

## อุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกอย่างง่ายสำหรับการสังเคราะห์ไมโครแคปซูลน้ำมันหอมระเหย ด้วยวิธีคอมเพล็กซ์โคอะเซอร์เวชัน

### Simple Microfluidic Device for Fabrication of Essential Oil Microcapsules via Complex Coacervation

วิรงรอง แสงอรุณเลิศ และ จีรพรรณ เทียนทอง\*

Wirungrong Sangarunlert and Jeerapan Tientong\*

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ นครสวรรค์ 60000 ประเทศไทย  
Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Nakhon Sawan Rajabhat University,  
Nakhon Sawan 60000, Thailand

\*E-mail: jeerapan.t@nsru.ac.th

Received: May 23, 2024

Revised: Jul 05, 2024

Accepted: Jul 16, 2024

#### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการกระบวนการเตรียม และการศึกษาสมบัติของไมโครแคปซูลน้ำมันหอมระเหยสังเคราะห์ด้วยวิธีคอมเพล็กซ์โคอะเซอร์เวชันโดยใช้อุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกอย่างง่าย โดยศึกษาผลของปัจจัยต่าง ๆ ที่มีต่อสมบัติของไมโครแคปซูลที่สังเคราะห์ได้ ได้แก่ ความเป็นกรดเบส (pH) อัตราส่วนโดยมวลของเจลาติน (GE) ต่อคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) ในสารห่อหุ้มเจลาติน-คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (GE-CMC) อัตราส่วนโดยมวลของสารห่อหุ้ม GE-CMC ต่อน้ำมันหอมระเหย (EO) และความเข้มข้นของกรดแทนนิก (TA) ที่ใช้เป็นสารเชื่อมขวางของสารห่อหุ้ม GE-CMC จากการสังเคราะห์ไมโครแคปซูลน้ำมันหอมระเหยที่ห่อหุ้มด้วยสารห่อหุ้ม GE-CMC (GE-CMC-EO) และที่ไม่มี TA เป็นสารเชื่อมขวาง (GE-CMC-EO) และการสังเคราะห์ GE-CMC-EO ที่มี TA เป็นสารเชื่อมขวาง (GE-CMC-EO-TA) พบว่าค่า pH อัตราส่วนโดยมวลของ GE ต่อ CMC ในสารห่อหุ้ม GE-CMC อัตราส่วนโดยมวลของ GE ต่อ CMC ต่อ EO ใน GE-CMC-EO และความเข้มข้นของ TA ที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ไมโครแคปซูลน้ำมันหอมระเหย คือ 4.0, 1:1, 1:1:1 และร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร ตามลำดับ จากการศึกษาหุ้มน้ำของไมโครแคปซูลน้ำมันหอมระเหย ด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy พบว่า GE-CMC-EO-TA มีพันธะ O-H เชื่อมขวางระหว่างโมเลกุล GE-CMC นอกเหนือจากการเชื่อมต่อกันเองระหว่างโมเลกุล GE-CMC ที่พบใน GE-CMC-EO จากการศึกษาสัณฐานวิทยาด้วยเทคนิค Scanning electron microscopy พบว่า GE-CMC-EO มีลักษณะของผนังขรุขระและโปร่งบาง ส่วน GE-CMC-EO-TA มีผนังที่หนาและแข็งแรงขึ้น และจากการศึกษาสมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิค Thermogravimetric analysis พบว่าการเติม TA ลงไป ทำให้ไมโครแคปซูลเสถียรต่อความร้อนได้ดีกว่าและปลดปล่อยน้ำมันหอมระเหยได้ช้ากว่า ซึ่งเหมาะที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในถุงหอมปรับอากาศได้

**คำสำคัญ:** ไมโครแคปซูล น้ำมันหอมระเหย คอมเพล็กซ์โคอะเซอร์เวชัน อุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกอย่างง่าย

#### Abstract

This research aimed to optimize the preparation process and characterize orange essential oil microcapsules synthesized by the complex coacervation method using a simple microfluidic device. The effects on the properties of the synthesized microcapsules of some factors were studied including pH, the mass ratio of gelatin (GE) to carboxymethyl cellulose (CMC) in gelatin-carboxymethyl cellulose (GE-CMC) shell, the mass ratio of GE-CMC shell to essential oil (EO) and the concentration of tannic acid (TA) used as a cross-linking agent for GE-CMC shell. From the synthesis of essential oil microcapsules covered by GE-CMC shell (GE-CMC-EO) and the synthesis of GE-CMC-EO with TA as a cross-linking agent (GE-CMC-EO-TA), it was found that the optimal pH,

mass ratio of GE to CMC in GE-CMC shell, mass ratio of GE to CMC to EO in GE-CMC-EO, and TA amount for the synthesis of microcapsules of orange essential oil were 4.0, 1:1, 1:1:1, and 2% w/v, respectively. Functional group analysis of the essential oil microcapsules using Fourier transform infrared spectroscopy revealed that GE-CMC-EO-TA exhibited O-H bond crosslinks between GE-CMC molecules, in addition to the self-linking between GE-CMC molecules found in GE-CMC-EO. Morphological study using Scanning electron microscopy demonstrated that GE-CMC-EO had rough and thin walls while GE-CMC-EO-TA had thicker and stronger walls. Thermal property study using Thermogravimetric analysis indicated that addition of TA enhanced the thermal stability of the microcapsules and resulted in slower release of the essential oil. These properties make the microcapsules suitable for applications in air freshener sachets.

**Keywords:** Microcapsule, Essential oil, Complex coacervation, Simple microfluidic device

## 1. บทนำ

ด้วยเหตุที่น้ำมันหอมระเหยมีการระเหยได้ง่ายและมีความไวต่อการเสื่อมสภาพ ทำให้อาจสูญเสียสภาพและฤทธิ์ทางยาระหว่างการแปรรูปและการเก็บรักษา ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาวิธีที่จะทำให้น้ำมันหอมระเหยไม่สูญเสียกลิ่นหรือเสื่อมสภาพจากปัจจัยแวดล้อมภายนอก เช่น ความร้อน แสง ออกซิเจน และความชื้น รวมถึงสามารถควบคุมการปลดปล่อยน้ำมันหอมระเหยได้ วิธีการที่นิยมนำมาใช้ในการแก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้นได้แก่ วิธีเจลไอออนิก (Ionic gelation) [1] วิธีโคเคอร์เวชัน (Coacervation) [2] วิธีโคเคอร์เวชัน-การอบแห้งแบบพ่นฝอย (Coacervation-Spray drying) [3] และการอบแห้งแบบพ่นฝอย (Spray drying) [4] สำหรับการห่อหุ้มน้ำมันหอมระเหยส้ม

กลิ่นส้มเป็นกลิ่นที่ไวต่อการรับรู้ทางประสาทสัมผัสของมนุษย์ มีความปลอดภัย และมีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านเชื้อราและแบคทีเรีย [5] น้ำมันหอมระเหยส้มเป็นสารแต่งกลิ่นรสตามธรรมชาติ เป็นหนึ่งในน้ำมันหอมระเหยที่นำไปใช้มากที่สุด ในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น เครื่องดื่ม ไอศกรีม หมากฝรั่ง ลูกอม และเค้ก [6] นอกจากนี้ยังใช้ในผลิตภัณฑ์อื่น ๆ อีก เช่น น้ำหอม และถุงหอมปรับอากาศ [7]

เอนแคปซูลชัน (Encapsulation) เป็นการห่อหุ้มสารสำคัญให้อยู่ในรูปของแคปซูลขนาดเล็ก โดยสร้างผนังแคปซูลห่อหุ้ม (Shell) น้ำมันหอมระเหยซึ่งเป็นสารแกนกลาง (Core) จะต้องเป็นสารที่ไม่เกิดปฏิกิริยากับสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหย แต่จะช่วยยืดระยะเวลาในการเก็บรักษา นอกจากนี้ยังช่วยเปลี่ยนสถานะของน้ำมันหอมระเหยจากของเหลวไปเป็นของแข็งห่อหุ้มภายนอก ทำให้เพิ่มความสะดวกในการขนส่งและเก็บรักษา [8] กระบวนการทำเอนแคปซูลชันมีหลายวิธี และวิธีหนึ่งที่ได้รับการนิยมนำมา

ใช้อย่างต่อเนื่องคือ วิธีคอมเพล็กซ์โคเคอร์เวชัน (Complex coacervation) ซึ่งใช้หลักการเกิดพันธะไฟฟ้าสถิต (Electrostatic bond) ระหว่างสารพอลิอิเล็กโทรไลต์ (Polyelectrolyte) 2 ชนิดที่มีประจุตรงข้ามกัน โดยสารห่อหุ้มที่มีประจุตรงข้ามกัน จะเกิดแรงดึงดูดทางไฟฟ้าสถิต (Electrostatic interactions) และสร้างพันธะไฟฟ้าสถิตระหว่างกันขึ้น เกิดเป็นโคเคอร์เวต (Coacervates) ที่จะห่อหุ้มสารสำคัญไว้ภายใน แยกเป็น 2 เฟส (Phase) คือ เฟสของโคเคอร์เวต (Coacervate phase) และเฟสสารละลายที่เป็นคอลลอยด์ (Colloidal phase) [9] โดยสารพอลิอิเล็กโทรไลต์ที่นำมาใช้ส่วนใหญ่จะเป็นโปรตีน เช่น เจลาติน (Gelatin) และโพลีแซคคาไรด์ ได้แก่ เซลลูโลส (CMC) และกัมอะราบิก (Gum arabic) จากการศึกษาของ Chen et al. [10] โปรตีนเป็นไบโอพอลิเมอร์ (Biopolymer) ที่มีประจุเป็นบวกในสภาวะความเป็นกรดต่ำกว่าที่มีค่าต่ำกว่าจุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point; pI) ส่วนพอลิแซคคาไรด์เป็นไบโอพอลิเมอร์ที่มีประจุเป็นลบที่เกิดจากหมู่คาร์บอกซิล ( $-\text{COOH}$ ) ทำให้เกิดพันธะไฟฟ้าสถิตระหว่างโปรตีนและพอลิแซคคาไรด์ โปรตีนและพอลิแซคคาไรด์ได้รับความสนใจอย่างมากในการห่อหุ้มส่วนประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีขนาดอนุภาคระดับไมโคร [11] ซึ่งมีข้อดีคือ ประสิทธิภาพในการกักเก็บสูง และควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ [12]

เพื่อเพิ่มความแข็งแรงของสารห่อหุ้มที่ใช้ในการกักเก็บ จึงมีการใช้สารเชื่อมขวาง (Crosslinkers) เช่น Transglutaminase (TGA) เป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพมากที่สุดที่ทำให้ผนังของไมโครแคปซูล (Microcapsule) แข็งตัว โดยเปลี่ยนโครงสร้างที่ผนังเมมเบรนและเพิ่มความเสถียรในการปลดปล่อยไมโครแคปซูลโดยการทำงานของเอนไซม์ แต่ TGA มีราคาแพง ดังนั้นกรดแทนนิก (Tannic acid) จึงได้รับความสนใจมาก

ขึ้น เนื่องจากมีหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) มากที่จะเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนและกรดอะมิโน ทำให้ผนังของไมโครแคปซูลแข็งแรงและทำให้สามารถบรรจุวัสดุแกนกลางได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง [13]

อย่างไรก็ตาม ขั้นตอนการเกิดอนุภาคหรือหยดของเหลวที่มีขนาดเล็กโดยเทคนิคโคเอเซอร์เวชัน เป็นขั้นตอนที่สำคัญที่ทำให้เกิดไมโครแคปซูลที่มีการกระจายตัวของขนาดที่ใกล้เคียงกัน (Monodisperse microcapsule) ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการนำไปใช้งานต่าง ๆ ไมโครแคปซูลซึ่งมีการกระจายตัวของขนาดที่ใกล้เคียงกัน สามารถทำได้จากการหยดอิมัลชันที่มีความแม่นยำและสม่ำเสมอด้วยเทคนิคที่หลากหลาย ได้แก่ เมมเบรนอิมัลซิฟิเคชัน (Membrane emulsification) และไมโครฟลูอิดิกอิมัลซิฟิเคชัน (Microfluidic emulsification) เป็นต้น อย่างไรก็ตามเทคนิคไมโครฟลูอิดิกเป็นเทคนิคที่มีความเหมาะสมที่สุดในการทำไมโครแคปซูลที่มีการกระจายตัวของขนาดที่ใกล้เคียงกัน [14], [15]

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงสนใจสังเคราะห์ไมโครแคปซูลน้ำมันหอมระเหยส้มด้วยวิธีคอมเพล็กซ์โคเอเซอร์เวชันโดยใช้อุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกอย่างง่าย

## 2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

### 2.1. การวัดค่าความขุ่น

การวัดค่าความขุ่น (Turbidity test) ทำโดยนำสารห่อหุ้มเจลาติน (Gelatin; GE) (Food grade : กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย) และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (Carboxymethyl cellulose; CMC) (Food grade : กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย) (GE-CMC) ที่อัตราส่วน 2:1, 1:1 และ 1:2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งเตรียมโดยชั่งน้ำหนัก GE 0.5 กรัม เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร คนให้ละลายที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และละลาย CMC น้ำหนัก 0.25, 0.5 และ 1.0 กรัม ตามลำดับในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นำ GE-CMC ที่ได้มาผสมกันจนเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องกวนสารให้ความร้อน (Hotplate and magnetic stirrer MSH-20D, Korea) แล้วปรับปริมาตรทั้งหมดให้เป็น 100 มิลลิลิตร และปรับค่า pH ด้วยกรดอะซิติก (Acetic acid) (Analytical grade : Merck, Germany) หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) (Analytical grade : Merck, Germany) จนได้ pH ในช่วง 1 ถึง 12 ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH

meter Seven Compact, Switzerland) นำไปวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิดแบบอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิล (UV-Visible spectrophotometer Evolution 201, USA) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร [16] เพื่อศึกษาอัตราส่วนโดยมวลและ pH ที่เหมาะสมในการเกิดโคเอเซอร์เวต GE-CMC

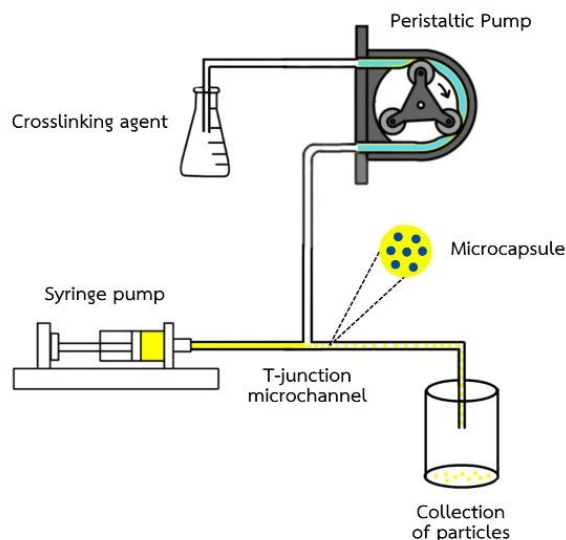
### 2.2. การสังเคราะห์ไมโครแคปซูลน้ำมันหอมระเหยส้มด้วยวิธีคอมเพล็กซ์โคเอเซอร์เวชันโดยใช้อุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกอย่างง่าย

#### 2.2.1. การทำให้เป็นอิมัลชัน

การทำให้เป็นอิมัลชัน (Oil in water emulsion) ด้วยวิธีคอมเพล็กซ์โคเอเซอร์เวชัน ดัดแปลงมาจากวิธีของ Muhoza et al. [17] โดยนำ GE-CMC ที่อัตราส่วนโดยมวลและ pH ที่เหมาะสม มาเติมน้ำมันหอมระเหยส้ม (EO) (Cosmetic grade : AsianBioplex, ประเทศไทย) ที่เศษส่วนโดยมวลต่าง ๆ ของ EO ต่อสารห่อหุ้ม (0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องปั่นสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenizer T25, Germany) ที่ความเร็ว 3,600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2-3 นาที จะได้อิมัลชัน จากนั้นนำไปแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดโครงสร้างตาข่ายเจล (Gel network) ทำให้ไมเซลล์ (Micelle) สามารถแขวนลอยได้ในสารละลาย เกิดเป็นไมโครแคปซูลน้ำมันหอมระเหย (GE-CMC-EO) ด้วยวิธีคอมเพล็กซ์โคเอเซอร์เวชัน

#### 2.2.2. การทำให้สารห่อหุ้มแข็งแรง

นำ GE-CMC-EO ที่ได้ในหัวข้อที่ 2.2.1. มาเติมลงในเครื่องควบคุมการให้สารด้วยกระบอกฉีด (Syringe pump) และเติมสารละลายกรดแทนนิก (Tannic acid; TA) (Analytical grade : Loba Chemie, India) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ร้อยละ 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 โดยมวลต่อปริมาตร) ลงในขวดรีเอเจนต์สารเชื่อมขวาง (Crosslinking agent) เพื่อให้เกิดการเชื่อมขวาง (Crosslink) ระหว่าง TA กับ GE-CMC-EO เกิดเป็นไมโครแคปซูลน้ำมันหอมระเหยที่เชื่อมขวางด้วย TA (GE-CMC-EO-TA) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Patrick and Ntsama [18] ด้วยอุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกอย่างง่ายโดยฉีดสารผ่านรูเข็มที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 0.30 มิลลิเมตร ดังแสดงใน Figure 1



**Figure 1** A schematic diagram of the simple microfluidic device for preparing GE-CMC-EO-TA  
GE-CMC-EO microcapsules (dispersed phase) were extruded through the T-junction microchannel  
to mix with TA crosslinking agent (continuous phase).

### 2.2.3. การทำแห้งไมโครแคปซูล

นำ GE-CMC-EO และ GE-CMC-EO-TA ที่เตรียมได้ในหัวข้อที่ 2.2.1. และ 2.2.2. ตามลำดับ มาทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบสุญญากาศ (Freeze dryer TFD5503, Korea) ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำ GE-CMC-EO และ GE-CMC-EO-TA ที่ได้ไปศึกษาคุณลักษณะต่าง ๆ

## 2.3. การศึกษาคุณลักษณะของไมโครแคปซูลของน้ำมันหอมระเหยส้มที่เตรียมได้

### 2.3.1. การศึกษาโครงสร้างทางเคมี

ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ GE-CMC-EO และ GE-CMC-EO-TA ด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectrometry (FT-IR) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางโครงสร้างเคมีของสารโดยใช้ความยาวคลื่นช่วงอินฟราเรด (Fourier transform infrared spectrometer spectrum GX, USA) ในช่วงเลขคลื่น (Wave number) 400-4000 เซนติเมตร<sup>-1</sup> ด้วยโหมด ATR และบันทึกสเปกตรัมด้วยจำนวนรอบการสแกน (Number of scan) 16 ครั้ง ที่ความละเอียด (Resolution) 4 เซนติเมตร<sup>-1</sup>

### 2.3.2. การศึกษาสัณฐานวิทยา

ศึกษาสัณฐานวิทยาของ GE-CMC-EO และ GE-CMC-EO-TA ด้วยเทคนิค Scanning electron microscopy (SEM) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope M-30AXM, Korea) โดยนำ GE-CMC-EO และ GE-CMC-EO-TA ติดด้วยเทปคาร์บอน เคลือบด้วยแผ่นทองคำหนา 3 นาโนเมตร นาน 250 วินาที ทำการส่องกล้อง และถ่ายภาพโดยใช้ค่าความต่างศักย์ 15 กิโลโวลต์

### 2.3.3. การศึกษาสมบัติทางความร้อน

ศึกษาสมบัติทางความร้อนด้วยด้วยเทคนิค Thermogravimetric analysis (TGA) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์สมบัติการเปลี่ยนแปลงเชิงน้ำหนักด้วยความร้อน (Thermogravimetry Analyzer TGA/DSC 3+, Switzerland) ที่สภาวะการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิตั้งแต่ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียส ต่อนาที ภายใต้บรรยากาศของก๊าซ N<sub>2</sub> ที่อัตราการไหล 40 มิลลิลิตรต่อนาที

### 3. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

#### 3.1. ผลของอัตราส่วนโดยมวลของ GE-CMC และ pH ต่อการเกิดโคอะเซอร์เวต

จุดไอโซอิเล็กทริก (pI) คือค่า pH ที่โมเลกุลมีประจุไฟฟ้าหรือมีประจุรวมเป็นศูนย์ ซึ่ง pI จะมีความสำคัญอย่างมากสำหรับโมเลกุลที่มีทั้งประจุบวกและลบ เช่น กรดอะมิโน เปปไทด์ และโปรตีน [19] GE มีโครงสร้างเป็นโปรตีนที่มีประจุรวมเป็นลบ (Negative charge) ประจุลบที่เหมือนกันจะเกิดแรงผลักกันโมเลกุลจึงละลายในน้ำได้ เมื่อเตรียมสารละลายผสมระหว่าง GE-CMC ที่อัตราส่วนโดยมวลต่าง ๆ (1:2, 1:1 และ 2:1) พบว่าทุกอัตราส่วนเป็นสารละลายใส อย่างไรก็ตามจาก Figure 2 เมื่อนำสารละลายผสมของ GE และ CMC ทั้ง 3 อัตราส่วนมาปรับค่า pH ตั้งแต่ 1 ถึง 12 แล้ววัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พบว่าที่อัตราส่วนโดยมวลของ GE-CMC ได้แก่ 1:2, 1:1 และ 2:1 มีค่าความขุ่นสูงสุดในช่วงเป็นกรดที่ pH 3, 4 และ 5 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า pH มีผลต่อค่าความขุ่นของโคอะเซอร์เวต GE-CMC ที่มีลักษณะเป็นคอลลอยด์ในน้ำ และเมื่อสัดส่วนของ GE มากขึ้น โคอะเซอร์เวตจะขุ่นมากขึ้นเมื่อปรับค่า pH ให้เลื่อนไปด้านที่ pH สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Guo et al. [20]

นอกจากนี้จาก Figure 2 ยังพบว่า อัตราส่วนโดยมวล และ pH มีผลต่อค่าความขุ่นของโคอะเซอร์เวต GE-CMC โดยที่ pH มากกว่า 6 ซึ่งมีค่ามากกว่า pI ของ GE ซึ่งมีค่า 4.6-5.2 [21] ทำให้โมเลกุลของ GE มีประจุเป็นลบจากการคลายตัวของโครงสร้างโปรตีน และ CMC มีโครงสร้างเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นลบจากหมู่คาร์บอกซิล เกิดแรงผลักกันอย่างมากระหว่างประจุที่เหมือนกัน ทำให้สารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกัน

ที่ pH น้อยกว่า 6 ค่าความขุ่นของโคอะเซอร์เวต GE-CMC จะเพิ่มขึ้น เพราะมี  $H^+$  ที่เพิ่มขึ้นจะไป Protonate หมู่อะมิโนบางส่วน ของ GE ได้ประจุบวกที่เพิ่มขึ้นของ

$-[H_2N-H]^+$  และหมู่คาร์บอกซิลบางส่วน ของ CMC ได้  $-COOH$  มากขึ้น ทำให้ประจุลบลดลง มีประจุรวมของโคอะเซอร์เวตจะเป็นบวก แรงผลักระหว่างโมเลกุลจึงลดลง มีแรงดึงดูดทางไฟฟ้าสถิตระหว่างโปรตีนและพอลิแซ็กคาไรด์แบบอ่อน เกิดเป็นโคอะเซอร์เวตที่ละลายได้ (Soluble coacervates) ที่มีลักษณะเป็นสีขาวนํ้ามใส (Light milky white appearance) เมื่อลด pH ลงจาก pH 5-3 ค่าความขุ่นจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้เห็นเป็นสารละลายสีขาวนํ้ามใสมากขึ้น แสดงว่าความสามารถในการละลายของโคอะเซอร์เวตที่ละลายได้เริ่มลดลงเปลี่ยนเป็นรูปที่ไม่สามารถละลายได้ (Insoluble coacervates) จึงมีค่าความขุ่นสูงสุด ซึ่งเป็น pH ณ จุดที่มีแรงดึงดูดทางไฟฟ้าสถิตระหว่าง GE และ CMC ที่แข็งแรงที่สุด และมีประจุบวกและลบสมดุลกันมากที่สุด ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Li et al. [22] เมื่อ pH ลดลงจาก pH 3-1 ค่าความขุ่นลดลงอย่างรวดเร็ว เกิดจากโคอะเซอร์เวตที่ไม่ละลายน้ำสามารถละลายได้มากขึ้น ในสารละลายที่มีความเป็นกรดสูงขึ้น จนเกิดเป็นสารละลายใส ในที่สุด และที่ pH 1-2 โคอะเซอร์เวตทุกอัตราส่วนจะมีค่าความขุ่นต่ำมากจนได้เป็นสารละลายใส สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhang et al. [23] และที่อัตราส่วนของโคอะเซอร์เวตที่มี GE มากกว่า จะมีโมเลกุล GE ที่มีประจุบวกที่เพิ่มขึ้นในโคอะเซอร์เวตทำให้มีค่าความขุ่นสูงสุดที่ค่า pH ที่สูงขึ้น ทั้งนี้ เพราะโมเลกุล GE ที่มีประจุบวกจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามค่า pH ที่ลดลง และประจุลบของ CMC จะค่อย ๆ ลดลงเนื่องจากการยับยั้งการแตกตัวเป็นไอออนของหมู่คาร์บอกซิล สอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu and Jiang [24] ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเกิดโคอะเซอร์เวตระหว่าง GE-CMC คือ อัตราส่วนโดยมวลระหว่าง GE-CMC เท่ากับ 1:1 และ pH เท่ากับ 4 เนื่องจากมีค่าความขุ่นสูงสุด

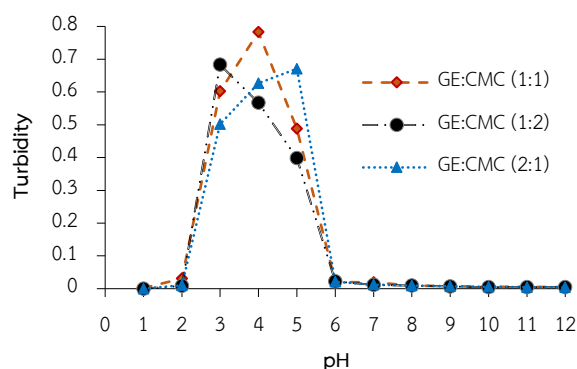


Figure 2 Turbidity of GE-CMC coacervate at ratios of 1:2, 1:1 and 2:1 with pH ranging from 1 to 12

### 3.2. ผลของอัตราส่วนโดยมวลของ GE-CMC-EO และความเข้มข้นของ TA ที่มีต่อความคงตัวของไมโครแคปซูล

เมื่อนำโคอะเซอร์เวต GE-CMC ที่อัตราส่วนโดยมวล 1:1 และ pH 4 ผสมกับน้ำมันหอมระเหยส้มที่เศษส่วนโดยมวลของ EO ต่อโคอะเซอร์เวต GE-CMC ต่าง ๆ ( $X_i = 0.2, 0.3, 0.4, 0.5$  และ  $0.6$ ) จะได้ GE-CMC-EO ดัง Figure 3A แสดงให้เห็นว่าอิมัลชันกระจายตัวในเฟสน้ำ เป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (Oil in water; o/w) ลักษณะที่ปรากฏโดยทั่วไปของอิมัลชันหลังจากตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าที่เศษส่วนโดยมวลของ EO ใน GE-CMC-EO ที่แตกต่างกัน จะมีความเสถียรของเฟลอิมัลชันต่างกัน เมื่อเศษส่วนโดยมวลเพิ่มขึ้น ( $X_i = 0.4, 0.5$  และ  $0.6$ ) จะเห็นได้ชัดว่าเฟลอิมัลชันมีปริมาตรคอลลอยด์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ไม่พบการแยกเฟส มีความคงตัวของไมโครแคปซูลหลังจากการเก็บรักษา 24 ชั่วโมง ในขณะที่อิมัลชันที่เตรียมด้วยเศษส่วนโดยมวล ( $X_i = 0.2$  และ  $0.3$ ) จะเกิดการแยกชั้นเป็นชั้นน้ำสีขาวอยู่ด้านล่างและชั้นอิมัลชันสีเหลืองอ่อนอยู่ด้านบน [25] จึงสามารถสรุปได้ว่าเศษส่วนโดยมวลของ EO ใน

GE-CMC-EO คือ 0.5 หรือกล่าวได้ว่าอัตราส่วนโดยมวลระหว่าง GE-CMC-EO ที่เหมาะสมที่สุด คือ 1:1:1

Figure 3B แสดงผลการศึกษาความเข้มข้นของ TA (ร้อยละ 1-5 โดยมวลต่อปริมาตร) ของ GE-CMC-EO-TA พบว่าที่ความเข้มข้นของ TA ที่แตกต่างกัน (ร้อยละ 2-5 โดยมวลต่อปริมาตร) จะเกิดความคงตัวของไมโครแคปซูลไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้เพราะความเข้มข้นของ TA ที่สูงขึ้น จะทำให้เกิดการอิมัลชันของการเชื่อมขวางระหว่าง TA และ GE-CMC-EO [20] ในขณะที่ความเข้มข้นของ TA ร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร จะสังเกตเห็นว่าเกิดอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำไม่สมบูรณ์ เนื่องจากเกิดการแยกชั้นโดยสังเกตเห็นน้ำสีขาวปนอยู่ในอิมัลชันเล็กน้อย ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้น TA ที่ทำให้เกิดความคงตัวของไมโครแคปซูล คือ ร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร

ขั้นตอนต่อไปจะนำ GE-CMC-EO และ GE-CMC-EO-TA ที่สังเคราะห์ได้ที่สภาวะที่เหมาะสม มาทำให้แห้ง และนำไปศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ



Figure 3 Appearance of microcapsules after storage for 24 hours at 4°C

(A) GE-CMC (1:1 w/w) of shell with various oil mass fractions ( $X_i = 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6$ ; from left to right)

(B) Shell-EO (2:1 w/w) with different concentrations of tannic acid (1, 2, 3, 4, 5 %w/v; from left to right)

### 3.3. ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค FT-IR

ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค FT-IR ของ GE-CMC-EO และ GE-CMC-EO-TA แสดงใน Figure 4 พบว่าทั้ง GE-CMC-EO และ GE-CMC-EO-TA มีแถบการดูดกลืนแสงช่วง 3600-3000 เซนติเมตร<sup>-1</sup> (พีค 1) ที่เกิดจากการยืดของหมู่ -OH และหมู่ -NH<sub>2</sub> [20], [26] และพบว่าพีคการดูดกลืนแสงช่วง 3600-3000 เซนติเมตร<sup>-1</sup> ของ GE-CMC-EO-TA จะเลื่อนไปทางด้านเลขคลื่นที่ต่ำกว่าเล็กน้อย

จาก 3266 เซนติเมตร<sup>-1</sup> (ของ GE-CMC-EO) เป็นตำแหน่ง 3261 เซนติเมตร<sup>-1</sup> (ของ GE-CMC-EO-TA) เนื่องจากหมู่ -OH และหมู่ -COOH ของ CMC และ GE เกิดการเชื่อมต่อกันกับ TA ทำให้พันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ -OH ลดลง พบว่า GE-CMC-EO มีแถบการดูดกลืนแสงที่ตำแหน่ง 2920 เซนติเมตร<sup>-1</sup> (พีค 2) ที่เกิดจากการยืดของพันธะ C-H [20] และเกิดจากการยืดของพันธะของ =C-H และ CH<sub>2</sub> (ของหมู่ เอไมด์) [26] GE-CMC-EO-TA มีความเข้มข้นของพีคลดลงที่ตำแหน่ง 2913 เซนติเมตร<sup>-1</sup> (พีค 2) (ซึ่งเลื่อนมาจากตำแหน่ง

2920 เซนติเมตร<sup>-1</sup> ของ GE-CMC-EO เล็กน้อย) เพราะเกิดการยืดที่ลดลงของพันธะของ  $=C-H$  และ  $-CH_2$  (ของหมู่เอไมด์) มากขึ้น พีคการดูดกลืนแสงที่ตำแหน่ง 1614 เซนติเมตร<sup>-1</sup> (พีค 3), 1564 เซนติเมตร<sup>-1</sup> (พีค 4), 1400 เซนติเมตร<sup>-1</sup> (พีค 5) เกิดจากหมู่คาร์บอนิลของเอไมด์ I, เอไมด์ II และ เอไมด์ III ตามลำดับ [20] นอกจากนี้ที่ตำแหน่ง 1614 เซนติเมตร<sup>-1</sup> (พีค 3) ของ GE-CMC-EO ยังเกิดจากการสั่นแบบยืดของหมู่  $-C=O$  และ  $-COO$  [20, 26] แต่พบว่า GE-CMC-EO-TA เกิดการเปลี่ยนแปลงในช่วง 1610-1540 เซนติเมตร<sup>-1</sup> (พีค 3 และ 4) ที่แสดงการยืดของหมู่  $-COO^-$  ระบุได้ว่าพันธะไอออนิกของคาร์บอกซิเลทไอออน จากการเกิดเรโซแนนซ์ของอิเล็กตรอนระหว่างพันธะของ  $C=O$  กับ  $C-O$  ของหมู่  $-COO^-$  ทำให้

สังเกตเห็นพีคของหมู่  $-COO^-$  ของ GE-CMC-EO ที่ตำแหน่ง 1547 เซนติเมตร<sup>-1</sup> (พีค 4) ชัดเจน ที่ตำแหน่ง 1400 เซนติเมตร<sup>-1</sup> (พีค 5) เกิดจากการงอของพันธะ  $C-H$  [20] พบว่าที่ตำแหน่ง 1547 และ 1400 เซนติเมตร<sup>-1</sup> ของ GE-CMC-EO-TA มีความเข้มลดลงหรือหายไปเพราะ TA จะเชื่อมขวางระหว่าง GE-CMC-EO มากขึ้น ตำแหน่ง  $-COO^-$  ลดลง ที่ตำแหน่ง 1020 เซนติเมตร<sup>-1</sup> (พีค 6) เกิดจากการสั่นของ  $-C-O$  ใน TA และ  $-C-O$  ใน GE-CMC-EO จะสังเกตได้ว่าพีคการดูดกลืนแสงของ GE-CMC-EO-TA ที่ตำแหน่ง 1020 เซนติเมตร<sup>-1</sup> มีความเข้มของพีคสูงมากกว่าพีคของทั้ง GE-CMC-EO และ TA แสดงให้เห็นว่ามีองค์ประกอบของสารประกอบพอลิเมอร์ของ TA เกิดขึ้นในโครงสร้าง GE-CMC-EO-TA [20]

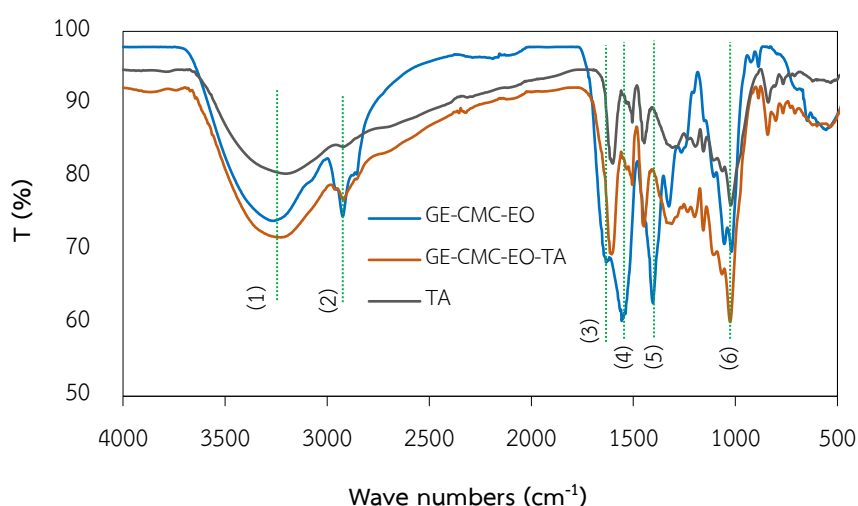


Figure 4 FT-IR spectra of GE-CMC-EO, GE-CMC-EO-TA and TA showing absorption band at 3266 cm<sup>-1</sup> (1), 2920 cm<sup>-1</sup> (2), 1614 cm<sup>-1</sup> (3), 1564 cm<sup>-1</sup> (4), 1400 cm<sup>-1</sup> (5) and 1020 cm<sup>-1</sup> (6)

### 3.4. ผลการวิเคราะห์สัณฐานวิทยาด้วยเทคนิค SEM

ผลการศึกษาลักษณะรูปร่างภายนอกของไมโครแคปซูลด้วยเทคนิค SEM ที่กำลังขยาย 2,000 เท่า พบว่า GE-CMC-EO (Figure 5A) และ GE-CMC-EO-TA (Figure 5B) พบว่า GE-CMC-EO (Figure 5A) จะมีลักษณะของผนังขรุขระและโปร่งบาง และ GE-CMC-EO-TA (Figure 5B) จะมีผนังที่เรียบและหนาขึ้น ทำให้สนับสนุนได้ว่า GE-CMC-EO-TA มีช่องว่างในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยและมีผนังห่อหุ้มที่แข็งแรงมากขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Alexandre et al. [27] และ Karagozlu et al. [28]

### 3.5. ผลการวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิค TGA

Figure 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักที่เหลือ (Residue weight) กับ อุณหภูมิ ของ GE-CMC-EO และ GE-CMC-EO-TA พบว่า GE-CMC-EO และ GE-CMC-EO-TA ที่ช่วงอุณหภูมิ 45-110 องศาเซลเซียส มีการสูญเสียน้ำหนักเพียงเล็กน้อยเนื่องจากการระเหยของโมเลกุลน้ำ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu et al. [29] และเริ่มสลายตัวทางความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 190-250 องศาเซลเซียส จากการสลายตัวของโปรตีนขนาดเล็กของ GE องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยและโครงสร้างที่ก่อกวนพันธะของน้ำที่ถูกดูดซับอยู่บน

โมเลกุลขนาดใหญ่ของ GE และ CMC (Structurally bound water) และที่อุณหภูมิระหว่าง 280-400 องศาเซลเซียส จากการสลายตัวของโครงสร้างอะโรมาติกที่มีความเสถียรสูงของ น้ำมันหอมระเหยและโปรตีนขนาดใหญ่ของ GE สอดคล้องกับ งานวิจัยของ Shahbazi et al. [30] และ Hosseini et al. [31] โดย GE-CMC-EO มีน้ำหนักลดลงเหลือร้อยละ 37.93 ซึ่งลดลงอย่างรวดเร็วมากกว่า GE-CMC-EO-TA ที่มีน้ำหนักลดลงเหลือร้อยละ 48.43 จะเห็นได้ว่าการเติม TA ลงไปจะทำให้ ไมโครแคปซูลเสถียรต่อความร้อนได้ดีกว่าและปลดปล่อย น้ำมันหอมระเหยได้ช้ากว่า ทั้งนี้เพราะ TA จะทำหน้าที่เป็น Crosslinking agent ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันจำนวนมากที่สามารถเกิด

พันธะไฮโดรเจนกับหมู่คาร์บอนิลและหมู่ไฮดรอกซิลของ สารหอมหุ้ม ซึ่งทำให้สารหอมหุ้มมีโครงสร้างที่มีความแข็งแรงขึ้น กว่าเดิมจึงเสถียรต่อความร้อนสูงกว่า สอดคล้องกับงานวิจัย ของ Jia et al. [32] และ Maiti et al. [33] อีกทั้งอุณหภูมิ การสลายตัวอยู่ระหว่าง 310 ถึง 320 องศาเซลเซียส ยังบ่งบอก ถึงความเสถียรของทั้ง GE-CMC-EO และ GE-CMC-EO-TA โดยการสูญเสียน้ำหนักจะเกิดที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เป็นต้นไป สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในถุงหอมปรับอากาศได้ เนื่องจากทนต่อความร้อนสูงและช่วยรักษากลิ่นของน้ำมัน หอมระเหยไว้ให้นานขึ้น

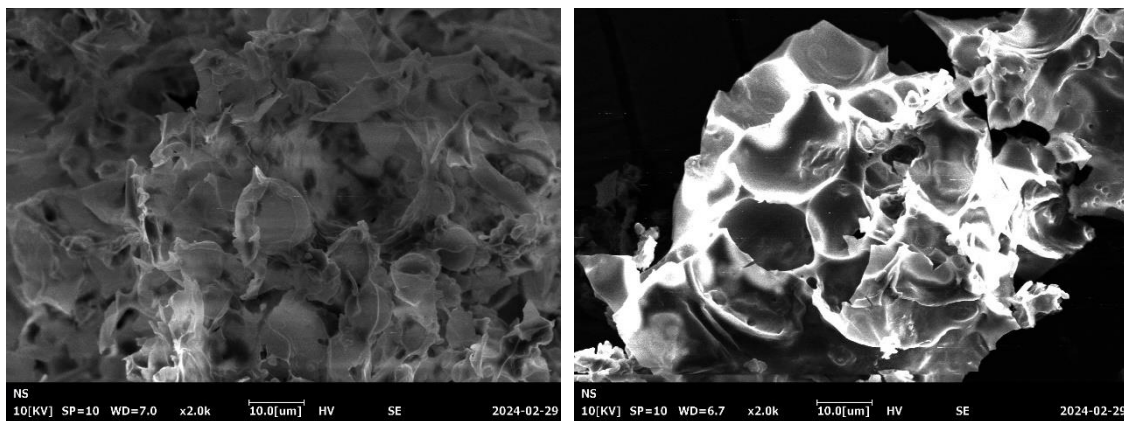


Figure 5 SEM micrographs at a magnification of 2,000x showing (A) GE-CMC-EO (1:1:1) and (B) GE-CMC-EO-TA (1:1:1:1) fabricated by simple microfluidic device

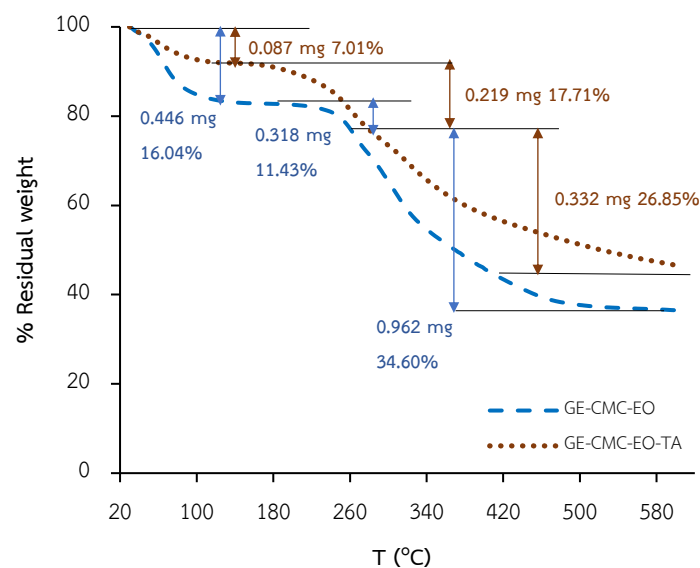


Figure 6 Thermogravimetric curves of GE-CMC-EO microcapsules and GE-CMC-EO-TA microcapsules

#### 4. บทสรุป

ในศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อกระบวนการเตรียมและการศึกษาสมบัติของไมโครแคปซูลน้ำมันหอมระเหยส้มที่สังเคราะห์ด้วยวิธีคอมเพล็กซ์โคอะเซอร์เวชันโดยใช้อุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกอย่างง่าย พบว่าสถานะที่เหมาะสมที่สุดคืออัตราส่วนโดยมวลของ GE-CMC คือ 1:1 ที่ pH 4.0 จะเกิดโคอะเซอร์เวตมากที่สุด เนื่องจาก GE มีประจุบวกและ CMC มีประจุลบ เมื่อมีอัตราส่วนเท่ากันจึงทำให้ประจุในระบบมีความสมดุลมากที่สุด อัตราส่วนโดยมวลของ GE-CMC-EO คือ 1:1:1 เมื่อมีส่วนของพอลิเมอร์ที่ทำหน้าที่เป็นสารห่อหุ้มที่มากกว่าน้ำมันหอมระเหยที่เป็นสารแกนกลาง จะทำให้เกิดโครงสร้างของไมโครแคปซูลที่สามารถกักเก็บน้ำมันหอมระเหยได้ดี และความเข้มข้นของ TA ร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตรทำให้เกิดความคงตัวของอิมัลชันที่สมบูรณ์ โดย GE-CMC-EO-TA จะมีผนังที่หนาและแข็งแรงกว่า GE-CMC-EO ทั้งนี้เพราะ TA จะเกิดพันธะเชื่อมขวางกับพันธะ O-H ระหว่าง GE-CMC-EO และยังพบว่า การเติม TA ลงไปจะทำให้ไมโครแคปซูลเสถียรต่อความร้อนได้ดีกว่า แสดงว่าช่วยเก็บรักษาน้ำมันหอมระเหยไม่ให้สูญเสียกลิ่นหรือเสื่อมสภาพจากปัจจัยแวดล้อมภายนอก

การประยุกต์ใช้งานไมโครแคปซูลน้ำมันหอมระเหยส้มที่ผลิตได้ เช่น ใช้ในถุงหอมปรับอากาศ โดยผู้ใช้งานสามารถถุงหอมปรับอากาศเบา ๆ ให้น้ำมันไมโครแคปซูลแตกออก กลิ่นส้มจะปลดปล่อยออกมาเพื่อดับกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์หรือช่วยในการผ่อนคลายความเครียด โดยการทำเป็นไมโครแคปซูลน้ำมันหอมระเหยจะทำให้สามารถเก็บไว้ได้นานหากยังไม่ต้องการใช้งาน

#### 5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณเพื่อสนับสนุนงานมูลฐาน (Fundamental Fund) ปีงบประมาณ 2566 และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ

#### 6. References

- [1] Benavides, S. and et al. 2016. Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. **Food Chemistry**. 204: 77-83.
- [2] Rojas-Moreno, S. and et al. 2018. Effect of the cross-linking agent and drying method on encapsulation efficiency of orange essential oil by complex coacervation using whey protein isolate with different polysaccharides. **Journal of Microencapsulation**. 35(2): 165-180.
- [3] Rojas-Moreno, S. and et al. 2018. Effects of complex coacervation-spray drying and conventional spray drying on the quality of microencapsulated orange essential oil. **Journal of Food Measurement and Characterization**. 12(1): 650-660.
- [4] Aguiar, M.C.S. and et al. 2020. Evaluation of the Microencapsulation of Orange Essential Oil in Biopolymers by using a Spray-drying Process. **Scientific Reports**. 10(1): 1-11.
- [5] Razola-Díaz, M.D.C. and et al. 2021. Recent developments in extraction and encapsulation techniques of orange essential oil. **Food Chemistry**. 354: 1-13.
- [6] Tavassoli-Kafrani, E., Goli, S.A.H. and Fathi, M. 2018. Encapsulation of orange essential oil using cross-linked electrospun gelatin nanofibers. **Food and Bioprocess Technology**. 11: 427-434.
- [7] Fekadu, T., Seifu, T. and Abera, A. 2019. Extraction of essential oil from orange peel using different methods and effect of solvents, time, temperature to maximize yield. **International Journal of Engineering Science and Computing**. 9(12): 24300-24308.
- [8] Turasan, H., Sahin, S. and Sumnu, G. 2015. Encapsulation of rosemary essential oil. **LWT-Food Science and Technology**. 64(1): 112-119.
- [9] de Kruif, C.G., Weinbreck, F. and de Vries, R. 2004. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. 9(5): 340-349.

- [10] Chen, K. and et al. 2014. Quinoa protein isolate-gum Arabic coacervates cross-linked with sodium tripolyphosphate: Characterization, environmental stability, and Sichuan pepper essential oil microencapsulation. **Food Chemistry**. 404(Part A): 1-10.
- [11] Naderi, B. and et al. 2020. Complex coacervation between oak protein isolate and gum Arabic: optimization & functional characterization. **International Journal of Food Properties**. 23(1): 1854-1873.
- [12] Muhoza, B. and et al. 2022. Combined plant protein modification and complex coacervation as a sustainable strategy to produce coacervates encapsulating bioactives. **Food Hydrocolloids**. 124(Part B): 1-19.
- [13] Jia, C. and et al. 2020. Tannic acid-assisted cross-linked nanoparticles as a delivery system of eugenol: The characterization, thermal degradation and antioxidant properties. **Food Hydrocolloids**. 104(1): 1-13.
- [14] Marquis, M. and et al. 2016. Microfluidic encapsulation of pickering oil microdroplets into alginate microgels for lipophilic compound delivery. **American Chemical Society Biomaterials Science & Engineering**. 2(4): 535-543.
- [15] Yao, J. and et al. 2019. The effect of oil viscosity on droplet generation rate and droplet size in a T-junction microfluidic droplet generator. **Micromachines**. 10(12): 1-8.
- [16] Lv, Y. and et al. 2014. Formation of heat-resistant nanocapsules of jasmine essential oil via gelatin/gum arabic based complex coacervation. **Food Hydrocolloids**. 35: 305-314.
- [17] Muhoza, B. and et al. 2019. Gelatin and pectin complex coacervates as carriers for cinnamaldehyde: Effect of pectin esterification degree on coacervate formation, and enhanced thermal stability. **Food Hydrocolloids**. 87: 712-722.
- [18] Patrick, K.E. and Ntsama, I.S.B. 2014. Optimization process by complex coacervation of fish oil using gelatin/SDS/NaCMC and secondary coating application with sodium polyphosphate. **International Journal of Sciences: Basic and Applied Research**. 17(1): 74-94.
- [19] Moldoveanu, S.C. and David, V. 2017. **Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis**. Amsterdam: Elsevier.
- [20] Guo, Q. and et al. 2022. Formulation and characterization of microcapsules encapsulating carvacrol using complex coacervation crosslinked with tannic acid. **LWT-Food Science and Technology**. 165: 1-10.
- [21] Ji, F. and et al. 2022. Effects of relative molecular weight distribution and isoelectric point on the swelling behavior of gelatin films. **Frontiers in Chemistry**. 10: 1-9.
- [22] Li, D. and et al. 2022. Superior environmental stability of gelatin/CMC complex coacervated microcapsules via chitosan electrostatic modification. **Food Hydrocolloids**. 124(Part B): 1-10.
- [23] Zhang, J. and et al. 2021. Nanoencapsulation of zeaxanthin extracted from Lycium barbarum L. by complex coacervation with gelatin and CMC. **Food Hydrocolloids**. 112: 1-10.
- [24] Liu, Y. and Jiang, J. 2023. Preparation of  $\beta$ -ionone microcapsules by gelatin/pectin complex coacervation. **Carbohydrate Polymers**. 312: 1-12.
- [25] Dai, L. and et al. 2018. Characterization of Pickering emulsion gels stabilized by zein/gum arabic complex colloidal nanoparticles. **Food Hydrocolloids**. 74: 239-248.
- [26] Tran, T.T.V. and et al. 2023. Gelatin/carboxymethyl cellulose edible films: modification of physical properties by different hydrocolloids and application in beef preservation in combination with shallot waste powder. **Royal Society of Chemistry Advances**. 13(15): 10005-10014.

- [27] Alexandre, J.B. and et al. 2019. Cross-linked coacervates of cashew gum and gelatin in the encapsulation of pequi oil. **Food Technology**. 49(12): 1-12.
- [28] Karagozlu, M. and et al. 2021. Effect of tannic acid concentration on the physicochemical, thermal, and antioxidant properties of gelatin/gum arabic-walled microcapsules containing *Origanum onites* L. essential oil. **Food and Bioprocess Technology**. 14(8): 1231-1243.
- [29] Liu, B. and et al. 2021. Complex coacervates based on gelatin and sodium carboxymethyl cellulose as carriers for cinnamaldehyde: Effect of gelatin Bloom values on coacervates formation and interfacial properties. **Food Bioscience**. 44(Part A): 1-10.
- [30] Shahbazi, Y. and et al. 2021. Electrospun carboxymethyl cellulose-gelatin nanofibrous films encapsulated with *Mentha longifolia* L. essential oil for active packaging of peeled giant freshwater prawn. **LWT-Food Science and Technology**. 152: 1-15.
- [31] Hosseini, S.F. and et al. 2016. Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. **Food Chemistry**. 194: 1266-1274.
- [32] Jia, C. and et al. 2020. Tannic acid-assisted cross-linked nanoparticles as a delivery system of eugenol: The characterization, thermal degradation and antioxidant properties. **Food Hydrocolloids**. 104: 1-13.
- [33] Maiti, S., Maji, B. and Yadav, H. 2024. Progress on green crosslinking of polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**. 326: 1-28.