บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1) ชนิดขององค์ประกอบทางเคมีของอาหารโมเดลมีผลต่อการลดค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมดในอาหารให้ต่ำลง โดยลำดับความสามารถในการลดปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมดในอาหารเป็นดังนี้ โปรตีน > คาร์โบไฮเดรต > ไขมัน

2) ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน (ABTS, DPPH และ FRAP) ของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟในอาหารโมเดลยังคงตรวจพบได้เมื่อผ่านการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์

3) การให้ความร้อนต่ออาหารโมเดลด้วยวิธีการต้ม (100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) การอบ (180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) และการนึ่งภายใต้แรงดันสูง (121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) ไม่มีผลในการลดฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟในอาหารโมเดล

4) ชีวปริมาณออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟในอาหารโมเดลเมื่อผ่านการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์อยู่ในช่วงร้อยละ 30-45 ส่วนสารที่เหลือ (ร้อยละ 55-70) จะไม่ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย

5) สารสกัดจากกากกาแฟเมื่อผ่านระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์พบความสามารถลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ HepG2 และ SHSY-5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระได้

5.2 อภิปรายผลการวิจัย

การใช้ประโยชน์จากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของร่างกายนั้นจะมีขั้นตอนที่สำคัญ คือ (1) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพควรอยู่ในรูปละลายน้ำ (soluble form) ได้ หากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นถูกจับหรือเชื่อมต่อกับโมเลกุลขององค์ประกอบในอาหาร ร่างกายจะไม่สามารถดูดซึมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นจะถูกขับออกจากร่างกายผ่านทางอุจจาระ (2) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้องถูกซึมหรือผ่านผนังลำไส้ได้ หรือเรียกว่า ชีวปริมาณออกฤทธิ์ (bioavailability) โดยแม้ว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ แต่หากไม่สามารถถูกดูดซึมผ่านผนังลำไส้ได้ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะออกไปจากร่างกายพร้อมกับอุจจาระเช่นเดียวกัน และ (3) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้องออกฤทธิ์ได้ภายเซลล์ของมนุษย์ แม้ว่าการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะตรวจพบในการทดสอบในหลอดทดลอง การทดสอบในเซลล์ของมนุษย์ (ภายนอกมนุษย์) จะช่วยให้ทราบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่สนใจนั้นต่อการทำงานในร่างกายมนุษย์ได้

งานวิจัยนี้จึงศึกษา (1) ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน (2) ชีวปริมาณออกฤทธิ์ (3) ฤทธิ์ต้านการแบ่งเซลล์ของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟในอาหารโมเดล เมื่อผ่านระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์

1) ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟในอาหารโมเดล เมื่อผ่านระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์

1.1) ผลขององค์ประกอบอาหารในอาหารโมเดลต่อฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบ ในการวิจัยส่วนใหญ่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารออกฤทธ์ทางชีวภาพเป็นสารสกัดในหลอดทดลองหรือศึกษาในเซลล์ (ภายนอกร่างกายมนุษย์) จึงมีข้อคำถามว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเมื่ออยู่ในอาหารแล้ว สารออกฤทธ์ทางชีวภาพนั้นยังคงมีฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่หรือไม่ เนื่องจากอาหารที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลาย และสามารถเกิดพันธะทางเคมีระหว่างกันหรือกับสารอื่น ๆ ได้ ที่อาจส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารออกฤทธ์ทางชีวภาพได้

งานวิจัยนี้จึงมีสมมติฐานว่าองค์ประกอบของอาหารมีผลในการจับกับสารออกฤทธ์ทางชีวภาพที่ได้จากกากกาแฟหยาบ ซึ่งอาจส่งผลต่อการใช้ประโยชน์จากสารออกฤทธ์ทางชีวภาพได้ จึงได้ใช้อาหารโมเดลที่มีองค์ประกอบอาหารครบทั้ง 3 องค์ประกอบสำคัญ คือ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน หรือขาดสารใดสารหนึ่ง ที่มีการเติมสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ (SCG) พบว่าค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมดในอาหารโมเดลที่มีองค์ประกอบครบทั้ง 3 องค์ประกอบและเติม SCG คือ 17 mg GAE/g sample และ 11.4 mg CGA/g sample (ตารางที่ 4.1) เมื่ออาหารโมเดลไม่มีองค์ประกอบใดองค์ประกอบหนึ่ง หากพบว่าค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมดลดลงแสดงว่าองค์ประกอบของอาหารมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมดที่ได้จากสารสกัดจากกากกาแฟ โดยผลขององค์ประกอบของอาหารต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกที่ได้จากกากกาแฟหยาบเรียงลำดับได้ดังนี้ โปรตีน > คาร์โบไฮเดรต > ไขมัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากโปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีทั้งความชอบน้ำ (hydrophillic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ในโมเลกุลเดียวกัน (Ustunol, 2015) ประกอบกับสารออกฤทธ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากกากกาแฟส่วนใหญ่เป็นสารที่ชอบน้ำ เนื่องจากในงานวิจัยนี้ได้ใช้ aqueous ethanol เป็นสารสกัด ซึ่งตามรายงานของ Ranic et al. (2014) พบว่า aqueous ethanol ที่มีเอทานอลปริมาณต่ำสามารถสกัดสารประกอบโพลีฟีนอล (polyphenol) จากพืชได้ดี เป็นผลทำให้โมเลกุลโปรตีนเข้าจับกับสารประกอบฟีนอลลิกที่อยู่ในสารสกัดหยาบจากกากกาแฟได้ ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมดในอาหารลดลง อีกทั้งโปรตีนที่ใช้ในอาหารโมเดล คือ เคซีน ซึ่งโมเลกุลโปรตีนที่มีความยืดหยุ่นสูง (flixible) และมีโครงสร้างที่เปิดตัวออก (unfold) (Andrew et al., 1979) ทำให้หมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ ภายในโมเลกุลเข้าจับกับสารออกฤทธ์ทางชีวภาพจากกากกาแฟได้ง่าย ส่วนคาร์โบไฮเดรต (แป้งและใยอาหาร) พบว่ามี

ความสามารถจับกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกากกาแฟรองลงมา แม้ว่าโครงสร้างของแป้งและใยอาหารปกติจะมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) มาก ซึ่งควรจับกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติชอบน้ำได้ดี แต่เนื่องจากอาหารโมเดลไม่ได้ผ่านความร้อน โมเลกุลของแป้งจึงคงเป็นเม็ดกลานูล (granule) หมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ ยังคงอยู่ภายในโมเลกุล ขณะที่ไขมันพบว่ามีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมดน้อยมาก อาจเพราะด้วยคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำทำให้ไม่สามารถเข้าจับหรือเกิดพันธะกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกากกาแฟได้ นอกจากนี้ไขมันบางส่วนในอาหารโมเดลอาจอยู่ในรูปอีมัลชัน (emulsion) กับโปรตีนเคซีน ดังนั้นการไม่มีเม็ดไขมันในอาหารโมเดลจึงทำให้มีโปรตีนเคซีนมากพอที่จะจับกับสารประกอบฟีนอลลิกได้จึงพบการลดลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกในตัวอย่างอาหารโมเดลที่ไม่มีไขมัน

เมื่อนำอาหารโมเดลผ่านระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์พบว่า ตัวอย่างอาหารโมเดลที่ไม่เติม SCG และน้ำปราศจากไอออนมีค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมดสูงขึ้นกว่าตัวอย่างก่อนการย่อยในระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์ (ตารางที่ 4.1) ทั้งนี้ค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมดที่สูงขึ้นนี้อาจมาจาก 2 ส่วน คือ (1) เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในระบบทางเดินอาหาร และ (2) ผลผลิต (product) ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร คือ กรดอะมิโนและเปปไทด์จากโปรตีนอาหาร และสารประกอบฟีนอลิกจากแป้งและใยอาหารที่ถูกปลดปล่อยออกมา เป็นผลทำให้ได้ค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมดสูงขึ้น

เมื่อพิจารณาค่าสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมดในตัวอย่างโมเดลที่เติม SCG และผ่านระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์พบว่า ผลของชนิดขององค์ประกอบทางเคมีอาหาร (คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน) ให้ผลที่แตกต่างจากตัวอย่างอาหารโมเดลก่อนการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์ (ตารางที่ 4.1) โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมดของอาหารโมเดลที่เติม SCG ที่มีครบ 3 องค์ประกอบ อาหารโมเดลที่ไม่มีโปรตีน อาหารโมเดลที่ไม่มีคาร์โบไฮเดรต และอาหารโมเดลที่ไม่มีไขมัน คือ 80.9, 77.9, 73.1 และ 103.9 mg GAE/g sample ตามลำดับ และ 58.4, 56.4, 52.6 และ 74.9 mg CGA/g sample ตามลำดับ แสดงให้เป็นว่าไขมันมีผลต่อยับยั้งการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลลิกจากสารสกัดกากกาแฟหยาบในอาหาร เพราะเมื่ออาหารโมเดลไม่มีไขมัน (มีโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต) พบปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมดสูงที่สุด อาจเกิดจากการขัดขวางการย่อยด้วยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของไขมัน Jin et al. (2019) รายงานว่าไขมันในแป้งข้าวฟ่างหางกระรอก (foxtail millet flour) มีผลลดกิจกรรมเอนไซม์ในการย่อยสลายแป้งได้เนื่องจากการเกิดอันตรกิริยาระหว่างกัน ดังนั้นแม้ว่าองค์ประกอบของอาหารจะสามารถจับกับสารประกอบฟีนอลลิกจากสารสกัดกากกาแฟหยาบได้ แต่ด้วยระบบเอนไซม์ในทางเดินอาหารของมนุษย์จะสามารถปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลลิกเหล่านั้นออกให้เป็นอิสระได้ (ตารางที่ 4.1)

นอกจากนี้การพบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในตัวอย่างอาหารโมเดลที่เติม SCG เมื่อผ่านระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์ (ตารางที่ 4.1) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากกากกาแฟในระบบอาหารโมเดลยังคงมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันแม้ว่าจะผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ที่มีทั้งการปรับสภาพกรด ด่าง และเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่เข้าย่อยสลายองค์ประกอบของอาหาร

เมื่อตรวจวัดฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟในอาหารโมเดลเมื่อผ่านการย่อยในระบบอาหารจำลองของมนุษย์แล้ว (ตารางที่ 4.1) พบว่าองค์ประกอบของอาหารไม่มีผลต่อฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในค่า DPPH และ FRAP ของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ เนื่องจากมีค่าใกล้เคียงกันในตัวอย่างที่มีองค์ประกอบครบ 3 องค์ประกอบ และตัวอย่างอาหารโมเดลที่ขาดองค์ประกอบใดองค์ประกอบหนึ่ง (ตารางที่ 4.1) ยกเว้นฤทธิ์การต้านออกซิเดชันค่า ABTS ที่ตัวอย่างอาหารโมเดลที่ไม่มีไขมันมีค่าสูงที่สุด ($p<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกในอาหารที่ไม่มีไขมันเกิดขึ้นได้ดีที่สุด (ตารางที่ 4.1) ทั้งนี้ตัวอย่างอาหารโมเดลที่เติม SCG ไม่พบค่า metal chelating ability ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่มีรายงานว่าไม่พบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันค่า metal chelating ability ในสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ

สำหรับตัวอย่างอาหารโมเดลที่ไม่เติม SCG ที่ตรวจพบค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมดค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารโมเดลที่เติม SCG แต่กลับพบฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน DPPH และ FRAP มีค่าต่ำมาก แสดงให้เห็นว่าผลผลิตจากการย่อยองค์ประกอบของอาหารโดยเฉพาะจากโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน (ABTS และ metal chelating ability) ได้ในธรรมชาติได้แต่ปริมาณจะค่อนข้างต่ำ Xie et al. (2013) พบว่าเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์สามารถผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากโปรตีนเคซีนได้แต่มีค่าที่ต่ำกว่าการใช้อัลคาลาเลส (Alcalase) ที่เป็นเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรีย ขณะที่ Wang et al. (2018) รายงานว่าเมื่อนำแฮม (Xuanwie ham) ผ่านระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์จะตรวจวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยได้ค่า ABTS สูงขึ้นมากกว่าก่อนการย่อย แต่ไม่พบค่า DPPH เนื่องจากเปปไทด์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยด้วยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์มีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) จึงจับสาร ABTS ได้ดีกว่า DPPH

เมื่อนำตัวอย่าง SCG (สารสกัดจากกากกาแฟ ไม่เติมลงในอาหารโมเดล) ไปย่อยในระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์ (ตารางที่ 4.3) พบค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมดและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันเช่นเดียวกัน ซึ่งสูงกว่าตัวอย่าง DI ยกเว้นค่า metal chelating ability แสดงว่าระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์ไม่มีผลต่อฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากกากกาแฟ นอกจากนี้แหล่งเอนไซม์ที่ใช้ในระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์ให้ค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกทั้งหมดและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันค่า ABTS และ metal chelating ability (ตัวอย่าง DI)

ได้ ทั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของเอนไซม์โปรติเอส และการย่อยสสายเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ในระบบการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส

1.2) ผลของการให้ความร้อนต่อฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบ จากผลการศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟในอาหารโมเดลที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนเมื่อผ่านการย่อยในระบบอาหารจำลองของมนุษย์ จึงเกิดคำถามว่าหากอาหารนั้นผ่านความร้อนแล้ว สารประกอบฟีนอลลิกของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟในอาหารโมเดลยังคงถูกปลดปล่อยเป็นอิสระเมื่อผ่านการย่อยในระบบอาหารจำลองของมนุษย์หรือไม่ และยังคงมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันอยู่หรือไม่ เพราะปกติมนุษย์จะเตรียมอาหารทั้งในลักษณะที่ให้ความร้อนและไม่ให้ความร้อนแก่อาหาร

เมื่อนำอาหารโมเดลที่เติมและไม่เติม SCG ให้ความร้อนด้วยวิธีการต่าง ๆ (ต้ม อบ และนึ่งในหม้อนึ่งแรงดันสูง) แล้วนำไปย่อยในระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์ (ตารางที่ 4.2) พบว่าในตัวอย่างอาหารโมเดลที่เติม SCG การให้ความร้อนทั้งการต้ม อบ และนึ่งในหม้อนึ่งแรงดันสูงมีไม่มีผลฤทธิ์การต้านออกซิเดชันทั้งค่า DPPH, FRAP และ metal chelating ability (ตารางที่ 4.2) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างอาหารโมเดลที่เติม SCG ที่ไม่ให้ความร้อน (ตารางที่ 4.1) ยกเว้นค่า ABTS ที่เพิ่มขึ้น อาจเกี่ยวข้องกับสารที่เกิดขึ้นในระหว่างการอบจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) Yilmez and Toledo (2005) กล่าวว่าผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction products : MRP) เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโน (หรือโปรตีน) และน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่ง MRP มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยการบ่มที่อุณหภูมิสูงและเวลานานมีผลต่อการลดฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสาร MRP ได้ ดังรายงานวิจัยของ Castillo, Ames, and Gordon (2002) พบว่าสารประกอบโมเลกุลขนาดเล็ก (low molecular mass : LMM) และสารประกอบโมเลกุลขนาดใหญ่ (high molecular mass : HMM) เกิดขึ้นในเมล็ดกาแฟคั่วที่มีระดับการคั่วแบบอ่อน (light) และปานกลาง (medium) ซึ่งเป็นสารมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันเมื่อวิเคราะห์ด้วยค่า ABTS ทั้งนี้เนื่องจากการให้ความร้อนสูงต่อเมล็ดกาแฟดิบซึ่งมีองค์ประกอบของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตมีผลต่อการเกิดสารที่มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยปฏิกิริยาเมลลาร์ดได้ (Nicoli et al., 1997)

1.3 การระบุชนิด และปริมาณสารสำคัญของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟในอาหารโมเดล การระบุชนิดและปริมาณสารสำคัญของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟในอาหารโมเดล (ตารางที่ 4.3) พบว่าสารที่พบปริมาณมากในตัวอย่างอาหารโมเดล (เติม SCG) ที่ผ่านการย่อยในระบบอาหารจำลองของมนุษย์ คือ 3-CQA+4-CQA, 5-CQA และ caffeine ขณะที่ 3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA และ caffeic acid พบในปริมาณน้อย สารทั้งหมดเหล่านี้จัดเป็นปริมาณสารชีวภาพความพรอมนำไปใช (bioaccessibility) เพราะคงอยู่ในอาหารที่ผ่านการย่อยในระบบอาหารจำลองของมนุษย์ แต่การจะนำไปใช้ได้เท่าไรนั้นจำเป็นต้องศึกษาในส่วนชีวปริมาณออกฤทธิ์ต่อไป เป็นที่น่าสังเกตว่า

วิธีการอบ (180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) มีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารสำคัญของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟในอาหารโมเดลได้ ($p<0.05$)

2) ชีวปริมาณออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟในอาหารโมเดล เมื่อผ่านระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์

การวิเคราะห์ชีวปริมาณออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ (ตัวอย่าง SCG) แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลลิกจากสารสกัดกากกาแฟหยาบสามารถถูกดูดซึมได้ประมาณร้อยละ 28.9-29.9 (ตารางที่ 4.4) ขณะที่ในตัวอย่างสารสกัดหยาบจากกากกาแฟในอาหารโมเดล (ตัวอย่าง Food model+SCG) ถูกดูดซึมได้ประมาณร้อยละ 43.2-43.3 (ตารางที่ 4.4) แสดงให้เห็นว่าชีวปริมาณออกฤทธิ์จากสารสกัดจากกากกาแฟหยาบจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่ออยู่ในอาหารโมเดล เนื่องจากการแพร่ของสารผ่านเยื่อของถุงไดอะไลซิสเป็นผลจากโมเลกุลของสารเคลื่อนที่แบบสุ่มหรือไร้ทิศทางผ่านเยื่อเลือกผ่านสู่ด้านที่มีสารละลายความเข้มข้นน้อยกว่า (Sam, 2014) ซึ่งตัวอย่างอาหารโมเดลที่มี SCG มีความเข้มข้นของตัวถูกละลายสูงกว่าตัวอย่าง SCG ดังนั้นตัวถูกละลายในอาหารโมเดลที่มี SCG จึงมีโอกาสเคลื่อนที่สู่ส่วนซีรัม (IN) ได้มากกว่า

ผลที่เกิดขึ้นข้างต้นคล้ายคลึงกับสารประกอบฟีนอลลิกจากสารสกัดกากกาแฟหยาบในส่วนของซีรัม (IN) ในอาหารโมเดลที่ไม่มีองค์ประกอบใดองค์ประกอบหนึ่ง พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกจากสารสกัดกากกาแฟหยาบในส่วนที่ถูกดูดซึมได้จะต่ำกว่าตัวอย่างอาหารโมเดลที่มีครบทุกองค์ประกอบ (ตารางที่ 4.4) จึงอาจเกี่ยวข้องกับ concentration gradient ที่น้อยกว่าของอาหารโมเดลที่ไม่มีองค์ประกอบใดองค์ประกอบหนึ่ง

เมื่อพิจารณาผลของการให้ความร้อนอาหารโมเดลพบว่า มีปริมาณสารชีวปริมาณออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟใกล้เคียงหรือต่ำกว่าเล็กน้อยกับเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารโมเดลที่ไม่ผ่านความร้อน โดยการอบทำให้ได้สารชีวปริมาณออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟน้อยที่สุดประมาณร้อยละ 35.9-36.2 ($p<0.05$) (ตารางที่ 4.4) โดยการให้ความร้อนอาหารมีผลต่อชีวปริมาณออกฤทธิ์ของสารประกอบฟีนอลลิกอาจเกิดจาก 2 เหตุผล คือ (1) การเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารประกอบฟีนอลลิกกับสารที่ถูกย่อย (digest) ซึ่งจะมีผลต่อปริมาณสารชีวปริมาณออกฤทธิ์ที่ได้เนื่องจากเป็นการการขัดขวางการเคลื่อนที่ของสารผ่านเยื่อไดอะไลซิส โดย Quirós-Sauceda et al. (2014) พบว่าภายหลังการย่อยอาหารในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์แล้ว การเกิดอัตรกิริยาระหว่างใยอาหารกับสารประกอบฟีนอลลิกมีผลต่อการลดลงของชีวปริมาณออกฤทธิ์ของสารประกอบฟีนอลลิก และ (2) ระดับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของอาหารโมเดลที่ผ่านหรือไม่ผ่านความร้อนไม่เท่ากัน ดังรายงานของ Chi et al. (2019) พบว่าการให้ความร้อนแบบแห้ง (dry heat) ร่วมกับ annealing แป้งข้าวโพดและแป้งมันฝรั่งมีผลลดการย่อยสลายด้วย

เอนไซม์ลง จึงอาจมีผลต่อการลดการย่อยสลายแป้งลงซึ่งกรณีจะเกี่ยวข้องกับความแตกต่างของ concentration gradient และขนาดโมเลกุลของสารอาหารที่เคลื่อนที่ผ่านเยื่อไดอะไลซิส

3) ฤทธิ์ต้านการแบ่งเซลล์ของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟในอาหารโมเดล เมื่อผ่านระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์

การทดสอบฤทธิ์ต้านการแบ่งเซลล์ของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟในเซลล์ HepG2 และ SHSY-5Y เป็นการศึกษาในสภาวะปกติที่ไม่เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดความความเครียด เพื่อตรวจวัดการอยู่รอดของเซลล์หรือความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยแสดงค่าในรูป IC_{50} ที่แสดงถึงความเข้มข้นของสารที่ผ่านการย่อย (digest) ในระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์ที่ทำให้เซลล์ที่มีชีวิตของ HepG2 หรือ SHSY-5Y ลดลงร้อยละ 50 ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากกากกาแฟ (ตัวอย่าง SCG) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 สูงกว่าน้ำปราศจากไอออน (ตัวอย่าง DI) โดยตัวอย่าง SCG มีค่า IC_{50} ต่ำกว่าตัวอย่าง DI ($p<0.05$) ทั้งนี้ตัวอย่างน้ำปราศจากไอออนเป็นตัวอย่างที่ผ่านระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์แล้วทำให้สามารถรายงานค่าความเข้มข้นเป็นค่า mg gallic acid/ml ได้ (ตารางที่ 4.5) ขณะที่สารสกัดจากกากกาแฟ (ตัวอย่าง SCG) พบความเป็นพิษต่อเซลล์ SHSY-5Y ไม่แตกต่างจากตัวอย่าง DI ($p\geq0.05$) (ตารางที่ 4.5) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากกากกาแฟเมื่อผ่านการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ได้ แต่ไม่มีผลต่อเซลล์ประสาท SHSY-5Y Iriondo-DeHond et al. (2019) ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ลำไส้ใหญ่ CCD-18 เมื่อใช้สารสกัดที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จากกากกาแฟ (10 μg/ml) ขณะที่ Panzella et al. (2016) พบว่าการใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากกากกาแฟปริมาณสูง (200-1000 μg/ml) มีผลทำให้เซลล์ HepG2 มีการตายสูงขึ้น

เมื่อพิจารณาตัวอย่างอาหารโมเดลผ่านระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์ พบว่าอาหารโมเดลที่ไม่เติม SCG (food model (no heat)) มีค่า IC_{50} ทั้งเซลล์ HepG2 และ SHSY-5Y ต่ำกว่าตัวอย่างอาหารโมเดลที่เติม SCG ($p<0.05$) ยกเว้นเซลล์ HepG2 ในตัวอย่างอาหารโมเดลที่เติม SCG ที่ผ่านการต้ม (food model+SCG/boil) ($p\geq0.05$) แสดงให้เห็นว่าสารอาหารที่สมบูรณ์สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ HepG2 และ SHSY-5Y ได้ดีที่สุด (ตารางที่ 4.5) ทั้งนี้อาจเพราะสารที่มีในอาหารโมเดลที่ผ่านระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์คือ อาหารที่ผ่านการย่อยสลายแล้วจึงอาจมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ถูกปลดปล่อยออกมาจึงช่วยลดการแบ่งตัวหรือยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Chen et al. (2019) รายงานว่าเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเนสจากระบบทางเดินอาหารมนุษย์ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 แต่มีผลปกป้องการตายของเซลล์ (protective effect) เมื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายด้วยเอทานอล (ethanol-induced cytotoxicity)

เมื่อทดสอบการลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ HepG2 และ SHSY-5Y เมื่อเซลล์ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระด้วย H_2O_2 วิเคราะห์ด้วยวิธี DCF assay พบว่าตัวอย่างน้ำปราศจากไอออน ตัวอย่างสารสกัดจากกากกาแฟ (SCG) และอาหารโมเดล (ไม่เติม SCG) ที่ผ่านระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์ มีความสามารถลดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำด้วย H_2O_2 ได้ (ภาพที่ 4.1 และ 4.2) แสดงให้เห็นว่า (1) เอนไซม์ที่ใช้ทดสอบในระบบจำลองการย่อยอาหารของมนุษย์มีสารหรือผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (2) อาหารอาจมีสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน หรือเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์สามารถผลิตเปปไทด์หรือกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันภายในเซลล์ได้ และ (3) สารสกัดจากกากกาแฟมีความสามารถลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ HepG2 และ SHSY-5Y ได้ Iriondo-DeHond et al. (2019) พบว่าสารสกัดจากกากกาแฟมีความสามารถลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ CCD-18 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระด้วย *t*-BOOH ได้ โดยสารสกัดจากกากกาแฟไม่มีฤทธิ์ทำให้เกิดอนุมูลอิสระในเซลล์หรือไม่เป็น pro-oxidant

จากนั้นเมื่อนั้นนำสารสกัดจากกากกาแฟเติมลงในอาหารโมเดลแล้วผ่านระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์ พบว่าทุกตัวอย่างมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันใน HepG2 และ SHSY-5Y (ภาพที่ 4.1 และ 4.2) หากพิจารณาความสามารถในการลดอนุมูลอิสระในอาหารโมเดลที่เติม SCG จากความเข้มข้นของสารที่ใช้ศึกษาโดยไม่เกิดให้เกิดพิษต่อเซลล์จะเรียงลำดับความสามารถลดอนุมูลอิสระได้ดังนี้ ตัวอย่างไม่ให้ความร้อน > ต้ม > อบ > นึ่งในหม้อแรงดันสูงสำหรับเซลล์ HepG2 และตัวอย่างไม่ให้ความร้อน > ต้ม ≈ อบ > นึ่งในหม้อแรงดันสูงสำหรับเซลล์ SHSY-5Y จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการลดอนุมูลอิสระในเซลล์เกี่ยวข้องกับ (1) เซลล์ได้รับสารอาหารสมบูรณ์หรือไม่ หากเซลล์ได้รับสารอาหารสมบูรณ์ ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันจะมีผลจากสารอาหารนั้นเป็นหลัก โดยสารอาหารอาจกระตุ้นการทำงานในระบบลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (2) วิธีการให้ความร้อน พบว่าการให้ความร้อนสูงและรุนแรงในอาหารที่มีเติม SCG มีแนวโน้มลดฤทธิ์การต้านออกซิเดชันลง

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. การใช้ประโยชน์จากสารสกัดจากกากกาแฟได้ใน 2 รูปแบบคือ (1) การบริโภคโดยตรง ในลักษณะผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่เป็นอาหารฟังก์ชัน (functional foods) และ (2) การเติมลงในอาหารเพื่อเพิ่มคุณประโยชน์ เนื่องจากทั้งสองรูปแบบยังคงพบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันเมื่อผ่านการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์ และคงมีชีวปริมาณออกฤทธิ์ระบบการดูดซึมสารอาหาร

2. การบริโภคอาหารที่เติมสารสกัดจากกากกาแฟสามารถช่วยลดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกายได้ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้ที่ต้องการสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive

compound) โดยวิธีการเตรียมอาหารควรเลือกวิธีการให้ความร้อนที่ไม่รุนแรง (เช่น การต้ม) จะช่วยให้สารสกัดจากกากกาแฟมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง