

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 วิธีวิจัย

โครงการวิจัยนี้แบ่งการดำเนินงานออกเป็น 4 กิจกรรมหลัก ได้แก่ 1) การพัฒนาผลิตภัณฑ์เมล็ดกาแฟโครงการหลวงรูปแบบใหม่เสริมสารสกัดจากธรรมชาติด้วยเทคโนโลยีการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศ 2) การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารประกอบพันธะเชื่อมจากเมล็ดกาแฟอบกับกากโครงการหลวง 3) การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากผลพลอยได้เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตกาแฟ และ 4) การศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนาเยื่อเซลลูโลสสำหรับวัสดุกรองกาแฟหรือบรรจุภัณฑ์จากกะลากาแฟและกากกาแฟ โดยแต่ละกิจกรรมมีการดำเนินงาน 3 ปี สำหรับรายละเอียดของแต่ละกิจกรรมในแต่ละปีมีดังต่อไปนี้

กิจกรรมที่ 1 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เมล็ดกาแฟโครงการหลวงรูปแบบใหม่เสริมสารสกัดจากธรรมชาติด้วยเทคโนโลยีการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศ

1.1 ตัวอย่างกาแฟเมล็ด (Green beans)

เตรียมวัตถุดิบเมล็ดกาแฟ โดยใช้เมล็ดกาแฟดิบ หรือ Green beans ตามมาตรฐานของมูลนิธิโครงการหลวง

1.2 การผลิตสารไอโซฟลาโวนอะไกลโคนและสารกาบา

โดยประยุกต์ใช้องค์ความรู้เดิมที่ได้ศึกษามาแล้ว โดยผลิตสารไอโซฟลาโวนจากจมูกถั่วเหลืองตามวิธีของไพโรจน์และคณะ (2555) และผลิตสารกาบาจากหอมหัวใหญ่ตามวิธีของเรวัตรและคณะ (2561) ดังนี้

- การผลิตสารไอโซฟลาโวนจากจมูกถั่วเหลือง โดยนำจมูกถั่วเหลืองมาแช่น้ำเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นึ่งด้วยไอน้ำเป็นเวลา 3 ชั่วโมง บรรจุในถุงโพลีเอทิลีนขณะร้อนปิดปากถุงด้วยส้อมแล้วรอจนอุณหภูมิลดลงต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเชื้อบริสุทธิ์ *Bacillus coagulans* PR03 ร้อยละ 1 ของปริมาณจมูกถั่วเหลืองสุก บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง จึงนำจมูกถั่วเหลืองมาสกัดสารไอโซฟลาโวนด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 ด้วยเครื่องสกัดคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายที่ได้มาระเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศจะได้สารสกัดไอโซฟลาโวน เก็บตัวอย่างวิเคราะห์หาปริมาณไอโซฟลาโวนตามวิธีของ Klejdus *et al.* (2004)

- การผลิตสารกาบาจากหอมหัวใหญ่ โดยนำหอมหัวใหญ่มานั่นให้ละเอียดและปั่นผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 นำเข้าเครื่องฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที รอจนอุณหภูมิลดลงต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเชื้อบริสุทธิ์ *Micrococcus varians* ร้อยละ 10 ของสารละลาย บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน จึงนำมากรองแยกกาก จะได้สารสกัดกาบา เก็บตัวอย่างวิเคราะห์หาปริมาณกาบาตามวิธีของ Lu *et al.* (2008)

1.3 การศึกษาการสกัดสารคาเทชินจากใบชาเขียวด้วยน้ำ

1) การศึกษาการสกัดสารคาเทชินจากใบชาเขียวด้วยน้ำจะทำการผันแปรปัจจัยในการสกัด 3 ปัจจัย ได้แก่

- อุณหภูมิ	50-90	องศาเซลเซียส
- เวลาสกัด	10-60	นาที
- อัตราส่วนใบชาต่อน้ำ	1:10-1:250	

2) วางแผนการทดลองแบบ 2^3 Factorial experiment design with 3 center points (ไพโรจน์, 2555) ดังตารางที่ 3.1

3) นำสารสกัดที่ได้ในแต่ละหน่วยทดลองมาวิเคราะห์หาปริมาณคาเทชินตามวิธีของ Adnan *et al.* (2013) และนำผลที่ได้มาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารสกัดคาเทชินด้วยวิธีออกแบบพื้นที่ตอบสนอง (response surface methodology; RSM) ตามวิธีของไพโรจน์ (2555)

ตารางที่ 3.1 แผนการทดลองแบบ 2^3 Factorial experiment design with 3 center points ในการสกัดสารคาเทชินจากใบชาเขียวด้วยน้ำ

สิ่งทดลอง	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลาสกัด (นาที)	อัตราส่วนใบชาต่อน้ำ
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
ระดับต่ำ (-1)	50	10	1:10
ระดับกลาง (0)	70	35	1:130
ระดับสูง (1)	90	60	1:250

1.4 การศึกษาการออกแบบส่วนผสมของระบบสารละลายสารสกัดจากธรรมชาติ

1) การศึกษาการออกแบบส่วนผสมของระบบสารละลายสารสกัดจากธรรมชาติจะทำการผันแปรสารละลาย 3 ชนิด ได้แก่

- สารไอโซฟลาโวน	ร้อยละ 20-60
- สารกาบา	ร้อยละ 20-60
- สารคาเทชิน	ร้อยละ 20-60

2) วางแผนการทดลองแบบ Mixture design (ไพโรจน์, 2555) ดังตารางที่ 3.2 โดยนำส่วนผสมสารละลายแต่ละสูตรเสริมเข้าในเมล็ดกาแฟราบีก้าดิบด้วยเทคโนโลยีการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศที่ระดับความดัน -0.5 บาร์ ระยะเวลาคงความดัน 30 นาที ระยะเวลาแช่ที่ความดันบรรยากาศ 30 นาที นำเมล็ดกาแฟที่ผ่านกระบวนการไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนความชื้นไม่เกินร้อยละ 10

ตารางที่ 3.2 แผนการทดลองแบบ Mixture design ในการออกแบบส่วนผสมของระบบสารละลาย สารสกัดจากธรรมชาติ

สิ่งทดลอง	สารไอโซฟลาโวน (ร้อยละ)	สารกาบา (ร้อยละ)	สารคาเทชิน (ร้อยละ)
1	60.00	20.00	20.00
2	20.00	60.00	20.00
3	20.00	20.00	60.00
4	40.00	40.00	20.00
5	40.00	20.00	40.00
6	20.00	40.00	40.00
7	33.33	33.33	33.34
8	46.66	26.67	26.67
9	26.67	46.66	26.67
10	26.67	26.67	46.66

3) เก็บตัวอย่างเมล็ดกาแฟดิบมาวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวน (Klejdus *et al.*, 2004) กาบา (Lu *et al.*, 2008) และคาเทชิน (Singh *et al.*, 1999)

4) นำผลการทดลองมาหาส่วนผสมของระบบสารละลายที่เหมาะสมโดยวิธีการออกแบบพื้นที่ตอบสนอง (response surface methodology; RSM) ตามวิธีของไพโรจน์ (2555) และคัดเลือกส่วนผสมของระบบสารละลายที่เหมาะสมไปใช้ในการทดลองต่อไป

1.5 การศึกษากระบวนการแทรกซึมภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการเสริมสารไอโซฟลาโวน สารกาบาและสารเคเทชินในเมล็ดกาแฟอาราบิก้าดิบ

1) ในการศึกษากระบวนการแทรกซึมภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการเสริมสารสกัดจากธรรมชาติจากข้อ 1.4 จะทำการผันแปรปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 3 ปัจจัย ดังนี้

รหัส	ระดับความดันสุญญากาศ (บาร์)	ระยะเวลาคงความดัน (นาทีก)	ระยะเวลาแช่ที่ความดัน บรรยากาศ (นาทีก)
A	0	0	0
B	-0.4	30	30
C	-0.8	60	60

**หมายเหตุ A คือเมล็ดกาแฟดิบตั้งต้น ที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการแทรกซึมภายใต้สภาวะสุญญากาศ

2) วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนำเมล็ดกาแฟที่ผ่านกระบวนการไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนความชื้นไม่เกินร้อยละ 10

3) เก็บตัวอย่างเมล็ดกาแฟดิบมาวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวน (Klejdus *et al.*, 2004) กาบา (Lu *et al.*, 2008) และคาเทชิน (Adnan *et al.*, 2013) และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยหาความแปรปรวนโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ของปริมาณสารต่างๆ ที่เติมลงไปเมล็ดกาแฟดิบ

4) เมล็ดกาแฟดิบที่ผ่านการเสริมสารไอโซฟลาโวน กาบาและคาเทชินด้วยกระบวนการแทรกซึมภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจะถูกนำไปศึกษาวิจัยในการดำเนินงานในปีที่ 2 คือ การศึกษาระดับการคั่วที่เหมาะสมและการศึกษาเอกลักษณ์ทางกลิ่นรสของกาแฟต่อไป

กิจกรรมที่ 2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารประกอบพันธะเชื่อมจากเมล็ดกาแฟอาราบิก้าดิบโครงการหลวง

2.1 การศึกษากระบวนการผลิตสารประกอบพันธะเชื่อมจากเมล็ดกาแฟดิบที่เหมาะสม

1) นำตัวอย่างเมล็ดกาแฟดิบบดให้มีอนุภาคขนาด 0.5-1 มิลลิเมตร และทำการสกัดโดยใช้ น้ำกลั่นในอัตราส่วนผงเมล็ดกาแฟต่อน้ำ 1 ต่อ 4 โดยน้ำหนัก โดยใช้คลื่นอัลตราโซนิกเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2) นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 1) มาศึกษาผลของปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารประกอบพันธะเชื่อม โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely randomized design (CRD) แปรผันกระบวนการในการผลิตสารประกอบพันธะเชื่อม 4 วิธี ได้แก่ การใช้ความร้อนแบบเปียก (wet process) การใช้แรงดันสูง (high pressure) การใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ (pulse electric field) และเทคโนโลยีพลาสมา (plasma technology) ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แผนการทดลองการพัฒนาระบวนการผลิตสารประกอบพันธะเชื่อมที่เหมาะสม

สิ่งทดลอง	ปัจจัย	สถานะ
1	ตัวอย่างควบคุม (pH5.73)	อัลตราโซนิก 30 นาที อุณหภูมิห้อง (ดัดแปลงจาก Natnoi and Pirak (2019))
2	ตัวอย่างควบคุม (pH9)	อัลตราโซนิก 30 นาที อุณหภูมิห้อง ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วย 1N NaOH (ดัดแปลงจาก Kroll <i>et al.</i> (2003))
3	การให้ความร้อนแบบเปียก (wet process)	95 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Mu <i>et al.</i> (2011))
4	แรงดันสูง	121 องศาเซลเซียส 40 นาที (ดัดแปลงจาก Imran <i>et al.</i> (2016))
5	สนามไฟฟ้าแบบพัลส์	2500 V/cm, Pulse length 10 μ s, 100 pulse (ดัดแปลงจาก Nowacka <i>et al.</i> (2019))
6	เทคโนโลยีพลาสมา	อากาศ 30 นาที (ดัดแปลงจาก Eto <i>et al.</i> (2008))

3) ทดลองเก็บตัวอย่างของแต่ละวิธีโดยนำสารที่สกัดได้มากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 แล้วนำมาวิเคราะห์หา

- ปริมาณกรดคลอโรจีนิก (chlorogenic acids) โดย HPLC ตามวิธีการของ Budryn *et al.* (2009)
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดย DNS method (Miller, 1959)
- ปริมาณโปรตีนและลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence) โดย HPLC (AOAC 2000)
- ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compound) ตามวิธีการของ Oluwakemi *et al.* (2017)
- ค่าการต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH radical scavenging activity assay ตามวิธีการของ Naidu *et al.* (2008)
- น้ำหนักของพอลิเปปไทด์และความบริสุทธิ์ของโปรตีน โดย Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

4) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยหาความแปรปรวนโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และคัดเลือกกระบวนการผลิตสารประกอบพันธะเชื่อมที่เหมาะสม

2.2 การพัฒนาระบวนการผลิตสารประกอบพันธะเชื่อมที่เหมาะสม

1) ทำการสกัดสารสำคัญจากเมล็ดกาแฟดิบตามวิธีการที่เหมาะสมในข้อที่ 2.1 โดยวิธีการให้ความร้อนแบบเปียก (wet process) ทำการแปรผันปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 3 ปัจจัย ได้แก่

- ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5 - 9
- อุณหภูมิ 70 - 90 องศาเซลเซียส
- ระยะเวลา 1 - 3 วัน

วางแผนการทดลองแบบ 2^3 Factorial experiment design with 3 center points (ไพโรจน์, 2555) ดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 แผนการทดลองแบบ 2^3 Factorial experiment design with 3 center points ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกโดยวิธีการให้ความร้อนแบบเปียก (wet process)

สิ่งทดลอง	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา (วัน)
1	5.00	70	1
2	9.00	90	1
3	5.00	70	1
4	9.00	90	1
5	5.00	70	3
6	9.00	90	3
7	5.00	70	3
8	9.00	90	3
9	7.00	80	2
10	7.00	80	2
11	7.00	80	2
ระดับต่ำ (-1)	5.00	70	1
ระดับกลาง (0)	7.00	80	2
ระดับสูง (1)	9.00	90	3

2) ทำการเก็บตัวอย่างของแต่ละวิธีโดยนำสารที่สกัดได้มากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 แล้วนำมาวิเคราะห์หา

- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดย DNS method (Miller, 1959)
- ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compound) ตามวิธีการของ Oluwakemi *et al.* (2017)
- ค่าการต้านออกซิเดชันด้วย DPPH radical scavenging activity assay ตามวิธีการของ Naidu *et al.* (2008)
- ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid) โดย OPA assay ตามวิธีของ Martinez-Alvarenga *et al.* (2014)
- น้ำหนักของพอลิเปปไทด์และความบริสุทธิ์ของโปรตีน โดย Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

3) วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ด้วยวิธีออกแบบพื้นที่ตอบสนอง (response surface methodology; RSM) ตามวิธีของไพโรจน์ (2555) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารประกอบฟีนอลิก

กิจกรรมที่ 3 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพจากกากกาแฟ

3.1 การศึกษาการเตรียมกากกาแฟที่เหมาะสมสำหรับนำไปสกัดน้ำมันจากกากกาแฟ

1) ทำการศึกษากากกาแฟจากการคั่วเมล็ดกาแฟระดับต่างๆ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely randomized design (CRD) แปรผันระดับการคั่วเมล็ดกาแฟ 4 ระดับ ทำการทดลอง 3 ซ้ำได้แก่

สิ่งทดลองที่ 1 ระดับอ่อน (light roast level)

สิ่งทดลองที่ 2 ระดับกลาง (medium roast level)

สิ่งทดลองที่ 3 ระดับเข้ม (dark roasted level)

สิ่งทดลองที่ 4 ระดับเข้มมาก (very dark roasted level)

2) นำเมล็ดกาแฟคั่วที่ระดับต่างๆ มาทำการบดและชงด้วยเครื่องชงแบบเอสเพรสโซ

3) นำกากกาแฟแต่ละระดับการคั่วที่ได้จากการชงมาลดความชื้นจนเหลือน้อยกว่าร้อยละ 15

4) ทำการสกัดน้ำมันจากกากกาแฟด้วยสารละลายเฮกเซนอัตราส่วน 1:2 โดยปริมาตร นำเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำไปประเหยสารละลายเฮกเซนออกด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ

5) นำน้ำมันที่ได้จากการสกัดและกากกาแฟหลังสกัดมาวิเคราะห์คุณภาพ ดังนี้

- ค่าสี (L^* , a^* และ b^*) ด้วยเครื่องวัดสี (Konica-Minolta: CR-410, Japan)
- ความชื้น (AOAC, 2000)
- ไขมัน (AOAC, 2000)
- ปริมาณไดเทอร์พีนส์ ด้วย HPLC (Barbosa *et al.*, 2014)
- ปริมาณสารประกอบฟีนอล และสมบัติการต้านออกซิเดชัน

6) นำผลการทดลองมาทำคัดเลือกระดับการคั่วเมล็ดกาแฟที่เหมาะสมสำหรับนำกากกาแฟไปสกัดน้ำมันในข้อ 3.2

3.2 การศึกษากระบวนการสกัดที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันจากกากกาแฟ

1) การเตรียมตัวอย่างกากกาแฟโดยวิธีที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1

2) ทำการศึกษาวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันจากกากกาแฟด้วยวิธีการสกัด 3 วิธี ได้แก่

วิธีที่ 1 การสกัดแบบใช้ชุดกลั่นซอกท์เลตร่วมกับตัวทำละลายเฮกเซน โดยใช้ n-Hexane เป็นตัวทำละลาย ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

วิธีที่ 2 การสกัดแบบต้มกลั่น โดยผันแปรระยะเวลาในการสกัดที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

สิ่งทดลองที่ 1 ระยะเวลาสกัด 1 ชั่วโมง

สิ่งทดลองที่ 2 ระยะเวลาสกัด 2 ชั่วโมง

สิ่งทดลองที่ 3 ระยะเวลาสกัด 3 ชั่วโมง

สิ่งทดลองที่ 4 ระยะเวลาสกัด 4 ชั่วโมง

สิ่งทดลองที่ 5	ระยะเวลาสกัด	5 ชั่วโมง
สิ่งทดลองที่ 6	ระยะเวลาสกัด	6 ชั่วโมง
สิ่งทดลองที่ 7	ระยะเวลาสกัด	7 ชั่วโมง
สิ่งทดลองที่ 8	ระยะเวลาสกัด	8 ชั่วโมง

วิธีที่ 3 วิธีการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ภายใต้สภาวะวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical carbon dioxide extraction, SC-CO₂) โดยผันแปร 2 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิในการสกัด 35-65 องศาเซลเซียส และความดันในการสกัด 100-200 บาร์ วางแผนการทดลองแบบ 2² Factorial experiment design with 2 center points (ไพโรจน์, 2555) ดังตารางที่ 3.5

3) นำน้ำมันที่สกัดได้มาวิเคราะห์คุณภาพ ดังนี้

- วัดปริมาณน้ำมันจากกากกาแฟที่สกัดได้ (yield)
- วิเคราะห์หาปริมาณไคโธเทอรปีนส์ในน้ำมันจากกากกาแฟด้วย HPLC (Barbosa *et al.*, 2014)

4) นำผลการทดลองมาคัดเลือกกระบวนการสกัดน้ำมันจากกากกาแฟที่เหมาะสม และนำกากหลังสกัดไปทำการทดลองในข้อ 3.3 ต่อไป

ตารางที่ 3.5 แผนการทดลองแบบ 2² Factorial experiment design with 2 center points ในการสกัดน้ำมันจากกากกาแฟด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ภายใต้สภาวะวิกฤตยิ่งยวด

สิ่งทดลอง	อุณหภูมิในการสกัด (องศาเซลเซียส)	ความดันในการสกัด (บาร์)
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0
6	0	0
ระดับต่ำ (-1)	35	100
ระดับกลาง (0)	50	150
ระดับสูง (1)	65	200

3.3 การศึกษากระบวนการสกัดที่เหมาะสมในการสกัดสารที่ยังคงเหลือในกากกาแฟหลังสกัดน้ำมัน

1) กากกาแฟหลังสกัดน้ำมันจากข้อ 3.2 จะถูกนำมาสกัดสารที่ยังคงเหลืออยู่ในกากกาแฟ 2 วิธี

- การสกัดด้วยน้ำ แปรผันอุณหภูมิและเวลาในการสกัดที่ 30-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-120 นาที วางแผนการทดลองแบบ 2^2 Factorial experiment design with 2 center points (ไพโรจน์, 2555) ดังตารางที่ 3.6

- วิธีการสกัดด้วยเอทานอล แปรความเข้มข้นของเอทานอล ร้อยละ 40, 60, 80 และ 95 ตามลำดับวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2) นำสารสกัดที่ได้จาก 1) มาวิเคราะห์คุณภาพ ดังนี้

- ค่าสี (L^* , a^* และ b^*) ด้วยเครื่องวัดสี (Konica-Minolta: CR-410, Japan)
- ความชื้น (AOAC, 2000)
- ไขมัน (AOAC, 2000)
- ปริมาณสารประกอบฟีนอล และสมบัติการต้านออกซิเดชัน

ตารางที่ 3.6 แผนการทดลองแบบ 2^2 Factorial experiment design with 2 center points ในการสกัดกากกาแฟด้วยน้ำ

สิ่งทดลอง	อุณหภูมิในการสกัด (องศาเซลเซียส)	เวลาในการสกัด (นาที)
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0
6	0	0
ระดับต่ำ (-1)	30	30
ระดับกลาง (0)	65	75
ระดับสูง (1)	100	120

3) นำผลการทดลองที่ได้มาประเมินความเป็นไปได้ของกระบวนการทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพของสารที่สกัดได้และต้นทุน หากมีความเป็นไปได้ในการผลิตในเชิงการค้า สารสกัดที่ได้จะถูกนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสารอาหารสูงจากสารสกัดกากกาแฟ และหากไม่มีความคุ้มค่าในการนำไปใช้ประโยชน์ กากกาแฟที่ได้จะถูกนำไปใช้ศึกษาในกิจกรรมที่ 4 ต่อไป

กิจกรรมที่ 4 การศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนาเยื่อเซลลูโลสสำหรับวัสดุกรองกาแฟหรือบรรจุภัณฑ์จากกะลากาแฟและกากกาแฟ

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกะลากาแฟและกากกาแฟ

- 1) การเตรียมตัวอย่างกะลากาแฟ นำกะลากาแฟมาลดความชื้นจนเหลือ้น้อยกว่าร้อยละ 10 จากนั้นบดให้เป็นผง
- 2) การเตรียมตัวอย่างกากกาแฟ นำกากกาแฟมาลดความชื้นจนเหลือ้น้อยกว่าร้อยละ 15
- 3) นำตัวอย่างกะลากาแฟและกากกาแฟหลังการชงมาวิเคราะห์หาปริมาณกากใย (fiber) ปริมาณเส้นใยอาหาร (dietary fiber) ปริมาณเซลลูโลส ปริมาณเฮมิเซลลูโลส และปริมาณลิกนิน (AOAC, 2010)
- 4) นำผลการทดลองมาประเมินความเป็นไปได้ในการนำกะลากาแฟและกากกาแฟมาพัฒนาวัสดุกรองกาแฟหรือบรรจุภัณฑ์

3.2 สถานที่ดำเนินการวิจัย

- โรงคั่วกาแฟมูลนิธิโครงการหลวง
- ห้องปฏิบัติการคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

