บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1) กากกาแฟบดแห้งมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน โดยวิธีการสกัดสารจากกากกาแฟบดแห้งที่ได้สารประกอบฟีนอลลิกและกรดคลอโรจีนิกที่สกัดได้ทั้งหมด และฤทธิ์การต้านออกซิเดชันปริมาณสูงสุด คือ สารละลายเมทานอลเข้มข้น 70% ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบชนิดสารสกัดต่อความสามารถในการสกัดสารจากกากกาแฟบดแห้งพบว่า สารละลายเมทานอลและเอทานอลเข้มข้น 70% มีประสิทธิภาพสูงกว่าน้ำกลั่นปราศจากไอออน ($p<0.05$)

2) วิธีการให้ความร้อนและสภาวะที่มีความเป็นกรดมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกที่สกัดได้ทั้งหมดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากกากกาแฟ โดยสภาวะที่มีความเป็นกรดมีผลลดปริมาณและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุด ($p<0.05$)

3) สารสำคัญที่พบปริมาณมากในสารสกัดจากกากกาแฟบดแห้ง เรียงลำดับดังนี้ คือ 4-CQA > 5-CQA > 3-CQA > 3,4-diCQA > 4,5-diCQA > 3,5-diCQA

4) สารสกัดจากการกาแฟในปริมาณ 0.5 และ 1.0 g gallic acid equivalent มีความสามารถลดปริมาณ ROS กลับสู่สภาวะปกติเมื่อเซลล์ HepG2 ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด ROS ด้วย H_2O_2

5) คุ๊กกี้ที่เติมกากกาแฟบดแห้งมีการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่เติม BHA

5.2 อภิปรายผล

งานวิจัยพบว่ากากกาแฟมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของกากกาแฟ โดยวิธีการใช้สารละลายเมทานอลเข้มข้น 70% ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกที่สกัดได้ทั้งหมดและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันสูงที่สุด เมื่อศึกษาสารสำคัญที่พบปริมาณมากในสารสกัดจากกากกาแฟ พบว่า สารสำคัญในสารสกัดจากกากกาแฟ คือ 3-CQA, 4-CQA และ 5-CQA จากนั้นเมื่อนำสารสกัดทดสอบความคงตัวต่ออุณหภูมิและสภาวะที่มีความเป็นกรด พบว่าสภาวะที่มีความเป็นกรดมีผลลดปริมาณและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุด และเมื่อทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในเซลล์ HepG2 พบว่าเซลล์ที่มีสารสกัดจากกากกาแฟสามารถลดปริมาณ ROS ได้ ในขณะที่เซลล์ HepG2 ที่ไม่มีสารสกัดจากกากกาแฟพบปริมาณ ROS มากกว่าถึง 15-18 เท่า และคุ๊กกี้ที่เติมกากกาแฟบดแห้งมีการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่เติม BHA

5.2.1 คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของกากกาแฟบดแห้ง

คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของกากกาแฟบดแห้งที่ได้จากการทดลอง (ตารางที่ 4.1) มีค่าใกล้เคียงกับรายงานค่าวิเคราะห์ในกากกาแฟทางการค้า Cruz et al. (2012) ได้รายงานปริมาณไนโตรเจน โปรตีน ไขมัน และเถ้าในกากกาแฟเอสเพสโซ่ทางการค้ามีค่าเท่ากับ 2.3, 14.2, 12.5 และ 1.9% dm ตามลำดับ เนื่องจากค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ (a_w) ของกากกาแฟบดแห้งมีค่า 0.21 (ตารางที่ 4.1) ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการค่าวอเตอร์แอกติวิตี้สำหรับการเจริญประมาณ $\geq$0.6 และการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี ดังนั้นการเสื่อมเสียของกากกาแฟบดแห้งจากจุลินทรีย์และเคมีจึงเกิดขึ้นได้ยาก ค่าพลังงาน (energy value) สำหรับการบริโภคกากกาแฟบดแห้งได้มาจากโปรตีนและไขมันเท่านั้น (ตารางที่ 4.1) คิดเป็นประมาณ 185 kcal/100g ซึ่งเป็นต่ำกว่าค่าพลังงานในกากกาแฟจากเมล็ดกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า คือ 411 kcal/100g (Martinez-Saez et al., 2017)

ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีที่พบมากที่สุดคือ ใยอาหาร (total dietary fiber) ประมาณ 72% และไม่มีน้ำตาลในปริมาณที่ตรวจวัดได้ (ตารางที่ 4.1) จึงแสดงให้เห็นว่ากากกาแฟบดแห้งเป็นสารที่มีค่า glycemic index ต่ำ และกากกาแฟบดแห้งเป็นแหล่งของใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble fiber) เป็นส่วนใหญ่ (คิดเป็น 67% ของใยอาหารทั้งหมด) (ตารางที่ 4.1) Martinez-Saez et al. (2017) ได้รายงานว่าการใช้กากกาแฟบดแห้งเป็นส่วนผสมอาหารนั้นมีความปลอดภัยทั้งทางจุลินทรีย์และทางเคมี และยังพบว่าใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำในกากกากแฟมีความคงตัวอูณหภูมิการอบผลิตภัณฑ์เบเกอรี (อุณหภูมิ 185 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 นาที)

คาแฟอีนจัดเป็นสารที่เป็นปัญหาหลักในการใช้ประโยชน์จากกากกาแฟ เนื่องจากเป็นสารที่ก่อความเป็นพิษ (toxicity) ได้ ในกากกาแฟบดแห้งมีปริมาณ 0.16% dry matter (ตารางที่ 4.1) ซึ่งถือว่ามีปริมาณไม่สูงมากนัก อาจเกี่ยวข้องกับโดยธรรมชาติเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อะราบิก้าจะมีปริมาณคาแฟอีนต่ำกว่ากาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า Cruz et al. (2012) รายงานค่าปริมาณคาแฟอีนของเมล็ดกาแฟดิบสายพันธุ์อะราบิก้าและโรบัสต้า คือ 0.8-1.4% และ 1.7-4.0% ตามลำดับ ข้อแนะนำการบริโภคคาแฟอีนในผู้ใหญ่คือ ประมาณ 200-300 mg/วัน (Gargulinski, 2017) ดังนั้นจึงมีความเป็นได้ในกรณีใช้กากกาแฟบดแห้งเป็นส่วนผสมอาหารที่ไม่ทำให้ผู้บริโภครับปริมาณคาแฟอีนสูงเกินกว่าค่าแนะนำ เนื่องจากพบปริมาณคาแฟอีนเพียง 160 mg/100g dm (ตารางที่ 4.1) นอกจากนี้หากใช้ประโยชน์กากกาแฟในรูปสารสกัดจากกาแฟหรือใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหาร (food additive) ปริมาณคาแฟอีนจะไม่เป็นปัญหาในการใช้ประโยชน์ เนื่องจากปริมาณคาแฟอีนจะลดต่ำลงมาก ตามรายงานของ Bravo et al. (2012) พบว่าปริมาณคาแฟอีนในสารสกัดจากกากกาแฟอยู่ระหว่าง 0.0038-0.0052% และ 0.0057-0.0075% สำหรับกากกาแฟจากเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อะราบิก้าและโรบัสต้า ตามลำดับ

5.2.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของกากกาแฟ

การสกัดเป็นขั้นตอนของการแยกเฉพาะสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากกากกาแฟบดแห้งเพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของกากกาแฟ สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่ในกากกาแฟ ส่วนที่สกัดออกมาได้จึงสามารถนำไปใช้งานตามวัตถุประสงค์ต่างๆ ได้ ซึ่งมีปัจจัยหลากหลายที่มีผลต่อปริมาณสารที่สกัดได้ เช่น ชนิดและปริมาณตัวทำละลาย (solvent) อัตราส่วนระหว่างของตัวอย่างและตัวทำละลาย อุณหภูมิ ค่า pH เวลา วิธีการให้ความร้อน และอื่นๆ (Ranic et al., 2014) วัตถุประสงค์ของการศึกษาวิธีการสกัดนี้ คือ เพื่อให้ได้สารสกัดจากกากกาแฟที่มีสารประกอบฟีนอลลิกและมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง อย่างไรก็ตามมีรายงานวิธีการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากกากกาแฟที่หลากกหลายทั้งชนิดสารสกัดพบว่ามีทั้งการใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออน สารละลายเอทานอล และสารละลายเมทานอล ณ ความเข้มข้นต่างๆ หรือสภาวะการสกัดก็มีความแตกต่างกัน

งานวิจัยนี้จึงเลือกวิธีการจากได้ศึกษาแล้วจากงานก่อนหน้า 5 วิธีการ โดยดัดแปลงสภาวะการสกัดเล็กน้อย (ภาคผนวกแสดงตารางเปรียบสภาวะการสกัดที่ใช้ในงานวิจัยกับวิธีการดั้งเดิม) ประกอบด้วย (1) สกัดด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน (100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที) (2) สารละลายเอทานอลเข้มข้น 20% (ไมโครเวฟพลังงาน 300 วัตต์ เป็นเวลา 45 วินาที) (3) สารละลายเอทานอลเข้มข้น 60% (35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที) (4) สารละลายเมทานอลเข้มข้น 60% (60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที) และ (5) สารละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 70% (35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง) ตามอัตราส่วนที่ระบุในวิธีการนั้นๆ (Belviso et al., 2014; Ranic et al., 2014; Martinez-Saez et al., 2017; Moon et al. 2009; Mussatto et al, 2011) จากผลการทดลองเห็นได้ว่าวิธีการสกัดด้วยสารละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 70% (35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง) ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ($p<0.05$) สอดคล้องกับค่าดูดกลื่นคลื่นแสงที่ 280 และ 420 นาโนเมตร ซึ่งแสดงถึงปริมาณสารประกอบกลุ่มอะโรมาติกและสารประกอบให้สีน้ำตาลตามลำดับ ที่ถูกสกัดออกมามากขึ้น (ตารางที่ 4.2) อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวใช้ระยะเวลาการสกัดที่ยาวนาน (12 ชั่วโมง) ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการนำไปใช้งานจริงที่จะมีต้นทุนทางเศรษฐกิจสูงกว่า ซึ่งหากพิจารณาผลการศึกษาเปรียบกับวิธีการอื่นๆ พบว่าใช้เวลาน้อยกว่า โดยบางวิธีการได้สารสกัดที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกัน คือ การสกัดด้วยสารละลายเมทานอลเข้มข้น 60% (60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที) ที่ให้ค่า DPPH ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) นอกจากนั้นเมื่อพิจารณาปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากวิธีการสกัดด้วยสารละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 70% (35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง) จะพบว่าไม่เป็นสัดส่วนที่สูงขึ้นตามระยะเวลาการสกัดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่นๆ (ใช้เวลาการสกัด 10 นาที ถึง 90 นาที) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกสภาวะการสกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ในการศึกษาชนิดสารสกัดที่เหมาะสมต่อไป

จากผลการทดลองเห็นได้ว่าค่าดูดกลื่นคลื่นแสงที่ 280 มีความสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (ตารางที่ 4.2) เนื่องจากสารประกอบกลุ่มฟีนอลลิกเป็นสารที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกที่สกัดได้ทั้งหมด เป็นที่น่าสังเกตว่าค่าดูดกลื่นคลื่นแสงที่ 420 นาโนเมตร มีความสอดคล้องกับค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกที่สกัดได้ทั้งหมดและค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 4.2) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสารเมลานอยดิน (melanoidin) ที่เกิดจากปฏิกิริยาเมลลาร์ดนั้นจะจับอยู่กับสารโมเลกุลขนาดเล็ก ซึ่งด้วยสารเมลานอยดินบริสุทธิ์นั้นไม่แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระหรือมีฤทธิ์ต่ำมาก แต่สารประกอบที่ทำให้สารเมลานอยดินแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้นั้นเกิดจากสารโมเลกุลขนาดเล็ก ซึ่งเมื่อระบุชนิดแล้วคือ กรดคลอโรจีนิก (Delgado-Andrade, Rufián-Henares, and Morales, 2005; Delgado-Andrade and Morales, 2005; Rufián-Henares and Morales, 2007)

จากผลการทดลองดังตารางที่ 4.2 จะสามารถระบุวิธีการที่ได้สารสกัดที่มีค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดได้ แต่เป็นข้อสงสัยถึงประสิทธิภาพของชนิดตัวทำละลายที่ใช้ และสภาวะการสกัด เนื่องจากวิธีการใช้สารละลายเอทานอลเข้มข้น 60% (35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที) และสารละลายเมทานอลเข้มข้น 60% (60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที) ซึ่งใช้เวลาการสกัดน้อยกว่าแต่ได้สารประกอบฟีนอลลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ในปริมาณสูง นอกจากนี้สารเมทานอลจัดเป็นสารที่มีพิษ เนื่องจากเป็นสาเหตุของการสะสมของกรดฟอร์มิกในร่างกาย ซึ่งทำให้เกิด metabolic acidosis และ ocular toxicity ในผู้ที่บริโภคเมทานอลได้ หากพบเมทานอลตกค้างอยู่ในสารสกัดอาจเป็นข้อจำกัดในการใช้ประโยชน์ต่อไป

งานวิจัยจึงทดสอบเพื่อเปรียบเทียบสารสกัดจำนวน 3 ชนิด คือ น้ำกลั่นปราศจากไอออน สารละลายเอทานอลเข้มข้น 70% และสารละลายเมทานอลเข้มข้น 70% โดยสกัดสารที่สภาวะเดียวกัน คือ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารละลายเอทานอลและสารละลายเมทานอลมีประสิทธิภาพการสกัดสารประกอบฟีนอลลิกไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) และสูงกว่าการใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออน ($p<0.05$) รวมถึงสารสกัดที่ได้มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า ($p<0.05$) (ตารางที่ 4.3) แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากกากกาแฟเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ชอบน้ำ (hydrophilic bioactive compound) เนื่องจากสกัดได้ดีด้วยตัวทำละลายที่มีขั้ว (polar) Bravo et al. (2013) ได้ทดสอบวิธีการสกัดสารประกอบฟีนอลลิกจากกากกาแฟพบว่าน้ำกลั่นปราศจากไอออนได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกสูงกว่าเอทานอล (100%) และเมทานอล (100%) ($p<0.05$) แต่การใช้สารละลายเอทานอลเข้มข้น 60% และสารละลายเมทานอลเข้มข้น 30% ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกสูงกว่าน้ำกลั่นปราศจากไอออน อย่างไรก็ตามผลการศึกษาของ Bravo et al. (2013) พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH ในสารสกัดจากน้ำกลั่นปราศจากไอออนมีค่าสูงสุด ($p<0.05$) แสดงให้เห็นว่าปริมาณสารประกอบฟี

นอลลิกอาจไม่สามารถบ่งชี้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ ซึ่งคล้ายคลึงกับผลการทดลองเมื่อวิเคราะห์ค่าความสามารถในการจับโลหะ (metal chelating ability) (ตารางที่ 4.3) พบว่าสารสกัดด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนมีค่าสูงสุด ($p<0.05$) ในขณะที่ค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ (ABTS, DPPH และ FRAB) มีค่าต่ำกว่า ($p<0.05$) ทั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกที่สกัดได้มีความแตกต่างกันระหว่างน้ำกลั่นปราศจากไอออนและสารตัวทำละลาย (เอทานอลและเมทานอล) ซึ่งจะเกี่ยวข้องฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่แสดงออกมา จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากน้ำกลั่นปราศจากไอออนได้สารส่วนใหญ่ที่สามารถจับกับโลหะไอออน (metal chelating) ได้ดี ซึ่งโลหะไอออนมีผลต่อเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Alam, Bristi, and Rafiquzzaman, 2013) ขณะที่สารตัวทำละลาย (เอทานอลและเมทานอล) จะสกัดได้สารประกอบส่วนใหญ่ที่มีผลต่อการยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain-breaking activity) และได้สารรีดักแทนซ์ (reductant) ที่สามารถรีดิวซ์เฟอริคให้เป็นเฟอรัสได้ (Krishnaiah, Sarbatly, and Nithyanandam, 2011; Bravo et al., 2013) ดังนั้นการเลือกใช้สารสกัดมีผลต่อกลไกของฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่ได้จากกากกาแฟ

5.2.3 การระบุชนิดและปริมาณสารสำคัญ และการศึกษาผลของอุณหภูมิและวิธีการแปรรูปต่อเสถียรภาพสารต้านออกซิเดชันในกากกาแฟ

เมื่อวิเคราะห์ระบุชนิดและปริมาณสารสำคัญที่ได้สกัดได้จากสารสกัดจำนวน 3 ชนิด คือ น้ำกลั่นปราศจากไอออน สารละลายเอทานอลเข้มข้น 70% และสารละลายเมทานอลเข้มข้น 70% ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.4 ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้วิธีการ liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometric method ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถระบุชนิดสารประกอบฟีนอลลิกอย่างชัดเจนโดยเทียบ parent m/z (MS1) และ fragment m/z (MS2) โดยใช้สารมาตรฐานเป็นสารต้นแบบเพื่อเปรียบเทียบ ทั้งนี้เนื่องจากสารประกอบฟีนอลลิกยังไม่มีฐานข้อมูล (database) ที่สมบูรณ์เพียงพอที่จะใช้ระบุชนิดสารประกอบอย่างแน่ชัดโดยไม่ใช้สารมาตรฐาน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงจำเป็นต้องเลือกชนิดสารสำคัญจากเอกสารอ้างอิง ซึ่งมีงานวิจัยที่หลากหลายที่ศึกษาชนิดสารประกอบฟีนอลิกสำคัญในเมล็ดกาแฟ ในเครื่องดื่มกาแฟหรือสารสกัดจากกากกาแฟพบว่า 5-caffeoylqunic acid (5-CQA) เป็นสารประกอบกลุ่มกรดคลอโรจีนิกชนิดหลักที่พบในเครื่องดื่มกาแฟ และกากกาแฟ (Cruz et al., 2012; Ludwig et al., 2012) สารสำคัญในกลุ่มกรดคลอโรจีกอื่นๆ ที่พบในกาแฟชงและกากกาแฟ คือ monocaffeoylquinic acid (ได้แก่ 3-caffeoylqunic acid : 3-CQA; 4-caffeoylqunic acid : 4-CQA); dicaffeoylquinic acid (ได้แก่ 3, 4-dicaffeoylqunic acid , 3, 4-diCQA; 3,5-dicaffeoylqunic acid : 3, 5-diCQA; 4,5-dicaffeoylqunic acid : 4, 5-diCQA), feruloylquinic acid (ได้แก่ 3-feruloylquinic acid, 3-FQA; 4-feruloylquinic acid, 4-FQA; 5-feruloylquinic acid, 5-FQA), ferulic acid, *p*-coumaric acid, sinapic acid, 4-hyroxybenzoic acid และ caffeic acid (Moon, Yoon, and Shibamoto, 2009; Bravo et al., 2012; Ludwig et al., 2012;

Monente et al., 2015) เมื่อพิจารณาปริมาณที่มีรายงานแล้ว จึงเลือกวิเคราะห์สารดังนี้ 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA, 4-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, sinapic acid และ ferulic acid

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารสำคัญกลุ่มกรดคลอโรจีนิกในภาพรวมได้เป็นดังนี้ 4-CQA > 5-CQA > 3-CQA > 3,4-diCQA > 4,5-diCQA > 3,5-diCQA (ตารางที่ 4.4) โดยกลุ่ม monocaffeoylquinic acid มีปริมาณสูงกว่ากลุ่ม dicaffeoylquinic acid ตามรายงานของ Xu et al. (2015) พบว่าปริมาณสารสำคัญในสารสกัดจากกากกาแฟ คือ 5-CQA > 4-CQA > 3-CQA หรือรายงานของ Ludwig et al. (2012) พบปริมาณสารกาแฟชงเอสเพสโซ่ คือ 5-CQA > 4-CQA > 3-CQA > 3,4-diCQA ≈ 4,5-diCQA > 3,5-diCQA และ Bravo et al. (2012) พบว่า 5-CQA > 4-CQA > 3-CQA > 3,4-diCQA > 4,5-diCQA > 3,5-diCQA ซึ่งผลที่ได้แตกต่างจากงานวิจัยนี้เล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณสารสำคัญกลุ่ม chlorogenic acid ในสารสกัดจากกากกาแฟเกี่ยวข้องกับแหล่งที่มาและสายพันธุ์ของเมล็ดกาแฟ (Daglia et al., 2000; Richelle, Tavazzi, and Offord, 2001; Moon, Yoon, and Shibamoto, 2009; Bravo et al., 2012) วิธีการคั่วเมล็ดการแฟดิบ (roating processs) (Nicoli, Anese, Manzocco, and Lerici, 1997;Daglia et al., 2000; Richelle, Tavazzi, and Offord, 2001; del Castillo, Ames, and Gordon, 2002; de Silveira Duarte et al., 2005; Cämmerer and Kroh, 2006; Moon, Yoon, and Shibamoto, 2009; Perrone et al., 2012; Vignoli et al., 2014) การเตรียมกาแฟ (Sánchez-González, Jiménez-Escrig, and Saura-Calixto, 2005; Bravo et al., 2012; Ludwig et al., 2012) และวิธีการสกัดสารจากกากกาแฟ (Bravo et al., 2012; Ludwig et al., 2012; Al-Dhabi, Ponmurugan, & Jeganathan, 2017) เนื่องจากสารประกอบที่ได้จากการสกัดนั้นคือ ส่วนที่เหลืออยู่จากการเตรียมกาแฟและสกัดด้วยตัวทำละลายได้ แต่อย่างไรก็ตาม Xu et al. (2015) พบว่าสารประกอบฟีนอลลิก 3 ชนิด คือ 3-CQA, 4-CQA และ 5-CQA เป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในกากกาแฟเมื่อวิเคราะห์ด้วย ABTS ในขณะที่ Gómez-Ruiz, Leake, and Ames (2007) รายงานว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (วิเคราะห์ด้วย ABTS) มีลำดับดังนี้ ferulic acid > caffeic acid > chlorogenic acid > m-coumaric acid และไม่พบว่าคาแฟอีนมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ซึ่ง ferulic acid ตรวจไม่พบในสารสกัดจากกากกาแฟบดแห้ง (ตารางที่ 4.4) ขณะที่ Sato et al. (2011) รายงานว่า caffeic acid มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารกรดคลอโรจีนิกเมื่อทดสอบแบบ in vitro study Choi and Koh (2017) พบว่ากรดแกลลิกให้ฤทธิ์คล้าย superoxide dismutase (SOD)-like activity และ protocatechuic active มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสัมพันธ์กับค่า FRAB เมื่อสกัดสารจากกากกาแฟด้วยเมทานอล (methanolic extract) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่ได้จากน้ำกลั่นปราศจากไอออน สารละลายเอทานอล

เข้มข้น 70% และสารละลายเมทานอลเข้มข้น 70% ได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญเป็นกลุ่มสารชนิดเดียวกัน

สารสกัดกลุ่มกรดคลอโรจีนิกที่ได้จากกากกาแฟจะพบว่าปริมาณของสาร monocaffeoylquinic acid สูงกว่าสาร dicaffeoylquinic acid (ตารางที่ 4.4) ข้อสันนิษฐานคือ ในระหว่างการคั่วเมล็ดกาแฟสารกลุ่มกรดคลอโรจีนิกจะเชื่อมกับสารเมลานอยดินด้วยสาร hydroxycinnamic acid (เช่น caffeic acid) ซึ่งสารกลุ่ม dicaffeoylquinic acid เมื่อเชื่อมกับสารเมลานอยดินแล้วจะถูกสกัดได้เป็นสารรูปโมแลกุลอิสระได้ยากกว่ากลุ่ม monocaffeoylquinic (Perrone et al., 2012) จึงทำให้พบสาร monocaffeoylquinic ในปริมาณสูงกว่าในสารสกัดจากกากกาแฟ (ตารางที่ 4.4) นอกจากนั้นเมื่อเปรียบเทียบสารสกัดกลุ่มกรดคลอโรจีนิกแต่ละชนิดที่ได้จากน้ำกลั่นปราศจากไอออน สารละลายเอทานอลเข้มข้น 70% และสารละลายเมทานอลเข้มข้น 70% (ตารางที่ 4.4) พบว่าการใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็นสารสกัดได้ปริมาณสารกลุ่ม monocaffeoylquinic acid และ dicaffeoylquinic acid สูงกว่าตัวทำละลายที่มีขั้ว (polar solvent) เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมด (ในหน่วย gram gallic acid equivalent) ที่เท่ากัน (ตารางที่ 4.4) แสดงให้เห็นว่าสารกลุ่มกรดคลอโรจีนิกมีแนวโน้มที่จะละลายในน้ำมากกว่าในตัวทำละลายที่มีขั้ว แต่ตัวทำละลายที่มีขั้วจะมีประสิทธิภาพสกัดสารประกอบฟีนอลลิกในกากกาแฟที่อาจจับอยู่กับสารต่างๆ เช่น โพลีแซคคาไรด์ หรือเมลานอยดินได้ดีกว่าน้ำกลั่นปราศจากไอออน ซึ่ง Monente et al. (2015) รายงานว่าสารประกอบฟีนอลลิกในเมล็ดกาแฟคั่วมีประมาณ 54% ที่เชื่อมพันธะกับสารเมลานอยดิน โดยพันธะที่เชื่อมโมเลกุลเข้าไว้ด้วยกันนั้นส่วนใหญ่เป็นพันธะนันโคเวเลนซ์ (non-covalent interaction) ดังนั้นการใช้ความร้อนร่วมกับตัวทำละลายที่มีขั้วจึงมีประสิทธิภาพการสกัดสารจากกากกาแฟได้ปริมาณทั้งหมดสูงกว่า

เช่นเดียวกับปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแต่ละชนิดเปรียบเทียบกับปริมาณของสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมด (ในหน่วย gram gallic acid equivalent) ที่เท่ากัน พบว่าการใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็นสารสกัดจะได้ปริมาณสารสำคัญ ได้แก่ monocaffeoylquinic acid ทั้ง 3 ชนิด (3-CQA, 4-CQA และ 5-CQA) และ caffeic acid สูงที่สุด (ตารางที่ 4.4) แสดงให้เห็นว่าน้ำกลั่นปราศจากไอออนมีประสิทธิภาพสกัดสารสำคัญได้ดี ($p<0.05$) แต่ปริมาณรวมทั้งหมดได้น้อยกว่าการใช้สารละลายเอทานอลและเมทานอล (ตารางที่ 4.3) ทำให้พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารละลายที่มีขั้ว

เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิหรือวิธีการให้ความร้อนและสภาวะที่มีความเป็นกรดมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (ตารางที่ 4.5) โดยพบว่าการใช้ความร้อนแห้ง (dry heat) ด้วยวิธีอบลมร้อนมีผลต่อการลดลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกน้อยกว่าความร้อนชื้น (moist heat) ด้วยวิธีนึ่ง ต้ม และหม้อนึ่งแรงดันสูง (ตารางที่ 4.5) del Castillo, Ames, and Gordon (2002) พบว่าการคั่วเมล็ดกาแฟแบบอ่อน (light) และกลาง (medium) พบค่าปริมาณกรดคลอโรจีนิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการคั่วแบบเข้ม (dark) แสดงให้เห็นว่าโดยธรรมชาติความร้อนมีผลต่อการลดลงของ

สารประกอบฟีนอลลิกและกรดคลอโรจีนิก แต่ยังไม่มีรายงานการลดลงของกรดคลอโรจีนิกในสภาวะความร้อนชื้น ทั้งนี้การต้มและนึ่งมีผลต่อการลดลงของปริมาณกรดคลอโรจีนิกไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่การใช้หม้อต้มแรงดันสูงมีผลต่อปริมาณกรดคลอโรจีนิก ($p<0.05$) ที่มีค่าปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมดเหลือประมาณ 68% เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม (ตารางที่ 4.5) นอกจากนี้การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ ซึ่งเป็นวิธีการเกิดขึ้นของความร้อนภายในตัวของอาหาร ไม่มีผลต่อปริมาณสาร chlorogenic acid ($p>0.05$) (ตารางที่ 4.5) ดังนั้นการอุ่นอาหารด้วยไมโครเวฟจึงอาจไม่มีผลต่อปริมาณสาร chlorogenic acid ในสารสกัดจากกากกาแฟ การใช้สารสกัดจากกากกาแฟในอาหารที่มีค่า pH ต่ำหรือมีความเป็นกรด เช่น น้ำสลัด (salad dressing) อาหารหรือเครื่องดื่มปรับกรด (acidified low-acid food or beverage) มีผลต่อการลดลงของปริมาณสาร chlorogenic acid ($p<0.05$) โดยพบว่าปริมาณฟีนอลลิกเหลือประมาณ 45-54% เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม (ตารางที่ 4.5)

เมื่อพิจารณาปริมาณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (ABTS, DPPH และ FRAB) พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกับปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมดและปริมาณกรดคลอโรจีนิก (ตารางที่ 4.5) แสดงให้เห็นว่าวิธีการให้ความร้อนและสภาวะที่มีความเป็นกรดทั้งการอบลมร้อน ต้ม นึ่ง หม้อนึ่งแรงดันสูง ไมโครเวฟ และ pH 4 มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกที่คงที่หรือลดลงโดยตรง งานวิจัยนี้จึงทำการระบุชนิดสารและปริมาณของสารสำคัญที่คงเหลือในสารสกัดจากกากกาแฟเมื่อผ่านการอบลมร้อน (เป็นตัวแทนของการใช้ความร้อนแห้ง) และหม้อนึ่งแรงดันสูง (เป็นตัวแทนของการใช้ความร้อนชื้น) พบว่าการอบลมร้อนมีผลลดปริมาณ 3-CQA, 5-CQA, 3, 4-diCQA, 4, 5-diCQA, caffeic acid, และ p-coumaric acid ขณะที่สภาวะหม้อนึ่งแรงดันสูงมีผลลดปริมาณ 3-CQA เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมด (ในหน่วย gram gallic acid equivalent) ที่เท่ากัน (ตารางที่ 4.6) การลดงลงของสารประกอบฟีนอลลิกเกิดขึ้นเมื่อเมล็ดกาแฟได้รับอุณหภูมิสูง โดยมีรายงานว่าสารประกอบกลุ่มกรดคลอโรจีนิกทั้ง monocaffeoylquinic acid (3-CQA, 4-CQA และ 5-CQA) และ dicaffeoylquinic acid (3, 4-diCQA, 3, 5-diCQA และ 4, 5-diCQA) จะลดปริมาณลงในระหว่างการคั่วเมล็ดกาแฟ (อุณหภูมิประมาณ 230-250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-21 นาที) (Moon, Yoon, and Shibamoto, 2009) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแม้ว่าการอบลมร้อนจะลดปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกหรือ chlorogenic acid ทั้งหมดเพียงเล็กน้อยแต่มีผลต่อการลดลงของสารสำคัญหลายชนิด ในขณะที่สภาวะหม้อนึ่งแรงดันสูงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกลิกหรือ chlorogenic acid ทั้งหมดสูงกว่าโดยมีผลต่อปริมาณ 3-CQA มากที่สุด (ตารางที่ 4.6)

5.2.4 การศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในเซลล์ของสารสกัดจากกากกาแฟ

การวิจัยได้ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ HepG2 พบว่าสารสกัดจากกากกาแฟไม่มีฤทธิ์เป็นสารกระตุ้นการเกิดออกซิเดชันในเซลล์ (pro-oxidants) ทั้งสารสกัดจากกาแฟ สารสกัดจากกาแฟที่ผ่าน

การอบลมร้อนและที่ผ่านหม้อนึ่งแรงดันสูง (ภาพที่ 4.2) โดยพิจารณาจากเมื่อเติมตัวอย่าง SCG0.5 และ SCG1.0 ไม่พบการสร้าง ROS เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (C) และสารควบคุม *N*-acetyl-L-cysteine (สารต้านอนุมูลอิสระ, antioxidant) แสดงให้เห็นว่าสารประกอบในสารสกัดจากกาแฟไม่มีผลเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดจากการออกซิเดชัน (oxidative stress) ภายในเซลล์ ทั้งจากการสร้าง ROS ขึ้นเองหรือยับยั้งระบบป้องกันออกซิเดชัน (antioxidant system) ภายในเซลล์

เมื่อเติมสาร H_2O_2 พบว่าภายในเซลล์ HepG2 มี ROS เกิดขึ้นจำนวนมากประมาณ 15-17 เท่า (ตัวอย่าง H_2O_2, ภาพที่ 4.2) แสดงให้เห็นว่า ระบบป้องกันความเครียดจากการออกซิเดชันภายเซลล์ไม่สามารถลดปริมาณ ROS ลงให้อยู่ในระดับปกติได้ ซึ่งตามปกติภายในเซลล์จะมีระบบป้องกันออกซิเดชัน เช่น superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidases, peroxiredoxins เป็นต้น (Du et al., 2012) แต่เนื่องจากเซลล์ได้รับสารกระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชันปริมาณสูงกว่าความสามารถของเซลล์ในการกำจัด ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ จึงคงตรวจวัดปริมาณสาร ROS ได้ในปริมาณสูง

เมื่อทดสอบโดยบ่มเซลล์ HepG2 กับสารสกัดจากการกาแฟในปริมาณ 0.5 และ 1.0 gram gallic acid equivalent ภายหลังการได้รับ H_2O_2 (ตัวอย่าง H_2O_2 + SCG0.5 และ H_2O_2 + SCG1.0, ภาพที่ 4.2) พบว่าปริมาณ ROS ลดลงอยู่ในระดับที่ปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (C) ของทั้งสารสกัดจากกาแฟ สารสกัดจากกาแฟที่ผ่านการอบลมร้อนและที่ผ่านหม้อนึ่งแรงดันสูง ($p>0.05$) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากกากกาแฟมีความสามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันในระบบเซลล์ได้ แม้ว่าสารสกัดจากกากกาแฟจะผ่านความร้อนสูงทั้งแบบความร้อนแห้ง (dry heat) และความร้อนชื้น (moist heat) ที่อุณหภูมิสูง 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตามลำดับ

หากพิจารณาชนิดและปริมาณสารสำคัญจะพบว่าตัวอย่างปริมาณของสารสำคัญทั้ง 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA และ caffeic acid มีปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น สารสกัดจากกากกาแฟ (control) มีปริมาณ 3-CQA และ caffeic acid สูงที่สุด ในขณะที่สารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านหม้อนึ่งแรงดันสูงมี 4-CQA และ 5-CQA สูงที่สุด (ตารางที่ 4.6) ซึ่งผลการลดลงของ ROS ภายในเซลล์ HepG2 ที่เติมสารสกัดจากกากกาแฟที่ทดสอบนั้นไม่ได้เกิดจากสารประกอบชนิดใดชนิดหนึ่ง แต่เป็นอาจเป็นผลทำงานร่วมกัน (synergistic effect) ของสารหลายๆ ชนิด ดังเช่นผลรายงานของ Richelle, Tavazzi, and Offord (2001) พบว่าเครื่องดื่มกาแฟมีสารออกฤทธิ์ต้านการออกซิเดชันของ LDL-cholesterol ในเลือดของมนุษย์ ซึ่งสันนิษฐานว่าเกิดจากสารประกอบฟีนอลิกหลายหลายชนิดที่ทำงานร่วมกัน อย่างไรก็ตามมีรายงานของ Gómez-Ruiz, Leake, and Ames (2007) ได้ทดสอบการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของ LDL-cholesterol ด้วยสาร caffeic acid, ferulic, isoferulic และ vanillic acid พบว่ามีเฉพาะ caffeic acid เท่านั้นที่ช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชันได้

5.2.5 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิดในอาหาร

ในขั้นต้นงานวิจัยได้วางแผนการทดลองโดยใช้สารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการระเหิดแห้ง (lyophilized sample) เติมลงในผลิตภัณฑ์คุ๊กกี้ และพัฒนาวิธีการวิเคราะห์การเกิดออกซิเดชันในอาหารด้วยวิธีการ peroxide value (PV) และ thiobarbituric acid (TBA) test โดยใช้เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ใช้ปริมาณตัวอย่างวิเคราะห์น้อยกว่าวิธีการมาตรฐานของ AOAC และ AOCS (titration method) โดยงานวิจัยได้เริ่มต้นพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ค่า PV ด้วยวิธีการ ferric thiocyanate assay (ISO3976:2006(E), IDF74:2006(E)) พบว่าตัวอย่างไขมันสกัดจากคุ๊กกี้ที่มีกลิ่นหืนไม่เกิดปฏิกิริยากับเฟอรัส (Fe^{2+}) และไม่เกิดเป็นสีแดง ซึ่งในการวิเคราะห์สารมาตรฐานเฟอริก (Fe^{3+}) นั้นให้สีแดงที่เป็นปกติ จากนั้นจึงทดสอบวิธีการ TBA test (spectrophotometer) พบว่าเมื่อทดสอบกับสารมาตรฐาน 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) ให้สีของปฏิกิริยาเป็นสีชมพูแดง (red chromogen) ที่มีความเข้มของค่าการดูดกลืนคลื่นแสงเป็นไปตามความเข้มข้นของ TEP ซึ่งเป็นไปตามหลักการวิเคราะห์ แต่เมื่อทดลองกับตัวอย่างคุ๊กกี้พบว่าปฏิกิริยาที่ได้กลับเป็นสีเหลือง ทั้งนี้อาจเนื่องชนิดของสารประกอบกลิ่นหืนนั้นมีผลต่อระบบการวิเคราะห์ โดยหากสารประกอบกลิ่นหืนในอาหารเป็นสารมาลอนไดแอลดีไฮด์ (malondialdehyde: MDA) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี TBA test จะได้สีชมพู (เป็นไปตามหลักการวิเคราะห์) แต่หากสารประกอบที่ได้เป็นกลุ่มอัลดีไฮด์ (aldehyde) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี TBA test จะได้ปฏิกิริยาที่มีสีเหลือง (Rossell, 1999) ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์ PV และ TBA test ดังกล่าวจึงไม่เหมาะสมสำหรับการทดลองนี้เนื่องจากเป็นได้ว่าสารประกอบที่ก่อให้เกิดกลิ่นหืนส่วนใหญ่ในผลิตภัณฑ์คุ๊กกี้นี้มีสารกลุ่มอัลดีไฮด์เป็นสารประกอบหลัก

จากนั้นจึงได้วางแผนการทดลองโดยใช้กากกาแฟบดแห้งในการเตรียมผลิตภัณฑ์คุ๊กกี้ โดยอ้างอิงงานวิจัยของ Martinez-Saez et al. (2017) ที่นำเสนอการใช้กากกาแฟบดแห้งเป็นส่วนผสมหนึ่งในอาหารเพื่อทดแทนการเตรียมสารสกัดที่มีขั้นตอนมากกกว่าการใช้กากกาแฟบดแห้งโดยตรงและได้ประโยชน์จากใยอาหาร (dietary fiber) ที่มีอยู่มากในกากกาแฟ ในงานวิจัยดังกล่าวได้ทดสอบใช้กากกาแฟบดแห้งในการผลิตบิสกิต (biscuit) วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนการ และความปลอดภัยในอาหาร งานวิจัยดังกล่าวสรุปได้ว่ากากกาแฟบดแห้งมีความคงตัวต่อสภาวะการเตรียมบิสกิต มีความปลอดภัยสำหรับการบริโภค และบิสกิตที่เติมกากกาแฟบดแห้งเป็นที่ยอมรับทางประสาทสัมผัส แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยไม่ได้ระบุถึงความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิดในผลิตภัณฑ์อาหาร ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทดสอบการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิดในผลิตภัณฑ์คุ๊กกี้ที่เติมกากกาแฟบดแห้ง

การวิจัยได้วิเคราะห์การเกิดออกซิเดชันของไขมันโดยวิธี acid value ที่สะท้อนการเกิดกลิ่นหืนจากการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ (หรือเรียกว่า hydrolytic rancidity) และวิธี PV เพื่อวิเคราะห์การเกิดสารเพอร์ร็อกไซด์ (peroxide) ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) (หรือเรียกว่า oxidative rancidity) ที่เกิดในช่วงต้นของปฏิกิริยาการเกิดกลิ่นหืน การทดลองได้ใช้สารบิวทิเลเทตไฮดรอกซีแอนิโซล (butylated

hydroxyanisole: BHA) เป็นสารยั้บยั้งการเกิดกลิ่นหืนทางการค้า ใช้เติมลงในคุ๊กกี้เพื่อเป็นตัวอย่างควบคุม โดยเติมในปริมาณเป็นตามปริมาณสูงสุดที่อนุญาตในประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 389 (พ.ศ.2561) เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 5) คือ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สำหรับตัวอย่างทดสอบนั้นได้เติมกากกาแฟบดแห้งที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 และ 8 ลงในสูตรคุ๊กกี้ โดยคิดเป็นคิดเป็นร้อยละ 15 และ 30 โดยน้ำหนักของไขมันทั้งหมดในสูตรคุ๊กกี้ ตามลำดับ การทดลองใช้วิธีการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันที่อุณหภูมิสูง (60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วัน)

จากผลการทดลองพบว่าค่า acid value ของทุกตัวอย่าง (C, BHA, SCG4 และ SCG8) ไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 4.3ก) แสดงให้เห็นว่าตลอดช่วงเวลาการศึกษา (45 วัน) ตัวอย่างคุ๊กกี้ไม่พบการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ ซึ่งเกิดกรดไขมันอิสระในตัวอย่างจะมีผลอย่างมากต่อการเร่งการเกิด “oxidative rancidity” Patrignani, Conforti, and Lupano (2014) ได้รายงานว่าน้ำมันแต่ละชนิดมีความคงตัวต่อการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยอุณหภูมิสูงที่แตกต่างกัน เช่น เวลาที่ใช้เหนี่ยวนำให้น้ำมันเกิดออกซิเดชันที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสในน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน (sunflower oil) น้ำมันข้าวโพด (corn oil) และน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูง (high oleic sunflower oil) คือ 2.9, 11.4, และ 27.3 ชั่วโมง ทั้งนี้ไขมันพืชที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงจะมีความคงตัวต่อการเกิดออกซิเดชันน้อยกว่าไขมันจากสัตว์ (เช่น เนย (butter) เป็นต้น) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเนยเค็ม (salted butter) ที่ใช้ในการวิจัยมีความคงตัวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีมาก นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าค่า acid value เริ่มต้น (0 day) ของตัวอย่าง SCG4 และ SCG8 (ภาพที่ 4.3ก) สูงกว่าตัวอย่าง C และ BHA อาจเนื่องจากกากกาแฟบดแห้งมีปริมาณไขมัน (ประมาณร้อยละ 14) ซึ่งบางส่วนของน้ำมันในธรรมชาติของกากกาแฟเมื่อผ่านสภาวะการอบคุ๊กกี้จึงเกิดเป็นกรดไขมันอิสระได้ ทำให้พบค่าเริ่มต้นสูงกว่าตัวอย่างควบคุม ตามปกติผลิตภัณฑ์เบเกอรีการวิเคราะห์ค่า acid value สามารถใช้บ่งชี้แนวโน้มเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์ได้ Koczoń et al. (2016) รายงานค่า %free fatty acidของบิสกิตทางการค้าที่เติมข้าวโอ๊ตมีค่าเริ่มต้น 3.8% เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 เดือนมีค่าเพิ่มเป็น 8.2% เช่นเดียวกับบิสกิตที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 42 วัน พบค่า %free fatty acid เพิ่มขึ้นจาก 7.1% เป็น 14.10% (Reddy, Urooj, and Kumar, 2005)

เมื่อพิจารณาค่า PV ซึ่งแสดงถึง “oxidative rancidity” ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวนั้น (ภาพที่ 4.3ข) พบว่า ในช่วงการบ่มก่อน 20 วันแรกนั้นตัวอย่างคุ๊กกี้ที่เติม BHA มีค่า PV ต่ำกว่าตัวอย่างอื่นๆ ซึ่งตัวอย่างคุ๊กกี้ที่เติมกากกาแฟบดแห้ง SCG4 และ SCG8 กลับพบค่าที่สูงกว่าตัวอย่างควบคุม ทั้งนี้เป็นข้อสังเกตว่าการใช้กากแฟบดแห้งโดยตรงกับผลิตภัณฑ์นั้นมีผลต่อความสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือไม่ เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ในกากกาแฟที่มีอยู่ประมาณ 11.6-38.5 mg/g dm (ตารางที่ 4.2) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันนั้นไม่ได้อยู่อย่างอิสระ สารประกอบเหล่านี้คงจับกับสารประกอบต่างๆ ในกากกาแฟ เช่น เมลานอยดิน (melanoidin) หรือใยอาหารที่เป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ ทำให้ฤทธิ์ต้านการ

เกิดออกซิเดชันแสดงผลได้ไม่เท่าที่มีศักยภาพ ในขณะที่หากทำการสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันก่อนการนำใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหาร (food additive) แทนการใช้กากกาแฟบดแห้งที่ใช้เป็นส่วนผสมอาหารอาจให้ผลต่อการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันที่ชัดเจนกว่า ตัวอย่างเช่น Mildner-Szkudlarz et al. (2009) ใช้สารสกัดจากใบชาเขียวเติมลงในบิสกิตพบว่าลดค่า PV ได้ โดยในตัวอย่างควบคุม (ไม่เติมสารสกัด) มีค่า PV คือ 12.54 meq O_2/kg ขณะที่บิสกิตที่เติมสารสกัดจากใบชาเขียวมีค่า PV เท่ากับ 8.89 12.54 meq O_2/kg ณ วันที่ 20 ของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

เมื่อเก็บรักษาตัวอย่างคุ๊กกี้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสต่อเนื่องไปจนครบ 45 วัน พบว่าค่า PV ของทุกตัวอย่างใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4.3ข) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ค่า acid value (ภาพที่ 4.3ก) โดยค่า PV ของตัวอย่าง SCG8 มีแนวโน้มสูงกว่าตัวอย่างอื่นตลอดช่วงการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากกรดไขมันส่วนใหญ่ของกากกาแฟบดแห้งคือ กรดไขมันไม่อิ่มตัว C18:2 และ C18:1 คิดเป็น 44% และ 10% ตามลำดับของกรดไขมันในกากกาแฟ (Cruz et al., 2012) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าคุ๊กกี้ที่เตรียมในการทดลองมีความคงตัวต่อการเกิดออกซิเดชัน เป็นผลทำให้การติดตามผลของความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิดในผลิตภัณฑ์คุ๊กกี้ที่เติมกากกาแฟบดแห้งจึงยังไม่ชัดเจนนัก ความสอดคล้องกันของค่า PV และ acid value นี้พบได้ในการวิเคราะห์การเกิดออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์บิสกิต (Reddy, Urooj, and Kumar, 2005; Koczoń et al., 2016)

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ข้อเสนอแนะที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้

กากกาแฟมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยสามารถสกัดสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ด้วยวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก ทั้งสารละลายเอทานอลและเมทานอลเข้มข้น 70% หรือใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออน ซึ่งสารสำคัญดังกล่าวมีเสถียรภาพต่อสภาวะการให้ความร้อนหรือด้วยวิธีการต่างๆ ที่ใช้ในกระบวนแปรรูปหรือการเตรียมอาหาร ประกอบกับสารที่สกัดได้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเมื่อทดสอบกับเซลล์ HepG2 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากกากกาแฟมีสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงอาจพัฒนาสารสกัดจากกากกาแฟต่อไปเป็นส่วนผสมอาหาร เพื่อเพิ่มคุณประโยชน์ของอาหารให้มีการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้

5.3.2 ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยครั้งต่อไป

1) การใช้กากกาแฟบดแห้งอาจยังไม่ให้ผลการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของลิพิดในคุ๊กกี้ที่ชัดเจน เนื่องจากสารสกัดจากกากกาแฟเป็นสารที่ละลายในตัวทำละลายที่มีขั้ว (polar solvent) และโมเลกุลเชื่อมจับกับคาร์โบไฮเดรตหรือสารอื่นๆ แม้ว่าการผลิตคุ๊กกี้จะผสมกากกาแฟบดแห้ง ไขมัน กับสารอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) ก่อนการผสมส่วนผสมอื่นๆ แต่สารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพอาจไม่ได้ถูกปลอดปล่อยออกมา ดังนั้น

การวิจัยต่อไปอาจพิจารณาเลือกใช้สารสกัดทางชีวภาพในการทดสอบต่อไป และควรเลือกระบบวิเคราะห์ที่มีไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณสูง

2) แม้ว่างานวิจัยนี้จะแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากกากกาแฟทั้งในระบบหลอดทดลองและเซลล์ รวมถึงความคงตัวของสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในระบบการให้ความร้อนแบบต่าง ๆ ในกระบวนการแปรรูปอาหาร แต่การคงอยู่ของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันนั้นยังเกี่ยวกับเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการได้คุณประโยชน์ของร่างกาย ดังนั้นการศึกษาถึงผลของระบบการย่อยอาหารของมนุษย์ต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากกากกาแฟจึงเป็นประเด็นที่ควรศึกษาต่อไป