บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

4.1 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เมล็ดกาแฟโครงการหลวงรูปแบบใหม่เสริมสารสกัดจากธรรมชาติด้วยเทคโนโลยีการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศ

4.1.1 ตัวอย่างเมล็ดกาแฟ (Green beans)

ตัวอย่างเมล็ดกาแฟดิบจากมูลนิธิโครงการหลวง ดังภาพที่ 4.1

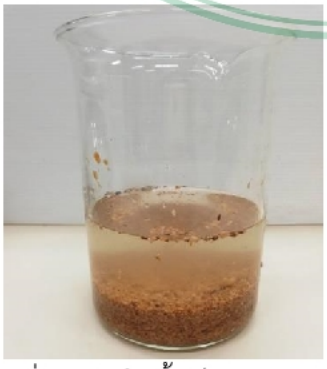
ภาพที่ 4.1 ตัวอย่างเมล็ดกาแฟดิบจากมูลนิธิโครงการหลวง

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

4.1.2 การผลิตสารไอโซฟลาโวนและสารกาบา

1) การผลิตสารไอโซฟลาโวน

การผลิตสารไอโซฟลาโวนจากจมูกถั่วเหลืองมีกระบวนการผลิตดังต่อไปนี้ (ภาพที่ 4.2)



แช่จมูกถั่วเหลืองในน้ำเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

นึ่งด้วยไอน้ำเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

นำจมูกถั่วบรรจุถุงโพลิเอทิลีนขณะร้อนปิดปากด้วยสำลีรอจนอุณหภูมิต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส เติมเชื้อบริสุทธิ์ *Bacillus coagulans* PR03 ร้อยละ 1 บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส 120 ชั่วโมง

สกัดไอโซฟลาโวนจากจมูกถั่วเหลืองด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 ด้วยเครื่องสกัดความถี่สูง เป็นเวลา 30 นาที

นำสารละลายมาระเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ

สารไอโซฟลาโวนที่ได้นำไปวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนรวม

ภาพที่ 4.2 กระบวนการผลิตสารไอโซฟลาโวนจากจมูกถั่วเหลือง

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

สารสกัดไอโซฟลาโวนจากจมูกถั่วเหลืองที่ได้นำมาวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนตามวิธีของ Klejdus et al. (2004) ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography; HPLC) ที่ช่วงความยาวคลื่น 200-350 นาโนเมตร ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณไอโซฟลาโวนในสารไอโซฟลาโวนจากจมูกถั่วเหลือง

ไอโซฟลาโวน	ปริมาณไอโซฟลาโวน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
ไอโซฟลาโวนกลุ่มกลูโคไซด์	
ไดซิน	27.18±2.27
เจนิสทิน	111.08±14.32
ไกลซิทิน	25.21±12.81
ไอโซฟลาโวนกลุ่มกลูโคไซด์รวม	163.47±9.80
ไอโซฟลาโวนกลุ่มอะไกลโคน	
ไดซีอีน	457.37±21.50
เจนิสทีอีน	433.57±22.13
ไกลซิทีอีน	102.43±3.63
ไอโซฟลาโวนกลุ่มอะไกลโคนรวม	993.37±15.75

จากตารางที่ 4.1 พบว่า สารไอโซฟลาโวนจากจมูกถั่วเหลืองมีปริมาณสารไอโซฟลาโวนกลุ่มกลูโคไซด์ประกอบด้วย ไดซิน เจนิสทิน และไกลซิทิน เท่ากับ 27.18, 111.08 และ 25.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

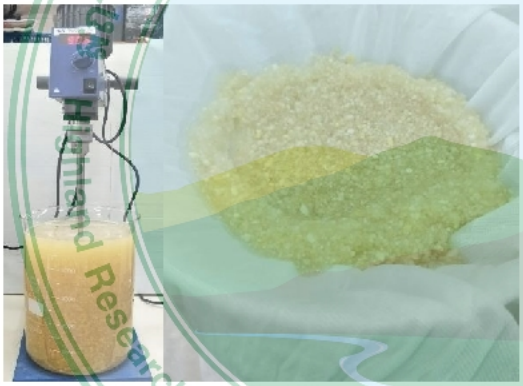
ปริมาณไอโซฟลาโวนกลุ่มอะไกลโคนประกอบด้วยไดซีอีน เจนิสทีอีน และไกลซิทีอีน เท่ากับ 457.37, 433.57 และ 102.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยพบปริมาณสารไอโซฟลาโวนรวมระหว่างกลุ่มกลูโคไซด์และกลุ่มอะไกลโคนมีปริมาณเท่ากับ 1,156.84 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2) การผลิตสารกาบา

จากต้นแบบการผลิตสารกาบาจากโครงการการพัฒนาระบบการผลิตกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกโดยเทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นระดับขยายขนาด (เรวัตร และคณะ, 2561) โดยผลิตสารกาบาจากวัตถุดิบหอมหัวใหญ่ มีขั้นตอนการผลิต ดังภาพที่ 4.3

หอมหัวใหญ่มาหั่นให้เป็นชิ้นบางๆ จากนั้นนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนความชื้นอยู่ที่ประมาณ ร้อยละ 5-6

บดหอมหัวใหญ่อบแห้งให้ละเอียดด้วยเครื่องบดผง



นำผงหอมหัวใหญ่อบแห้งผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 30 กวนผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวน เป็นระยะเวลา 10 นาที

กรองเอาเฉพาะส่วนใสด้วยผ้าขาวบาง และกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นนำส่วนที่กรองได้ไปทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศเอาน้ำออกร้อยละ 50

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

ผสมน้ำหอมหัวใหญ่ที่สกัดได้กับส่วนผสมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อตามสูตรอาหารของ เรวัตร และคณะ (2561)

เตรียมหัวเชื้อ *M. varians* โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ลงไป 6 log CFU ต่อสารสกัด 1 ลิตร ของสูตรอาหาร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงเอาเฉพาะส่วนใส ที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm/15 นาที

ได้เป็นสารละลายกาบาอย่างหยาบ (crude GABA)

ภาพที่ 4.3 กระบวนการผลิตสารกาบาจากหอมหัวใหญ่

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

โดยในงานวิจัยครั้งได้ทดสอบศึกษาในเชื้อจุลินทรีย์ คือ *M. varians* โดยทำการบ่มสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อจากสารสกัดหอมหัวใหญ่ เป็นระยะเวลา 6 วัน สุ่มตัวอย่างสารละลายทำการวิเคราะห์ปริมาณสารกาบาและปริมาณกรดกลูตามิกในสารละลายที่ผลิตได้ตามวิธีของ Shimadzu Corporation (2005) ด้วยเครื่องมือโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ได้ผลดังตารางที่ 4.2 พบว่า การใช้เชื้อ *M. varians* ในการหมักทำให้เกิดสารกาบาในสารสกัดจากหอมหัวใหญ่เท่ากับ 2.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สอดคล้องกับการศึกษาของเรวัตร และคณะ (2561) ที่ทำการศึกษาการผลิตสารกาบาจากหอมหัวใหญ่ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *M. varians* ได้สารสกัดกาบาอย่างหยาบอยู่ที่ประมาณ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสารสกัด ดังนั้น จึงคัดเลือกเชื้อ *M. varians* หมักในสารสกัดจากหอมหัวใหญ่ บ่มเป็นระยะเวลา 6 วัน เพื่อใช้เป็นสารสกัดกาบาตั้งต้นในการนำไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เมล็ดกาแฟโครงการหลวงรูปแบบใหม่เสริมสารสกัดจากธรรมชาติด้วยเทคโนโลยีการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารกาบาและปริมาณกรดกลูตามิกในสารละลายจากหอมหัวใหญ่ (มิลลิกรัมต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร)

ค่าคุณภาพ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
ปริมาณสารกาบา	2.18±0.05
ปริมาณกรดกลูตามิก	0.56±0.06

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

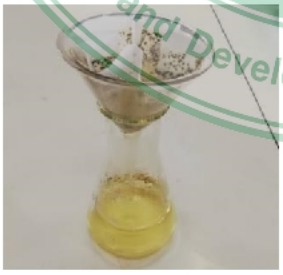
4.1.3 การศึกษาการสกัดสารคาเทชินจากใบชาเขียวด้วยน้ำ

การสกัดสารคาเทชินจากใบชาเขียวด้วยน้ำมีขั้นตอนดังภาพที่ 4.4

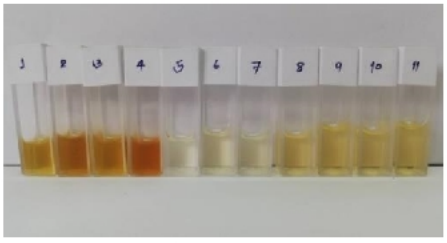
ใบชาเขียวจากโครงการหลวง

บดด้วยเครื่องบดแห้ง

สกัดสารคาเทชินจากใบชาด้วยน้ำ



กรองใบชาออก



สารสกัดคาเทชินที่ได้

ภาพที่ 4.4 ขั้นตอนการสกัดสารคาเทชินจากใบชาเขียวด้วยน้ำ

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

การศึกษาการสกัดสารคาเทชินจากใบชาเขียวด้วยน้ำจะทำการผันแปรปัจจัยในการสกัด 3 ปัจจัย ได้แก่

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

ทำการวางแผนการทดลองแบบ 2^3 Factorial experiment in central composite design (ไพโรจน์, 2555) ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แผนการทดลองแบบ 2^3 Factorial experiment design with 3 center point ในการสกัดสารคาเทชินจากใบชาเขียวด้วยน้ำ

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

นำสารสกัดที่ได้ในแต่ละหน่วยทดลองมาวิเคราะห์หาปริมาณคาเทชินและอิพิคาเทชิน ตามวิธีของ Fernaldez *et al.* (2000) ได้ผลการศึกษาดังตารางที่ 4.4 และนำผลที่ได้มาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารสกัดคาเทชินและอิพิคาเทชินด้วยวิธีออกแบบพื้นที่ตอบสนอง (response surface methodology; RSM) ตามวิธีของไพโรจน์ (2555)

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

ตารางที่ 4.4 ปริมาณคาเทชินและอิพิคาเทชินในการแปรผันอุณหภูมิ เวลา และอัตราส่วนใบชาต่อน้ำในการสกัด

สิ่งทดลอง	คาเทชิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	อิพิคาเทชิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0.00 (ND)	301.99±36.98
2	40.17±4.00	454.97±31.43
3	32.42±1.19	397.14±12.07
4	71.98±4.68	443.49±13.89
5	0.00 (ND)	20.96±1.04
6	0.00 (ND)	24.70±0.53
7	0.00 (ND)	15.96±6.11
8	0.00 (ND)	18.19±1.72
9	0.00 (ND)	34.65±3.15
10	0.00 (ND)	40.03±4.78
11	0.00 (ND)	42.78±1.99

หมายเหตุ ND หมายถึง ไม่พบในการวิเคราะห์หรือมีค่าเท่ากับ 0

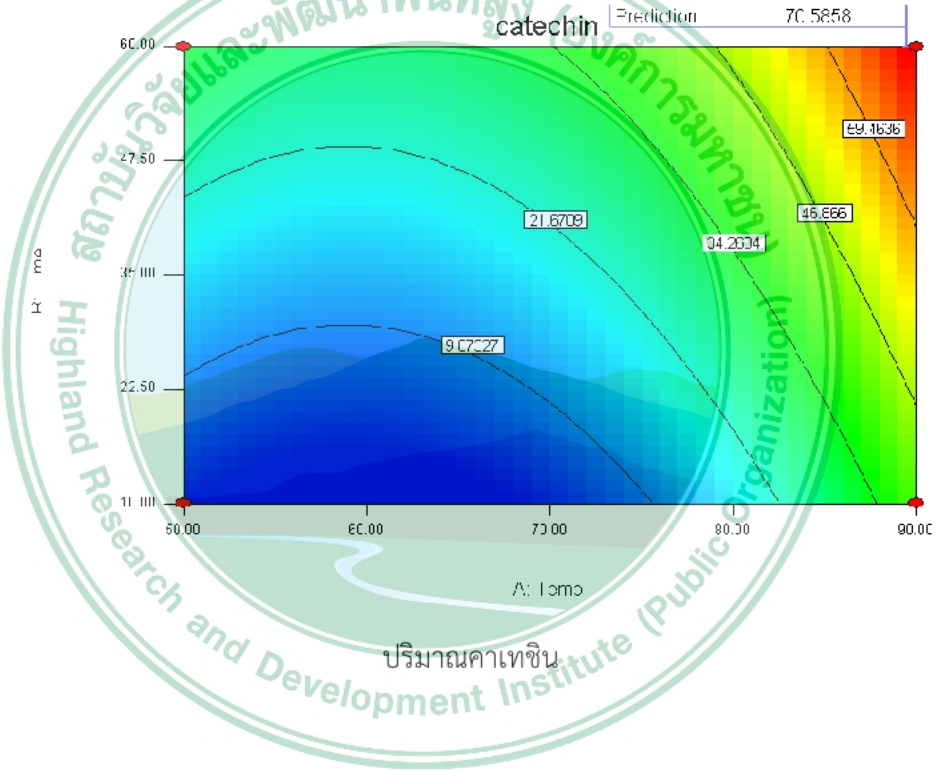
จากตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณคาเทชินและอิพิคาเทชิน พบว่า ปริมาณคาเทชินอยู่ในช่วง 0.00-71.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณอิพิคาเทชินอยู่ในช่วง 15.96-454.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปริมาณคาเทชินและอิพิคาเทชินในแต่ละสิ่งทดลองมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งอุณหภูมิและเวลาในการสกัดที่เพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณคาเทชินและอิพิคาเทชินมีค่าเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนใบชาต่อน้ำในสัดส่วนของการใช้ตัวทำละลายน้ำที่มากขึ้น ส่งผลทำให้ปริมาณสารคาเทชินและสารอิพิคาเทชินในสารสกัดนั้นมีค่าลดลง ทั้งนี้ก็เป็นไปตามสัดส่วนของชาและตัวทำละลายยิ่งมีสัดส่วนของตัวทำละลายมากขึ้นก็ส่งให้สารที่สกัดได้มีแนวโน้มเจือจางลงเช่นกัน

เมื่อนำข้อมูลที่ได้ทั้ง 10 สิ่งทดลองไปวิเคราะห์ในรูปสมการถดถอย (multiple regression) เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ เวลา และอัตราส่วนใบชาต่อน้ำในการสกัดแสดงดังตารางที่ 4.5 และพื้นที่ตอบสนองดังภาพที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 สมการความสัมพันธ์การแปรผันอุณหภูมิ เวลา และอัตราส่วนใบชาต่อน้ำในการสกัดที่มีผลต่อปริมาณคาเทชินและปริมาณอิพิคาเทชิน

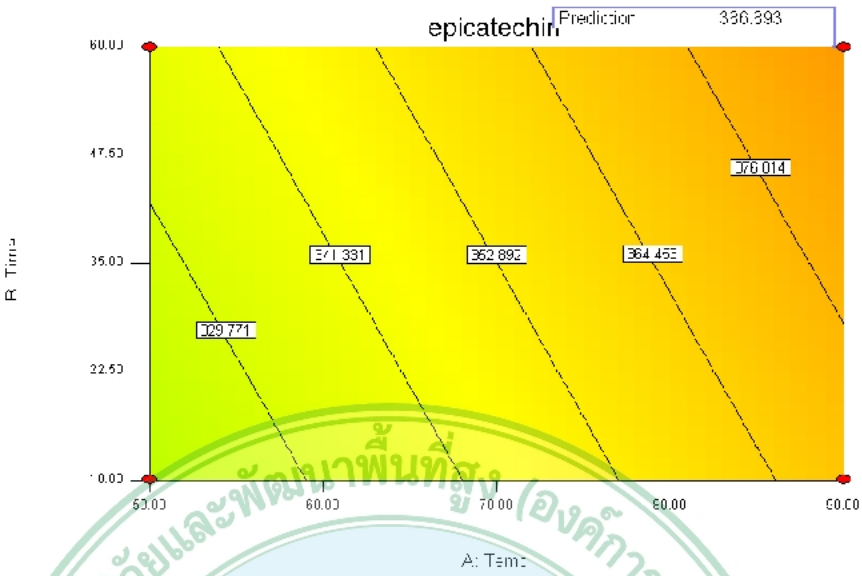
ค่าคุณภาพ	สมการความสัมพันธ์กับตัวแปร	R^2
ปริมาณคาเทชิน	9.97(A) + 8.03(B) - 18.07(C) - 0.07(A)(B) – 9.97(A)(C) - 8.03(B)(C) + 18.07$(A)^2$	0.9998
ปริมาณอิพิคาเทชิน	266.25 + 1.28(A) + 0.36(B) – 1.58(C)	0.8029

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษ A หมายถึง อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
ตัวอักษรภาษาอังกฤษ B หมายถึง เวลา (นาที)
ตัวอักษรภาษาอังกฤษ C หมายถึง อัตราส่วนใบชาต่อน้ำ



ปริมาณคาเทชิน

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)



ปริมาณอิพิคาเทชิน

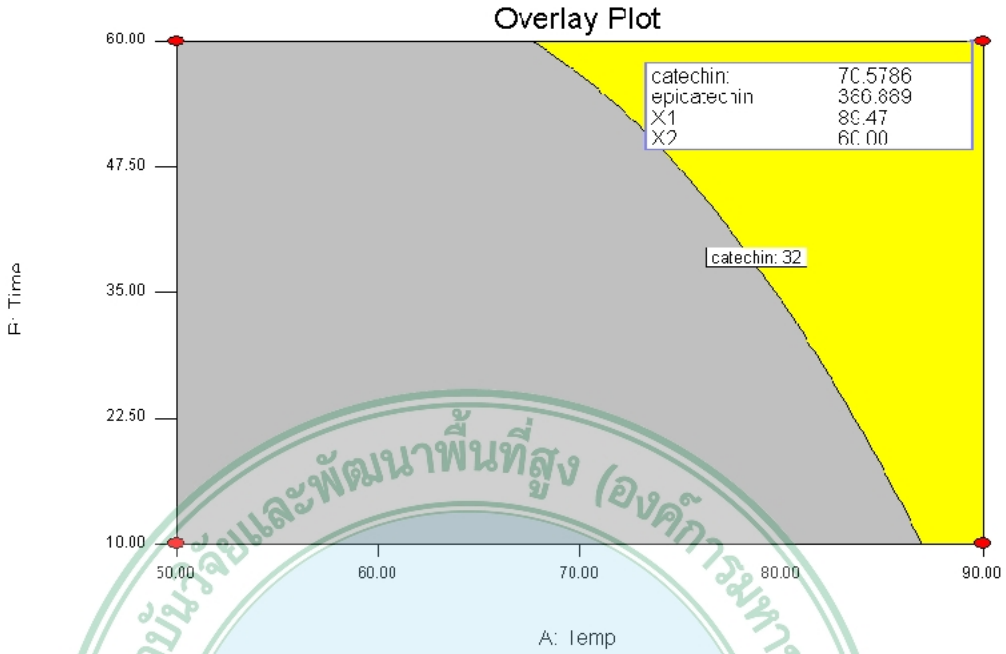
ภาพที่ 4.5 พื้นที่ตอบสนองของสมการความสัมพันธ์ของอุณหภูมิ เวลา และอัตราส่วนใบชาต่อน้ำ

เมื่อนำสมการที่ได้จากตารางที่ 4.5 มาวิเคราะห์หาอุณหภูมิ เวลา และอัตราส่วนใบชาต่อน้ำในการสกัดที่เหมาะสมโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Design Expert 7.1.0 กำหนดขอบเขตปัจจัยที่ศึกษาและขอบเขตของคุณลักษณะที่ต้องการดังตารางที่ 4.6 ได้ Overlay plot แสดงอุณหภูมิ เวลา และอัตราส่วนใบชาต่อน้ำที่เหมาะสมในการสกัดดังภาพที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ขอบเขตของปัจจัยที่ศึกษาและขอบเขตของคุณลักษณะที่ต้องการในการศึกษาอุณหภูมิ เวลา และอัตราส่วนใบชาต่อน้ำที่เหมาะสม

ปัจจัย	ขอบเขตที่กำหนด	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	หน่วย
อุณหภูมิ	ในช่วงที่ศึกษา	50	90	องศาเซลเซียส
เวลา	ในช่วงที่ศึกษา	10	60	นาที
อัตราส่วนใบชาต่อน้ำ	ในช่วงที่ศึกษา	1:10	1:250	
คุณภาพ	**ขอบเขตที่กำหนด**	**ค่าต่ำสุด**	**ค่าสูงสุด**	**หน่วย**
คาเทชิน	เข้าใกล้ค่าสูงสุด	0.00	71.98	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
อิพิคาเทชิน	เข้าใกล้ค่าสูงสุด	15.96	454.97	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)



ภาพที่ 4.6 อุณหภูมิ เวลา และอัตราส่วนใบชาต่อน้ำที่เหมาะสมในการสกัด

จากภาพที่ 4.6 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดอยู่ที่ 89.47 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการสกัด 60 นาที และอัตราส่วนใบชาต่อน้ำในการสกัดที่เหมาะสมอยู่ที่ 1:10

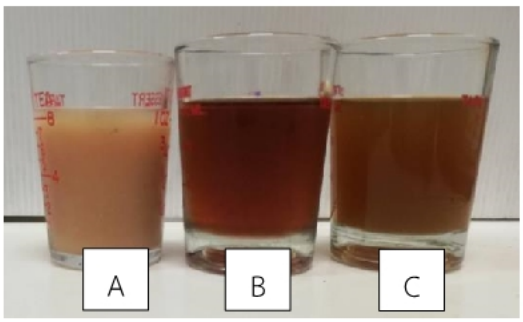
4.1.4 การศึกษาการออกแบบส่วนผสมของระบบสารละลายสารสกัดจากธรรมชาติ

การศึกษาการออกแบบส่วนผสมของระบบสารละลายสารสกัดจากธรรมชาติจะทำการผันแปรสารละลาย 3 ชนิด ได้แก่

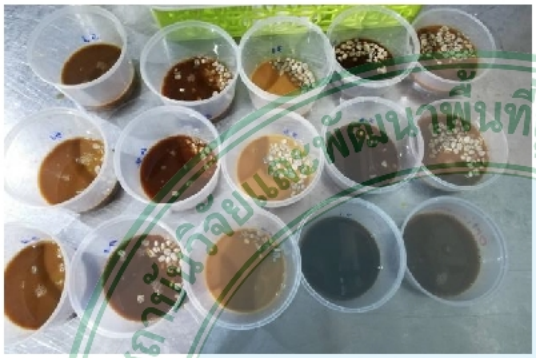
- สารไอโซฟลาโวน ร้อยละ 20-60
- สารกาบา ร้อยละ 20-60
- สารคาเทชิน ร้อยละ 20-60

วางแผนการทดลองแบบ Mixture design (ไพโรจน์, 2555) ดังตารางที่ 4.7 โดยนำส่วนผสมสารละลายแต่ละสูตรเสริมเข้าในเมล็ดกาแฟอราบิก้าดิบด้วยเทคโนโลยีการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศที่ระดับความดัน -0.5 บาร์ ระยะเวลาคงความดัน 30 นาที ระยะเวลาแช่ที่ความดันบรรยากาศ 30 นาที นำเมล็ดกาแฟที่ผ่านกระบวนการไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนความชื้นไม่เกินร้อยละ 10 ทั้งนี้ศึกษาการออกแบบส่วนผสมของระบบสารละลายมีขั้นตอนดังนี้ (ภาพที่ 4.7)

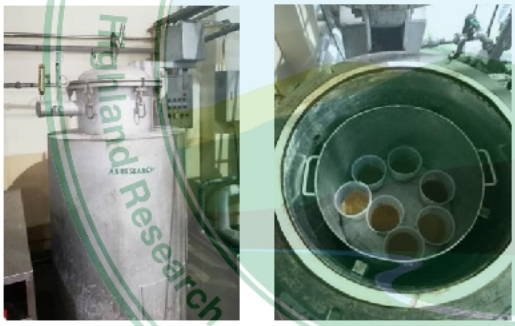
สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)



A คือ สารไอโซฟลาโวนจากจมูกถั่วเหลือง
B คือ สารกาบาจากหอมหัวใหญ่
C คือ สารคาเทชินจากใบชาเขียว



ผสมสารไอโซฟลาโวน สารการบา และสารคาเทชิน ตามแผนการทดลอง นำเมล็ดกาแฟดิบใส่ในสารละลายที่ได้ อัตราส่วนน้ำหนักสารละลายต่อเมล็ดกาแฟดิบเท่ากับ 2 ต่อ 1



ทำการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศที่ระดับความดัน -0.5 บาร์ ระยะเวลาคงความดัน 30 นาที ระยะเวลาแช่ที่ความดันบรรยากาศ 30 นาที

เมล็ดกาแฟที่ผ่านกระบวนการไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนความชื้นไม่เกินร้อยละ 10

ภาพที่ 4.7 ขั้นตอนกระบวนการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศ

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

ตารางที่ 4.7 แผนการทดลองแบบ Mixture design ในการออกแบบส่วนผสมของระบบสารละลายสารสกัดจากธรรมชาติ

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

เก็บตัวอย่างเมล็ดกาแฟดิบมาวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวน (Klejdus *et al.*, 2004) กาบา (Lu *et al.*, 2008) และคาเทชิน (Singh *et al.*, 1999) และนำผลการทดลองที่ดีที่สุดมาทดสอบหากระบวนการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศที่เหมาะสมโดยวิธีการออกแบบพื้นที่ตอบสนอง (response surface methodology; RSM) ตามวิธีของไพโรจน์ (2555) ผลการทดลองดังตารางที่ 4.8 และ 4.9

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

ตารางที่ 4.8 ปริมาณไอโซฟลาโวนในเมล็ดกาแฟดิบที่ผ่านกระบวนการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศ เมื่อแปรผันปริมาณสารไอโซฟลาโวนรวม สารกาบา และสารคาเทชิน

สิ่งทดลอง	ไอโซฟลาโวนกลุ่มกลูโคไซด์ (ไมโครกรัมต่อกาแฟดิบ 1 กรัม)			ไอโซฟลาโวนกลุ่มอะไกลโคน (ไมโครกรัมต่อกาแฟดิบ 1 กรัม)			ไอโซฟลาโวนรวม (ไมโครกรัมต่อกาแฟดิบ 1 กรัม)
	ไดซิน	ไกลซิติน	เจนิสติน	ไดซีอีน	ไกลซิทีอีน	เจนิสทีอีน	
1	0.00 (ND)	18.96±1.44	9.97±1.48	58.92±5.31	32.76±2.85	9.16±0.51	92.65
2	0.00 (ND)	7.30±1.99	0.00 (ND)	91.20±6.10	20.54±2.55	5.47±0.70	162.06
3	0.00 (ND)	4.99±0.78	0.00 (ND)	52.87±9.44	21.70±3.09	7.03±0.95	86.18
4	0.00 (ND)	13.87±1.15	0.00 (ND)	51.67±7.49	19.12±2.72	5.03±1.07	84.67
5	0.00 (ND)	15.08±2.64	0.00 (ND)	81.17±2.00	28.54±7.48	8.63±2.22	133.42
6	0.00 (ND)	4.52±3.99	0.00 (ND)	75.25±4.05	21.68±1.12	6.80±0.58	113.27
7	0.00 (ND)	9.08±0.98	0.00 (ND)	48.03±9.33	28.25±1.92	8.55±0.51	98.59
8	0.00 (ND)	13.61±5.75	0.00 (ND)	107.33±4.06	33.37±6.06	10.75±1.30	165.06
9	0.00 (ND)	7.69±1.16	0.00 (ND)	45.87±2.39	27.81±2.75	8.08±0.53	89.44
10	0.00 (ND)	10.39±0.67	0.00 (ND)	92.87±2.53	26.82±0.46	13.35±0.31	154.44

หมายเหตุ ND หมายถึง ไม่พบในการวิเคราะห์หรือมีค่าเท่ากับ 0

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

ตารางที่ 4.9 ปริมาณสารกาบา สารคาเทชิน และอิพิคาเทชินของตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศ เมื่อแปรผันปริมาณสารไอโซฟลาโวน สารกาบา และสารคาเทชิน

สิ่งทดลอง	กาบา (ไมโครกรัมต่อกาแฟดิบ 1 กรัม)	คาเทชิน (มิลลิกรัมต่อกาแฟดิบ 1 กรัม)	อิพิคาเทชิน (ไมโครกรัมต่อกาแฟดิบ 1 กรัม)
1	325.39±32.28	16.73±3.79	110.00±4.18
2	329.24±32.28	14.94±0.55	89.67±6.91
3	339.54±32.28	13.55±3.62	78.58±3.47
4	348.92±11.35	17.72±0.34	94.20±7.29
5	328.48±19.44	18.60±0.95	104.61±9.56
6	343.13±55.27	16.96±2.32	108.62±2.40
7	346.99±23.41	17.42±3.12	85.12±1.53
8	346.79±8.41	16.66±1.08	90.47±4.02
9	366.18±23.52	18.46±2.74	88.91±2.28
10	347.20±8.48	15.66±2.15	84.58±4.42

หมายเหตุ ตัวอย่างเมล็ดกาแฟชุดควบคุมมีปริมาณสารกาบา เท่ากับ 278.74±18.08 (ไมโครกรัมต่อกาแฟดิบ 1 กรัม), สารคาเทชิน เท่ากับ 13.68±0.45 (มิลลิกรัมต่อกาแฟดิบ 1 กรัม) สารอิพิคาเทชิน เท่ากับ 83.84±13.51 (ไมโครกรัมต่อกาแฟดิบ 1 กรัม) และไม่พบสารไอโซฟลาโวน

จากตารางที่ 4.8 ไม่พบสารไดซินในเมล็ดกาแฟดิบที่ผ่านกระบวนการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศ พบสารไกลซิทิน อยู่ในช่วง 4.52-18.96 ไมโครกรัมต่อกรัม สารเจนิสทิน อยู่ในช่วง 9.97-15.69 ไมโครกรัมต่อกรัม สารไดซีอีน อยู่ในช่วง 45.87-107.33 ไมโครกรัมต่อกรัม สารไกลซิทีอีน อยู่ในช่วง 19.12-33.37 ไมโครกรัมต่อกรัม สารเจนิสทีอีน อยู่ในช่วง 5.03-13.35 ไมโครกรัมต่อกรัม และปริมาณไอโซฟลาโวนรวมทั้งหมดอยู่ในช่วง 84.67-165.06 ไมโครกรัมต่อกรัม

ตารางที่ 4.9 แสดงปริมาณสารในเมล็ดกาแฟดิบที่ผ่านกระบวนการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศ พบว่ามีสารกาบา อยู่ในช่วง 325.39-366.18 ไมโครกรัมต่อกรัม คาเทชินอยู่ในช่วง 14.94-18.60 มิลลิกรัมต่อกรัม และอิพิคาเทชินอยู่ในช่วง 78.58-110.00 มิลลิกรัมต่อกรัม

โดยปริมาณไกลซิทิน ปริมาณไดซีอีน และปริมาณไอโซฟลาโวนรวมทั้งหมด มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยพบว่าปริมาณไกลซิทิน ปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อสารละลายมีสัดส่วนสารไอโซฟลาโวนเพิ่มขึ้น และลดลงเมื่อสารละลายมีสัดส่วนสารกาบาและคาเทชินเพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณไดซีอีน และปริมาณไอโซฟลาโวนรวมทั้งหมด มีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อสารละลายมีสัดส่วนสารไอโซฟลาโวน สารกาบา และสารคาเทชินเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาปริมาณสารประกอบทั้ง 4 ชนิดในเมล็ดกาแฟดิบควบคุมตั้งต้นก่อนการนำไปผ่านกระบวนการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศ พบว่า มีปริมาณสารกาบา สารคาเทชิน และสารอิพิคาเทชิน เท่ากับ 278.74±18.08 ไมโครกรัมต่อ

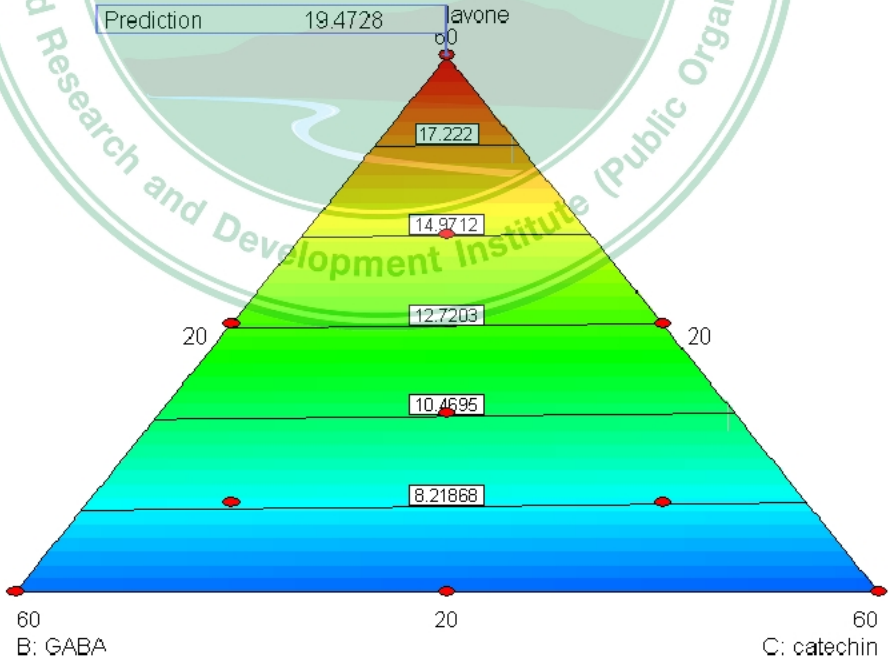
กรัม 13.68±0.45 มิลลิกรัมต่อกรัม และ เท่ากับ 83.84±13.51 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ แต่ไม่พบสารไอโซฟลาโวน ทั้งนี้กระบวนการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารต่างๆ เนื่องจากสารละลายของสารต่างๆ ที่อยู่ภายนอกเมล็ดกาแฟสามารถแพร่และซึมเข้าไปแทนที่น้ำในรูพรุนของโครงสร้างในเมล็ดกาแฟดิบได้ในระยะเวลาสั้นๆ จากการใช้ระบบของสุญญากาศช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการแลกเปลี่ยนมวลสาร (Deng and Zhao, 2008; ปวีณา และคณะ, 2560)

เมื่อนำข้อมูลที่ได้ทั้ง 10 สิ่งทดลองไปวิเคราะห์ในรูปสมการถดถอย (multiple regression) เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารไอโซฟลาโวนรวม สารกาบา และสารคาเทชินในระบบสารละลายสารสกัดจากธรรมชาติ แสดงดังตารางที่ 4.10 และพื้นที่ตอบสนองดังภาพที่ 4.8

ตารางที่ 4.10 สมการความสัมพันธ์การแปรผันปริมาณสารไอโซฟลาโวนรวม สารกาบา และสารคาเทชินในระบบสารละลายสารสกัดจากธรรมชาติ

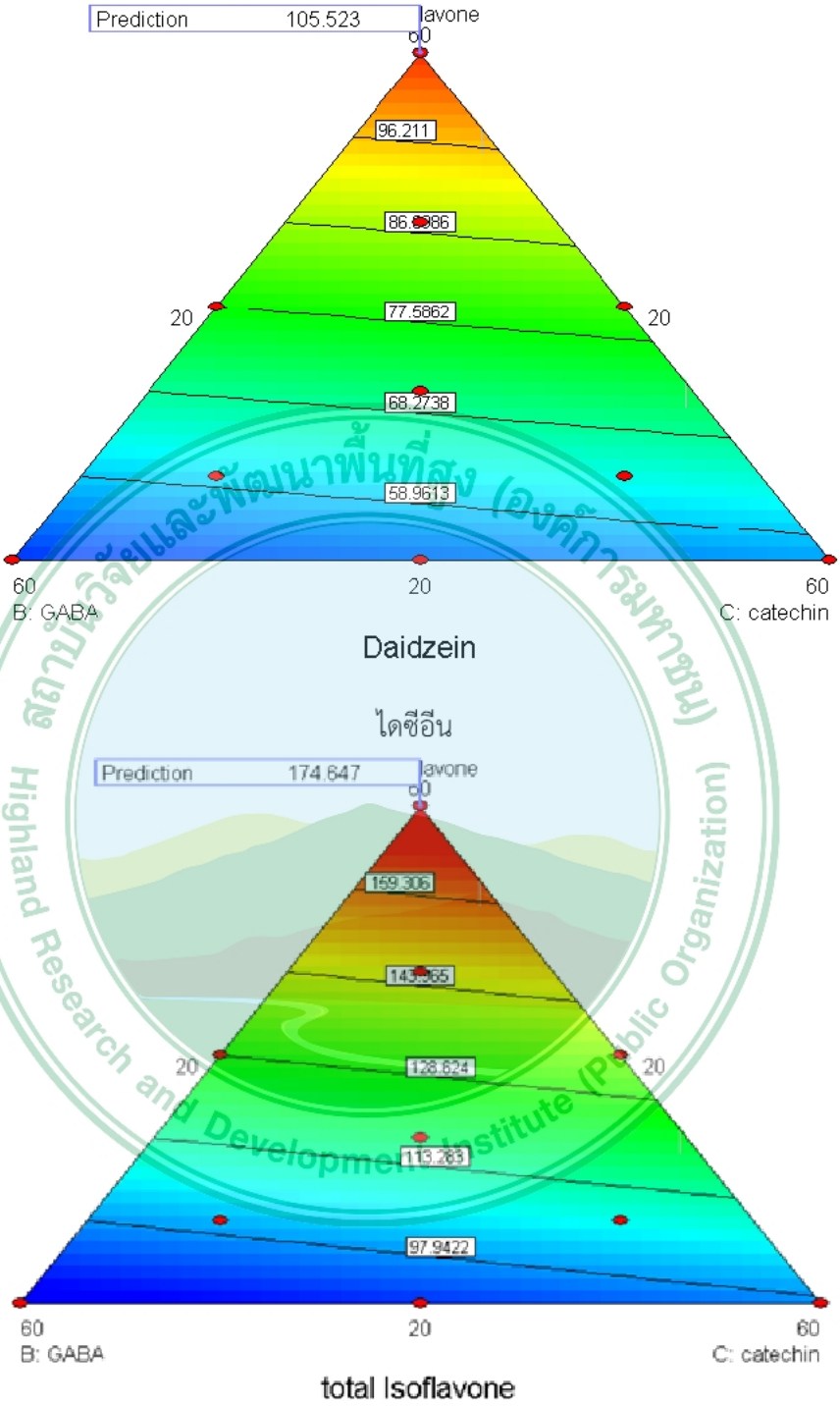
ค่าคุณภาพ	สมการความสัมพันธ์กับตัวแปร	R^2
ไกลซิทิน	0.32(A) - 0.003(B) – 0.009(C)	0.8968
ไดซีอีน	1.58(A) + 0.18(B) + 0.35(C)	0.6442
ไอโซฟลาโวนรวม	2.59(A) + 0.29(B) + 0.64(C)	0.7501

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษ A หมายถึง สารไอโซฟลาโวนรวม
ตัวอักษรภาษาอังกฤษ B หมายถึง สารกาบา
ตัวอักษรภาษาอังกฤษ C หมายถึง สารคาเทชิน



Glycitin

ไกลซิทิน

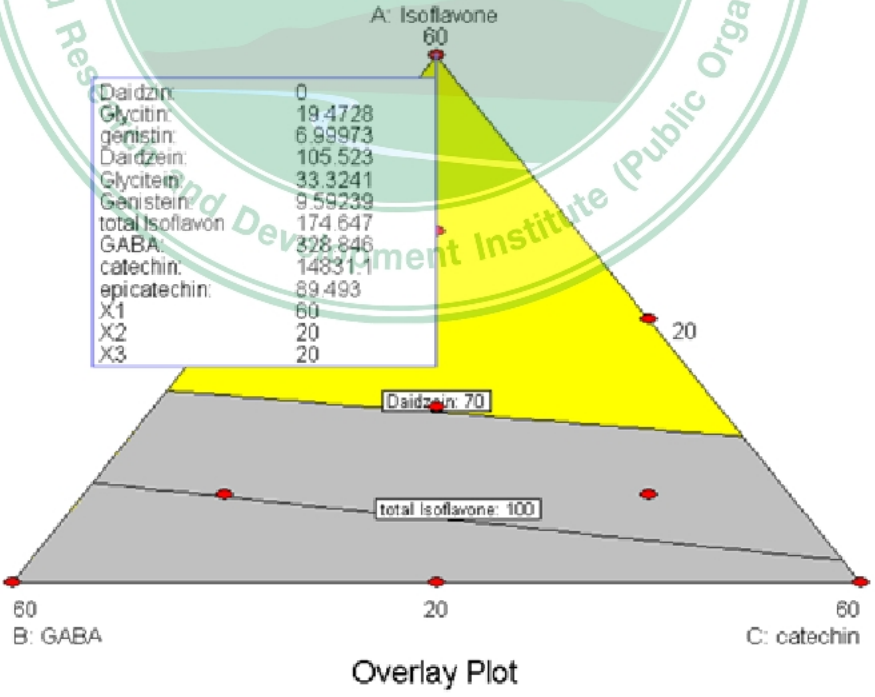


ภาพที่ 4.8 พื้นที่ตอบสนองของสมการความสัมพันธ์ของปริมาณสารไอโซฟลาโวนรวม สารกาบาและสารคาเทชิน ในระบบสารละลายสารสกัดจากธรรมชาติ

เมื่อนำสมการที่ได้จากตารางที่ 4.10 มาหาปริมาณสารไอโซฟลาโวนรวม สารกาบา และสารคาเทชินที่เหมาะสมโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Design Expert 7.1.0 กำหนดขอบเขตปัจจัยที่ศึกษาและขอบเขตของคุณลักษณะที่ต้องการ ดังตารางที่ 4.11 พบว่า สัดส่วนสารละลายสารสกัดจากธรรมชาติที่เหมาะสม คือ สารไอโซฟลาโวนรวมร้อยละ 60 สารกาบาร้อยละ 20 และสารคาเทชินร้อยละ 20 (ภาพที่ 4.9)

ตารางที่ 4.11 ขอบเขตของปัจจัยที่ศึกษาและขอบเขตของคุณลักษณะที่ต้องการในการศึกษาปริมาณสารไอโซฟลาโวนรวม สารกาบา และสารคาเทชินที่เหมาะสม

ปัจจัย	ขอบเขตที่กำหนด	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	หน่วย
สารไอโซฟลาโวน	ในช่วงที่ศึกษา	20	60	ร้อยละ
สารกาบา	ในช่วงที่ศึกษา	20	60	ร้อยละ
สารคาเทชิน	ในช่วงที่ศึกษา	20	60	ร้อยละ
คุณภาพ	**ขอบเขตที่กำหนด**	**ค่าต่ำสุด**	**ค่าสูงสุด**	**หน่วย**
ไกลซิติน	เข้าใกล้ค่าสูงสุด	4.51	18.96	ไมโครกรัมต่อกรัม
ไดซีอีน	เข้าใกล้ค่าสูงสุด	45.86	107.33	ไมโครกรัมต่อกรัม
ไอโซฟลาโวนรวม	เข้าใกล้ค่าสูงสุด	84.66	165.05	ไมโครกรัมต่อกรัม



ภาพที่ 4.9 ปริมาณสารไอโซฟลาโวนรวม สารกาบา และสารคาเทชินที่เหมาะสมในระบบสารละลายสารสกัดจากธรรมชาติ

4.1.5 การศึกษากระบวนการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศที่เหมาะสมในการเสริมสารไอโซฟลาโวนรวม สารกาบา และสารคาเทชินในเมล็ดกาแฟอราบิก้าดิบ

สำหรับการศึกษากระบวนการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศเพื่อเสริมสารสกัดจากธรรมชาติทั้ง 3 ชนิดที่ได้จากกระบวนการผลิตในข้อ 1.3 และอัตราส่วนที่เหมาะสมของสารละลายแต่ละชนิดที่ได้จากการศึกษาในข้อ 1.4 เป็นการใช้สัดส่วนของสารละลายสารสกัดโดยสารไอโซฟลาโวนรวมร้อยละ 60 สารกาบาร้อยละ 20 และสารคาเทชินร้อยละ 20 โดยกำหนดปัจจัย 3 ระดับ วางแผนการทดลอง Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยหาความแปรปรวนโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ของปริมาณสารต่างๆ ที่เติมลงไปเมล็ดกาแฟดิบ

รหัส	ระดับความดันสุญญากาศ (บาร์)	ระยะเวลาคงความดัน (นาที)	ระยะเวลาแช่ที่ความดันบรรยากาศ (นาที)
A	0	0	0
B	-0.4	30	30
C	-0.8	60	60

**หมายเหตุ A คือเมล็ดกาแฟดิบตั้งต้น ที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศ

จากการทดสอบปริมาณสารต่างๆ ที่เติมลงไปเมล็ดกาแฟดิบด้วยกระบวนการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศ (ตารางที่ 4.12 และภาพที่ 4.10) พบว่า เมล็ดกาแฟดิบทั้ง 3 รหัส มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยเมล็ดกาแฟดิบหลังผ่านกระบวนการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศมีปริมาณของสารประกอบเคมีต่างๆ ในปริมาณที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นของปริมาณสารไดซีอีน ไกลซิทีอีน เจนิสทีอีน และสารกาบา มีค่าสูงขึ้นเมื่อแปรียบเทียบกับตัวอย่างเมล็ดกาแฟดิบตั้งต้น (A) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำไปผ่านระดับความดันสุญญากาศ ระยะเวลาคงความดัน และระยะเวลาแช่ที่ความดันบรรยากาศที่เพิ่มขึ้นพบว่า ตัวอย่างเมล็ดกาแฟดิบรหัส B และ C ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) บ่งบอกถึงปริมาณของสารที่กล่าวไปข้างต้นมีความคงที่ ณ ระดับปัจจัยตั้งแต่การใช้ระดับความดันสุญญากาศ -0.4 บาร์ ระยะเวลาคงความดัน 30 นาที และระยะเวลาแช่ที่ความดันบรรยากาศ 30 นาที ทั้งนี้จากการศึกษาของ Kim *et al.* (2018) พบว่า ในเมล็ดกาแฟดิบตั้นมีปริมาณของสารกาบาอยู่แล้วที่ประมาณ 0.11 กรัมต่อเมล็ดกาแฟดิบ 100 กรัม ซึ่งอาจเกิดเนื่องมาจากกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟดิบแบบเปียก (wet process) ซึ่งต้องทิ้งระยะเวลาในการแช่เมล็ดกาแฟดิบเพื่อให้เมือกที่เคลือบกะลาหลุดออก เมล็ดกาแฟเขียวภายในจึงเกิดกระบวนการงอกขึ้นบางส่วนมีการสะสมของสารกาบาในเมล็ดกาแฟดิบ (Kramer *et al.*, 2010) ในส่วนของปริมาณของคาเทชิน และอิพิคาเทชิน มีปริมาณสูงที่สุดเมื่อใช้ระดับความดันสุญญากาศ -0.8 บาร์ ระยะเวลาคงความดัน 60 นาที และระยะเวลาแช่ที่ความดันบรรยากาศ 60 นาที ($p \leq 0.05$)

ดังนั้น จากผลการศึกษาการพัฒนาผลิตภัณฑ์เมล็ดกาแฟโครงการหลวงรูปแบบใหม่เสริมสารสกัดจากธรรมชาติด้วยเทคโนโลยีการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศพบว่า สัดส่วนสารละลายสารสกัดจากธรรมชาติที่เหมาะสมในการเพิ่มลงไปในส่วนเมล็ดกาแฟดิบ และระดับที่เหมาะสมของกระบวน

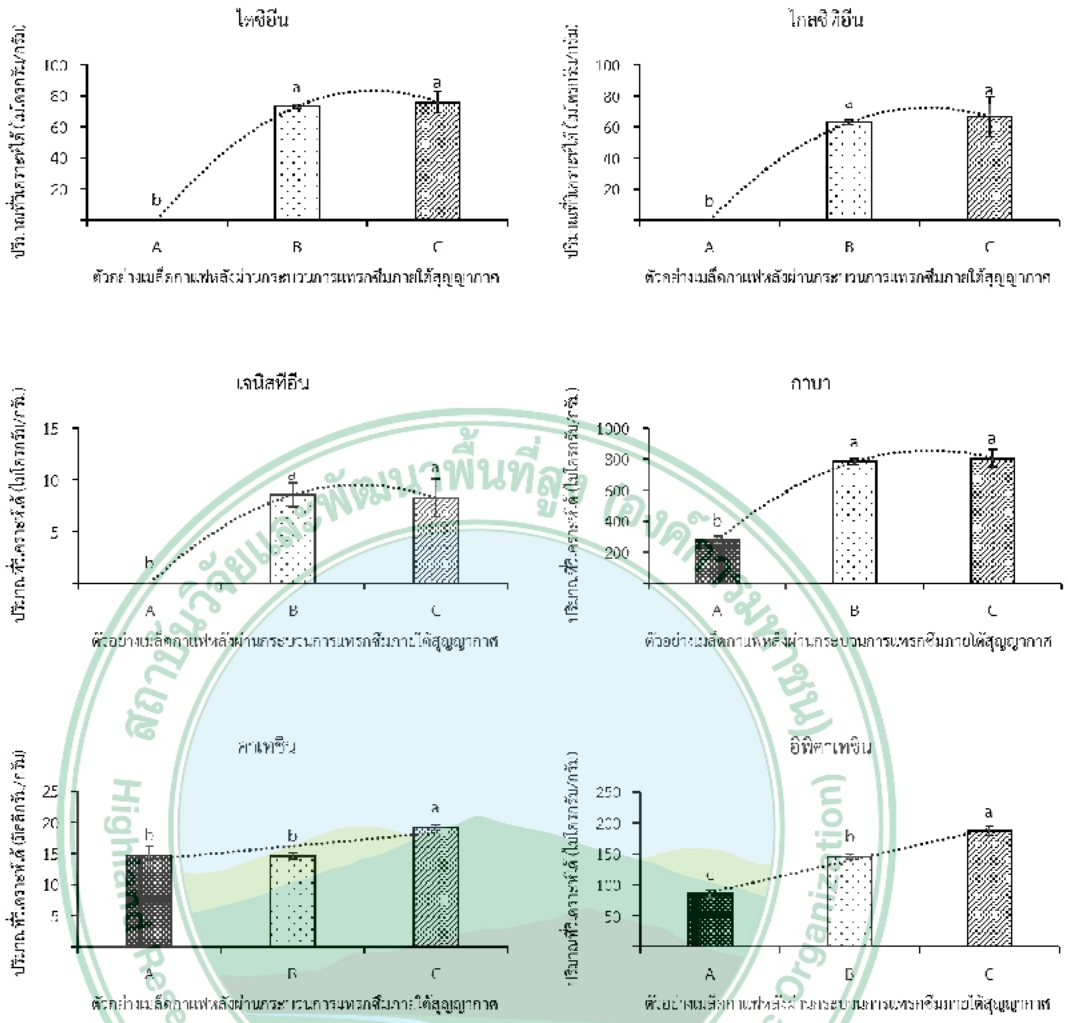
การแทรกซึมภายใต้สุญญากาศ คือ สารไอโซฟลาโวนรวมร้อยละ 60 สารกาบาร้อยละ 20 และสารคาเทชินร้อยละ 20 โดยกำหนดระดับความดันสุญญากาศที่ -0.80 บาร์ ใช้ระยะเวลาคงความดันคงที่เป็นเวลา 60 นาที และระยะเวลาแช่เมล็ดกาแฟดิบที่ความดันบรรยากาศเป็นเวลา 60 นาที

ตารางที่ 4.12 ผลของปริมาณสารต่างๆ ในเมล็ดกาแฟดิบหลังผ่านกระบวนการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศในแต่ละปัจจัย

ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้	รหัสตัวอย่าง		
	A	B	C
ไดซีอีน (ไมโครกรัมต่อกาแฟดิบ 1 กรัม)	0.00 (ND)^{b}	73.20±1.26^{a}	75.83±6.77^{a}
ไกลซิทีอีน (ไมโครกรัมต่อกาแฟดิบ 1 กรัม)	0.00 (ND)^{b}	63.10±1.39^{a}	66.56±12.66^{a}
เจนิสทีอีน (ไมโครกรัมต่อกาแฟดิบ 1 กรัม)	0.00 (ND)^{b}	8.56±1.17^{a}	8.24±1.81^{a}
กาบา (ไมโครกรัมต่อกาแฟดิบ 1 กรัม)	276.71±22.57^{b}	782.98±19.44^{a}	804.77±56.32^{a}
คาเทชิน (มิลลิกรัมต่อกาแฟดิบ 1 กรัม)	14.76±1.49^{b}	14.56±0.52^{b}	19.15±0.49^{a}
อิพิคาเทชิน (ไมโครกรัมต่อกาแฟดิบ 1 กรัม)	85.19±6.45^{c}	145.69±3.85^{b}	186.54±7.66^{a}

หมายเหตุ ND หมายถึง ไม่พบในการวิเคราะห์ หรือมีค่าเท่ากับ 0
อักษร a, b, c ในแนวนอน แสดงถึงค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)



ภาพที่ 4.10 ปริมาณสารต่างๆ ในเมล็ดกาแฟดิบหลังผ่านกระบวนการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศในแต่ละปัจจัย

4.2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารประกอบพันธะเชื่อมจากเมล็ดกาแฟอราบิก้าดิบโครงการหลวง

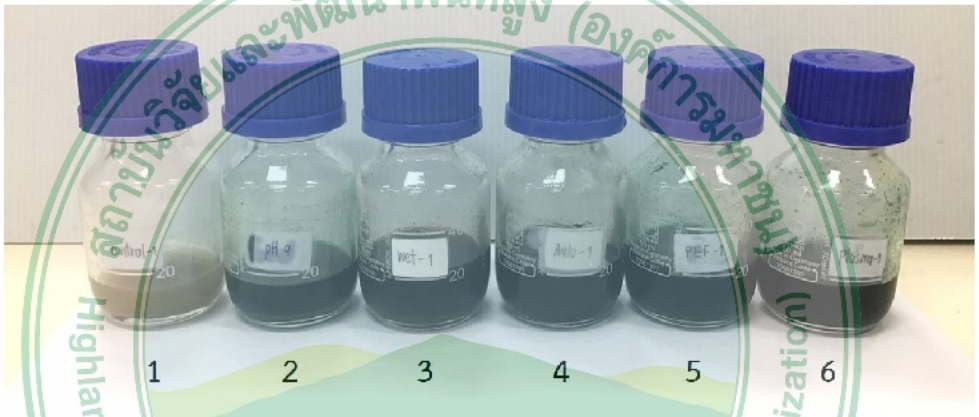
4.2.1 การศึกษากระบวนการผลิตสารประกอบพันธะเชื่อมจากเมล็ดกาแฟดิบที่เหมาะสม

ทำการศึกษากระบวนการผลิตสารประกอบพันธะเชื่อมจากเมล็ดกาแฟดิบ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely randomized design (CRD) ดังตารางที่ 4.13 ทำการสกัดตามวิธีการดังภาพที่ 4.11 ได้สารสกัดพันธะเชื่อมดังภาพที่ 4.12

ภาพที่ 4.11 กระบวนการสกัดสารประกอบพันธะเชื่อมจากเมล็ดกาแฟดิบ

ตารางที่ 4.13 แผนการทดลองการพัฒนากระบวนการผลิตสารประกอบพันธะเชื่อมที่เหมาะสม

สิ่งทดลอง	ปัจจัย	สภาวะ
1	ตัวอย่างควบคุม (pH5.73)	อัลตราโซนิก 30 นาที อุณหภูมิห้อง
2	ตัวอย่างควบคุม (pH9)	อัลตราโซนิก 30 นาที อุณหภูมิห้อง ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วย 1N NaOH
3	การให้ความร้อนแบบเปียก	95 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง
4	แรงดันสูง	121 องศาเซลเซียส 40 นาที
5	สนามไฟฟ้าแบบพัลส์	2500 V/cm, Pulse length 10 µs, 100 pulse
6	เทคโนโลยีพลาสมา	อากาศ 30 นาที



ภาพที่ 4.12 สารประกอบพันธะเชื่อมที่ผ่านกระบวนการต่างๆ

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดคลอโรจินิก น้ำตาลรีดิวซ์ และกรดอะมิโนทั้งหมด พบว่าสารสกัดที่ผ่านการปรับความเป็นกรด-ด่าง และมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9 มีปริมาณกรดคลอโรจินิก ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และสารสกัดที่ผ่านการให้ความร้อนเปียก และเทคโนโลยีพลาสมา (สิ่งทดลองที่ 3 และ 6 ตามลำดับ) มีปริมาณกรดคลอโรจินิก และน้ำตาลรีดิวซ์ที่ในปริมาณที่ต่ำที่สุด โดยมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม สำหรับสารสกัดที่ผ่านเทคโนโลยีพลาสมา พบว่าปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในปริมาณต่ำที่สุด โดยมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ดังตารางที่ 4.14

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

ตารางที่ 4.14 ปริมาณกรดคลอโรจินิก น้ำตาลรีดิวซ์ และกรดอะมิโนทั้งหมดในสารประกอบพันธะเชื่อม

สิ่งทดลอง	กรดคลอโรจินิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กรดอะมิโนทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	7.44 ± 0.02^{a}	2.97 ± 0.08^{a}	293.86 ± 10.87^{b}
2	1.43 ± 0.12^{b}	2.49 ± 0.01^{ab}	248.72 ± 9.95^{c}
3	0.24 ± 0.01^{d}	1.96 ± 0.29^{b}	428.45 ± 7.84^{a}
4	0.76 ± 0.04^{c}	2.53 ± 0.44^{ab}	411.63 ± 17.39^{a}
5	0.88 ± 0.03^{c}	2.75 ± 0.71^{ab}	248.04 ± 1.15^{c}
6	0.37 ± 0.04^{d}	1.81 ± 0.13^{b}	207.65 ± 2.09^{d}

หมายเหตุ อักษร a, b, c ในแนวคอลัมน์ แสดงถึงค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและค่าการต้านออกซิเดชัน DPPH พบว่า สารสกัดที่ผ่านการให้ความร้อนแบบเปียกและเทคโนโลยีพลาสมา (สิ่งทดลองที่ 3 และ 6 ตามลำดับ) มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม โดยมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 4.06 และ 3.93 mgGAE/mL extract ตามลำดับ สำหรับค่าการต้านออกซิเดชัน DPPH พบว่าสารสกัดที่ผ่านการปรับความเป็นกรด-ด่าง จนมีค่าเท่ากับ 9 และผ่านกระบวนต่างๆ ทั้ง 4 กระบวนการ มีค่าการต้านออกซิเดชัน DPPH อยู่ในช่วง 12.63-13.31 mgGAE/mL extract ดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และค่าการต้านออกซิเดชันด้วย DPPH radical scavenging activity assay ในสารประกอบพันธะเชื่อม

สิ่งทดลอง	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mgGAE/mL extract)	ค่าการต้านออกซิเดชัน DPPH (mgGAE/mL extract)
1	5.47 ± 1.09^{a}	15.04 ± 0.27^{a}
2	5.03 ± 0.11^{ab}	12.99 ± 0.16^{bc}
3	4.06 ± 4.47^{b}	12.86 ± 0.07^{bc}
4	4.47 ± 0.14^{ab}	13.05 ± 0.36^{bc}
5	4.35 ± 0.17^{ab}	12.63 ± 0.15^{c}
6	3.93 ± 0.09^{b}	13.31 ± 0.11^{b}

หมายเหตุ อักษร a, b, c ในแนวคอลัมน์ แสดงถึงค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนทั้ง 17 ชนิดในสารประกอบพันธะเชื่อม (ตารางที่ 4.16-4.17) พบว่าแต่ละสิ่งทดลองพบกรดอะมิโนชนิดกรดแอสปาติก ทรีโอนีน เซอรีน

กรดกลูตามิก โปรลีน ไกลซีน อะลานีน+ซิสทีน วาลีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน ไทโรซีน ฮีสทิดีน และไลซีน โดยปริมาณกรดอะมิโนที่สกัดได้มีความสอดคล้องกับปริมาณกรดอะมิโนที่วัดได้ในเมล็ดกาแฟเขียว พันธุ์อาราบิก้าที่มีปริมาณกรดกลูตามิก และอะลานีนในปริมาณสูง (Arnold *et al*., 1994; Murkovic and Derler, 2006) ส่วนกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ที่มีปริมาณแตกต่างจากการศึกษา อาจเกิดจากปัจจัยทางด้านการเพาะปลูก เช่น สายพันธุ์ สถานที่ปลูก และระยะเวลาเก็บเกี่ยว เป็นต้น (Sunarharum *et al*., 2014) สำหรับตัวอย่างควบคุม (สิ่งทดลองที่ 1) ไม่พบกรดอะมิโนชนิดฟีนิลอะนีน เนื่องจากสารประกอบพันธะเชื่อมอยู่ในสภาวะกรด (pH = 5.73) และสิ่งทดลองที่ 2-6 พบกรดอะมิโนชนิดฟีนิลอะลานีน เนื่องจากสารประกอบพันธะเชื่อมอยู่ในสภาวะด่าง (pH = 9) สำหรับกรดอะมิโนชนิดฟีนิลอะลานีลสามารถละลายได้ในสภาวะเบส และอยู่ในรูปของฟีนิลอะลานีนไอออน โดยเมื่อสารละลายมีค่าความเป็นกรดด่างที่ลดลง จะส่งผลให้ความสามารถในการละลายของกรดอะมิโนชนิดฟีนิลอะลานีนลดลง และทำให้เกิดการตกตะกอน (Sun *et al*., 2018)

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

ตารางที่ 4.16 ปริมาณกรดอะมิโนจำนวน 17 ชนิด ที่พบในสารประกอบพันธะเชื่อม

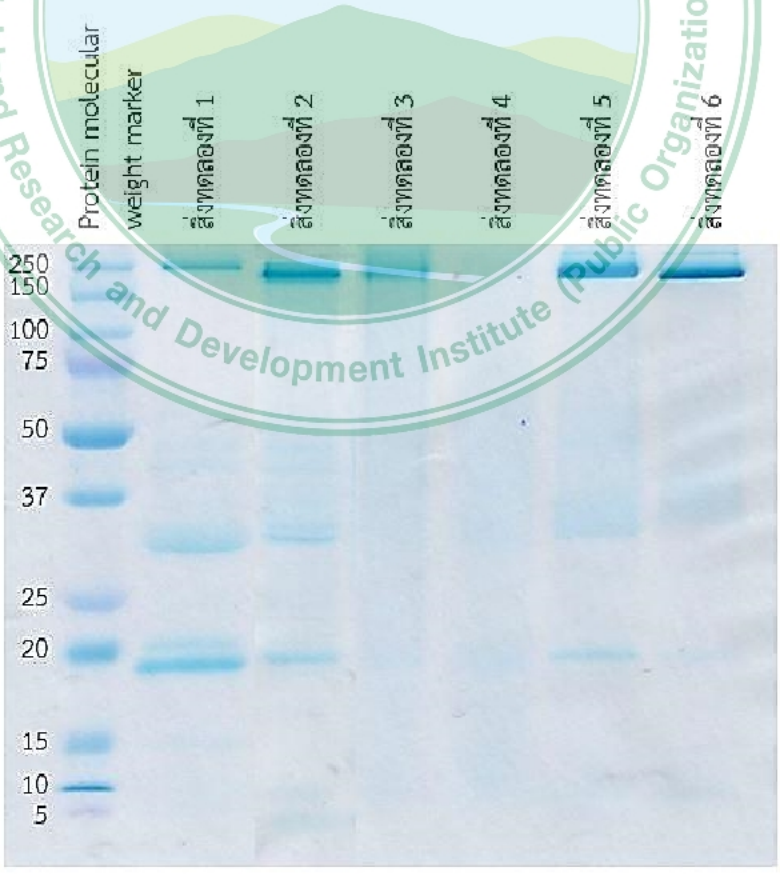
สิ่งทดลอง	กรดแอสปาติก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ทรีโอนีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	เซอรีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	กรดกลูตามิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	โปรลีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ไกลซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	อะลานีน + ซิสทีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	วาลีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0.60 ± 0.02^{e}	12.29 ± 0.37^{e}	0.00 (ND)^{e}	108.09 ± 5.39^{a}	41.53 ± 1.23^{a}	6.42 ± 0.19^{b}	89.88 ± 2.75^{a}	15.87 ± 0.47^{a}
2	35.22 ± 1.67^{cd}	26.15 ± 1.38^{c}	8.23 ± 0.30^{b}	81.25 ± 3.58^{b}	32.06 ± 0.85^{b}	1.45 ± 0.03^{d}	55.37 ± 1.55^{c}	11.83 ± 0.29^{b}
3	60.71 ± 2.67^{a}	31.53 ± 0.62^{b}	18.35 ± 0.35^{a}	106.17 ± 4.09^{a}	41.03 ± 0.82^{a}	7.44 ± 0.17^{a}	82.88 ± 1.81^{b}	15.70 ± 0.38^{a}
4	51.51 ± 2.21^{b}	36.92 ± 1.43^{a}	17.75 ± 0.61^{a}	111.41 ± 5.74^{a}	41.57 ± 1.59^{a}	5.61 ± 0.19^{c}	85.43 ± 2.77^{ab}	16.13 ± 0.93^{a}
5	36.50 ± 0.45^{c}	25.82 ± 0.66^{c}	8.25 ± 0.10^{b}	82.26 ± 0.56^{b}	31.67 ± 0.03^{b}	1.17 ± 0.03^{d}	55.60 ± 0.40^{c}	11.90 ± 0.06^{b}
6	31.46 ± 0.14^{d}	19.27 ± 0.17^{d}	5.68 ± 0.18^{c}	70.86 ± 0.50^{c}	29.02 ± 0.29^{c}	0.64 ± 0.14^{e}	46.35 ± 0.49^{d}	11.19 ± 0.19^{b}

ตารางที่ 4.17 ปริมาณกรดอะมิโนจำนวน 17 ชนิด ที่พบในสารประกอบพันธะเชื่อม (ต่อ)

สิ่งทดลอง	เมไธโอนีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ไอโซลิวซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ลิวซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ไทโรซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ฟีนิลอะลานีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ฮีสทิดีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ไลซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	อาร์จีนีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0.00 (ND)	1.78 ± 0.08^{c}	4.85 ± 0.15^{b}	0.00 (ND)^{b}	0.00 (ND)^{c}	3.84 ± 0.01^{b}	5.95 ± 0.43^{c}	0.00 (ND)
2	0.00 (ND)	4.18 ± 0.08^{b}	3.36 ± 0.14^{c}	0.00 (ND)^{b}	4.05 ± 0.10^{c}	1.27 ± 0.54^{c}	1.56 ± 0.17^{d}	0.00 (ND)
3	0.00 (ND)	6.40 ± 0.14^{a}	5.92 ± 0.20^{a}	3.52 ± 0.23^{a}	23.16 ± 7.22^{a}	6.03 ± 0.46^{a}	15.33 ± 0.44^{b}	0.00 (ND)
4	0.00 (ND)	6.59 ± 0.31^{a}	5.80 ± 0.24^{a}	3.71 ± 0.05^{a}	15.18 ± 0.33^{b}	5.02 ± 0.67^{ab}	16.63 ± 0.44^{a}	0.00 (ND)
5	0.00 (ND)	4.22 ± 0.05^{b}	3.48 ± 0.01^{c}	0.00 (ND)^{b}	4.17 ± 0.02^{c}	0.93 ± 0.83^{c}	1.46 ± 0.01^{d}	0.00 (ND)
6	0.00 (ND)	3.75 ± 0.30^{b}	3.23 ± 0.70^{c}	0.00 (ND)^{b}	2.89 ± 0.16^{c}	0.19 ± 0.08^{c}	0.00 (ND)^{e}	0.00 (ND)

หมายเหตุ อักษร a, b, c, d, e ในแนวคอลัมน์ แสดงถึงค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ND หมายถึง ไม่พบในการวิเคราะห์ หรือมีค่าเท่ากับ 0

เมื่อทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเพปไทด์และดูความบริสุทธิ์ของโปรตีน โดยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate polyacrylamise gel electrophoresis (SDS-PAGE) ดังภาพที่ 4.13 พบว่าตัวอย่างควบคุมมีพอลิเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 250, 30 และ 19-20 กิโลดาลตัน เมื่อทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดให้มีค่าเท่ากับ 9 (สิ่งทดลองที่ 2) พบว่ามีพอลิเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 250 กิโลดาลตันเพิ่มขึ้น เนื่องจากแถบแบนมีความเข้มที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าค่าความเป็นกรด-ด่างส่งผลต่อปริมาณและน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเพปไทด์ สำหรับสารสกัดที่ผ่านการให้ความร้อนแบบเปียก สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ และเทคโนโลยีพลาสมา (สิ่งทดลองที่ 3, 5 และ 6 ตามลำดับ) มีพอลิเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 250 กิโลดาลตันเช่นกัน แสดงให้เห็นว่ากระบวนการเหล่านี้ ส่งผลให้เกิดจากเกาะตัวของพอลิเพปไทด์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (สิ่งทดลองที่ 1) ซึ่งอาจเกิดกระบวนการ Conjugation ระหว่างโมเลกุลของพอลิเพปไทด์กับโมเลกุลของสารประกอบอื่นที่มีอยู่ในเมล็ดกาแฟดิบ เช่น โมเลกุลของน้ำตาล หรือโมเลกุลของสารประกอบกลุ่มพอลิฟีนอล สำหรับสารสกัดที่ผ่านแรงดันสูง (สิ่งทดลองที่ 4) พบว่าไม่ปรากฏแถบของพอลิเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 250 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยวิธีอื่น โดยแสดงให้เห็นว่าการสกัดโดยผ่านสภาวะที่มีแรงดันสูง โดยใช้อุณหภูมิและเวลาสูง (121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 40 นาที) ส่งผลให้โปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (Protein denaturation) (Qixing *et al.*, 2014)



ภาพที่ 4.13 แถบพอลิเพปไทด์บน SDS-PAGE ของสารประกอบพันธะเชื่อมที่ผ่านกระบวนการต่างๆ

เมื่อทำการวิเคราะห์ผลจากข้อมูลข้างต้น ประกอบกับผลการทดลองที่ได้จาก SDS-PAGE ทางคณะผู้วิจัยจึงเลือกทำการศึกษาต่อสำหรับการสกัดสารประกอบพันธะเชื่อมโดยวิธี การให้ความร้อนแบบเปียก (wet process) ต่อไป

4.2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารประกอบพันธะเชื่อม

ในส่วนของการศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในการเกิดสารประกอบพันธะเชื่อมโดยวิธีการให้ความร้อนแบบเปียก (wet process) ทำการแปรผันปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 3 ปัจจัย ได้แก่

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

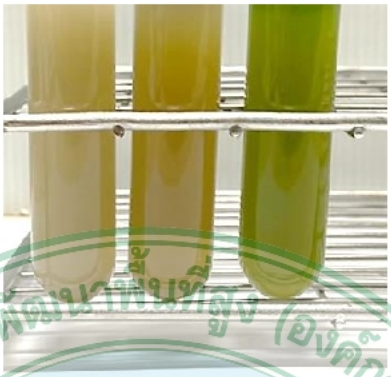
วางแผนการทดลองแบบ 2^3 Factorial experiment design with 3 center points (ไพโรจน์, 2555) ดังตารางที่ 4.18 โดยสารสกัดที่สกัดได้ในแต่ละสิ่งทดลองจะนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และค่าการต้านออกซิเดชัน DPPH ต่อไป

ตารางที่ 4.18 แผนการทดลองแบบ 2^3 Factorial experiment design with 3 center points ในการสกัดสารประกอบพันธะเชื่อมโดยวิธีการให้ความร้อนแบบเปียก (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

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

ทำการเตรียมสารสกัดก่อนผ่านกระบวนการให้ความร้อนแบบเปียก โดยทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้มีค่าเท่ากับ 5, 7 และ 9 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.14) ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ค่าการต้านออกซิเดชัน DPPH และปริมาณกรดอะมิโนอิสระ



pH 5 pH 7 pH 9

ภาพที่ 4.14 สารสกัดก่อนผ่านกระบวนการให้ความร้อนแบบเปียก

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ค่าการต้านออกซิเดชัน DPPH และปริมาณกรดอะมิโนอิสระของสารสกัดก่อนผ่านกระบวนการให้ความร้อนแบบเปียก พบว่าเมื่อสารสกัดมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9 ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณกรดอะมิโนอิสระลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) สำหรับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าอยู่ในช่วง 3.41-5.17 mgGAE/mL extract และค่าการต้านออกซิเดชัน DPPH มีค่าอยู่ในช่วง 13.29-14.08 mgGAE/mL extract ดังตารางที่ 4.19

ตารางที่ 4.19 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ค่าการต้านออกซิเดชัน DPPH และปริมาณกรดอะมิโนอิสระ ของสารสกัดก่อนผ่านกระบวนการให้ความร้อนแบบเปียก (wet process)

สิ่งทดลอง	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mgGAE/mL extract)	ค่าการต้านออกซิเดชัน DPPH (mgGAE/mL extract)	ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (mg equivalent L-Lysine/mL)
1	5	3.21 ± 0.17^{b}	4.24 ± 0.26^{b}	14.08 ± 0.26^{ab}	6.85 ± 0.24^{c}
2	7	3.08 ± 1.77^{b}	3.41 ± 0.11^{c}	14.59 ± 0.03^{a}	6.04 ± 0.12^{b}
3	9	1.77 ± 0.19^{a}	5.17 ± 0.09^{a}	13.29 ± 0.66^{b}	2.97 ± 0.08^{a}

หมายเหตุ อักษร a, b, c ในแนวคอลัมน์ แสดงถึงค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเพปไทด์และดูความบริสุทธิ์ของโปรตีน โดยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate polyacrylamise gel electrophoresis (SDS-PAGE) ดังภาพที่ 4.15 พบว่าสารสกัดที่มีค่ากรด-ด่างเท่ากับ 5 (pH5) มีพอลิเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 และ 19-20 กิโลดาลตัน เมื่อทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารสกัดให้มีค่าเท่ากับ 7 (pH7) พบว่า ปรากฏแถบแบนของพอลิเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 250 กิโลดาลตันขึ้น สำหรับสารสกัดที่มีค่ากรด-ด่างเท่ากับ 9 (pH9) ปรากฏแถบแบนของพอลิเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 250 กิโลดาลตันที่เข้มขึ้น และมีการหายไปของแถบแบนพอลิเพปไทด์ขนาดเล็ก ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 19-20 และ 30 กิโลดาลตัน ซึ่งการหายไปของพอลิเพปไทด์ขนาดเล็ก และเกิดพอลิเพปไทด์ที่มีน้ำโมเลกุลขนาดใหญ่เกิดขึ้น สามารถเกิดจากการเชื่อมพันธะโควาเลนต์ระหว่างโปรตีนและพอลิฟีนอล ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ไม่ต้องใช้เอนไซม์ (non-enzymatic reaction) และเกิดในสภาวะเบส (alkaline reaction) (Quan *et al.*, 2019) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แสดงให้เห็นว่าค่าความเป็นกรด-ด่างส่งผลต่อปริมาณและน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเพปไทด์ที่พบในสารสกัดก่อนผ่านกระบวนการให้ความร้อนแบบเปียก

ภาพที่ 4.15 แถบพอลิเพปไทด์บน SDS-PAGE ของสารสกัดก่อนผ่านกระบวนการให้ความร้อนแบบเปียก

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

เมื่อทำการวิเคราะห์สารสกัดที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนแบบเปียกทั้ง 11 สิ่งทดลอง (ตารางที่ 4.18 และภาพที่ 4.16) พบว่า สำหรับสารสกัดที่ผ่านการให้ความร้อนแบบเปียกที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในช่วง 3.68-10.27 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสารสกัดที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 มีปริมาณน้ำตาลริดิวซ์อยู่ในช่วง 3.08-3.54 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในช่วง 2.41-3.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับปริมาณกรดอะมิโนอิสระพบว่า สารสกัดที่ผ่านการให้ความร้อนแบบเปียกที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9 มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระอยู่ในช่วง 1.40-2.56 mg equivalent L-Lysine/mL extract โดยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและเพิ่มเวลาในกระบวนการ ส่งผลให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระลดลง สำหรับสารสกัดที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระอยู่ในช่วง 5.52-6.66 mg equivalent L-Lysine/mL extract และสารสกัดที่มีค่ากรด-ด่างเท่ากับ 7 มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระอยู่ในช่วง 5.58-5.93 mg equivalent L-Lysine/mL extract ดังตารางที่ 4.20

ภาพที่ 4.16 สารสกัดที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนแบบเปียก (wet process)

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

ตารางที่ 4.20 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ค่าการต้านออกซิเดชัน DPPH และปริมาณกรดอะมิโนอิสระ ของสารสกัดที่ผ่านการให้ความร้อนแบบเปียก (wet process)

สิ่งทดลอง	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา (วัน)	น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mgGAE/mL extract)	ค่าการต้านออกซิเดชัน DPPH (mgGAE/mL extract)	ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (mg equivalent L-Lysine/mL extract)
1	5	70	1	3.68 ± 0.12	5.27 ± 0.21	14.37 ± 0.02	6.26 ± 0.25
2	9	70	1	2.43 ± 0.11	4.05 ± 0.13	8.02 ± 1.72	2.52 ± 0.10
3	5	90	1	5.37 ± 0.02	4.38 ± 0.05	14.37 ± 0.34	6.66 ± 0.15
4	9	90	1	2.41 ± 0.03	4.14 ±0.05	12.97 ± 0.18	2.33 ± 0.17
5	5	70	3	6.89 ± 0.10	5.11 ± 0.13	12.43 ± 0.15	5.52 ± 0.14
6	9	70	3	2.80 ± 0.01	4.19 ± 0.02	5.20 ± 1.78	2.56 ± 0.10
7	5	90	3	10.27 ± 0.38	5.58 ± 0.12	9.21 ± 1.47	5.95 ± 0.38
8	9	90	3	3.09 ± 0.22	4.30 ± 0.08	10.06 ± 0.33	1.40 ± 0.10
9	7	80	2	3.08 ± 0.15	4.87 ± 0.27	14.32 ± 0.01	5.58 ± 0.31
10	7	80	2	3.34 ± 0.15	4.46 ± 0.16	14.31 ± 0.06	5.93 ± 0.11
11	7	80	2	3.54 ± 0.18	5.15 ± 0.07	14.34 ± 0.03	5.79 ± 0.29

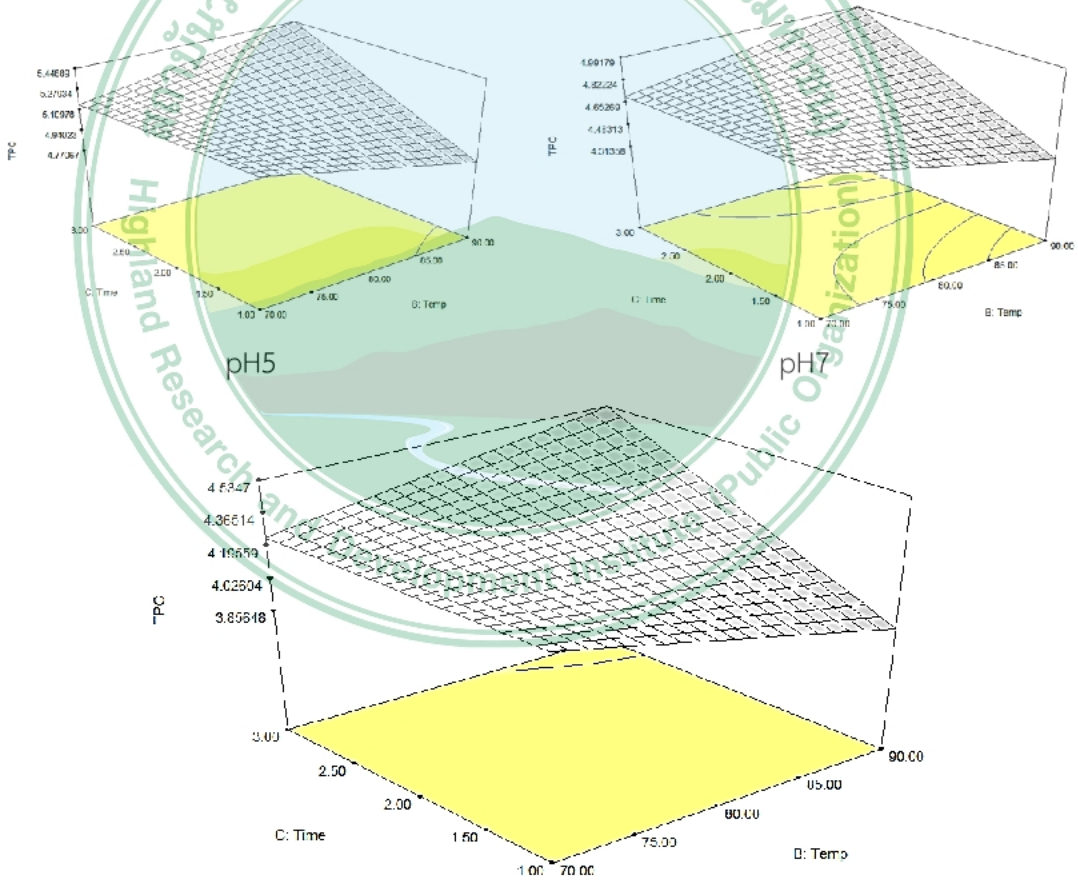
สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์การแปรผันของค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิและระยะเวลาในการสกัด พบว่าการแปรผันของค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิและระยะเวลาในการสกัดมีผลต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยมีความสัมพันธ์ดังตารางที่ 4.21 และภาพที่ 4.17

ตารางที่ 4.21 สมการความสัมพันธ์การแปรผันของค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิและระยะเวลาในการสกัดที่มีผลต่อค่าคุณภาพ

ค่าคุณภาพ	สมการความสัมพันธ์กับตัวแปร	R^2
ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mgGAE/mL extract)	= 8.94 - 0.23(A) - 0.04(B) - 1.22(C) + 0.02(A)(B)	0.7601

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษ A หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่าง
ตัวอักษรภาษาอังกฤษ B หมายถึง อุณหภูมิการสกัด (องศาเซลเซียส)
ตัวอักษรภาษาอังกฤษ C หมายถึง ระยะเวลาการสกัด (นาที)

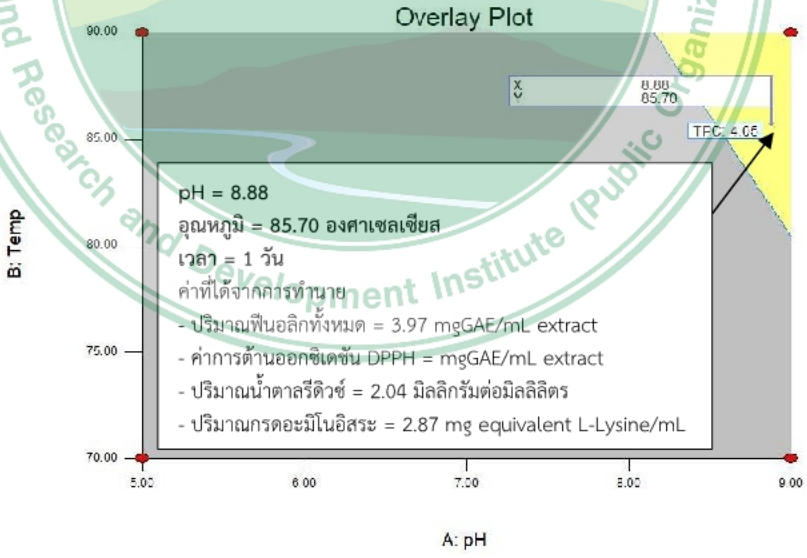


ภาพที่ 4.17 พื้นที่ตอบสนองของการสกัดต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

เมื่อนำสมการที่ได้จากตารางที่ 4.21 มาหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ที่เหมาะสมโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Design Expert 7.1.0 กำหนดขอบเขตปัจจัยที่ศึกษาและขอบเขตของคุณลักษณะที่ต้องการ ดังตารางที่ 4.22 พบว่าการสกัดสารประกอบพันธะเชื่อม โดยกระบวนการให้ความร้อนเปียกที่เหมาะสมได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.88 อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เวลา 1 วัน ดังภาพที่ 4.18 และแสดงแถบพอลิเพปไทด์บน SDS-PAGE ของสารประกอบพันธะเชื่อมที่ผ่านสภาวะที่เหมาะสม ดังภาพที่ 4.19

ตารางที่ 4.22 ขอบเขตของปัจจัยที่ศึกษาและขอบเขตของคุณลักษณะที่ต้องการในการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเมื่อแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และเวลาในการสกัด

ปัจจัย	ขอบเขตที่กำหนด	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	หน่วย
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	ในช่วงที่ศึกษา	-0.8	0	-
อุณหภูมิ	ในช่วงที่ศึกษา	0	60	องศาเซลเซียส
เวลา	ในช่วงที่ศึกษา	0	60	นาที
คุณภาพ	**ขอบเขตที่กำหนด**	**ค่าต่ำสุด**	**ค่าสูงสุด**	**หน่วย**
ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด	เข้าใกล้ค่าต่ำสุด	4.05	5.58	(mgGAE/mL extract)



ภาพที่ 4.18 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบพันธะเชื่อม โดยการให้ความร้อนแบบเปียก (wet process)

ภาพที่ 4.19 แถบพอลิเพปไทด์บน SDS-PAGE ของสารประกอบพันธะเชื่อมที่ผ่านสภาวะที่เหมาะสม

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

4.3 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพจากกากกาแฟ

4.3.1 การศึกษาการเตรียมกากกาแฟที่เหมาะสมสำหรับนำไปสกัดน้ำมันกากกาแฟ

ทำการศึกษากากกาแฟจากการคั่วเมล็ดกาแฟระดับต่างๆ ด้วยเครื่องคั่วแบบหมุน (Golden Coffee Roasters, GR05, Turkey) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely randomized design (CRD) แปรผันระดับการคั่วเมล็ดกาแฟ 4 ระดับ ดังภาพที่ 4.20 ทำการทดลอง 3 ซ้ำได้แก่

สิ่งทดลองที่ 1 ระดับอ่อน (light roast level) ที่ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

สิ่งทดลองที่ 2 ระดับกลาง (medium roast level) ที่ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สิ่งทดลองที่ 3 ระดับเข้ม (dark roasted level) ที่ 220 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สิ่งทดลองที่ 4 ระดับเข้มมาก (very dark roasted level) ที่ 220 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

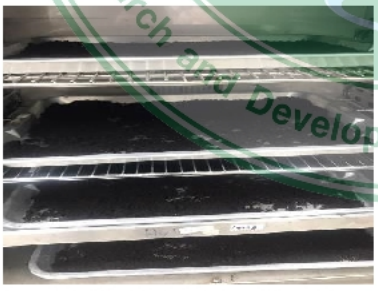
ภาพที่ 4.20 เมล็ดกาแฟคั่วที่ระดับต่างๆ (ก) สารกาแฟ เกรด A (ตามมาตรฐานของโครงการหลวง) (ข) คั่วอ่อน (ค) คั่วกลาง (ง) คั่วเข้ม และ (จ) คั่วเข้มมาก

นำเมล็ดกาแฟที่ได้จากการคั่วแต่ละระดับมาทำการบดและชงด้วยเครื่องชงแบบเอสเพรสโซ และนำกากกาแฟมาทำการสกัดน้ำมันด้วยสารละลายเฮกเซน ตามกระบวนการดังภาพที่ 4.21

เมล็ดกาแฟคั่วที่ระดับต่าง ๆ

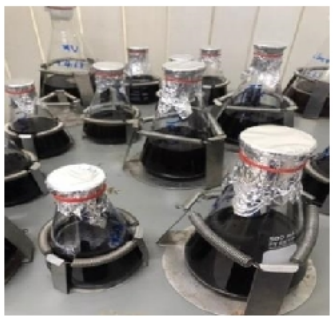
บดเมล็ดกาแฟแบบละเอียดด้วยเครื่องบดกาแฟ (DeLonghi KG89, De' Longhi S.p.A, Italy

ชงกาแฟสดด้วยเครื่องชงกาแฟแบบเอสเพรสโซ (Breville BES860, Hillkoff, Thailand)



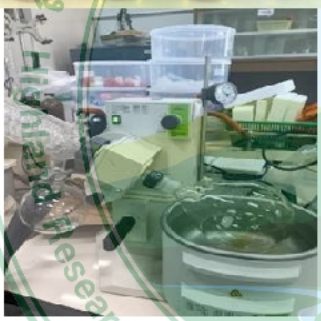
อบกากกาแฟด้วยตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เพื่อลดความชื้นในกากกาแฟให้เหลือน้อยกว่าร้อยละ 15

กากกาแฟที่ผ่านการลดความชื้นแล้ว

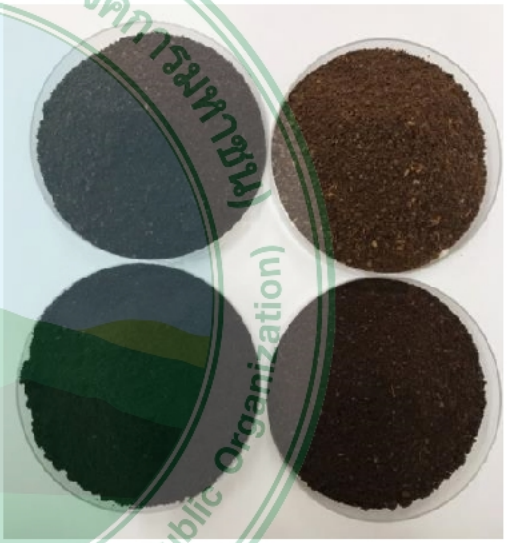


สกัดน้ำมันกากกาแฟด้วยสารละลายเฮกเซน อัตราส่วน 1:2 นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

นำมากรอง



นำไประเหยเฮกเซนออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (rotary evaporator)



กากกาแฟหลังสกัด

น้ำมันหลังสกัด

ภาพที่ 4.21 ขั้นตอนการเตรียมกากกาแฟ

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

ทำการนำน้ำมันที่ได้จากการสกัดและกากกาแฟหลังสกัดมาวิเคราะห์คุณภาพ ได้แก่ ค่าสี (*L**, *a** และ *b**) ปริมาณความชื้น ปริมาณไขมัน ปริมาณไดเทอร์พีนส์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสมบัติการต้านออกซิเดชัน ซึ่งวิธีที่ใช้วิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชัน มี 3 วิธี ได้แก่ 1) วิธี DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยากับ Antioxidations หรือกับ Radical 2) วิธี ABTS (2, 2-azino-bis (3-ethylbenzothialzoline-6-sulfonic acid)) เป็นการใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันให้เกิด ABTS cation radical และ 3) วิธี FRAP (Ferric reducing antioxidant power) วิธีนี้จะอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบเชิงซ้อน คือเมื่อสารประกอบเชิงซ้อน Ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPTZ) ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชัน แล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน Ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+}-TPTZ) ที่มีสีม่วงน้ำเงิน

จากการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและเคมีของน้ำมันกากกาแฟที่ระดับการคั่วแตกต่างกัน 4 ชนิด ประกอบด้วย น้ำมันกากกาแฟที่ระดับคั่วอ่อน คั่วกลาง คั่วเข้ม และน้ำมันกากกาแฟที่ระดับคั่วเข้มมาก พบว่าค่าความสว่าง (*L**) ค่าสีแดงและสีเขียว (*a**) ค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (*b**) ปริมาณน้ำมัน ปริมาณคาเฟสตอล ปริมาณคาห์วีออล ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สมบัติการต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP ของตัวอย่างน้ำมันกากกาแฟทั้ง 4 ชนิด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ส่วนปริมาณความชื้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยค่าสี *L**, *a** และ *b** อยู่ในช่วง 18.71-19.24, 1.63-4.62 และ 0.10-1.30 ตามลำดับ ปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 0.02-0.03 และปริมาณน้ำมันอยู่ในช่วงร้อยละ 7.89-13.35 ซึ่งน้ำมันจากกากกาแฟระดับคั่วเข้มมากมีปริมาณน้ำมันมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Somnuk *et al.*, (2017) ที่พบว่ากากกาแฟมีปริมาณน้ำมันร้อยละ 7.5-13.1 เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลาย เช่น เมทานอล เอทานอล และเฮกเซน เป็นต้น เมื่อนำน้ำมันกากกาแฟมาวิเคราะห์ปริมาณคาเฟสตอลและคาห์วีออล พบว่าน้ำมันกากกาแฟมีปริมาณคาเฟสตอลและคาห์วีออลอยู่ในช่วง 9.51-35.00 และ 181.87-694.74 มิลลิกรัมต่อน้ำมัน 100 กรัม ตามลำดับ ซึ่งจากการพิจารณาระดับการคั่วมีผลต่อปริมาณคาเฟสตอลและคาห์วีออล พบว่า น้ำมันจากกากกาแฟที่ระดับการคั่วอ่อน และคั่วกลางมีปริมาณคาเฟสตอลและคาห์วีออลมากกว่าน้ำมันจากกากกาแฟที่ระดับการคั่วเข้มและคั่วเข้มมาก โดยน้ำมันจากกากกาแฟที่ระดับคั่วเข้มมากมีปริมาณคาเฟสตอลและคาห์วีออลน้อยที่สุด นอกจากนี้ งานวิจัยของ Sridevi *et al.* (2011) และ จิระประภา (2561) ยังรายงานว่าเมล็ดกาแฟที่ระดับการคั่วอ่อนมีปริมาณคาเฟสตอลและคาห์วีออลมากกว่าระดับการคั่วกลาง คั่วเข้ม และคั่วเข้มมาก เนื่องจากกระบวนการคั่วกาแฟเป็นกระบวนการที่มีการใช้ความร้อน การคั่วที่ระดับคั่วอ่อนเป็นการคั่วที่ใช้อุณหภูมิต่ำกว่าระดับการคั่วอื่นๆ จึงทำให้มีปริมาณคาเฟสตอลและคาห์วีออลมากที่สุด ในขณะที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอยู่ในช่วง 0.15-0.27 gGAE ต่อน้ำมัน 100 กรัม ในส่วนของสมบัติการต้านออกซิเดชัน ซึ่งวัดโดยวิธี DPPH มีค่าอยู่ในช่วง 1.41-2.10 mgGAE ต่อน้ำมัน 100 กรัม วัดโดยวิธี ABTS มีค่าอยู่ในช่วง 0.18-0.22 gGAE ต่อน้ำมัน 100 กรัม และวัดโดยวิธี FRAP มีค่าอยู่ในช่วง 1.25-1.83 g$FeSO_4$ ต่อน้ำมัน 100 กรัม ดังตารางที่ 4.23 โดยน้ำมันจากกากกาแฟที่ระดับคั่วกลางมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และมีสมบัติการต้านออกซิเดชัน โดยวิธี DPPH, ABTS และวิธี FRAP มากที่สุด

ตารางที่ 4.23 คุณลักษณะทางกายภาพ และทางเคมีของน้ำมันกากกาแฟที่ระดับการคั่วแตกต่างกัน

คุณภาพทางกายภาพและเคมี	ระดับการคั่วของน้ำมันกากกาแฟ			
	คั่วอ่อน	คั่วกลาง	คั่วเข้ม	คั่วเข้มมาก
ค่าความสว่าง (*L**)	19.24±0.24^{a}	18.71±0.15^{c}	18.81±0.04^{bc}	19.16±0.27^{ab}
ค่าสีแดงและสีเขียว (*a**)	4.62±0.05^{a}	1.75±0.05^{c}	1.63±0.01^{d}	2.70±0.09^{b}
ค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (*b**)	1.30±0.24^{a}	0.10±0.03^{d}	0.38±0.09^{c}	0.65±0.14^{b}
ปริมาณความชื้น (ร้อยละ) ^{ns}	0.03±0.01	0.03±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01
ปริมาณน้ำมัน (ร้อยละของกากกาแฟ)	7.89±0.11^{d}	10.12±0.08^{c}	11.10±0.08^{b}	13.35±0.34^{a}
ปริมาณคาเฟสตอล				
(มิลลิกรัม/100กรัมน้ำมัน)	35.00±0.19^{a}	29.22±0.13^{b}	9.51±0.49^{c}	9.56±0.90^{c}
(มิลลิกรัม/100กรัมกากกาแฟ)	2.76±0.02^{b}	2.96±0.03^{a}	1.06±0.06^{d}	1.28±0.14^{c}
ปริมาณคาห์วีออล				
(มิลลิกรัม/100กรัมน้ำมัน)	694.74±3.08^{a}	592.60±3.14^{b}	188.78±6.07^{c}	181.87±9.05^{c}
(มิลลิกรัม/100กรัมกากกาแฟ)	54.81±0.72^{b}	59.97±0.28^{a}	20.95±0.81^{d}	24.28±0.79^{c}
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก				
(gGAE/100กรัมน้ำมัน)	0.15±0.01^{c}	0.27±0.02^{a}	0.26±0.01^{a}	0.19±0.01^{b}
สมบัติการต้านออกซิเดชัน				
- DPPH (mgGAE/100กรัมน้ำมัน)	1.61±0.12^{c}	2.10±0.01^{a}	1.82±0.01^{b}	1.41±0.06^{d}
- ABTS (gGAE/100กรัมน้ำมัน)	0.18±0.01^{b}	0.22±0.01^{a}	0.22±0.01^{a}	0.20±0.01^{ab}
- FRAP ($gFeSO_4$/100กรัมน้ำมัน)	1.36±0.06^{c}	1.83±0.01^{a}	1.63±0.07^{b}	1.25±0.11^{c}

หมายเหตุ ค่าของข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันในแถวแนวนอน แสดงถึงค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$), ^{ns} ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

เมื่อทำการศึกษาคุณภาพทางกายภาพและเคมีของกากกาแฟที่ได้หลังจากการสกัดเอาน้ำมันออกแล้วทั้ง 4 ระดับการคั่วที่ต่างกัน โดยประกอบด้วยกากกาแฟที่ระดับคั่วอ่อน คั่วกลาง คั่วเข้ม และกากกาแฟที่ระดับคั่วเข้มมาก พบว่าค่าความสว่าง (*L**) ค่าสีแดงและสีเขียว (*a**) ค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (*b**) ปริมาณความชื้น ปริมาณน้ำมัน ปริมาณคาเฟสตอล ปริมาณคาห์วีออล ปริมาณสารประกอบฟีนอลลิก ปริมาณการต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP ของกากกาแฟหลังสกัดทั้ง 4 ชนิด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยค่าสี *L* a** และ *b** อยู่ในช่วง 29.75-33.09, 2.93-6.09 และ (-0.34)-2.80 ตามลำดับ ปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 4.67-5.41 และปริมาณน้ำมันอยู่ในช่วงร้อยละ 0.36-1.01 จะเห็นได้ว่าเมื่อนำกากกาแฟหลังสกัดมาสกัดน้ำมันอีกรอบ ปริมาณน้ำมันที่ได้จะลดลงซึ่งขึ้นอยู่กับวิธีการสกัดเบื้องต้น จากนั้นนำน้ำมันที่ได้จากกากกาแฟหลังสกัดมาวิเคราะห์ปริมาณคาเฟสตอลและคาห์วีออล พบว่ามีปริมาณคาเฟสตอลและคาห์วีออลอยู่ในช่วง 0.03-0.46 และ 0.43-9.05 มิลลิกรัมต่อน้ำมัน 100 กรัม ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาปริมาณคาเฟสตอลและคาห์วีออลในกากกาแฟหลังสกัด พบว่า กากกาแฟหลังสกัดที่ได้ตรวจ ไม่พบปริมาณคาเฟสตอล และตรวจพบปริมาณคาห์วีออลน้อยมากเมื่อเทียบกับ

ปริมาณร้อยละของน้ำมันในกากกาแฟหลังสกัด ในขณะที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกอยู่ในช่วง 2.25-5.43 gGAE ต่อน้ำมัน 100 กรัม ในส่วนของสมบัติการต้านออกซิเดชัน ซึ่งวัดโดยวิธี DPPH มีค่าอยู่ในช่วง 63.72-112.64 mgGAE ต่อน้ำมัน 100 กรัม วัดโดยวิธี ABTS มีค่าอยู่ในช่วง 1.31-7.57 gGAE ต่อน้ำมัน 100 กรัม และวัดโดยวิธี FRAP มีค่าอยู่ในช่วง 4.37-10.10 $gFeSO_4$ ต่อน้ำมัน 100 กรัม ซึ่งพบว่าที่ระดับคั่วกลางมีค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกและสมบัติการต้านออกซิเดชันของทั้ง 3 วิธี มากที่สุด ดังตารางที่ 4.24

ตารางที่ 4.24 คุณลักษณะทางกายภาพ และทางเคมีของกากกาแฟหลังสกัด

คุณภาพทางกายภาพและเคมี	ระดับการคั่วของกากกาแฟ			
	คั่วอ่อน	คั่วกลาง	คั่วเข้ม	คั่วเข้มมาก
ค่าความสว่าง (L^*)	33.09±0.10^a	31.41±0.23^b	30.81±0.11^c	29.75±0.15^d
ค่าสีแดงและสีเขียว (a^*)	6.09±0.11^a	4.74±0.07^b	3.92±0.04^c	2.93±0.09^d
ค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (b^*)	2.80±0.06^a	0.68±0.10^b	-0.34±0.07^c	-1.35±0.06^d
ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)	5.41±0.03^a	5.08±0.04^c	5.16±0.05^b	4.67±0.02^d
ปริมาณน้ำมัน				
(ร้อยละของกากกาแฟ)	0.36±0.03^d	0.47±0.04^c	0.58±0.03^b	1.01±0.09^a
ปริมาณคาเฟสตอล				
(มิลลิกรัม/100กรัมน้ำมัน)	0.03±0.01^d	0.12±0.01^c	0.18±0.01^b	0.46±0.01^a
(มิลลิกรัม/100กรัมกากกาแฟ)	0.00 (ND)	0.00 (ND)	0.00 (ND)	0.00 (ND)
ปริมาณคาห์วีออล				
(มิลลิกรัม/100กรัมน้ำมัน)	0.43±0.06^d	2.50±0.16^c	3.64±0.18^b	9.05±0.12^a
(มิลลิกรัม/100กรัมกากกาแฟ)	0.00 (ND)	0.01±0.01	0.02±0.01	0.09±0.01
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก				
(gGAE/100gSCG)	5.43±0.21^a	4.19±0.22^b	3.33±0.03^c	2.25±0.03^d
สมบัติการต้านออกซิเดชัน				
- DPPH (mgGAE/100gSCG)	102.50±4.83^a	112.64±0.15^a	109.84±0.88^a	63.72±5.62^b
- ABTS (gGAE/100gSCG)	1.31±0.09^b	6.53±0.08^c	7.37±0.18^a	7.57±0.10^a
- FRAP ($gFeSO_4$/100gSCG)	10.10±0.17^a	8.69±0.39^b	5.26±0.24^c	4.37±0.11^d

หมายเหตุ ค่าของข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน ในแถวแนวนอนแสดงถึงค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$), ^{ns} ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$), ND หมายถึง ไม่พบในการวิเคราะห์ หรือมีค่าเท่ากับ 0

นำผลการทดลองมาทำการคัดเลือกระดับการคั่วเมล็ดกาแฟที่เหมาะสมสำหรับนำกากกาแฟไปสกัดน้ำมันในข้อ 4.3.2 จากผลการศึกษาข้างต้น จะเห็นว่าน้ำมันจากกากกาแฟที่ระดับการคั่วอ่อน และระดับคั่วกลาง มีปริมาณสารคาเฟสตอลและคาห์วีออลใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาปริมาณคาเฟสตอลและคาห์วีออลในน้ำมันกากกาแฟที่สกัดได้ พบว่า น้ำมันจากกากกาแฟที่ระดับการคั่วอ่อน 7.89 กรัม จะมีปริมาณสารคาเฟสตอลและคาห์วีออลเท่ากับ 2.76 และ 54.81 มิลลิกรัม

ตามลำดับ ในขณะที่น้ำมันจากกากกาแฟที่ระดับคั่วกลาง 10.12 กรัม มีปริมาณสารคาเฟสตอลและคาห์วีออล เท่ากับ 2.96 และ 59.97 มิลลิกรัม ตามลำดับ ดังนั้นน้ำมันจากกากกาแฟที่ระดับการคั่วกลางจึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

4.3.2 การศึกษากระบวนการสกัดที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันจากกากกาแฟ

1) เตรียมตัวอย่างกากกาแฟจากเมล็ดกาแฟคั่วระดับกลางมาศึกษาวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันกากกาแฟด้วยวิธีการสกัด 3 วิธี

2) ทำการศึกษาวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันกากกาแฟด้วยวิธีการสกัด 3 วิธี ได้แก่

วิธีที่ 1 การสกัดแบบใช้ชุดกลั่นซอกห์เลตร่วมกับตัวทำละลายเฮกเซน (SOX) โดยใช้ n-Hexane เป็นตัวทำละลาย ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

วิธีที่ 2 การสกัดแบบต้มกลั่น (HD) 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 การสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ภายใต้สภาวะวิกฤตยิ่งยวด (supercritical carbon dioxide extraction, SC-CO_2) โดยผันแปร 2 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิในการสกัด 35-65 องศาเซลเซียส และความดันในการสกัด 100-200 บาร์

จากการเปรียบเทียบวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันกากกาแฟ แสดงผลในตารางที่ 4.25 พบว่าการสกัดน้ำมันกากกาแฟด้วยวิธีการสกัดแบบใช้ชุดกลั่นซอกห์เลตร่วมกับตัวทำละลายเฮกเซน โดยใช้ n-Hexane เป็นตัวทำละลาย ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ให้ร้อยละผลผลิตน้ำมันกากกาแฟเท่ากับ 10.05 และน้ำมันกากกาแฟที่ได้มีปริมาณสารคาเฟสตอลและคาห์วีออลเท่ากับ 21.96 และ 439.19 มิลลิกรัมต่อน้ำมัน 100 กรัม ตามลำดับ การสกัดน้ำมันกากกาแฟโดยวิธีการสกัดแบบต้มกลั่น ที่ผันแปรระยะเวลาในการสกัด 1-8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ให้ร้อยละผลผลิตน้ำมันกากกาแฟอยู่ในช่วง 0.01-0.02 และน้ำมันกากกาแฟที่ได้ตรวจไม่พบสารคาเฟสตอลและคาห์วีออล ทั้งนี้เนื่องจากการสกัดน้ำมันโดยวิธีการสกัดแบบต้มกลั่น เป็นกระบวนการสกัดน้ำมันที่ใช้ความร้อนและใช้น้ำในการสกัด ทำให้สาร

คาเฟสตอลและคาห์วีออลในน้ำมันกากกาแฟเกิดการเสื่อมสลายเนื่องจากความร้อน หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ซึ่งส่งผลต่อคุณภาพของน้ำมันโดยตรง (Jimenez-Carmona *et al.*, 1999) ในขณะที่การสกัดน้ำมันกากกาแฟโดยวิธี SC-CO_2 ที่ผันแปรสภาวะในการสกัด (อุณหภูมิ 35-65 องศาเซลเซียส และความดัน 100-200 บาร์) ให้ร้อยละผลผลิตน้ำมันกากกาแฟอยู่ในช่วง 0.40-9.84 และน้ำมันกากกาแฟที่ได้ มีปริมาณสารคาเฟสตอลและคาห์วีออลอยู่ในช่วง 25.73-42.24 และ 412.60-796.34 มิลลิกรัมต่อน้ำมัน 100 กรัม ตามลำดับ โดยการสกัดด้วยวิธี SC-CO_2 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ร่วมกับความดัน 200 บาร์ ให้ปริมาณสารคาเฟสตอลและปริมาณคาห์วีออลมากที่สุด

ตารางที่ 4.25 กระบวนการและสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันกากกาแฟ

วิธีการสกัด	สภาวะการสกัด			ปริมาณน้ำมัน (ร้อยละของกากกาแฟ)	ปริมาณไดเทอร์พีนส์	
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความดัน (บาร์)	เวลา (ชั่วโมง)		คาเฟสตอล (มิลลิกรัมต่อน้ำมัน 100 กรัม)	คาห์วีออล (มิลลิกรัมต่อน้ำมัน 100 กรัม)
SOX	80	-	4	10.05±0.05	21.96±0.09	439.19±1.35
HD	90	-	1	0.01±0.01	0.00 (ND)	0.00 (ND)
	90	-	2	0.01±0.01	0.00 (ND)	0.00 (ND)
	90	-	3	0.01±0.01	0.00 (ND)	0.00 (ND)
	90	-	4	0.01±0.01	0.00 (ND)	0.00 (ND)
	90	-	5	0.01±0.01	0.00 (ND)	0.00 (ND)
	90	-	6	0.01±0.01	0.00 (ND)	0.00 (ND)
	90	-	7	0.02±0.01	0.00 (ND)	0.00 (ND)
	90	-	8	0.02±0.01	0.00 (ND)	0.00 (ND)
SC-CO_2	35	100	3	5.83±0.24	38.27±1.15	651.18±6.79
	65	100	3	0.40±0.07	27.57±0.14	468.13±7.01
	35	200	3	9.84±0.75	42.24±0.14	796.34±6.50
	65	200	3	7.70±0.42	37.81±0.17	593.82±2.28
	50	150	3	6.80±0.66	25.73±0.23	412.60±2.94
	50	150	3	6.97±0.61	26.56±0.44	434.43±3.04

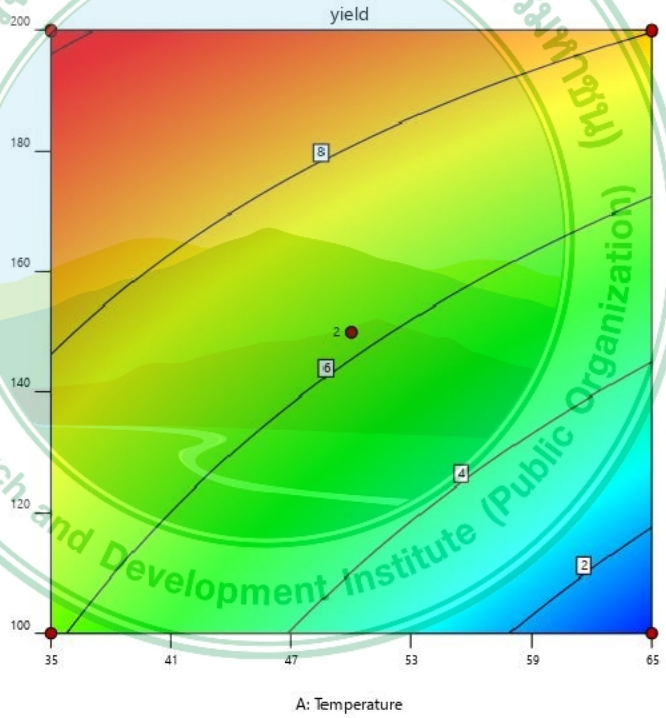
หมายเหตุ ค่าของข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)
ND หมายถึง ไม่พบในการวิเคราะห์ หรือมีค่าเท่ากับ 0

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี SC-CO_2 ไปวิเคราะห์หาสมการความสัมพันธ์และสร้างพื้นที่ผิวตอบสนอง (response surface methodology; RSM) ได้ผลวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่

4.26 และภาพที่ 4.22 ตามลำดับ พบว่าอุณหภูมิและความดันในการสกัดมีผลต่อปริมาณน้ำมันกากกาแฟอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยการสกัดที่อุณหภูมิต่ำ ความดันสูง ทำให้ได้ปริมาณน้ำมันกากกาแฟมากที่สุด และในน้ำมันกากกาแฟที่ได้มีสารคาเฟสตอลและคาห์วีออลมากกว่าการสกัดที่อุณหภูมิสูงและความดันต่ำ เนื่องจากสารคาเฟสตอลและคาห์วีออลไม่เสถียรที่อุณหภูมิสูง (Araujo and Sandi, 2006) ในขณะที่การสกัดที่ความดันสูงส่งผลให้ได้ปริมาณสารคาเฟสตอลและคาห์วีออลมากกว่าการสกัดที่ความดันต่ำ

ตารางที่ 4.26 สมการความสัมพันธ์ของอุณหภูมิ และความดันในการสกัดน้ำมันกากกาแฟ

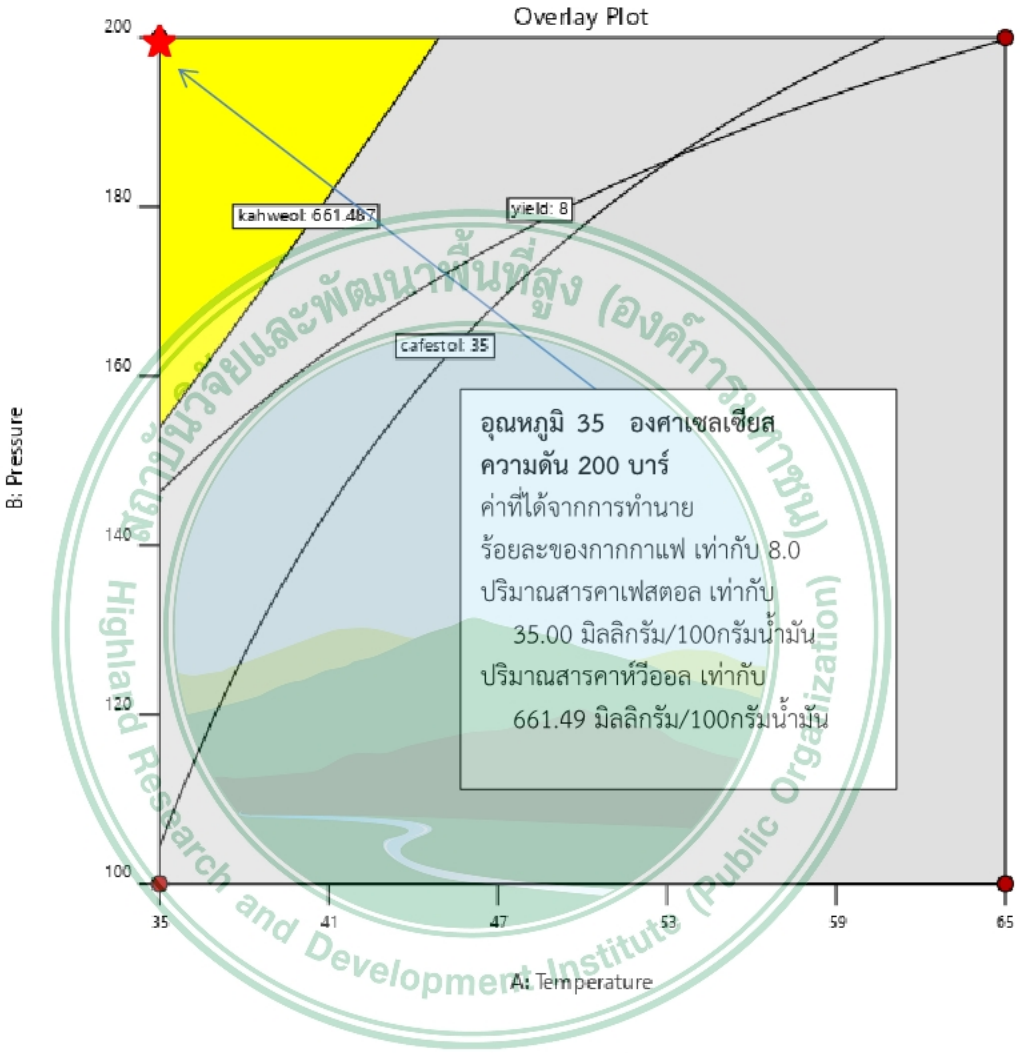
ค่าคุณภาพ	สมการความสัมพันธ์กับตัวแปร	R^2
ร้อยละผลได้	$= 12.31 - 0.29$(อุณหภูมิ) $+ (1.72\times10^{-3})$(ความดัน) $+ (1.10\times10^{-3})$ (อุณหภูมิxความดัน)	0.9761



ภาพที่ 4.22 พื้นที่การตอบสนองของปริมาณร้อยละผลได้ของกากกาแฟที่ผันแปรตามอุณหภูมิและความดัน

เมื่อทำการหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีการสร้างภาพ Overlay ด้วยโปรแกรม Design Expert version 7.1.0 (Statease Inc., Minneapolis, USA) โดยการกำหนดปริมาณร้อยละของกากกาแฟเท่ากับ 8 และกำหนดปริมาณสารคาเฟสตอล และคาห์วีออลให้เข้าใกล้ค่าสูงสุด คือ 35.00 และ 661.49 มิลลิกรัมต่อน้ำมัน 100 กรัม พบว่าสภาวะสำหรับการสกัดน้ำมันกากกาแฟโดยวิธี SC-CO_2 ที่เหมาะสม คือ การสกัดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และความดัน 200 บาร์ (ภาพที่ 4.23) โดยจะเห็นว่าแนวโน้มปริมาณคาเฟสตอลและคาห์วีออล จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อลดอุณหภูมิและเพิ่มความ

ดัน แต่เนื่องจากข้อจำกัดของเครื่อง SC-CO_2 ที่ใช้ในการทดลองไม่สามารถลดอุณหภูมิให้ต่ำกว่า และไม่สามารถเพิ่มความดันให้สูงกว่านี้ได้ จึงเลือกใช้สภาวะดังกล่าวในการสกัดน้ำมันกากกาแฟโดยวิธี SC-CO_2



ภาพที่ 4.23 สภาวะที่เหมาสมสำหรับการสกัดน้ำมันกากกาแฟโดยวิธี SC-CO_2

4.3.3 การศึกษากระบวนการสกัดที่เหมาะสมในการสกัดสารที่คงเหลือในกากกาแฟหลังสกัดน้ำมัน

ในส่วนของการศึกษากระบวนการสกัดสารที่คงเหลืออยู่ในกากกาแฟหลังสกัดน้ำมันจากข้อ 4.3.2 โดยใช้วิธีการสกัด 2 วิธี คือ 1) การสกัดด้วยน้ำ ซึ่งแปรผันอุณหภูมิและเวลาในการสกัดที่ 30-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-120 นาที โดยวางแผนการทดลองแบบ 2^2 Factorial experiment design with 2 center points (ไพโรจน์, 2555) และ 2) การสกัดด้วยเอทานอล ซึ่งผันแปรความเข้มของเอทานอล ร้อยละ 40, 60, 80 และ 95 ตามลำดับ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4.3.3.1 การสกัดสารที่คงเหลือในกากกาแฟหลังสกัดน้ำมันด้วยน้ำ

นำกากกาแฟหลังสกัดน้ำมัน มาทำการสกัดด้วยน้ำโดยแปรผันอุณหภูมิและเวลาในการสกัดที่ 30-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-120 นาที โดยวางแผนการทดลองแบบ 2^2 Factorial experiment design with 2 center points (ไพโรจน์, 2555) จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์คุณภาพ ได้แก่ ค่าสี (L*, a*, b*) ปริมาณน้ำมัน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสมบัติการต้านออกซิเดชัน ดังตารางที่ 4.27-4.28

ตารางที่ 4.27 คุณภาพทางกายภาพ และทางเคมีของกากกาแฟหลังสกัดที่สกัดด้วยน้ำ

สิ่งทดลอง	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	ค่าสี			ปริมาณน้ำมัน (ร้อยละ)
			L*	a*	b*	
1	30	30	20.78±0.25	4.96±0.25	-0.16±0.01	0.92±0.06
2	100	30	20.31±0.09	2.43±0.09	-1.11±0.05	0.71±0.05
3	30	120	20.34±0.10	3.01±0.10	-0.91±0.03	0.90±0.02
4	100	120	20.13±0.07	1.75±0.07	-1.15±0.03	0.69±0.02
5	65	75	20.29±0.21	2.84±0.21	-0.96±0.04	0.88±0.01
6	65	75	20.24±0.16	2.49±0.16	-1.04±0.03	0.86±0.04

หมายเหตุ ค่าของข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 4.28 คุณภาพทางกายภาพ และทางเคมีของกากกาแฟหลังสกัดที่สกัดด้วยน้ำ (ต่อ)

สิ่งทดลอง	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	สารประกอบฟีนอลิก (gGAE/100g SCG)	สมบัติการต้านออกซิเดชัน		
				DPPH (mgGAE/100gSCG)	ABTS (gGAE/100gSCG)	FRAP ($gFeSO_4$/100gSCG)
1	30	30	7.61±0.11	37.02±0.67	2.07±0.18	7.00±0.79
2	100	30	10.12±0.08	48.66±0.87	2.85±0.04	10.03±0.27
3	30	120	8.97±0.19	44.60±0.47	2.27±0.07	8.77±0.18
4	100	120	13.99±0.20	66.08±0.34	3.88±0.08	13.94±0.63
5	65	75	9.26±0.34	47.54±0.48	2.57±0.05	10.63±0.39
6	65	75	9.61±0.19	49.69±0.87	2.64±0.03	10.54±0.28

หมายเหตุ ค่าของข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากผลการทดลองข้างต้น เมื่อนำมาวิเคราะห์หาสมการความสัมพันธ์ พบว่า อุณหภูมิและเวลาในการสกัดกากกาแฟด้วยน้ำมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และมีผลทำให้คุณภาพของกากกาแฟหลังสกัดด้านค่าสี a* ปริมาณน้ำมัน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สมบัติการ

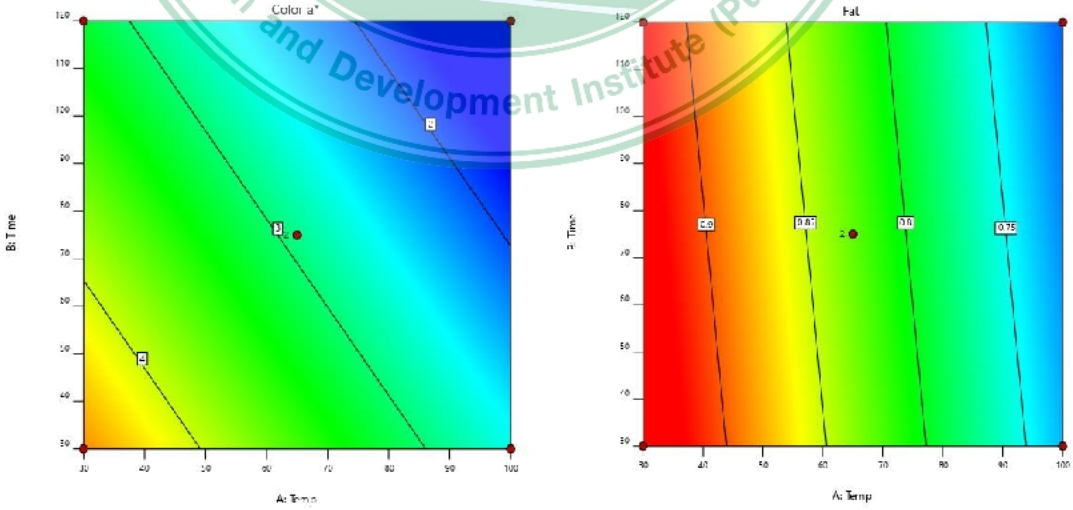
ต้านออกซิเดชันซึ่งวัดโดยวิธี DPPH และ ABTS มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีสมการความสัมพันธ์ ดังตารางที่ 4.29

ตารางที่ 4.29 สมการความสัมพันธ์ของอุณหภูมิ และเวลาในการสกัดกากกาแฟหลังสกัดที่สกัดด้วยน้ำ

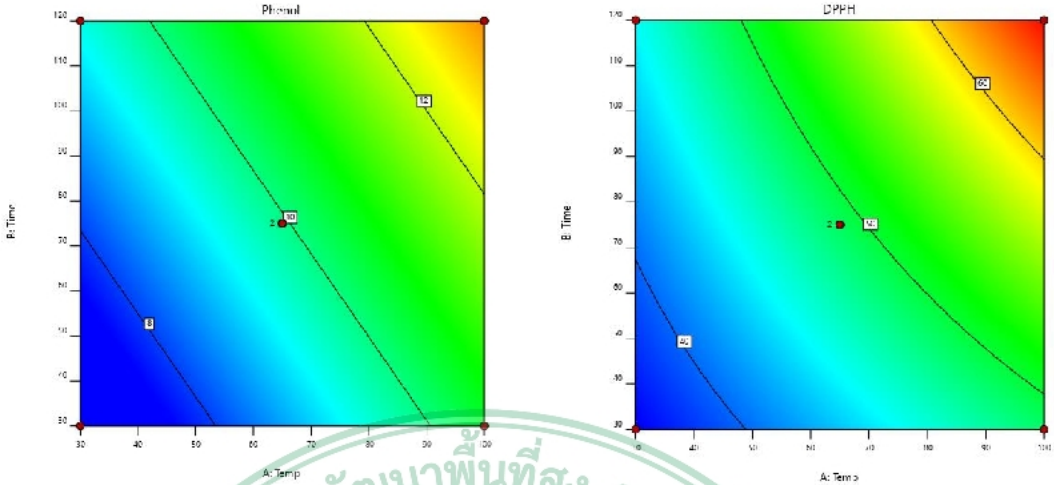
ค่าคุณภาพ	สมการความสัมพันธ์กับตัวแปร	R^2
ค่าสี a*	= 5.77 – 0.03(A) – 0.01(B)	0.8912
ปริมาณน้ำมัน	= 1.04 – 0.01(A) – 0.01(B)	0.8841
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก	= 4.25 + 0.05(A) + 0.03(B)	0.8990
สมบัติการต้านออกซิเดชัน		
วัดโดยวิธี DPPH	= 30.75 + 0.12(A) + 0.04(B) + 0.01(A)(B)	0.9943
วัดโดยวิธี ABTS	= 1.09 + 0.02(A) + 0.01(B)	0.8959

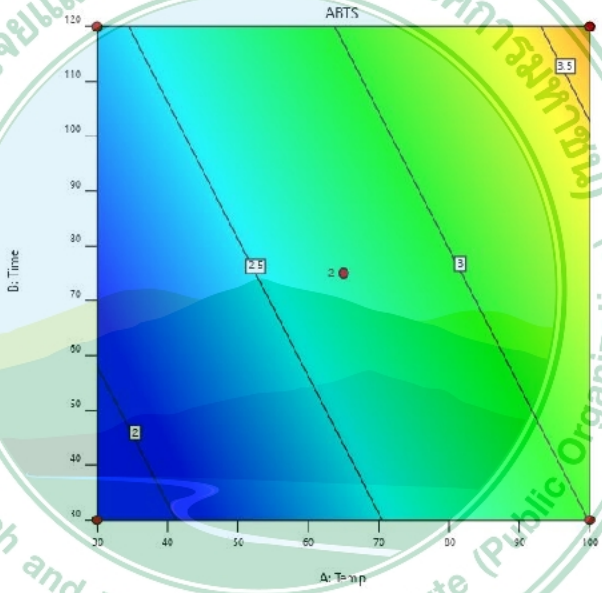
เมื่อ A หมายถึง อุณหภูมิในการสกัด และ B หมายถึง เวลาในการสกัด

จากสมการข้างต้น เมื่อพิจารณาสมการด้านค่าสี a* และปริมาณน้ำมัน พบว่า คุณภาพของกากกาแฟหลังสกัดด้านค่าสี a* และปริมาณไขมันขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและเวลาในการสกัด โดยเมื่อใช้อุณหภูมิและเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นจะทำให้ค่าสี a* และปริมาณไขมันลดลง ในขณะที่อุณหภูมิและเวลาในการสกัดลดลงจะส่งผลให้คุณภาพของกากกาแฟหลังสกัดด้านปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สมบัติการต้านออกซิเดชันซึ่งวัดโดยวิธี DPPH และ ABTS เพิ่มขึ้นตามไปด้วย โดยมีภาพพื้นที่ตอบสนองของสมการความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและเวลาในการสกัดกากกาแฟด้วยน้ำ ดังภาพที่ 4.24



(ก) (ข)





ภาพที่ 4.24 พื้นที่ตอบสนอง (ก) ค่าสี a* (ข) ปริมาณน้ำมัน (ค) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (ง) สมบัติการต้านออกซิเดชัน โดยวิธี DPPH และ (จ) สมบัติการต้านออกซิเดชัน โดยวิธี ABTS

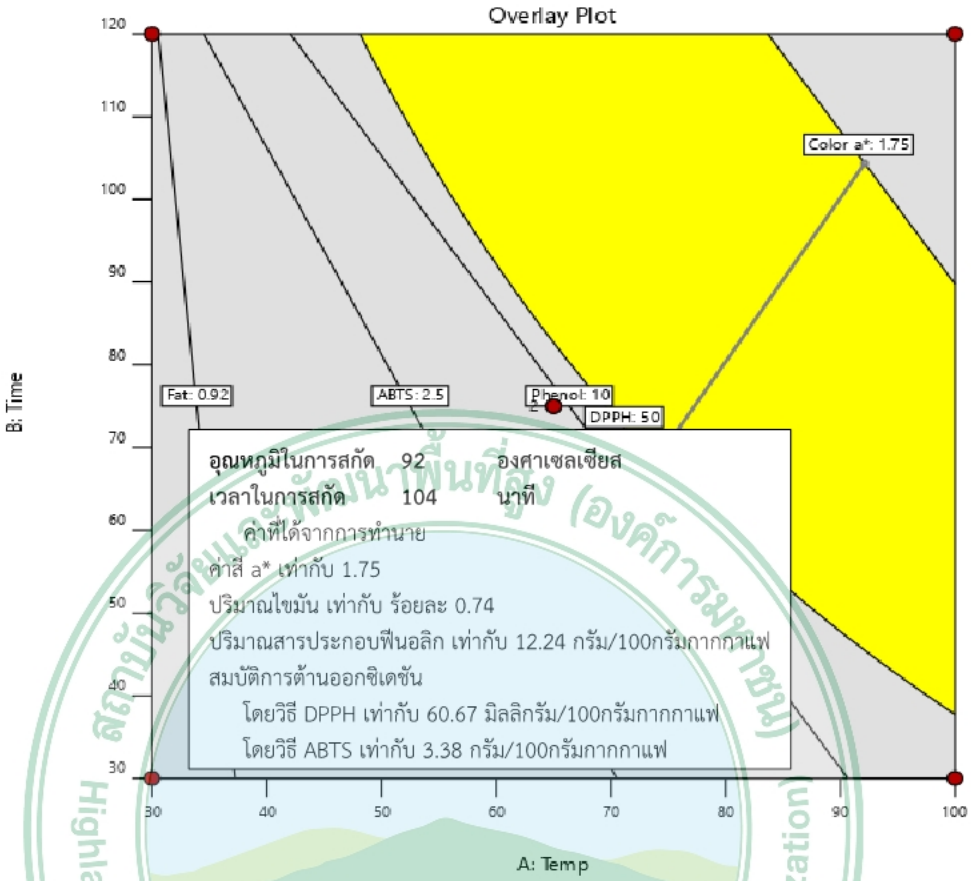
สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

เมื่อนำสมการความสัมพันธ์ที่ได้มาหาระดับอุณหภูมิและเวลาในการสกัดที่เหมาะสมในการสกัดกากกาแฟหลังสกัดด้วยน้ำ โดยใช้โปรแกรม Design-Expert version 12.0 แบบ Numerical และทำการกำหนดขอบเขตของปัจจัยที่ศึกษา ดังตารางที่ 4.30

ตารางที่ 4.30 ขอบเขตของปัจจัยที่ศึกษาและขอบเขตของคุณลักษณะที่ต้องการในการศึกษาค่าคุณภาพ เมื่อแปรผันอุณหภูมิ และเวลาในการสกัด

ปัจจัย	ขอบเขตที่กำหนด	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	หน่วย
อุณหภูมิ	ในช่วงที่ศึกษา	30	100	องศาเซลเซียส
เวลา	ในช่วงที่ศึกษา	30	120	นาที
คุณภาพ	**ขอบเขตที่กำหนด**	**ค่าต่ำสุด**	**ค่าสูงสุด**	**หน่วย**
ค่าสี a*	ในช่วงที่ศึกษา	1.75	4.96	-
ปริมาณน้ำมัน	ในช่วงที่ศึกษา	0.69	0.92	ร้อยละ
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก	เข้าใกล้ค่าสูงสุด	7.61	13.99	กรัม/100กรัมกากกาแฟ
การต้านออกซิเดชัน DPPH	เข้าใกล้ค่าสูงสุด	37.02	66.08	มิลลิกรัม/100กรัมกากกาแฟ
การต้านออกซิเดชัน ABTS	เข้าใกล้ค่าสูงสุด	2.07	3.88	กรัม/100กรัมกากกาแฟ

จากการกำหนดขอบเขตข้างต้นจะทำให้ได้สภาวะการสกัดกากกาแฟหลังสกัดด้วยน้ำที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส และเวลาในการสกัด 104 นาที ดังภาพที่ 4.25



ภาพที่ 4.25 สภาวะการสกัดกากกาแฟหลังสกัดด้วยน้ำที่เหมาะสม

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

4.3.3.2 การสกัดสารที่คงเหลือในกากกาแฟหลังสกัดน้ำมันด้วยเอทานอล

นำกากกาแฟหลังสกัดน้ำมัน มาทำการสกัดด้วยเอทานอล ซึ่งผันแปรความเข้มของเอทานอล ร้อยละ 40, 60, 80 และ 95 ตามลำดับ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์คุณภาพ ได้แก่ ค่าสี (L*, a*, b*) ปริมาณน้ำมัน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสมบัติการต้านออกซิเดชัน ดังตารางที่ 4.31-4.32

ตารางที่ 4.31 คุณภาพทางกายภาพ และทางเคมีของกากกาแฟหลังสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล

สิ่งทดลอง	ความเข้มข้นของเอทานอล (ร้อยละ)	ค่าสี			ปริมาณน้ำมัน (ร้อยละ)
		L*	a*	b*	
1	40	20.06±0.06^{b}	1.70±0.02^{c}	-1.16±0.06^{c}	1.01±0.01^{a}
2	60	20.06±0.09^{b}	1.66±0.05^{c}	-1.16±0.05^{c}	0.97±0.06^{a}
3	80	20.45±0.07^{a}	3.97±0.16^{b}	-0.48±0.05^{b}	0.77±0.04^{b}
4	95	20.53±0.07^{a}	11.26±0.04^{a}	9.87±0.14^{a}	0.39±0.03^{c}

หมายเหตุ ค่าของข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันในแนวคอลัมน์แสดงถึงค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.32 คุณภาพทางกายภาพ และทางเคมีของกากกาแฟหลังสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล (ต่อ)

สิ่งทดลอง	ความเข้มข้นของเอทานอล (ร้อยละ)	สารประกอบฟีนอลิก (gGAE/100gSCG)	สมบัติการต้านออกซิเดชัน		
			DPPH (mgGAE/100gSCG)	ABTS (gGAE/100gSCG)	FRAP ($gFeSO_4$/100gSCG)
1	40	14.97±0.75^{b}	61.42±0.78^{b}	3.75±0.10^{a}	10.50±0.55^{a}
2	60	15.78±0.33^{a}	68.19±0.79^{a}	3.45±0.08^{b}	10.19±0.91^{a}
3	80	10.90±018^{c}	42.19±0.71^{c}	2.58±0.06^{c}	6.96±0.20^{b}
4	95	1.31±0.08^{d}	4.99±0.34^{d}	0.33±0.01^{d}	1.04±0.01^{c}

หมายเหตุ ค่าของข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันในแนวคอลัมน์แสดงถึงค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

เมื่อนำกากกาแฟหลังสกัดมาทำการสกัดด้วยเอทานอลแต่ละความเข้มข้น พบว่า กากกาแฟหลังสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 40 60 80 และ 95 มีค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดงและสีเขียว (a*) ค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (b*) อยู่ในช่วง 20.06-20.56, 1.66-11.26 และ (-1.16)-9.87 ตามลำดับ และมีปริมาณน้ำมัน อยู่ในช่วงร้อยละ 0.39-1.01 ดังตารางที่ 4.58 จากการทดลองพบว่า เมื่อนำกากกาแฟหลังสกัดมาสกัดน้ำมันอีกครั้ง ปริมาณน้ำมันที่ได้มีปริมาณลดลง ซึ่งขึ้นอยู่กับวิธีการสกัดเบื้องต้น ในส่วนของปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสมบัติการต้านออกซิเดชัน ซึ่งวัดโดยวิธี ABTS และวิธี FRAP มีค่าอยู่ในช่วง 1.31-15.78, 0.33-3.75 gGAE ต่อกากกาแฟ 100 กรัม และ 1.04-10.50 $gFeSO_4$ ต่อกากกาแฟ 100 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่สมบัติการต้านออกซิเดชันซึ่งวัดโดยวิธี DPPH มีค่าอยู่ในช่วง 4.99-68.19 mgGAE ต่อกากกาแฟ 100 กรัม ดังนั้นกากกาแฟหลังสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 60 จะทำให้คุณภาพกากกาแฟหลังสกัดด้านปริมาณน้ำมัน สารประกอบฟีนอลิก สมบัติการต้านออกซิเดชันซึ่งวัดโดยวิธี DPPH และ FRAP มีค่ามากที่สุด และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังตารางที่ 4.33

ตารางที่ 4.33 ค่าคุณภาพต่างๆ ของกากกาแฟหลังสกัดเปรียบเทียบทั้ง 2 วิธี

ค่าคุณภาพ	กากกาแฟหลังสกัด	
	สกัดด้วยน้ำ	สกัดด้วยเอทานอล
ค่าสี L* ^{ns}	20.11±0.03	20.05±0.14
ค่าสี a* ^{ns}	1.72±0.04	1.65±0.01
ค่าสี b* ^{ns}	-1.16±0.03	-1.17±0.04
ปริมาณน้ำมัน (ร้อยละ)	0.69±0.02^{b}	0.97±0.06^{a}
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (gGAE/100gSCG)	14.05±0.20^{b}	15.91±0.39^{a}
สมบัติการต้านออกซิเดชัน		
วัดโดยวิธี DPPH (mgGAE/100gSCG)	66.25±0.01^{b}	68.78±0.37^{a}
วัดโดยวิธี ABTS (gGAE/100gSCG)^{ns}	3.90±0.08	3.82±0.11
วัดโดยวิธี FRAP ($gFeSO_4$/100gSCG)	14.14±0.60^{a}	10.89±0.34^{b}

หมายเหตุ ค่าของข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง สิ่งทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และ ^{ns} หมายถึง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

จากตารางการศึกษาเปรียบเทียบค่าคุณภาพต่างๆ ของกากกาแฟหลังสกัดทั้ง 2 วิธี ดังตารางที่ 4.59 พบว่า ปริมาณน้ำมัน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สมบัติการต้านออกซิเดชันซึ่งวัดโดยวิธี DPPH และวิธี FRAP มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีค่าปริมาณน้ำมันเท่ากับ ร้อยละ 0.97 สารประกอบฟีนอลิกปริมาณเท่ากับ 15.91 gGAE ต่อกากกาแฟ 100 กรัม และสมบัติการต้านออกซิเดชันซึ่งวัดโดยวิธี DPPH เท่ากับ 68.78 mgGAE ต่อกากกาแฟ 100 กรัม ในขณะที่คุณภาพด้านค่าสี L*, a*, b* และสมบัติการต้านออกซิเดชันซึ่งวัดโดยวิธี ABTS ไม่มีความ

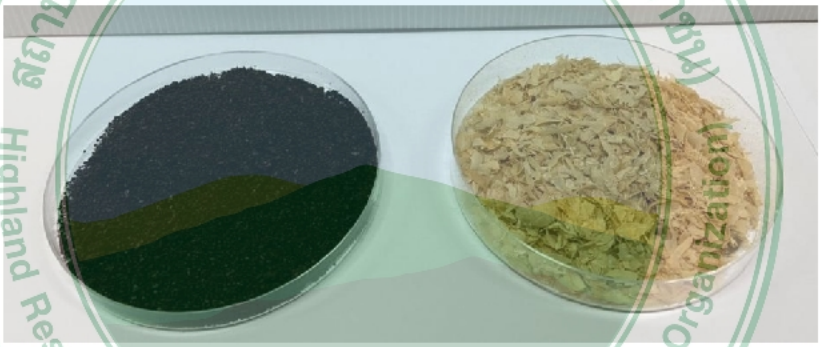
แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ซึ่งจากการเปรียบเทียบคุณภาพด้านต่างๆ ของกากกาแฟหลังสกัดทั้ง 2 วิธี สามารถสรุปได้ว่า กระบวนการสกัดที่เหมาะสมในการสกัดสารที่คงเหลือในกากกาแฟหลังสกัดน้ำมัน คือ การสกัดด้วยเอทานอล เนื่องจากมีปริมาณสารสำคัญคงเหลือในกากกาแฟหลังสกัดมากที่สุด ได้แก่ คุณภาพด้านปริมาณน้ำมัน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสมบัติการต้านออกซิเดชันซึ่งวัดโดยวิธี DPPH ทั้งนี้ในกระบวนการผลิตจริง การสกัดด้วยเอทานอลเป็นวิธีที่ต้องเพิ่มกระบวนการแยกเอทานอล ทำให้มีต้นทุนของกระบวนการเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงควรใช้วิธีการสกัดด้วยน้ำในการผลิตสารสกัดกากกาแฟที่มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสูง และสามารถประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมในอาหาร (food ingredient) และเครื่องดื่มได้

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน)
Highland Research and Development Institute (Public Organization)

4.4 การศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนาเยื่อเซลลูโลสสำหรับวัสดุกรองกาแฟหรือบรรจุภัณฑ์จากกะลากาแฟและกากกาแฟ

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกะลากาแฟและกากกาแฟ

เมื่อทำการเตรียมตัวอย่างกะลากาแฟ ที่มีความชื้นจนเหลือน้อยกว่าร้อยละ 10 และตัวอย่างกากกาแฟ ที่มีความชื้นจนเหลือน้อยกว่าร้อยละ 15 (ภาพที่ 4.26) นำมาวิเคราะห์หาปริมาณกากใย (fiber) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไฟเบอร์ (Fibertec™ 8000, FOSS, Denmark) และปริมาณเส้นใยอาหาร (dietary fiber) โดยวิธี AOAC (2016) พบว่ากะลากาแฟและกากกาแฟมีปริมาณกากใยเท่ากับ 50.46 และ 46.69 กรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม ตามลำดับ และมีปริมาณเส้นใยอาหารเท่ากับ 57.43 และ 70.35 กรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม โดยกากกาแฟหลังสกัดเอาน้ำมันออกของกาแฟอราบิก้า มีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของพิชัย (2559) และ Zainol *et al.* (2020) ซึ่งมีปริมาณกากใยอยู่ในช่วง 19.82-20.44 กรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม



(ก) (ข)

ภาพที่ 4.26 ตัวอย่าง (ก) กากกาแฟ (ข) กะลากาแฟ

สำหรับกะลากาแฟ มีปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เท่ากับ 20.83, 20.79 และ 8.83 กรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม ตามลำดับ และกากกาแฟ มีปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินเท่ากับ 11.55, 23.07 และ 12.07 กรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม ตามลำดับ สำหรับกากกาแฟมีปริมาณเซลลูโลสใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Mussatto *et al.* (2011) ซึ่งมีปริมาณเซลลูโลสเท่ากับ 8.6 กรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม

จากผลการวิเคราะห์ ปริมาณสารสำคัญข้างต้น ซึ่งพบว่าในกากกาแฟมีความเป็นไปได้ในการผลิตสารเพิ่มความทนร้อนในพอลิเมอร์ เพื่อพัฒนาเป็นพลาสติกทนร้อนจากกากกาแฟ รวมถึงยังสามารถผลิตเป็นกระดาษกรอง เพื่อใช้ในการกรองกาแฟในกระบวนการชงกาแฟแบบดริป นอกจากนี้ในกะลากาแฟยังมีความเป็นไปได้ในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ชนิด food grade และยังสามารถผลิตเป็นสารเคลือบผลไม้ รวมถึงผลิตไบโอพอลิเมอร์ฟิล์มที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

5.1 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เมล็ดกาแฟโครงการหลวงรูปแบบใหม่เสริมสารสกัดจากธรรมชาติด้วยเทคโนโลยีการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศ

5.1.1 การผลิตสารไอโซฟลาโวนจากจมูกถั่วเหลืองทำให้ได้ปริมาณสารไอโซฟลาโวนรวมที่สกัดได้จากจมูกถั่วเหลืองมีค่าเท่ากับ 1,156.84 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดโครงสร้างกลุ่มกลูโคไซด์ ได้แก่ สารไดซิน เจนิสทิน และไกลซิทิน มีค่าเท่ากับ 27.18, 111.08 และ 25.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และปริมาณของไอโซฟลาโวนชนิดโครงสร้างกลุ่มอะไกลโคน ได้แก่ สารไดซีอีน เจนิสทีอีน และไกลซิทีอีน เท่ากับ 457.37, 433.57 และ 102.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เป็นส่วนของสารสกัดกลุ่มไอโซฟลาโวนที่จะนำไปใช้ในกระบวนการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศในเมล็ดกาแฟดิบ

5.1.2 การผลิตสารกาบาจากสารสกัดจากหอมหัวใหญ่ พบว่า การใช้เชื้อ *M. varians* ในการหมักทำให้เกิดสารกาบาในสารสกัดเท่ากับ 2.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังการบ่มเป็นระยะเวลา 6 วัน เพื่อทำให้ได้สารสกัดกาบาไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เมล็ดกาแฟดิบโครงการหลวงรูปแบบใหม่เสริมสารสกัดจากธรรมชาติด้วยเทคโนโลยีการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศ

5.1.3 การศึกษาการสกัดสารคาเทชินจากใบชาเขียวด้วยน้ำ พบว่า สารสกัดมีปริมาณคาเทชินอยู่ในช่วง 0.00-71.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณอิพิคาเทชินอยู่ในช่วง 15.96-454.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดอยู่ที่ 89.47 องศาเซลเซียส (ประมาณ 90 องศาเซลเซียส) ใช้เวลาในการสกัด 60 นาที และอัตราส่วนใบชาต่อน้ำในการสกัดที่เหมาะสมอยู่ที่ 1:10

5.1.4 การศึกษาการออกแบบส่วนผสมของระบบสารละลายสารสกัดจากธรรมชาติ พบว่า สัดส่วนสารละลายสารสกัดจากธรรมชาติที่เหมาะสม คือ สารไอโซฟลาโวนร้อยละ 60 สารกาบาร้อยละ 20 และสารคาเทชินร้อยละ 20

5.1.5 กระบวนการแทรกซึมภายใต้สุญญากาศที่เหมาะสม ได้แก่ ระดับความดันสุญญากาศที่ -0.80 บาร์ ใช้ระยะเวลาคงความดันคงที่เป็นเวลา 60 นาที และระยะเวลาแช่เมล็ดกาแฟดิบที่ความดันบรรยากาศเป็นเวลา 60 นาที

5.2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารประกอบพันธะเชื่อมจากเมล็ดกาแฟอราบิก้าดิบโครงการหลวง

5.2.1 การศึกษากระบวนการผลิตสารประกอบพันธะเชื่อมจากเมล็ดกาแฟดิบที่เหมาะสม พบว่า กระบวนการให้ความร้อนแบบเปียก (wet process) มีความเหมาะสมในการผลิตสารประกอบพันธะเชื่อมจากเมล็ดกาแฟมากที่สุด เนื่องจากสามารถผลิตสารประกอบพันธะเชื่อม และเป็นกระบวนการที่สามารถทำได้ง่ายและประหยัดต้นทุนมากที่สุด

5.2.2 การศึกษากระบวนการผลิตสารประกอบพันธะเชื่อม โดยกระบวนการให้ความร้อนแบบเปียก (wet process) ที่เหมาะสมได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.88 โดยใช้อุณหภูมิ 86 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

5.3 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพจากกากกาแฟ

5.3.1 การศึกษาการเตรียมกากกาแฟที่เหมาะสมสำหรับนำไปสกัดน้ำมันกากกาแฟ พบว่า น้ำมันจากกากกาแฟที่ระดับการคั่วอ่อน และระดับคั่วกลาง มีปริมาณสารคาเฟสตอลและคาห์วีออลใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาปริมาณคาเฟสตอลและคาห์วีออลในน้ำมันกากกาแฟที่สกัดได้ พบว่า น้ำมันจากกากกาแฟที่ระดับการคั่วอ่อน จะมีปริมาณสารคาเฟสตอลและคาห์วีออลเท่ากับ 0.03 และ 0.43 มิลลิกรัมต่อน้ำมัน 100 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่น้ำมันจากกากกาแฟที่ระดับคั่วกลาง มีปริมาณสารคาเฟสตอลและคาห์วีออล เท่ากับ 0.12 และ 2.50 มิลลิกรัมต่อน้ำมัน 100 กรัม ตามลำดับ ดังนั้น น้ำมันจากกากกาแฟที่ระดับการคั่วกลางจึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

5.3.2 การศึกษากระบวนการสกัดที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันจากกากกาแฟ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันกากกาแฟได้แก่ การสกัดโดยวิธี SC-CO_2 โดยใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และความดันเท่ากับ 200 บาร์

5.3.3 การศึกษากระบวนการสกัดที่เหมาะสมในการสกัดสารที่คงเหลือในกากกาแฟหลังสกัดน้ำมัน พบว่า กระบวนการสกัดที่เหมาะสมคือ การสกัดด้วยเอทานอล เนื่องจากมีปริมาณสารสำคัญคงเหลือในกากกาแฟหลังสกัดมากที่สุด ได้แก่ คุณภาพด้านปริมาณน้ำมัน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสมบัติการต้านออกซิเดชันซึ่งวัดโดยวิธี DPPH ทั้งนี้ในกระบวนการผลิตจริง การสกัดด้วยเอทานอลเป็นวิธีที่ต้องเพิ่มกระบวนการและต้นทุนการผลิต ดังนั้นจึงควรใช้วิธีการสกัดด้วยน้ำ

5.4 การศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนาเยื่อเซลลูโลสสำหรับวัสดุกรองกาแฟหรือบรรจุภัณฑ์จากกะลากาแฟและกากกาแฟ

กะลากาแฟและกากกาแฟมีปริมาณกากใยเท่ากับ 50.46 และ 46.69 กรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม ตามลำดับ และมีปริมาณเส้นใยอาหารเท่ากับ 57.43 และ 70.35 กรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม ตามลำดับ กะลากาแฟ มีปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เท่ากับ 20.83, 20.79 และ 8.83 กรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม ตามลำดับ และกากกาแฟ มีปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เท่ากับ 11.55, 23.07 และ 12.07 กรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม ตามลำดับ ซึ่งพบว่าในกากกาแฟมีความเป็นไปได้ในการผลิตสารเพิ่มความทนร้อนในพอลิเมอร์ เพื่อพัฒนาเป็นพลาสติกทนร้อนจากกากกาแฟ รวมถึงยังสามารถผลิตเป็นกระดาษกรอง เพื่อใช้ในการกรองกาแฟในกระบวนการชงกาแฟแบบดริป นอกจากนี้ ในกะลากาแฟยังมีความเป็นไปได้ในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ชนิด food grade และยังสามารถผลิตเป็นสารเคลือบผลไม้ รวมถึงผลิตไบโอพอลิเมอร์ฟิล์มที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ