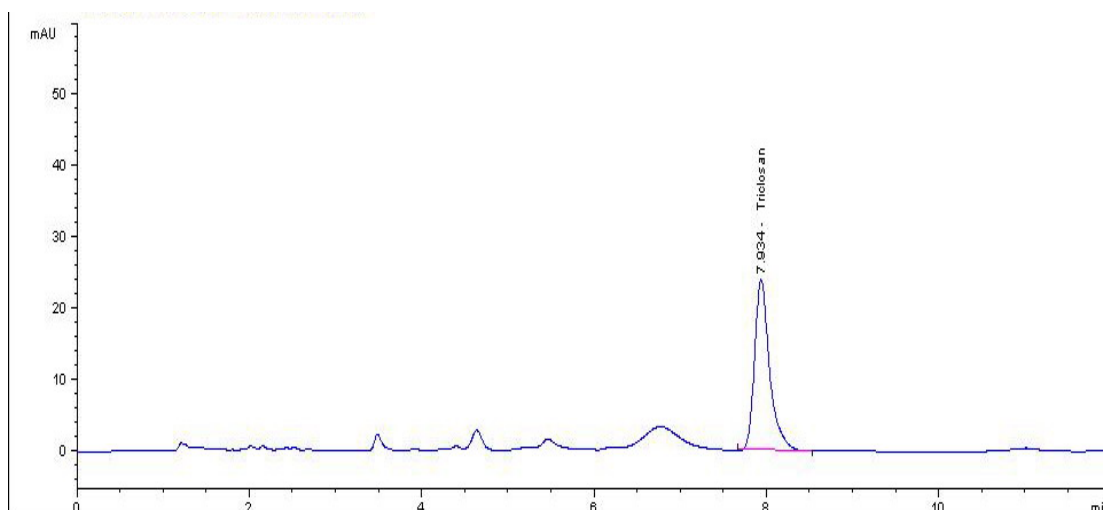


Figure 16. Chromatogram from HPLC technique of triclosan from standard solution and released triclosan into food simulating solvents A; triclosan from standard solution, B; triclosan in water, C; triclosan in 50% ethanol solution, D; triclosan in *n*-heptane solution.

## 5. การศึกษาการใช้กระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์กับตัวอย่างอาหาร

จากการศึกษาการใช้กระดาษเคลือบสารต่อต้านแบคทีเรียกับวุ้นจำลองอาหารโดยวางชิ้นวุ้นสัมผัสกับกระดาษทดสอบด้านที่เติม *E. coli* และ *S. aureus* ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น  $10^5$  CFU พบว่ากระดาษเคลือบด้วยตัวประสานและมี Triclosan เป็นองค์ประกอบ 5% มีความสามารถในการออกฤทธิ์ต่อต้านการเจริญหรือทำลาย *E. coli* และ *S. aureus* ได้ และชิ้นวุ้นที่วางบนกระดาษดังกล่าวสามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลา 4 วัน (เมื่อพิจารณาถึงการยอมรับได้ของ

ลักษณะทางกายภาพ) และปริมาณ *E. coli* และ *S. aureus* ในชิ้นวุ้นลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น โดยมีการเจริญของ *E. coli* น้อยมากจนไม่สามารถตรวจนับจำนวนโคโลนีได้ และตรวจนับจำนวนโคโลนีของ *S. aureus* ได้ประมาณ  $1 \times 10^1$  CFU/g ดังแสดงใน Table 11. ซึ่งปริมาณแบคทีเรียที่พบดังกล่าวอยู่ในระดับที่ไม่ทำให้อาหารเกิดการเสื่อมเสีย ทั้งนี้มีรายงานว่าโดยทั่วไประดับปริมาณจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเสื่อมเสียคือ  $10^6$  CFU/ml หรือต่อ g หรือต่อ  $\text{cm}^2$  (ของผิวน้ำอาหาร) (ธีรพร กงบังเกิด, 2546) ในขณะที่ชิ้นวุ้นที่เก็บรักษานบนกระดาศเคลือบด้วยตัวประสานเพียงอย่างเดียวหรือเก็บรักษานบนกระดาศที่ไม่ผ่านการเคลือบเลยมีลักษณะทางกายภาพที่ไม่สามารถยอมรับได้ ตั้งแต่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2 วัน เนื่องจากพบการเจริญของราและมีน้ำเยิ้มรอบชิ้นวุ้น นอกจากนี้ชิ้นวุ้นที่วางบนกระดาศเคลือบด้วยตัวประสานที่มี Triclosan เป็นองค์ประกอบ 5% ที่ระยะเวลาเก็บรักษา 2 วัน มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียทดสอบลดลงจากปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณหนึ่งร้อยเท่าสำหรับ *E. coli* และลดลงประมาณหนึ่งหมื่นเท่าสำหรับ *S. aureus* ในขณะที่ชิ้นวุ้นที่เก็บรักษานบนกระดาศเคลือบด้วยตัวประสานเพียงอย่างเดียวหรือชิ้นวุ้นที่เก็บรักษานบนกระดาศที่ไม่ผ่านการเคลือบเลยที่มีปริมาณ *E. coli* และ *S. aureus* เริ่มต้นและเก็บรักษาระยะเวลา 2 วันเท่ากัน มีปริมาณ *E. coli* และ *S. aureus* เพิ่มขึ้นจากปริมาณเชื้อเริ่มต้น และสำหรับในชิ้นวุ้นชุดควบคุม (ชิ้นวุ้นที่เก็บรักษานบนกระดาศทดสอบที่ไม่มีการเติมเชื้อเริ่มต้น) กลับพบการเจริญของ *E. coli* และ *S. aureus* ซึ่งอาจเกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าวในระหว่างการทดลอง อย่างไรก็ตามการที่ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในชิ้นวุ้นมีปริมาณลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นอาจเนื่องจาก Triclosan ในชั้นผิวเคลือบสามารถออกฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เติมลงบนกระดาศทำให้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นลดลง และยังสามารถต่อต้านการเจริญและทำลายแบคทีเรียที่รอดชีวิตและสัมผัสกับพื้นผิวชิ้นวุ้นที่สัมผัสกับกระดาศทดสอบ ทำให้ปริมาณแบคทีเรียลดลงเมื่ออายุการเก็บรักษานานขึ้น นอกจากนี้จะเห็นได้ว่า Triclosan มีประสิทธิภาพในการยับยั้งหรือทำลาย *S. aureus* ได้ดีกว่า *E. coli* ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในขั้นตอนการศึกษาคุณลักษณะการต่อต้านจุลินทรีย์ของกระดาศเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่แสดงในข้อ 3 และมีข้อสังเกตคือระยะเวลาการเก็บรักษาของวุ้นบนกระดาศทุกชุดการทดลองมีระยะเวลาในการเก็บรักษาสั้น (ประมาณ 2 วันสำหรับวุ้นที่วางบนกระดาศที่เคลือบด้วยตัวประสานเพียงอย่างเดียวหรือกระดาศที่ไม่ผ่านการเคลือบเลย และ 4 วันสำหรับวุ้นที่วางบนกระดาศที่เคลือบด้วยสารเคลือบที่มี Triclosan เป็นองค์ประกอบ 5%) อาจเนื่องจากในการทดลองเก็บรักษาวันจำลองอาหารที่สภาวะอุณหภูมิห้องซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์เจริญได้อย่างรวดเร็ว และทำให้อาหารเกิดการเสื่อมเสียและมีอายุการเก็บรักษาสั้นลง ดังนั้นการทดลองใน

สภาวะอุณหภูมิต่ำ เช่นอุณหภูมิแช่เย็น ย่อมทำให้อายุการเก็บรักษาของตัวอย่างอาหารยาวนานขึ้นกว่าการใช้สภาวะการเก็บรักษาที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

Table11. Microbial count of *E. coli* and *S. aureus* on simulant food agars contacted with antibacterial coated paper and control paper at ambient temperature in difference storage time.

Coating treatment	Inoculated microorganism	Microbial count	Storage time (days)				
			0	2	4	6	8
A	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	$10^5$	$110 \times 10^6$	N/A	N/A	N/A
	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	$10^5$	$63 \times 10^6$ , $84 \times 10^7$	N/A	N/A	N/A
	Control:	<i>E. coli</i>		$44 \times 10^1$	N/A	N/A	N/A
	No microorganism inoculated	<i>S. aureus</i>		$51 \times 10^1$	N/A	N/A	N/A
B	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	$10^5$	$160 \times 10^6$	N/A	N/A	N/A
	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	$10^5$	$38 \times 10^6$	N/A	N/A	N/A
	Control:	<i>E. coli</i>		$68 \times 10^2$	N/A	N/A	N/A
	No microorganism inoculated	<i>S. aureus</i>		$87 \times 10^1$	N/A	N/A	N/A
C	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	$10^5$	$81 \times 10^3$	ND	N/A	N/A
	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	$10^5$	$31 \times 10^1$	~10	N/A	N/A
	Control:	<i>E. coli</i>		$1 \times 10^1$	ND	N/A	N/A
	No microorganism inoculated	<i>S. aureus</i>		ND	ND	N/A	N/A

- N/A ; Not available in that day because the visible of stimulant food agars was not acceptable

- ND; Not detected

- A: Uncoated paper, B: Control paper (coated with SVU), C: Antimicrobial coated paper (SVU 95%,

Triclosan 5% (w/w))

## 6. การศึกษาการเตรียมกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์ในเชิงอุตสาหกรรม

การทดลองเตรียมกระดาษเคลือบสารต่อต้านแบคทีเรียในเชิงอุตสาหกรรมในครั้งนี้ได้ทำการคัดเลือกสภาวะการเคลือบกระดาษด้วยสารเคลือบที่ระดับความเข้มข้น Triclosan 5% (w/w) และมีการเคลือบแบบ No- precoating ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมกระดาษ

เคลือบในเชิงอุตสาหกรรม ทั้งนี้เนื่องจากผลการวิเคราะห์ทางสถิติที่พบว่าไม่มีความแตกต่างของประสิทธิภาพการต่อต้าน *E. coli* และ *S. aureus* ที่สภาวะการเคลือบที่ทุกระดับความเข้มข้นของ Triclosan และจากผลการทดลองแม้พบว่ากระดาษเคลือบด้วยตัวประสานที่ประกอบด้วย Triclosan 3% สามารถต่อต้าน *E. coli* และ *S. aureus* ได้ก็ตาม แต่เนื่องจากในกระบวนการผลิตในเชิงอุตสาหกรรมนั้นย่อมเกิดการสูญเสีย Triclosan ในระหว่างกระบวนการผลิต ซึ่งอาจทำให้กระดาษเคลือบมีปริมาณ Triclosan ในชั้นสารเคลือบต่ำไม่เพียงพอต่อการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการเลือกสภาวะสารเคลือบที่มี Triclosan เป็นองค์ประกอบ 5% (w/w) ใช้เตรียมกระดาษเคลือบในเชิงอุตสาหกรรมเพื่อป้องกันปัญหาที่เกิดจากการสูญเสียปริมาณ Triclosan ในระหว่างกระบวนการผลิตดังกล่าว จากการทดลองพบว่ากระดาษเคลือบที่ได้จากกระบวนการเคลือบกระดาษปะหน้าของเครื่องผลิตกระดาษลูกฟูกและกระดาษเคลือบที่ได้จากกระบวนการพิมพ์ไม่มีประสิทธิภาพในการต่อต้าน *E. coli* และ *S. aureus* ทั้งนี้เนื่องจากไม่ปรากฏ Inhibition zone เมื่อทดสอบโดยวิธี Agar diffusion assay อาจเนื่องจากปริมาณสารเคลือบที่ติดบนผิวกระดาษที่ผลิตโดยกระบวนการทั้งสองมีปริมาณน้อย (ไม่สามารถตรวจสอบน้ำหนักสารเคลือบบนกระดาษได้เนื่องจากน้อยมาก) ทำให้ปริมาณ Triclosan ในชั้นสารเคลือบบนกระดาษที่เตรียมได้มีปริมาณน้อย เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการต่อต้านแบคทีเรีย ปริมาณ Triclosan ที่แพร่ออกจากชั้นสารเคลือบอาจมีปริมาณน้อยหรือต่ำกว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของ Triclosan ที่สามารถต่อต้าน *E. coli* และ *S. aureus* ได้ จึงไม่สามารถแสดงการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายได้ การแก้ปัญหาดังกล่าวอาจทำได้โดยการปรับสภาวะของเครื่องจักรที่ใช้ในกระบวนการผลิต เช่น ปรับเพิ่มระยะช่องว่างระหว่างลูกกลิ้งกับกระดาษในกระบวนการ Roller coating และลูกกลิ้งในระบบการพิมพ์ของกระดาษลูกฟูกเพื่อเพิ่มปริมาณสารเคลือบบนผิวกระดาษในกระบวนการผลิตดังกล่าวให้มีปริมาณมากขึ้น หรือแก้ปัญหาโดยการปรับปรุงสูตรของสารเคลือบที่ใช้ในการผลิตกระดาษเคลือบเชิงอุตสาหกรรมให้สามารถใช้กับเครื่องจักรผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

## บทที่ 4

### บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองพบว่ากระดาษเคลือบด้วยตัวประสาน (Ethylene acrylic acid) ที่ประกอบด้วย Triclosan เท่านั้นที่มีประสิทธิภาพในการต่อต้าน *E. coli* และ *S. aureus* และประสิทธิภาพในการต่อต้านแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.5) และพบว่าที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันกระดาษที่เคลือบแบบ Precoating มีประสิทธิภาพในการต่อต้าน *E. coli* และ *S. aureus* ได้ต่ำกว่ากระดาษเคลือบแบบ No-precoating และพบว่ากระดาษเคลือบด้วยตัวประสานที่ประกอบด้วย Triclosan ทุกสภาวะการทดลองมีประสิทธิภาพในการต่อต้าน *S. aureus* ได้ดีกว่า *E. coli* ในขณะที่กระดาษเคลือบด้วยตัวประสานที่ประกอบด้วย Silver-zeolite ทั้งที่มีการเคลือบแบบ Precoating และแบบ No-precoating ไม่มีประสิทธิภาพในการต่อต้านทั้ง *E. coli* และ *S. aureus* ที่ทุกระดับความเข้มข้น

และเพื่อจำลองระยะเวลาการเก็บรักษากระดาษเคลือบในการผลิตในเชิงอุตสาหกรรม โดยศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษากระดาษเคลือบต่อประสิทธิภาพการต่อต้านแบคทีเรีย พบว่ากระดาษเคลือบด้วยตัวประสานที่ประกอบด้วย Triclosan ที่ทุกระดับความเข้มข้นยังคงมีประสิทธิภาพในการต่อต้าน *E. coli* และ *S. aureus* ได้ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อทำการเก็บรักษากระดาษเป็นระยะเวลา 2 เดือน

จากการทดสอบคุณสมบัติทางกลของกระดาษเคลือบ แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการป้องกันการซึมผ่านของน้ำ ความสามารถในการต้านแรงดันทะลุ และความต้านทานแรงกดตามแนวตั้ง ของกระดาษเคลือบด้วย 5% Triclosan ไม่ส่งผลต่อสมบัติดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกระดาษที่เคลือบด้วยตัวประสานเพียงอย่างเดียว

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและลักษณะพื้นฐานวิทยาของกระดาษเคลือบ โดยใช้ Fourier Transform Infrared Spectrometer และ Scanning Electron Microscopy ช่วยยืนยันการมี Triclosan ในชั้นสารเคลือบ การศึกษาการแพร่กระจายของสารต่อต้านจุลินทรีย์จากกระดาษเคลือบโดยใช้สารละลายตัวแทนอาหาร (Food simulating solvents: FSS) เป็น น้ำกลั่น สารละลาย 50% Ethanol และสารละลาย *n-heptane* แสดงให้เห็นว่า Triclosan ไม่สามารถแพร่ลงสู่น้ำกลั่นและสามารถแพร่ลงสู่สารละลาย *n-heptane* ได้ดีกว่าสารละลาย 50% Ethanol ดังนั้นการแพร่ของ Triclosan จึงขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลาย โดยส่วนใหญ่ Triclosan ไม่ละลายน้ำแต่พบว่าสามารถปลดปล่อยลงสู่สารละลาย Ethanol และ *n-heptane* ได้ดี ดังนั้นการประยุกต์ใช้บรรจุภัณฑ์กระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่มี Triclosan เป็นองค์ประกอบกับอาหารประเภทไขมันจึงควรให้

ความสำคัญต่อการแพร่กระจายของสารซึ่งมีโอกาสที่จะปนเปื้อนไปสู่อาหารเกินกว่าข้อกำหนด เช่นเดียวกับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารกลุ่มนี้

และเพื่อเป็นประโยชน์ในการนำงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้เป็นวัสดุบรรจุอาหาร ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองประยุกต์ใช้กระดาษเคลือบด้วย 5% Triclosan กับวุ้นจำลองอาหาร และทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง พบว่ากระดาษเคลือบด้วย Triclosan มีประสิทธิภาพในการต่อต้าน *E.coli* และ *S. aureus* ได้ และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งหรือทำลาย *S.aureus* ได้ดีกว่า *E.coli* โดยสามารถยืดอายุการเก็บรักษาวุ้นจำลองอาหารได้นานถึง 4 วัน

และจากการศึกษาการเตรียมกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์ในเชิงอุตสาหกรรมโดยเลือกสภาวะการเคลือบที่เหมาะสมคือ Triclosan 5% w/w และเคลือบแบบ No-precoating โดยกระบวนการ Roller Coating และระบบการพิมพ์แบบ Flexography พบว่ากระดาษเคลือบที่ได้จากกระบวนการทั้งสองไม่สามารถแสดงการต่อต้านการเจริญของ *E. coli* และ *S. aureus* ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณ Triclosan ในชั้นสารเคลือบบนกระดาษเคลือบจากกระบวนการทั้งสองมีปริมาณน้อยมาก (ไม่สามารถตรวจสอบน้ำหนักสารเคลือบบนกระดาษได้เนื่องจากน้อยมาก) ทำให้ปริมาณ Triclosan ที่อยู่บนชั้นสารเคลือบมีปริมาณน้อยหรือต่ำกว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ของ Triclosan ที่สามารถต่อต้าน *E. coli* และ *S. aureus* ส่งผลให้กระดาษเคลือบดังกล่าวไม่สามารถต่อต้านแบคทีเรียเป้าหมายได้

อย่างไรก็ตามสำหรับงานวิจัยในอนาคตควรมีการศึกษาความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ และทดสอบความสามารถในการประยุกต์ใช้กับอาหารที่หลากหลายมากขึ้น รวมทั้งปรับปรุงสูตรของสารเคลือบที่ใช้ในการผลิตกระดาษเคลือบหรือกระบวนการเคลือบในเชิงอุตสาหกรรมเพื่อให้สามารถเตรียมกระดาษเคลือบสารต่อต้านแบคทีเรียให้มีประสิทธิภาพเทียบเคียงกับในระดับห้องปฏิบัติการ



## เอกสารอ้างอิง

- ธีรพร กงบังเกิด. 2546. จุลชีววิทยาอาหาร. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์  
ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร. พิษณุโลก.
- พิมพ์จิต ดามพวรรณ และ วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล. 2548. อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ใน  
สเปกโทรสโกปีของสารอินทรีย์. พิมพ์ครั้งที่ 5. หน้า 208-290. คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.
- Appendini, P. and Hotchkiss, J. H. 2002. Review of antimicrobial food packaging. *Innov. Food  
Sci. Emerg.* 3: 113-126.
- American Society for Testing and Materials (ASTM). 1994. In: ASTM D 685-93. Standard  
practice for conditioning paper and products for testing. 4<sup>th</sup> ed. ASTM Philadelphia.  
p. 21-23.
- Baner, A. L., Franz, R. and Piringer, O. 1994. Alternative fatty food simulants for polymer  
migration testing. *In Food Packaging and Preservation.* (M. Mathlouthi, ed) p. 23-47.  
Blackie Academic & Professional. New York.
- Bhargava, H. N. and Leonard, P. A. 1996. Triclosan: Applications and safety. *Am. J. Infect.  
Control.* 24: 209-218.
- Braid, J. and Well, M. 2002. The antibacterial activity of triclosan-impregnated storage boxes  
against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus  
cereus* and *Shewanella putrefaciens* in conditions simulating domestic use.  
*J. Antimicrob. Chemoth.* 49: 87-94.
- Brody, A. L., Strupinsky, E. R. and Kline, L. R. 2001. Active packaging for food applications.  
Lancaster: Technomic Publishing Co., Inc. 218 p.
- Chung, D., Chikindas, M. L. and Yam, K. L. 2001a. Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* by  
slow release of propyl paraben from a polymer coating. *J. Food Prot.* 64: 1420-1424.

- Chung, D., Papadakis, S. E. and Yam, K. L. 2001b. Release of propyl paraben from a polymer coating into water and food simulating solvents for antimicrobial packaging applications. *J. Food Process Pres.* 25: 71-87.
- Chung, D., Papadakis, S. E. and Yam, K. L. 2003. Evaluation of a polymer containing triclosan as the antimicrobial layer for packaging materials. *Inter. J. Food Sci. Tech.* 38: 165-169.
- Cooksey, K. 2000. Utilization of antimicrobial packaging films for inhibition of selected microorganism. *In: Risch SJ, editor. Food packaging: testing methods and applications.* Washington, DC: American Chemical Society. p 17-25.
- Cooksey, K. 2001. Antimicrobial food packaging materials. *Addit. Polym.* 6-10.
- Cowan, M. M., Abshire, K. Z., Houk, S. L. and Evans, S. M. 2003. Antimicrobial efficacy of a silver-zeolite matrix coating on stainless steel. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 102-106.
- Cutter, C. N. 1999. The effectiveness of triclosan- incorporated plastic against bacteria on beef surfaces. *J. Food Prot.* 62: 474-479.
- Davidson, P. M. and Harrison, M. A. 2002. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technol.* 56: 69-78.
- Dibrov, P., Dzioba, J., Gosink, K. K. and Häse, C. C. 2002. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of  $Ag^+$  in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob. Agents CH.* 46: 2668-2670.
- Dowling, D. P., Betts, A. J., Pope, C., McConnell, M. L., Eloy, R. and Arnaud, M. N. 2003. Antibacterial silver coatings exhibiting enhanced activity through the addition of platinum. *Surf. Coat. Technol.* 163-164: 637-640
- European Food Safety Authority. 2005. Press release.
- Fiori, M. A., Paula, M. S., Bernardin, A. M., Riella, H. G. and Angioletto, E. 2009. Bactericide glasses developed by  $Na^+/Ag^+$  ionic exchange. *Mater. Sci. Eng.* 29:1569–1573

- Food and Drug Administration. 2002. Recommendations chemistry for preparation of food contact notifications and food additive petitions for food contact substances. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Washington, D.C.
- García, R. S., Silva, A. S., I.Cooper, R.Franz and Losada, P. P. 2006. Revision of analytical strategies to evaluate different migrants from food packaging materials. *Trends Food Sci. Technol.* 17: 354-366.
- Goydan, R., Schwope, A., Reid, R. and Cramer, G. 1990. High temperature migration of antioxidants from polyolefins. *Food Addit. Contam.* 7: 323-337.
- Gutiérrez, L., Sañchez, C., Batlle, R. and Nerín, C. 2009. New antimicrobial active package for bakery products. *Trends Food Sci. Technol.* 20: 92-99
- Han, J., Castell-Perez, M. E. and Moreira, R. G. 2007. The influence of electron beam irradiation of antimicrobial-coated LDPE/polyamide films on antimicrobial activity and film properties. *LWT Food Sci. Technol.* 40: 1545–1554.
- Han, J.H. 2000. Antimicrobial Food Packaging. *Food Tech.* 54: 56-65.
- Han, J.H. and Floros., J.D. 1999. Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. *J. Plast. Film Sheeting.* 13: 287-298.
- Heath, R. J., Rubin, J. R., Holland, D. R., Zhang, E., Snow, M. E. and Rock, C. O. 1999. Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.* 274: 11110-11114.
- Iconomopoulou, S. M., Andreopoulou, A. K., Soto, A., Kallitsis, J. K. and Voyiatzis, G. A. 2005. Incorporation of low molecular weight biocides into polystyrene-divinyl benzene beads with controlled release characteristics. *J. Controlled Release.* 102: 223-233.
- Intili, H. S. and Lewisville, N. C. 1985. Antimicrobial paper. U.S. Patent 4533435.

- Johnston, J. H., Borrmann, T., Rankin, D., Cairns, M., Grindrod, J. E. and Mcfarlane, A. 2008. Nano-structured composite calciumsilicate and some novel applications. *Curr. Appl Phys.* 8:504–507.
- Jones. R. D., Jampani, H. B., Newman, J. L. and Lee. A. S. 2000. Triclosan: A review of effectiveness and safety in health care settings. *Am. J. Infect. Control.* 28: 184-96.
- Jordan, S. L., Taylor, L. T., Mcpherson, B. and Rasmussen, H.T. 1996. Identification of an antibacterial agent in toothpaste via liquid chromatography-fourier tranform infrared spectrometry mobile phase elimination. *J. Chromatogr.* 755: 211-218
- Kane, M. 1999. The industrial applications of antibacterial materials of construction. *Food Sci. Technol. Today.* 13: 42-49.
- Koontz, J. L. 2006. Special delivery: controlled release of active ingredients from food and beverage packaging. Italian Packaging Technology Award (IPTA) Paper Competition.
- Kumar, R. and Münstedt, H. 2005. Silver ion release from antimicrobial polyamide/ silver composites. *Biomaterials.* 26: 2081–2088.
- Lee, C. H., An, D. S., Park, H. J. and Lee, D. S. 2003. Wide spectrum antimicrobial packaging materials incorporating nisin and chitosan in the coating. *Packag. Technol. Sci.* 16: 99-106.
- Lee, C. H., An, D. S., Park, H. J. and Lee, D. S. 2004. A coating for use as an antimicrobial and antioxidative packaging material incorporating nisin and a-tocopherol. *J. Food Eng.* 62: 323–329.
- Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D. Y., Brunet, L., Liga, M. V., Li, D. and Alvarez, P. J. J. 2008. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water Res.* 42:4591–4602.
- Limjaroen, P., Ryser, E., Lockhart, H. and Harte, B. 2003. Development of a food packaging coating material with antimicrobial properties. *J. Plast. Film Sheeting.* 19: 95-109

- Limm, W. and Hollifield, H. C. 1995. Effects of temperature and mixing on polymer adjuvant migration to corn oil and water. *Food Addit. Contam.* 12: 609-624.
- Lin, J., Smith, M. P., Chapin, K. C., Baik, H. S., Bennett, G. N. and Foster, J. W. 1996. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Lett. Appl. Microbiol.* 25: 279-283.
- Lu, J., Wang, X. and Xiao, C. 2008. Preparation and characterization of konjac glucomannan/poly(diallyldimethylammonium chloride) antibacterial blend films. *Carbohydr. Polym.* 73: 427-437.
- Mandel, I. D. 1994. Antimicrobial mouthwashes: over view and update . *J. Am. Dent. Assoc. Suppl.* 125: 2-10.
- Matsumura, Y., Yoshikata, K., Kunisaki, S.-i. and Tsuchido, T. 2003. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Appl. Environ. Microb.* 67: 4278-4281.
- Matsuura, T., Abe, Y., Sato, Y., Okamoto, K., Ueshige, M. and Akagawa, Y. 1997. Prolonged antimicrobial effect of tissue conditioners containing silver-zeolite. *J. Dent.* 25: 373-377.
- Neves, E. R., Schäfer, S., Phillips, A., Canejo, J., Macedo, M. F. 2009. Antifungal effect of different methyl and propyl paraben mixtures on the treatment of paper biodeterioration. *Int. Biodeter. Biodegr.* 63:267-272.
- Nikaido, H., & Vaara, M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49: 1-32.
- Nobile, M.A., Cannarsi, M., Altieri, C., Sinigaglia, M., Favia, P., Iacoviello, G. and D'Agostino, R. Effect of Ag-containing Nano-composite Active Packaging System on Survival of *Alicyclobacillus acidoterrestris* . 2006. *J. Food Sci.* 69: 379 - 383

- Office for Official Publications of The European Communities. 1982. Laying down the basic rules necessary for testing migration of the constituents of plastic of plastic materials and article intended to come into contact with foodstuffs 82/711/EEC.
- Radheshkumar, C. and Münstedt, H. 2006. Antimicrobial polymers from polypropylene/silver composites—Ag<sup>+</sup> release measured by anode stripping voltammetry. *Reactive & Functional Polymers*. 66: 780-788.
- Richards, R. M. E., Taylor, R. B. and Xing, D. K. L. 1984. Effect of silver on whole cells and spheroplasts of a silver resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbios*. 39: 151-158.
- Rico-Pena, D. C. and Torres, J. A. 1991. Sorbic acid and potassium sorbate permeability of an edible methylcellulose-palmitic acid film: water activity and pH effects. *J. Food Sci.* 56: 497-499.
- Russell, A. D. 1991. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics : food additives and food and pharmaceutical preservatives. *J. Appl. Bacteriol.* 71: 191-201.
- Russell, A. D. 2004. Whither triclosan?. *J. Antimicrob. Chemoth.* 1-3.
- Salton, M. R. J. 1994. The bacterial cell envelope—A historical perspective. *In* Bacterial cell wall. (Ghuysen, J. M., and Hakenbeck, R., eds.). p. 1–22. Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- Schierholz, J. M., Rump, A. F., Pulverer, G. and Beuth, J. 1998. Antiinfective catheters: novel strategies to prevent nosocomial infections in oncology. *Anticancer Res.* 18.
- Scientific Committee on Food. 2000. Opinion of the scientific committee on food on the 10th additional list of monomers and additives for food contact materials. CS/PM/GEN/M82 final, 11 July, pp.5-6.
- Seydim, A.C. and Sarikus, G. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Res. Int.* 39: 639–644.

- Sinanen Zeomic Co.,Ltd. 2008. Inorganic antimicrobial agent Zeomic's antimicrobial effect (Online). Available <http://www.erin.gov.au/library/guide.html> (19 May 2009).
- Slawson, R. M., VanDyke, M. Lee, I. H. and Trevors, J. T. 1992. Germanium and silver resistance, accumulation, and toxicity in microorganisms. *Plasmid*. 27:72–79.
- Sondi, I. and Sondi, S. B. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J. Colloid Interface Sci.* 275, 177–182.
- Sothornvit, R., Rhim, J. W. and Hong, S. I. 2009. Effect of nano-clay type on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/clay composite films. *J. Food Eng.* 91:468–473.
- Stobie, N., Duffy, B., McCormack, D. E., Colreavy, J., Hidalgo, M., McHale, P. and Hinder, S. J. 2007. Prevention of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol–gel coating. *Biomaterials*. 963-969.
- Suller, M. and Rusell, A. 2000. Triclosan and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 46: 11-18.
- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K. and Bigger, S. W. 2003. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *J. Food Sci.* 68: 408-420.
- TAPPI Standard T 441 om-90.1990. In: TAPPI Standard T 441 om-90. 1994. Water absorptiveness of size (non-bibulous) paper and paperboard (Cobb test). 4<sup>th</sup> ed. ASTM Philadelphia. p. 429-431.
- TAPPI Standard T 810 om-85.1985. In: TAPPI Standard T 810 om-85. 1994. Bursting strength of corrugated and solid fiberboard. 4<sup>th</sup> ed. ASTM Philadelphia. p. 438-440.

- Vartiainen, J., Motion, R., Kulonen, H., Ratto, M. and Skytta, E. 2004. Chitosan-coated paper: effects of nisin and different acids on the antimicrobial activity. *J. Appl. Polym. Sci.* 94: 986-993.
- Vartiainen, J., Skytta, E., Enqvist, J. and Ahvenainen, R. 2003. Properties of antimicrobial plastics containing traditional food preservatives. *Packag. Technol. Sci.* 16: 223-229.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F. and Debevere, J. 2002. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. *Food Addit. Contam.* 19: 163-171.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Beest, M., Kruijf, N. and Debevere, J. 1999. Developments in the active packaging of foods. *Trends Food Sci. Technol.* 10: 77-86
- Villaseñor, I. M., Canlas, A. P., Faustino, K. M. and Plana, K. G. 2004. Evaluation of the bioactivity of triterpene mixture isolated from *Carmona retusa* (Vahl.) Masam leaves. *J. Ethnopharmacol.* 92: 53-56.
- Vischer, W. A., and J. Regös. 1974. Antimicrobial spectrum of triclosan, a broad-spectrum antibacterial agent for topical application. *Zentbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektkrankh. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A* 226:376-389.
- Vojdani, F. and Torres, J. A. 1989a. Potassium sorbate permeability of polysaccharide films: chitosan, methylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose. *J. Food Process Eng.* 12: 33-48.
- Vojdani, F. and Torres, J. A. 1989b. Potassium sorbate permeability of methylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose multi-layer films. *J. Food Process Eng.* 13: 417-430.
- Vojdani, F. and Torres, J.A. 1990. Potassium sorbate permeability of methylcellulose and hydroxypropyl methyl-cellulose coatings: Effect of fatty acid. *J. Food Sci.* 55:841-846.
- Well, T. N., Scully, P., Paravicini, G., Proudfoot, A. E. and Payton, M. A. 1995. Mechanism of irreversible inactivation of phosphomannose isomerases by silver ions and flomazine. *Biochemistry.* 34: 896-903.



- Weng, Y. M. and Chen, M. J. 1997. Sorbic anhydride as anti-mycotic additive in polyethylene food packagingfilms. *Lebensm Wiss Technol.* 30:485-487.
- Weng, Y. M. and Hotchkiss, J. H. 1992. Inhibition of surface molds on cheese by polyethylene film containing the antimicotic imazalil. *J. Food Prot.* 55: 367-369.
- Weng, Y. M. and Hotchkiss, J. H. 1993. Anhydrides as antimycotic agents added to polyethylene films for food packaging. *Packag. Technol. Sci.* 6: 123-128.
- Wong, D. W. S., Gregorski, K.S., Hudson, J.S. and Pavlath, A. E. 1996. Calcium alginate films: Thermal propertiesand permeability to sorbate and ascorbate. *J. Food Sci.* 61:337-341.
- Yamanaka, M., Hara, K. and Kudo, J. 2005. Bactericidal Actions of a Silver Ion Solution on *Escherichia coli*, Studied by Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy and Proteomic Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7589–7593.
- Zhang, W., Chu, P. K., Ji, J., Zhang, Y., Fu, R. K. and Yan, Q. 2006. Antibacterial properties of plasma-modified and triclosan or bronopol coated polyethylene. *Polymer.* 47. 931-936.

**ภาคผนวก**

## ภาคผนวก ก

### 1. วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### Nutrient Broth (NB)

##### วิธีการเตรียม

ซั่งอาหาร NB สำเร็จรูป 8 กรัมเติมลงในน้ำกลั่นต้ม 1 ลิตร คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

#### Nutrient Agar (NA)

##### วิธีการเตรียม

ซั่งอาหาร NA สำเร็จรูป 20 กรัมเติมลงในน้ำกลั่นต้ม 1 ลิตร คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

#### Plate Count Agar (PCA)

##### วิธีการเตรียม

ซั่งอาหาร PCA สำเร็จรูป 22.5 กรัมเติมลงในน้ำกลั่นต้ม 1 ลิตร คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

#### Eosin Methylene-blue Lactose Sucrose Agar (EMB agar)

##### วิธีการเตรียม

ซั่งอาหาร EMB agar สำเร็จรูป 36 กรัมเติมลงในน้ำกลั่นต้ม 1 ลิตร คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

#### Baird Parker Agar (B-P)

##### วิธีการเตรียม

ซั่งอาหาร B-P สำเร็จรูป 58 กรัมเติมลงในน้ำกลั่นต้ม 0.95 ลิตร คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

ก่อนเทอาหารเลี้ยงเชื้อลง Plate ต้องทำการเติมสารคัดเลือก (Selective agent) Potassium tellurite ปริมาตร 2 ml และ โซเดียมคลอไรด์ที่ผสมกับ 0.85% NaCl (สารปฏิชีวนะ) ปริมาตร 10 ml ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 180 ml ที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 ถึง 50 °C หลังจากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 18 ถึง 20 ml ลง Plate ปล่อยให้แห้งเพื่อนำไป Spread plate ต่อไป

#### Peptone Water Diluent ( 0.1%)

##### วิธีการเตรียม

ชั่ง Peptone สำเร็จรูป 1 กรัมเติมลงในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

## 2. การศึกษาการใช้กระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์กับตัวอย่างอาหาร

### การเตรียมกระดาษเคลือบ Triclosan เพื่อใช้เป็นแผ่นรองวุ้น

1. เตรียมกระดาษเคลือบ 5% Triclosan และเคลือบแบบ No-precoating ตามวิธีที่ได้อธิบายในบทที่ 2 ข้อ 2.2.2
2. ตัดกระดาษที่เตรียมในข้อ 1. ให้มีขนาด กว้าง x ยาว เป็น 5.5 x 6 cm.
3. นำกระดาษเคลือบที่ตัดแล้วฉายแสง UV เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเก็บในภาชนะปลอดเชื้อ

### วิเคราะห์หาปริมาณ *E. coli*

1. นำชิ้นวุ้นที่ทำการบ่มครบตามระยะเวลา ทำการตีป่นด้วยสารละลาย 0.1 % Peptone water ปริมาตร 225 ml เป็นเวลา 4 นาที
2. นำส่วนละลายใสที่ได้ 1 ml เติมในสารละลาย 0.1 % Peptone water ปริมาตร 9 ml เพื่อทำการเจือจางให้ได้สารละลายที่ระดับความเข้มข้น  $10^{-2}$
3. ทำเช่นเดียวกับข้อ 2 จนได้สารละลายที่ระดับความเข้มข้นถึง  $10^{-7}$
4. นำสารละลายที่ทำการเจือจางที่ทุกกระดบความเข้มข้นปริมาตร 1 ml ทำการ Pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB agar ปริมาตร 18 ถึง 20 ml แล้ววางทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
5. ทำการบ่มจานเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการนับโคโลนี (นับเฉพาะจานที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 30 ถึง 300 โคโลนี) โดยโคโลนี ของ *E. coli* จะเกิดเป็นโคโลนีสีเขียวของโลหะ (Metallic sheen) และมีกลิ่นเหม็น

### วิเคราะห์หาปริมาณ *S. aureus*

ทำการทดลองเหมือนการวิเคราะห์หาปริมาณ *E. coli* แต่เปลี่ยนชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก EMB agar เป็น Baird Parker Agar และทำการทดลองดังนี้

1. นำสารละลายที่ทำการเจือจางที่ทุกระดับความเข้มข้นปริมาตร 0.1 ml ทำการ Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker Agar ที่ปราศจากเชื้อ
2. ทำการบ่มจานเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการนับโคโลนี (นับเฉพาะจานที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 30 ถึง 300 โคโลนี) โดยโคโลนีของ *S. aureus* จะเกิดเป็นโคโลนีสีดำและมีบริเวณใสล้อมรอบโคโลนี

### 3. การศึกษาการเตรียมกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์ในเชิงอุตสาหกรรม

3.1 การเตรียมกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์ในขั้นตอนการเคลือบกระดาษปะหน้าของเครื่องผลิตกระดาษลูกฟูกด้วยกระบวนการ Roller Coating (Figure 17.)

#### วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารเคลือบที่มีส่วนผสม Triclosan 5% (w/w) (วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับวิธีการทดลองข้อ 2.1 ในบทที่ 2 )
2. เทสารเคลือบลงภาชนะรองรับสารเคลือบ
3. ทำการผลิตกระดาษเคลือบด้วยกระบวนการผลิตตามปกติของโรงงาน โดยเคลือบแบบ No-precoating
4. นำกระดาษที่ได้จากการเตรียมกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์ในเชิงอุตสาหกรรมไปศึกษาประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์ตามวิธีข้อ 1 ในบทที่ 2

#### Coating holder equipment



Figure 17. Preparing coated paper by roller coating

3.2 การเตรียมกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์ในกระบวนการพิมพ์แบบ Flexography แสดงดังFigure 18.

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารเคลือบที่มีส่วนผสม Triclosan 5% (w/w) (วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับวิธีการทดลองข้อ 2.1 ในบทที่ 2)
2. เทสารเคลือบในภาชนะรองรับสารเคลือบสำหรับเครื่องพิมพ์ในกระบวนการพิมพ์แบบ Flexography ดัง Figure 18.
3. ทำการเคลือบกระดาษโดยเครื่องพิมพ์กล่องกระดาษลูกฟูก โดยเคลือบแบบ No-Precoating
4. นำกระดาษที่ได้จากการเตรียมกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์ในเชิงอุตสาหกรรมไปศึกษาประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์ตามวิธีข้อ 1 ในบทที่ 2



Coating holder equipment

Figure 18. Preparing coated paper by printing process

#### 4. การคำนวณดัชนีชี้วัดความสามารถต่อต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial index) ของกระดาษเคลือบ

สามารถคำนวณ Antimicrobial index ของกระดาษเคลือบ โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{Antimicrobial index} = (\text{พื้นที่ Inhibition zone} - \text{พื้นที่กระดาษ}) / \text{พื้นที่กระดาษ}$$

ตัวอย่างการคำนวณ

จากการทดลองความสามารถในการต่อต้าน *E. coli* ของกระดาษเคลือบด้วย 5% Triclosan โดยวิธี Agar diffusion assay พบว่าเกิด Inhibition zone  $9 \text{ cm}^2$  โดยพื้นที่กระดาษทดสอบเป็น  $4 \text{ cm}^2$  ดังนั้นสามารถคำนวณค่า Antimicrobial index ได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{Antimicrobial index} &= (\text{พื้นที่ Inhibition zone} - \text{พื้นที่กระดาษ}) / \text{พื้นที่กระดาษ} \\ &= (9 - 4) / 4 \\ &= 1.25 \end{aligned}$$

สรุปได้ว่าจากการทดลองครั้งนี้มี Antimicrobial index เท่ากับ 1.25

**ภาคผนวก ข**  
**ข้อมูลดิบจากการทดลอง**

น้ำหนักสารเคลือบของกระดาษเคลือบ

1.การศึกษาผลของชนิด ผลของระดับความเข้มข้นของสารต่อต้านจุลินทรีย์ และผลของการ Precoating ต่อประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์ของกระดาษเคลือบ

Table12. Coating weight (mg/cm<sup>2</sup>) of coated paper prepared to study the effect of type and concentration of antimicrobial agents and precoating on antimicrobial activity.

No.	Silver-zeolite coated paper						Triclosan coated paper											
	AJ10N			AW10N			3%		5%		10%		3%		5%		10%	
	3%		5%		10%		3%		5%		10%		3%		5%		10%	
	Precoating	No-precoating	Precoating	No-precoating	Precoating	No-precoating	Precoating	No-precoating	Precoating	No-precoating	Precoating	No-precoating	Precoating	No-precoating	Precoating	No-precoating	Precoating	No-precoating
1	4.2872	3.9469	4.3262	4.1025	4.2532	4.0732	4.1036	3.9649	4.2954	4.1738	4.2957	4.0021	4.193	4.1263	4.2573	4.0382	4.2783	4.1739
2	4.2800	4.0117	4.2874	4.048	3.9766	4.2746	4.2216	4.2014	4.0673	3.8527	4.3743	4.0257	4.0271	4.2537	4.2748	4.5823	4.1253	4.2649
3	4.2857	4.1039	4.3798	3.9473	4.2841	4.0196	4.3727	4.0287	4.3729	4.1864	4.2748	4.1633	4.2947	4.0142	4.2859	4.2893	4.1908	3.9874
4	4.2467	4.0692	3.9885	4.1621	4.0539	3.8957	4.3628	4.2947	4.2739	4.0158	4.1639	3.9462	4.2035	4.2637	4.1957	4.2957	4.0791	4.1958
5	4.2369	3.9677	4.3369	4.2462	4.2743	4.0892	4.1749	4.0197	4.2956	3.9784	4.1072	4.0958	4.1494	4.1536	4.2674	4.2732	4.2690	4.2527



2. การศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษากระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์ต่อประสิทธิภาพการต่อต้านจุลินทรีย์

Table 13. Coating weight ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ) of no-precoating triclosan coated paper prepared to study the effect of storage time on antimicrobial activity.

No.	No-precoating triclosan coated paper		
	3%	5%	10%
1	4.2872	4.1809	4.0903
2	3.9570	4.1487	4.2447
3	4.2838	4.2882	4.1986
4	4.0797	4.0604	4.2638
5	4.0369	4.0242	4.0437

3. การศึกษาคุณสมบัติเชิงกล องค์ประกอบเคมีและลักษณะปรากฏของกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์ การแพร่กระจายของสารต่อต้านจุลินทรีย์จากกระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์ และการศึกษาการใช้กระดาษเคลือบสารต่อต้านจุลินทรีย์กับตัวอย่างอาหาร

Table 14. Coating weight ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ) of 5% no-precoating paper prepared to study the mechanical, chemical composition, morphology, antimicrobial agents releasing and application of coated paper.

5% triclosan no-precoating paper													
No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.
1	4.1313	11	3.9805	21	4.2359	31	3.9164	41	4.3467	51	4.1274	61	4.1838
2	4.3323	12	3.9031	22	4.2159	32	4.1210	42	4.5856	52	4.0859	62	4.3477
3	3.9431	13	4.1405	23	4.1369	33	4.2872	43	4.3692	53	3.9363	63	4.0334
4	4.1897	14	3.8600	24	3.9805	34	3.7800	44	4.2467	54	3.9954	64	4.1255
5	4.2959	15	4.1426	25	3.9031	35	4.2877	45	4.1875	55	4.0203	65	4.2719
6	4.1692	16	4.4118	26	4.1405	36	4.0467	46	3.8730	56	4.2385	66	4.3873
7	4.1487	17	3.9231	27	3.8600	37	4.3369	47	4.1947	57	3.9640	67	4.5372
8	4.2359	18	3.9164	28	4.1426	38	4.4036	48	4.0467	58	4.1926	68	4.2975
9	4.2159	19	4.1210	29	4.4118	39	4.4159	49	4.8369	59	4.2749	69	4.0159
10	4.1369	20	4.1174	30	3.9231	40	4.1474	50	4.4356	60	4.1323	70	4.3492

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวกิตติมา เจริญสุข		
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5011020001		
วุฒิการศึกษา			
	วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)		มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2547

## ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนทักษะนักอุตสาหกรรมเกษตร จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ  
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

## การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Charoensuk, K. and Pisuchpen, S. 2008. Evaluation of the Antimicrobial Layer Containing Triclosan, Chitosan and Silver zeolite for Paper Packaging. In Proceeding of 16<sup>th</sup> IAPRI World Conference on Packaging. Miracle Grand Convention Hotel Bangkok, Thailand. 8-12 June 2008.