โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การพัฒนาวิธีการสกัดสาร polyphenolics และ caffeine จากกากกาแฟเพื่อประยุกต์ในบรรจุภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราสำหรับผลิตผลทางการเกษตร

Development of polyphenolics and caffeine extraction method from spent coffee ground to apply in antifungal agricultural production packaging

ชื่อนิสิต นางสาววรรณิดา ทรัพย์เย็น

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2559

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การพัฒนาวิธีการสกัดสาร polyphenolics และ caffeine จากกากกาแฟ เพื่อประยุกต์ในบรรจุภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราสำหรับผลิตผลทางการเกษตร

Development of polyphenolics and caffeine extraction method from spent coffee ground to apply in antifungal agricultural production packaging

โดย

นางสาววรรณิดา ทรัพย์เย็น

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559

โครงการ การพัฒนาวิธีการสกัดสาร polyphenolics และ caffeine จากกากกาแฟเพื่อประยุกต์ในบรรจุภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราสำหรับผลิตผลทางการเกษตร

โดย นางสาววรรณิดา ทรัพย์เย็น

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูวไพรศิริศาล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร.ลักษณา ดูบาส)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปกรณ์ วรานุศุภากุล)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)
หัวหน้าภาควิชาเคมี
วันที่ ..... เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2560

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ☑ ดีมาก ☐ ดี ☐ พอใช้

ชื่อโครงการ การพัฒนาวิธีการสกัดสาร polyphenolics และ caffeine จากกากกาแฟเพื่อประยุกต์ในบรรจุภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราสำหรับผลิตผลทางการเกษตร

ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาววรรณิดา ทรัพย์เย็น เลขประจำตัว 5633139023

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.ลักษณา ดูบาส

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อ

โครงการนี้มุ่งที่จะพัฒนาบรรจุภัณฑ์สำหรับผลิตผลทางการเกษตรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา โดยใช้สารสกัดหยาบจากกากกาแฟ ซึ่งเป็นของเหลือทิ้ง โดยในโครงการนี้ใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายควบคู่กับการเขย่าด้วยเครื่อง Overhead mixer และศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งทำให้เกิดจุดดำ หรือ โรคแอนแทรคโนสบนผลไม้ จากการศึกษาพบว่าภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกากกาแฟ คือ ตัวทำละลายผสมเอทิลแอลกอฮอล์และน้ำที่อัตราส่วน 1:1 โดยมีอัตราส่วนของกากกาแฟต่อตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเท่ากับ 1:5 กรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าอัตราเร็วของการเขย่าที่เหมาะสมเท่ากับ 30 รอบต่อนาที โดยระยะเวลาในการสกัดที่ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลและกาเฟอีนสูงที่สุด คือ 5 ชั่วโมง และจากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 6.97 ± 2.43, 13.03 ± 2.94 และ 22.78 ± 7.92 ตามลำดับ

คำสำคัญ : กากกาแฟ, แอนแทรคโนส, สารประกอบฟีนอล, กาเฟอีน, *C. gloeosporioides*

Project Title Development of polyphenolics and caffeine extraction method from spent coffee ground to apply in antifungal agricultural production packaging

Student Name Miss Wannida Sapyen Student ID 5633139023

Advisor Name Luxsana Dubas, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2016

Abstract

This project intends to develop antifungal packaging for agricultural products by using spent coffee ground extracts, which is a waste from coffee brewing process. The solvent extraction method with agitation by Overhead mixer was used in this study. The fungus *Colletotrichum gloeosporioides* that can cause dark spots or Anthracnose disease on fruit was used in the antifungal activity study of spent coffee ground extracts. The results showed that the optimum condition of spent coffee ground extraction was the solvent mixture of ethanol and water with a ratio of 1:1, and the spent coffee ground-to-solvent ratio of 1:5 g/mL. The optimized speed of agitation was at 30 revolutions per minute. The extraction time which gave the highest amount of polyphenolics and caffeine was 5 hours. In order to investigate the relationship between antifungal activity and the concentration of spent coffee ground extracts, various concentrations of the extracts were prepared. It was found that spent coffee ground extracts at concentrations of 50, 100, and 200 mg/mL could inhibit the growth of *C. gloeosporioides* at 6.97 ± 2.43%, 13.03 ± 2.94%, and 22.78 ± 7.92%, respectively.

Keywords : Spent coffee ground, Anthracnose, caffeine, polyphenolics, *C. gloeosporioides*

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก อาจารย์ ดร. ลักษณา ดูบาส อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่คอยให้คำแนะนำกำลังใจในการศึกษาทดลองของข้าพเจ้า ขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูวไพรศิริศาล ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมืออุปกรณ์ในการทดลองและให้เกียรติมาเป็นกรรมการโครงการนี้ รวมถึงผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปกรณ์ วรานุศุภากุลที่ให้เกียรติมาเป็นกรรมการในการสอบโครงการ และให้คำแนะนำแก้ไขเล่มรายงานจนเป็นฉบับสมบูรณ์เช่นกัน

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ และเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการภาคพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาฯ ที่ให้ความกรุณาเอื้อเฟื้อสารเคมีอุปกรณ์เครื่องมือที่จำเป็น รวมถึงคำแนะนำในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา นอกจากนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ ๆ ในหน่วยปฏิบัติการวิจัย Chromatography และ Separation รวมถึงเพื่อน ๆ ที่คอยให้การสนับสนุนช่วยเหลือในการทำโครงการวิจัยครั้งนี้ จนทำให้โครงการสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย (SAST) ที่คอยสนับสนุนทุนการศึกษาแก่ข้าพเจ้าตลอดระยะช่วงการศึกษาปริญญาตรี

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2559 ที่ให้เงินสนับสนุนในการทำโครงการครั้งนี้

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ง
กิตติกรรมประกาศ จ
สารบัญรูปภาพ ซ
สารบัญตาราง ฌ
อธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ญ
บทที่ 1 บทนำ
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ 1
1.2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง 2
1.2.1 โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) ในมะม่วง 2
1.2.2 กากกาแฟ 3
1.2.3.1 วิธี Agar disc diffusion 6
1.2.3.2 วิธี Poisoned food 7
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 7
1.4 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 9
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 10
บทที่ 2 วิธีการทดลอง
2.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง 11
2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 12
2.3 วิธีการทดลอง 12
2.3.1 การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกากกาแฟ 12
2.3.2 การตรวจวัดปริมาณสารสำคัญในสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ 14
2.3.2.1 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลในรูป Total phenolics content 14
2.3.2.2 การหาปริมาณกาเฟอีนด้วยเทคนิค RPLC 15
2.3.3 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ 16
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง
3.1 การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกากกาแฟ 18
3.1.1 การศึกษาอัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสม 18
3.1.2 การศึกษาอัตราเร็วของการเขย่าที่เหมาะสม 20
3.1.3 การศึกษาระยะเวลาในการสกัดที่เหมาะสม 21
3.1.4 การศึกษาอัตราส่วนระหว่างกากกาแฟตัวทำละลายที่เหมาะสม 23

3.1.5 การศึกษาผลของอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด 24
3.2 ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ของกระดาษชุบสารสกัดจากกากกาแฟด้วยวิธี Agar disc diffusion 25
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง
4.1 สรุปผลการทดลอง 29
4.2 ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยต่อในอนาคต 29
เอกสารอ้างอิง 30
ภาคผนวก 35
ประวัติผู้วิจัย 39

สารบัญรูปภาพ

บทที่ 1 บทนำ

รูปที่ 1.1 ลักษณะของเชื้อรา และอาการโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง 3

รูปที่ 1.2 สูตรโครงสร้างของกาเฟอีน 4

รูปที่ 1.3 ตัวอย่างโครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอล 5

รูปที่ 1.4 ประเภทสารประกอบฟีนอล 5

รูปที่ 1.5 แผนภาพการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar disc diffusion 7

บทที่ 2 วิธีการทดลอง

รูปที่ 2.1 เครื่อง overhead mixer 11

รูปที่ 2.2 เครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย 11

บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

รูปที่ 3.1 Total phenolic content ของสารสกัดหยาบกากกาแฟที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์และน้ำ 19

รูปที่ 3.2 ปฏิกิริยาการเกิด Chlorogenic acid 19

รูปที่ 3.3 ปริมาณกาเฟอีนของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์และน้ำที่สัดส่วนต่าง ๆ 20

รูปที่ 3.4 Total phenolic content ของสารสกัดหยาบกากกาแฟที่สกัดด้วยระยะเวลาต่างกัน 21

รูปที่ 3.5 Total phenolic content และปริมาณกาเฟอีนของสารสกัดหยาบกากกาแฟที่สกัด ด้วยระยะเวลาต่างกัน 22

รูปที่ 3.6 Total phenolic content และกาเฟอีนของสารสกัดหยาบกากกาแฟที่สกัดด้วยสัดส่วน ของแข็งต่อของเหลวต่างกัน 23

รูปที่ 3.7 ลักษณะเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ %inhibition หลังทดสอบกับสารสกัดหยาบกากกาแฟ ที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 mg/mL เป็นเวลา 3 วัน 26

รูปที่ 3.8 ลักษณะเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ %inhibition หลังทดสอบกับสารสกัดหยาบกากกาแฟ ที่ความเข้มข้น 50 และ 200 mg/mL เป็นเวลา (a) 3 วัน, (b) 7 วัน และ (c) 11 วัน 27

ภาคผนวก

รูปที่ 1 กราฟสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 36

รูปที่ 2 กราฟสารละลายมาตรฐานกาเฟอีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 36

รูปที่ 3 สารมาตรฐานกาเฟอีนที่ความเข้มข้น 16, 32, 48, 64 และ 80 ppm 37

รูปที่ 4 การ spike สารสกัดหยาบกากกาแฟที่สกัดด้วยน้ำลงสารมาตรฐานกาเฟอีน 16 ppm 37

รูปที่ 5 การ spike สารสกัดหยาบกากกาแฟที่สกัดด้วยน้ำและเอทิลแอลกอฮอล์ลงสารมาตรฐานกาเฟอีน 38

รูปที่ 6 สารสกัดหยาบกากกาแฟที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์ 38

สารบัญตาราง

บทที่ 2 วิธีการทดลอง

ตารางที่ 2.1 ปริมาตรน้ำ DI และเอทิลแอลกอฮอล์ที่ศึกษา 13

ตารางที่ 2.2 ภาวะในการวิเคราะห์หาปริมาณกาเฟอีนด้วยเทคนิค RPLC 15

บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

ตารางที่ 3.1 แสดงค่า Total phenolic content และกาเฟอีนของสารสกัดหยาบกากกาแฟที่สกัดด้วยอัตราเร็วรอบต่อนาทีต่าง ๆ 21

ตารางที่ 3.2 Total phenolic content และกาเฟอีนของสารสกัดหยาบกากกาแฟที่สกัดในแต่ละครั้ง 24

ตารางที่ 3.3 แสดงปริมาณ Total phenolic content และกาเฟอีนของสารสกัดหยาบกากกาแฟ 28

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง

ตารางที่ 4.1 ภาวะการสกัดกากกาแฟที่เหมาะสม 29

อธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

SCG	Spent coffee ground (กากกาแฟ)
TPC	Total phenolic content
GAE	Gallic acid equivalent
CGA	Chlorogenic acid
C. gloeosporioides	*Colletotrichum gloeosporioides*
g	กรัม
mg	มิลลิกรัม
mL	มิลลิลิตร
µL	ไมโครลิตร

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

ประเทศไทยถือเป็นแหล่งผลิตผลไม้เขตร้อนที่สำคัญของโลก อย่างไรก็ตามการส่งออกผลผลิตไปยังต่างประเทศต้องเผชิญอุปสรรคทางการค้า[1] เช่นมาตรฐานที่มีข้อกำหนดระดับสารปนเปื้อนประเภทยาปราบศัตรูพืชในผักผลไม้ และมาตรการในการป้องกันศัตรูพืช เช่น โรค แมลง วัชพืช รวมถึงวัสดุต่าง ๆ ที่มีโอกาสเป็นพาหะของศัตรูพืชไม่ให้แพร่ระบาดจากประเทศหนึ่งไปสู่อีกประเทศหนึ่ง[2] ดังนั้นผู้ประกอบการจึงต้องควบคุมผลผลิตตั้งแต่กระบวนการเพาะปลูก การใช้สารเคมีปราบศัตรูพืช การเก็บเกี่ยว การจัดการหลังการเก็บเกี่ยว การห่อบรรจุภัณฑ์ ไปจนถึงควบคุมคุณภาพการส่งออกเพื่อให้ผ่านมาตรฐาน และข้อกำหนดการนำเข้าของประเทศคู่ค้า อุปสรรคทางการค้าอีกประการหนึ่ง คือ ข้อจำกัดด้านระยะเวลาในการขนส่งที่ยาวนานอาจทำให้ผลผลิตเกิดความเสียหายในระหว่างการขนส่ง การเก็บรักษา และการจำหน่าย โดยความเสียหายนี้มีสาเหตุหนึ่งมาจากเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา[3]

โรคแอนแทรคโนส เป็นโรคผลไม้ที่เกิดหลังการเก็บเกี่ยว พบในมะม่วง พริก มันสำปะหลังซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจของไทย โดยมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (*C. gloeosporioides*) การควบคุมโรคแอนแทรคโนสที่ใช้กันในปัจจุบัน แบ่งได้ 2 วิธี คือ การฉีดพ่นหรือชุบสารเคมี[4] แต่เนื่องด้วยมาตรฐานต่าง ๆ ในการส่งออกผลไม้สดทั้งในและต่างประเทศ ทำให้การใช้สารเคมีควบคุมโรคแอนแทรคโนสนั้นมีข้อจำกัด และการใช้น้ำร้อนและไอน้ำร้อนเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีที่ส่งผลอันตรายต่อมนุษย์[5] แต่การใช้น้ำร้อนและไอน้ำร้อนควบคุมโรคแอนแทรคโนสอาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการบ่มผลไม้ได้ และทำให้ผลไม้สุกนิ่มเกิน[6] นอกจากนี้ยังมีการรายงานวิธีการควบคุมโรคแอนแทรคโนสอีกมากมาย เช่น การใช้รังสีแกมมาควบคู่กับการอบควันด้วย Ethanedinitrile เพื่อยืดอายุของ Apple[7] การเคลือบผิวมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ด้วยไคโตซาน[8] การเคลือบผิวผลผลิตด้วยสารจากธรรมชาติ เช่น น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย[9] มะนาวเม็กซิโกและไทม์[10] อย่างไรก็ตามการใช้น้ำมันหอมระเหยเคลือบผิวผลผลิตโดยตรงอาจทำให้กลิ่นและรสชาติเปลี่ยนแปลงไป อีกทั้งน้ำมันหอมระเหยบริสุทธิ์นั้นมีราคาแพง ทำให้ต้นทุนในการควบคุมผลผลิตสูงขึ้น

ปัจจุบันจึงมีการศึกษาและพัฒนาบรรจุภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราเพื่อควบคุมโรคในผลไม้กันมากขึ้น เนื่องจากขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ง่ายต่อการใช้งาน ไม่ต้องชุบผลผลิตกับสารละลายที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราแล้วตากให้แห้ง อีกทั้งยังช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้ เช่น การผลิตกระดาษซึ่งมี Carbendazim และผงถ่านกัมมันต์เป็นส่วนประกอบ[11]

ในปัจจุบันกาแฟถือเป็นเครื่องดื่มที่นิยมกันทั่วโลก จึงมีกากกาแฟซึ่งเป็นของเหลือทิ้งเป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงมีผู้วิจัยศึกษาการเพิ่มมูลค่าให้กับกากกาแฟด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น ผลิตเป็นไบโอดีเซล[12] ใช้เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ[13] ใช้กำจัด Ni(II) ในน้ำเสีย[14] เป็นต้น อีกทั้งกากกาแฟยังเป็นวัตถุดิบที่ไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายสามารถขอได้ตามร้านกาแฟ ซึ่งมีงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดหยาบจากกากกาแฟมีแนวโน้มในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสได้[15] และสามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus sp.*,

Aspergillus flavus, *Aspergillus niger*, *Penicillum citrinum*, *Penicillum chrysogenum* และ *Eurotium amstelodami* ได้ โดยตั้งสันนิษฐานว่ากาเฟอีนเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในการยับยั้งการเกิดสปอร์ของเชื้อรา[16]

อีกทั้งกาเฟอีนที่ความเข้มข้นมากกว่า 5,000 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Monacrosporium ambrosium* และ *Rhizopus oryzae* ได้[17] และสารสกัดจากใบบัวบกซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดสูงที่สุด มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ได้ดี[18] จากงานวิจัยข้างต้นผู้วิจัยจึงตั้งสันนิษฐานว่ากาเฟอีน และสารประกอบฟีนอลที่มีในกากกาแฟน่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามยังไม่มีงานวิจัยใดระบุชัดเจนว่าสารออกฤทธิ์ใดในสารสกัดจากกากกาแฟมีผลในการยั้บยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides*

ดังนั้นในโครงการนี้จึงสนใจศึกษาพัฒนาวิธีการสกัดสารประกอบฟีนอล และกาเฟอีนจากกากกาแฟเพื่อประยุกต์ใช้ในบรรจุภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. gloeosporioides* และเพื่อระบุถึงสารออกฤทธิ์ โดยวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอล และกาเฟอีนในสารสกัดด้วยเทคนิค Folin-Ciocalteau colorimetry และ RPLC ตามลำดับ

1.2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) ในมะม่วง[19]

เชื้อราสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะโคโลนี (colony) ของเชื้อราบนอาหาร Potato dextrose agar, PDA

โคโลนีขอบเรียบเจริญเป็นวงแหวน (concentric ring) เส้นใยมีสีขาว อมเทา ฟูเล็กน้อย สร้างกลุ่มโคนิเดีย (conidia) สีส้มบริเวณกลางโคโลนีตามภาพที่ 1 ของ**รูปที่ 1.1**

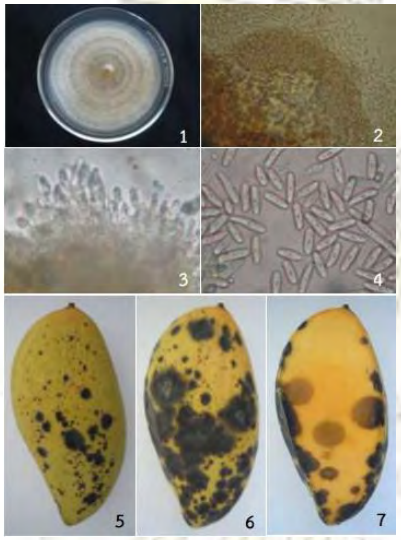
เชื้อราสร้างฟรุตติ้งบอดี (fruiting body) แบบอะเซอวูลัส (acervulus) เป็นรูปถ้วย โคนิดิโอฟอร์ (conidiophores) เป็นก้านตรง เซลล์เดียว ใส ไม่มีสีเกิด อยู่ในอะเซอวูลัสที่มีลักษณะตามภาพที่ 2 ของ**รูปที่ 1.1**

โคนิเดียมีเซลล์เดียว ใส ไม่มีสีรูปไข่ถึงทรงกระบอก หัวท้ายมน เมื่อโคนิเดีย งอก สร้างแอพเพรสซอเรีย (appressoria) รูปทรงกระบองตามภาพที่ 3 และ 4 ของ**รูปที่ 1.1**

ลักษณะอาการของโรค

อาการเริ่มแรกเป็นจุดสีน้ำตาลขนาดเล็ก ซึ่งต่อมาขยายใหญ่ขึ้นเป็นแอ่งบุ๋มตามภาพที่ 5-7 ของ**รูปที่ 1.1** ในสภาพที่มีความชื้นในอากาศสูง จะเกิดกลุ่มโคนิเดียสีส้มหรือสีชมพูอยู่ตรงกลางแผล เชื้อราทำให้ผลมะม่วงเน่านิ่ม มีกลิ่นหมัก พันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค เช่น มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ แรด และอกร่อง

จากการค้นคว้า พบว่ามีสารสกัดจากธรรมชาติที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ เช่น เหง้าว่านน้ำ เหง้ากระทือ เหง้าเร่วหอม เหง้าขิง เหง้าขมิ้นชัน เหง้าไพล ใบเทียนกิ่ง ใบทองพันชั่ง ใบพลู เปลือกมังคุด[4] รวมถึงสารจากธรรมชาติอย่างไคโตซานก็มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้เช่นกัน[8]



ภาพที่ 1 โคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหารพีดีเอ (PDA)

ภาพที่ 2 ลักษณะอะเซอวูลัส (acervulus) และกลุ่มของโคนิเดีย (conidia)

ภาพที่ 3 ลักษณะโคนิดิโอฟอร์ (conidiophores) และโคนิเดีย

ภาพที่ 4 ลักษณะโคนิเดีย

ภาพที่ 5-7 ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง

รูปที่ 1.1 ลักษณะของเชื้อรา และอาการโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง[19]

1.2.2 กากกาแฟ[20]

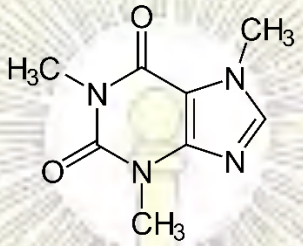
กากกาแฟ หรือ Spent coffee ground (SCG) ประกอบด้วยสารอินทรีย์จำนวนมาก เช่น กรดไขมัน, lignin, กรดอะมิโน, สารประกอบฟีนอล, เกลือแร่และ polysaccharides ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้

สารสำคัญในกากกาแฟที่มีการศึกษาวิจัยเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ มีดังนี้

- คาร์โบไฮเดรต
- โปรตีน
- Non-protein nitrogeneous compounds
- สารที่มีสีน้ำตาล
- กาเฟอีน
- ไขมัน
- สารประกอบฟีนอล
- เกลือแร่

1.2.2.1 กาเฟอีน[21]

กาเฟอีน (1,3,7-trimethylxanthine, $C_8H_{10}N_4O_2$) เป็นสารที่มีรสขม ไม่มีกลิ่น พบในเมล็ดกาแฟพันธุ์ Robusta มากกว่าพันธุ์ Arabica



รูปที่ 1.2 สูตรโครงสร้างของกาเฟอีน

กาเฟอีนละลายได้เล็กน้อยในน้ำเย็น และละลายได้อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จากการศึกษาของ Nonthakaew และคณะ[17] พบว่ากาเฟอีนมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ โดยกาเฟอีนที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 62.5 ถึง 2,000 µg/ml สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และแบคทีเรียแกรมลบได้ เช่น *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* และกาเฟอีนที่ความเข้มข้นมากกว่า 5,000 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ เช่น *Monacrosporium ambrosium*, *Rhizopus oryzae*

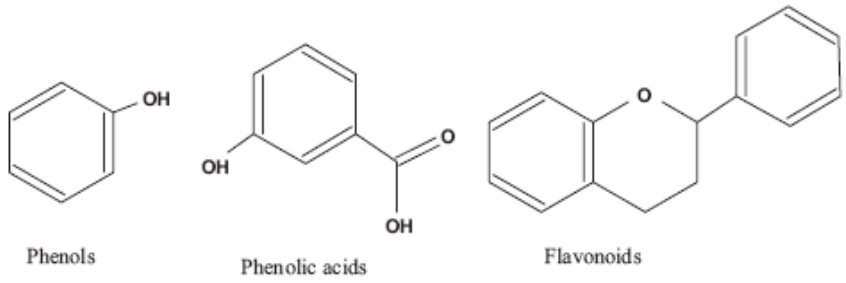
การตรวจวัดปริมาณกาเฟอีนจะใช้เทคนิค Reversed-phase Liquid Chromatography หรือ RPLC นอกจากนี้ Ploypradub และคณะ[22] ได้ศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในรูปของปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (total polyphenol content : TPC) ของสารสกัดจากผลกาแฟอาราบิก้าและกากกาแฟโดยทำการสกัดด้วยน้ำกลั่น พบว่าเมล็ดกาแฟมีค่า TPC (% gallic acid) ต่อน้ำหนักแห้งสูงที่สุดเท่ากับ 1.42 % รองลงมา คือ เนื้อผลกาแฟที่ได้จากโรงงาน, ผลกาแฟ, เนื้อผลกาแฟสด และกากกาแฟ ซึ่งมีค่า TPC เท่ากับ 1.22 %, 1.18 %, 0.96 % และ 0.36-0.42 % ตามลำดับ

1.2.2.2 สารประกอบฟีนอล[23] และการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอล

สารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) เป็นสารที่พบตามธรรมชาติในพืชหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ สมุนไพร ถั่วเมล็ดแห้ง เมล็ดธัญพืช ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในการเจริญเติบโต โดยสารประกอบฟีนอลมีสรรพคุณที่ดีต่อสุขภาพ คือ มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สามารถละลายได้ในน้ำ

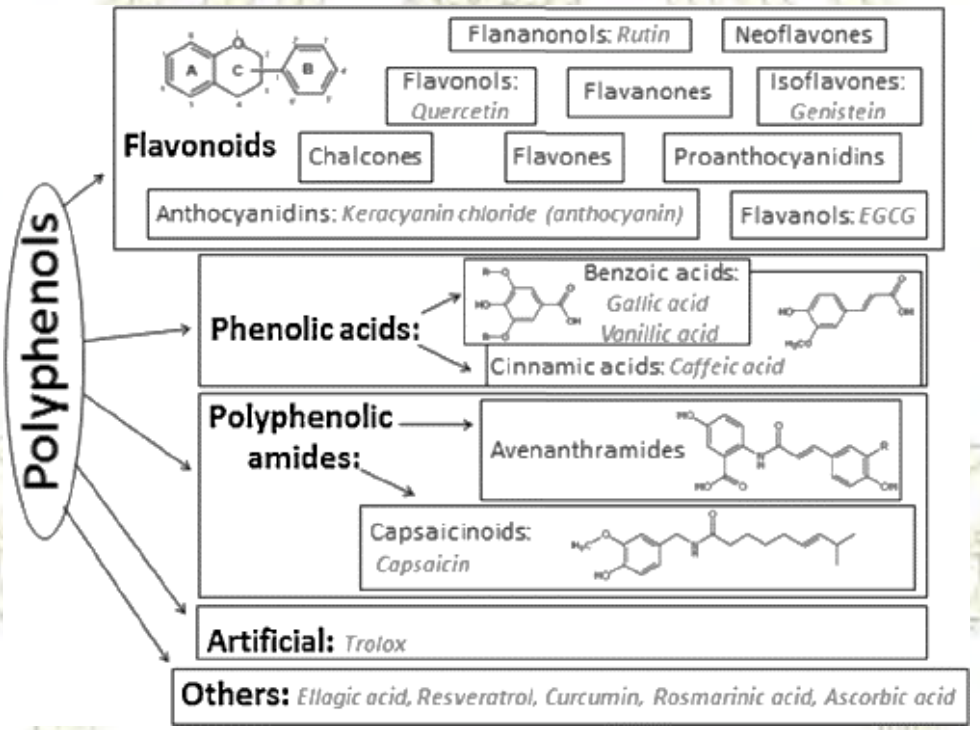
โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล

สารประกอบฟีนอล มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติก ที่เป็นอนุพันธ์ของวงแหวนเบนซีน มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) อย่างน้อยหนึ่งหมู่ สารประกอบฟีนอลพื้นฐาน คือ สารฟีนอล (phenol) ในโมเลกุลประกอบด้วยวงแหวนเบนซิน 1 วง และหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่



รูปที่ 1.3 ตัวอย่างโครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอล

สารประกอบฟีนอลที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด และมีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ตั้งแต่กลุ่มที่มีโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก (phenolic acids) ไปจนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ เช่น ลิกนิน (lignin) กลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบ คือ สารประกอบพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoid)



รูปที่ 1.4 ประเภทสารประกอบฟีนอล[24]

จากงานวิจัยของ Saenthaweesuk และคณะ[18] พบว่าใบบัวบกที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดสูงที่สุด คือ 56.254 มิลลิกรัมต่อกรัม มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ได้ดี จากงานวิจัยข้างต้นผู้วิจัยจึงตั้งสันนิษฐานว่าสารประกอบฟีนอลน่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ซึ่งก็คือเชื้อราได้เช่นเดียวกับแบคทีเรียที่งานวิจัยดังกล่าวได้ทดลองไปแล้ว

การตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลในรูปของปริมาณ Total phenolics content ด้วยเทคนิค Folin-Ciocalteau colorimetry

Folin-Ciocalteau colorimetry เป็นเทคนิคการวัดหาปริมาณสารประกอบฟีนอล ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยอาศัยการเปลี่ยนสีจากการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ reagent ที่เป็นสารผสมระหว่าง MoO_4^{2-} และ WO_4^{2-} ทำให้โลหะใน reagent ที่มีเลขออกซิเดชัน 6+ (สีเหลือง) กลายเป็น 5+ (สีน้ำเงิน) โดยได้รับอิเลกตรอนจาก phenolate ion ซึ่งเป็นสารประกอบ phenolics ในสภาวะเบส[25]

1.2.3 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา[15,26]

ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา แบ่งเป็น 2 วิธีหลัก ดังนี้

1.2.3.1 วิธี Agar disc diffusion

เป็นเทคนิคที่ใช้ทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยใช้กระดาษกรองที่ชุบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และนำกระดาษกรองนี้ไปวางบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นวุ้นซึ่งมีเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ตรวจสอบวางอยู่ตรงกลางอยู่แล้วดัง**รูปที่ 1.5** สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนี้จะเกิดการแพร่ออกจากกระดาษกรองซึมเข้าสู่วุ้น และไปยับยั้งการเกิดและการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบ ทำให้บริเวณที่มีความเข้มข้นของสารมากพอที่จะยับยั้งเชื้อได้เกิดเป็นโซนใส (clear zone) หรือ inhibition zone

ผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์วัดได้จากขนาดของโซนใสตามสมการที่ (1.1) โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสจะแปรผกผันกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย (Minimal Inhibitory Concentration หรือ MIC) ซึ่งนิยมใช้ทดสอบในห้องปฏิบัติการ โดยข้อดีของวิธี Agar disc diffusion คือ เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และมีราคาถูก

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{a - b}{a} \qquad (1.1)$$

โดย a คือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อจุลินทรีย์ในจานอาหารที่ไม่มีสารสกัด

b คือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อจุลินทรีย์ในจานอาหารที่มีสารสกัด

รูปที่ 1.5 แผนภาพการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar disc diffusion

1.2.3.2 วิธี Poisoned food

เป็นวิธีที่นิยมใช้ทดสอบผลการยับยั้งเชื้อรา ซึ่งจะผสมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเข้าไปในวุ้นที่ยังละลายอยู่โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่าที่ต้องการทดสอบ และคนให้เข้ากัน จากนั้นจึงเทส่วนผสมที่เตรียมไว้ลงบนจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อให้วุ้นแข็งตัว และตัดเชื้อราขนาด 2-5 มิลลิเมตรวางลงบนจุดศูนย์กลางของจานเพาะเชื้อ หลังจากบ่มด้วยภาวะที่เหมาะสมจึงวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของจานเพาะเชื้อชุดควบคุมซึ่งไม่ได้ผสมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และจานเพาะเชื้อที่ผสมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนำไปคำนวณด้วยสูตรที่ (1.1) เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.3.1 สารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา

จากการค้นคว้าศึกษา พบว่ามีงานวิจัยจำนวนมากได้รายงานว่าสารสกัดจากธรรมชาติสามารถยับยั้งเชื้อราได้ ดังเช่นงานวิจัยโดยวิชัย และคณะ[4] ได้ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ของพืชสมุนไพรต่าง ๆ ได้แก่ เหง้าว่านน้ำ เหง้ากระทือ เหง้าเร่วหอม เหง้าขิง เหง้าขมิ้นชัน เหง้าไพล ใบเทียนกิ่ง ใบทองพันชั่ง ใบพลู เปลือกมังคุด หัวกระเทียม และดอกโป๊ยกั๊ก โดยสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน และเมทิลแอลกอฮอล์ จากการทดลองพบว่าสารสกัดทุกชนิดที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต

ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีกว่าการสกัดด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ และสารสกัดจากว่านน้ำที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญโคโลนีของเชื้อราได้ดีที่สุดเท่ากับ 85.89 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้งานวิจัยของนางสาวพรพนา นาคสิงห์[27] พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมที่ความเข้มข้น 20,000 40,000 60,000 80,000 และ 100,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ โดยที่ความเข้มข้น 100,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสูงที่สุด 64.97% รวมถึงงานวิจัยของ Khewkhom และคณะ[28] ที่ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ของสารสกัดหยาบจากข่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทิลแอลกอฮอล์และอะซีโตน พบว่าสารสกัดหยาบจากอะซีโตนสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากองุ่นที่ค่า MIC เท่ากับ 1,250 µg/ml และสารสกัดจากเมทิลแอลกอฮอล์สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* ซึ่งแยกได้จากพริก องุ่น มะม่วง มังคุดได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2,500 1,250 2,500 และ 625 µg/mL ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาผลของไคโตซานต อการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี Poisoned food[8] โดยผสมไคโตซานในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าไคโตซานที่ความเข้มข้น 2.0% สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ 80.4% โดย Benomyl ซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้ควบคุมโรคแอนแทรคโนสและน้ำกลั่นปลอดเชื้อสามารถยับยั้งได้ 100.0% และ 0.0% ตามลำดับ

มีการรายงานถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคได้ คือ *Phoma violacea* และ *Cladosporium cladosporioides* ของสารสกัด polysaccharides จากกากกาแฟ โดยสกัดด้วยสารละลาย NaOH ที่ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นเวลา 1 คืนตามงานวิจัยของ Ballesteros และคณะ[29] และจากการศึกษาของนางสาวอิสริยาภรณ์ ประเสริฐวิริยะ[15] พบว่าสารสกัดหยาบจากกากกาแฟที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์นั้นสามารถยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยข้างต้นจะเห็นได้ว่ายังไม่มีงานวิจัยใดที่รายงานผลเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟที่ติดตามจากส่วนประกอบของสารประกอบฟีนอล และกาเฟอีน อีกทั้งยังไม่มีงานวิจัยใดที่ระบุว่าสารชนิดใดในสารสกัดหยาบจากกากกาแฟที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides*

1.3.2 การพัฒนาวิธีการสกัดสารจากกากกาแฟ

นอกจากนี้มีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาวิธีการสกัดกากกาแฟ ดังเช่นงานวิจัยของ Getachew และคณะ[30] ที่ศึกษาผลของการปรับสภาพกากกาแฟด้วยไมโครเวฟ และ Ultra-sonication ก่อนนำไปสกัด และการใช้แก๊ส CO_2 และ N_2 ในขณะทำการสกัดด้วยวิธี Subcritical water extraction ที่ภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง พบว่าสารสกัดที่ได้สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคทางอาหารได้ดีกว่าเชื้อรา โดยสามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุด ที่ค่า MIC เท่ากับ 5 mg/ml lyophilized extracts อีกทั้งยังพบว่าการปรับสภาพกากกาแฟ และการใช้แก๊สที่ศึกษานั้นยังช่วยลดการสลายตัวของสารสำคัญในสารสกัดเมื่อทำการสกัดที่อุณหภูมิสูง และจากงานวิจัยของ Al-Dhabi และคณะ[31] ซึ่งสกัดกากกาแฟด้วยตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์ควบคู่กับการใช้คลื่น Ultrasound พบว่าภาวะในการสกัดที่ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงที่สุด คือ การใช้คลื่น Ultrasound 244 W ที่ 40 °C เป็นระยะเวลา 34 นาที และใช้อัตราส่วนกากกาแฟต่อเอทิลแอกอฮอล์ที่ 1:17 กรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการสกัดกากกาแฟด้วยตัวทำละลายผสมเอทิลแอกอฮอล์และน้ำควบคู่กับการ

ใช้คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจากไมโครเวฟตามงานวิจัยของ Pavlovic´ และคณะ[32] พบว่าภาวะที่ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงที่สุด คือ การใช้คลื่นจากเครื่องไมโครเวฟที่ 80 W เป็นเวลา 40 วินาที และใช้ตัวทำละลาย 20% เอทิลแอลกอฮอล์

อย่างไรก็ตามวิธีสกัดเหล่านี้จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือ ซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุน ได้มีรายงานเกี่ยวกับการสกัดสารประกอบฟีนอลและกาเฟอีนไว้อย่างกว้างขวาง โดยสารประกอบฟีนอลสามารถละลายได้ในตัวทำละลายโปรติกที่มีขั้ว (Polar protic solvent) เช่น น้ำ เอทิลแอลกอฮอล์ เมทิลแอลกอฮอล์ เป็นต้น[33] ส่วนกาเฟอีนละลายได้ดีในน้ำร้อน[34] คลอโรฟอร์มและไดคลอโรมีเทน[35] อย่างไรก็ตามคลอโรฟอร์มมีพิษกดประสาทอย่างรุนแรงมีพิษต่อตับและไต[36] ในขณะที่ไดคลอโรมีเทนเป็นสารก่อมะเร็ง[37] อีกทั้งยังมีการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างน้ำและเอทิลแอลกอฮอล์จะช่วยทำให้ค่าการละลายของกาเฟอีนดีขึ้น[38] จากที่กล่าวมาข้างต้น ในโครงการนี้จึงเลือกใช้ตัวทำละลาย คือ น้ำและเอทิลแอลกอฮอล์ในการสกัดกากกาแฟ เนื่องจากน้ำและเอทิลแอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลายที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และเป็นพิษต่อเซลล์น้อย

ส่วนการพัฒนาบรรจุภัณฑ์สำหรับผลผลิตทางการเกษตรนั้น พบว่ามีงานวิจัยจาก อ.สุพัฒน์ คำไทยและคณะ[11] ที่ศึกษาการควบคุมโรคและการยืดอายุมังคุดด้วยกระดาษที่เติมสารเคมี Carbendazim และผงถ่านกัมมันต์ พบว่ากระดาษดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* ได้ และเก็บรักษามังคุดได้นานถึง 21 วัน อีกทั้ง Nonthakaew และคณะ[16] ได้พัฒนาบรรจุภัณฑ์ห่อทุเรียนกวนโดยใช้กาบใบต้นหมากเหลืองที่จุ่มสารสกัดหยาบจากกากกาแฟที่ความเข้มข้น 460 µg/ml พบว่าบรรจุภัณฑ์ดังกล่าวสามารถยืดอายุทุเรียนกวนได้ 3 ถึง 21 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งส่วนประกอบหลักของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ คือ กาเฟอีน 84.92% และพบว่าสารสกัดหยาบจากกากกาแฟที่สกัดด้วยเมทิลแอกอฮอล์สามารถยับยั้งเชื้อราที่ศึกษาได้ดีกว่ากากกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ โดยเชื้อราที่ศึกษา ได้แก่ *Aspergillus sp.*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillum citrinum*, *Penicillum chrysogenum*, *Eurotium amstelodami* และ*Rhizopus sp*. นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาบรรจุภัณฑ์สำหรับมะม่วงสุกโดยใช้ไขผึ้งที่เติมน้ำมันหอมระเหยจากใบยูลิปตัสผสมเสม็ดขาว และเปลือกอบเชยเคลือบบนถุงกระดาษ พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยผสมของยูคาลิปตัสและเสม็ดขาว ผสมกับ น้ำมันอบเชย คือ 3:7 ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสูตรผสมดังกล่าวที่ความเข้มข้น 8 % ก็สามารถยับยั้งการเกิดโรคจากเชื้อ *C. gloeosporioides* ในผลมะม่วงได้[39]

จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่า ยังไม่มีงานวิจัยใดที่พัฒนาบรรจุภัณฑ์สำหรับมะม่วงจากของเหลือทิ้งอย่างกากกาแฟ อีกทั้งยังไม่มีงานวิจัยใดที่ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอล และกาเฟอีนจากกากกาแฟด้วยตัวทำละลายผสมเอทิลแอลกอฮอล์และน้ำ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาและพัฒนาวิธีการสกัดสารประกอบฟีนอล และกาเฟอีนจากกากกาแฟด้วยตัวทำละลายผสมเอทิลแอลกอฮอล์และน้ำควบคู่กับการเขย่าด้วยเครื่อง Overhead mixer และนำสารสกัดที่ได้ไปศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง

1.4 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. หาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอล และกาเฟอีนจากกากกาแฟ
2. ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟด้วยเทคนิค Agar disc diffusion

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สารสกัดหยาบจากกากกาแฟที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสเพื่อนำไปประยุกต์ในบรรจุภัณฑ์ผลิตผลทางการเกษตร

บทที่ 2
วิธีการทดลอง

2.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่อง overhead mixer, VELP Scientifica ROTAX 6.8
2. เครื่องปั๊มสุญญากาศ, Becthai
3. เครื่องกวนสารพร้อมให้ความร้อน (hotplate stirrer), IKA
4. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง, Mettler Toledo
5. เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์, Hewlett Packard HP8453
6. เครื่อง HPLC, Varian Prostar
7. ตู้อบ, Memmert
8. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave), HIRAYAMA
9. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow hood), Augusta Safety Cabinet
10. เครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator), Buchi B-480
11. เครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย (Mini spray dryer), Buchi B-290

รูปที่ 2.1 เครื่อง overhead mixer

รูปที่ 2.2 เครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้	ผู้ผลิต	เกรด
1. Gallic acid	Sigma-Aldrich	Reagent
2. Folin-Ciocalteau reagent	Merck	Reagent
3. Anhydrous sodium carbonate	Carlo Erba Reagents	Reagent
4. กาเฟอีน (Caffeine anhydrous)	Fluka	HPLC
5. เอทิลแอลกอฮอล์	Merck	Reagent
6. เมทิลแอลกอฮอล์	Merck	Reagent
7. กากกาแฟ	อินทนิล และ O's Coffee	-
8. วุ้นเลี้ยงเชื้อ (Agar C)	Bio Basic Inc.	-
9. Dextrose	Difco Laboratories	-

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกากกาแฟ

ในการทดลองส่วนนี้เป็นการศึกษาเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกากกาแฟ โดยศึกษา 5 ปัจจัย ได้แก่ อัตราส่วนตัวทำละลายระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์กับน้ำ อัตราเร็วของการเขย่าด้วยเครื่อง Overhead mixer ระยะเวลาในการสกัด อัตราส่วนระหว่างกากกาแฟและตัวทำละลาย และอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด โดยติดตามปริมาณสารประกอบฟีนอล และกาเฟอีนในตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด เพื่อสรุปหาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารจากกากกาแฟ

ขั้นต้นทำการอบกากกาแฟไปที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อระเหยน้ำออกก่อน จากนั้นจึงนำกากกาแฟมาผึ่งให้เย็นลงถึงอุณหภูมิห้อง บรรจุใส่ซองซิป เก็บไว้ในเดซิเคเตอร์เพื่อนำไปสกัดต่อไป ทั้งนี้ในทุกการทดลองจะสกัดตามขั้นตอนที่แสดงข้างล่างดังนี้ทั้งหมดสามซ้ำ ยกเว้นปัจจัยการสกัดที่จะศึกษาในแต่ละส่วน ซึ่งจะแสดงไว้ในหัวข้อต่อไป

วิธีการสกัดกากกาแฟด้วยตัวทำละลาย

1. ชั่งกากกาแฟที่อบแห้งแล้วให้มีน้ำหนักใกล้เคียง 10.000 กรัม ลงในขวด polypropylene ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เติมตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวด polypropylene
3. ปิดฝาให้สนิท และนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Overhead mixer ที่อัตราเร็ว 25 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง
4. กรองสุญญากาศด้วยกรวยบุชเนอร์และกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บส่วนที่เป็นของเหลวเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอล และกาเฟอีน

2.3.1.1 การศึกษาอัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสม

ในการศึกษาส่วนนี้จะหาอัตราส่วนตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์ต่อน้ำที่เหมาะสมในการสกัดสารจากกากกาแฟ โดยอัตราส่วนที่ศึกษาดังแสดงใน**ตารางที่ 2.1**

ตารางที่ 2.1 ปริมาตรน้ำ DI และเอทิลแอลกอฮอล์ที่ศึกษา

เอทิลแอลกอฮอล์ : น้ำ DI	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	
	เอทิลแอลกอฮอล์	น้ำ DI
0 : 1	0	50
1 : 1	25	25
1 : 0	50	0

2.3.1.2 การศึกษาอัตราเร็วของการเขย่าที่เหมาะสม

ในการศึกษาส่วนนี้จะมุ่งหาอัตราเร็วของการเขย่าด้วยเครื่อง Overhead mixer ที่เหมาะสม ซึ่งช่วงอัตราเร็วของการเขย่าที่ศึกษา คือ 10, 20 และ 30 รอบต่อนาที โดยใช้อัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสมจากการทดลองที่ **2.3.1.1**

2.3.1.3 การศึกษาระยะเวลาในการสกัดที่เหมาะสม

ในการศึกษาระยะเวลาในการสกัดที่เหมาะสมจะศึกษาในช่วง 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนตัวทำละลาย อัตราเร็วของการเขย่าที่เหมาะสมจากการทดลองที่ **2.3.1.1** และ **2.3.1.2** ตามลำดับ

2.3.1.4 การศึกษาอัตราส่วนระหว่างกากกาแฟและตัวทำละลายที่เหมาะสม

a) การศึกษาอัตราส่วนระหว่างกากกาแฟและตัวทำละลายที่เหมาะสม

ในการทดลองขั้นนี้มุ่งหาอัตราส่วนระหว่างกากกาแฟและตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยศึกษาในช่วงอัตราส่วน 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 และ 1:6 กรัมต่อมิลลิลิตร โดยกำหนดให้น้ำหนักกากกาแฟคงที่ และปรับปริมาตรตัวทำละลายเป็น 20, 30, 40, 50 และ 60 มิลลิลิตร ตามลำดับ และใช้อัตราส่วนตัวทำละลาย อัตราเร็วของการเขย่า และระยะเวลาในการสกัดที่เหมาะสมจากการทดลองที่ **2.3.1.1, 2.3.1.2** และ **2.3.1.3** ตามลำดับ

b) การศึกษาจำนวนครั้งในการสกัด

ในการทดลองส่วนนี้จะทำการสกัดกากกาแฟชุดเดิมสองครั้ง โดยเก็บกากกาแฟที่สกัดไปแล้วในครั้งที่หนึ่งมาทำการสกัดต่อครั้งที่สอง โดยใช้อัตราส่วนตัวทำละลาย อัตราเร็วของการเขย่า และ

ระยะเวลาในการสกัด อัตราส่วนระหว่างกากกาแฟและตัวทำละลายที่เหมาะสมจากการทดลองที่ **2.3.1.1, 2.3.1.2, 2.3.1.3** และ **2.3.1.4 a)** ตามลำดับ

2.3.1.5 การศึกษาผลของอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด

ในการศึกษาขั้นนี้มุ่งที่จะเปรียบเทียบผลของการสกัดด้วยอุปกรณ์ที่ต่างกันระหว่างการเขย่าด้วยเครื่อง Overhead mixer กับการกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก (stirrer bar) โดยสกัดกากกาแฟด้วยเครื่อง Overhead mixer ที่ความเร็ว 30 รอบต่อนาที และสกัดด้วยแท่งแม่เหล็ก (stirrer bar) ที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5, 8 และ 12 ชั่วโมง และใช้อัตราส่วนตัวทำละลาย อัตราเร็วของการเขย่า และระยะเวลาในการสกัด อัตราส่วนระหว่างกากกาแฟและตัวทำละลายที่เหมาะสมจากการทดลองที่ **2.3.1.1, 2.3.1.2, 2.3.1.3** และ **2.3.1.4** ตามลำดับ

2.3.2 การตรวจวัดปริมาณสารสำคัญในสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ

ในการทดลองแต่ละส่วนของโครงการนี้จะติดตามปริมาณสารในตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสองชนิด ได้แก่ สารประกอบฟีนอล และกาเฟอีน

2.3.2.1 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลในรูป Total phenolics content

ในการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลในรูป Total phenolics content จะใช้เทคนิค Folin-Ciocalteau colorimetry ซึ่งปรับเปลี่ยนมาจาก Handbook of food analytical chemistry[40] โดยขั้นตอนในการวิเคราะห์มีดังนี้

1. ปิเปตสารตัวอย่าง หรือ สารละลายมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้น 50, 100, 150, 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 25.0 มิลลิลิตร และเติมน้ำ DI ประมาณ 18 มิลลิลิตร ตามลำดับ
2. เติม Folin-Ciocalteau reagent 1.25 มิลลิลิตร หมุนขวดกำหนดปริมาตรให้สารละลายเข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-8 นาที แล้วเติม 20% Na_2CO_3 3.75 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย ปรับปริมาตรให้เป็น 25.00 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ DI
3. บ่มไว้ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำสารละลายที่เตรียมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร ทั้งหมดสามซ้ำ และรายงานผลเป็นค่า Gallic acid equivalent หรือ GAE ในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง

วิธีการคำนวณ Total phenolics content (TPC) ด้วยวิธี external standard

1. สร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) จากค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Gallic acid ความเข้มข้น 50, 100, 150, 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. แทนค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารตัวอย่างในค่า y ของสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน เพื่อหาค่า x คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร
3. นำค่าความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 2. คูณกับค่า Dilution factor หากต้องเจือจางสารละลายตัวอย่างในการวัด จะได้ค่าความเข้มข้นในหน่วย mg GAE/L
4. เทียบค่าความเข้มที่ได้จากข้อ 3. กับน้ำหนักกากกาแฟที่สกัด 10 กรัมตามสูตรดังนี้

$$\text{TPC (mg GAE/g SCG)} = \frac{\text{mg GAE}}{\text{L}} \times \text{ปริมาตรที่สกัด (mL)} \times \frac{1\ \text{L}}{1000\ \text{mL}} \times \frac{1}{10\ \text{g dry SCG}}$$

2.3.2.2 การหาปริมาณกาเฟอีนด้วยเทคนิค RPLC

ในการหาปริมาณกาเฟอีนด้วยเทคนิค RPLC ใช้ภาวะในการวิเคราะห์ดังตารางที่ 2.2 และคำนวณหาความเข้มข้นของกาเฟอีนจากกราฟมาตรฐานด้วยวิธี External standard โดยนำค่าสัญญาณ Peak area ที่ได้ไปแทนในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 2.2 ภาวะในการวิเคราะห์หาปริมาณกาเฟอีนด้วยเทคนิค RPLC

ปัจจัย	ข้อมูล
ชนิดคอลัมน์	C-18 (Reversed-phase)
ตัวทำละลาย	น้ำ 60% เมทิลแอลกอฮอล์ 40%
Flow rate	1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
ความยาวคลื่นที่วัดค่าการดูดกลืนแสง	272 นาโนเมตร
ปริมาตรที่ฉีด	20 ไมโครลิตร
จำนวนครั้งที่ฉีด	3
ตัวทำละลายที่ใช้ล้างเข็ม	เมทิลแอลกอฮอล์

วิธีการคำนวณปริมาณกาเฟอีนด้วยวิธี external standard

1. สร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) จาก Peak area ของสารมาตรฐานกาเฟอีนที่ความเข้มข้น 16, 32, 48, 64 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. แทนค่า Peak area ของสารตัวอย่างในค่า y ของสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน เพื่อหาค่า x คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร
3. นำค่าความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 2. คูณกับค่า Dilution factor หากต้องเจือจางสารละลายตัวอย่างในการวัด จะได้ค่าความเข้มข้นในหน่วย mg กาเฟอีน/L
4. เทียบค่าความเข้มที่ได้จากข้อ 3. กับน้ำหนักกากกาแฟที่สกัด 10 กรัมตามสูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณกาเฟอีน (mg กาเฟอีน/g SCG)} = \frac{\text{mg กาเฟอีน}}{\text{L}} \times \text{ปริมาตรที่สกัด (mL)} \times \frac{1\ \text{L}}{1000\ \text{mL}} \times \frac{1}{10\ \text{g dry SCG}}$$

2.3.3 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ

2.3.3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar)

ทำการล้างปลอกเปลือก และหั่นมันฝรั่งเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋า นำไปต้มในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จนสุกแล้วกรองเอาแต่น้ำ จากนั้นต้มวุ้น (Agar) ในน้ำกลั่นจนสุก แล้วเติม Dextrose คนให้ละลาย นำน้ำจากมันฝรั่งที่เตรียมไว้มาผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร เทใส่ขวดรูปชมพู่ขวดละประมาณ 150 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดด้วยถุงร้อนและมัดให้สนิท จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ตู้นึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.3.3.2 การเตรียมสารสกัดจากกากกาแฟเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา

ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรานั้น จะทำการเพิ่มขนาดการทดลองโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ลิตรในการสกัดกากกาแฟ เพื่อให้ได้ปริมาณสารสกัดหยาบที่เพียงพอต่อการศึกษา และใช้ภาวะการสกัดกากกาแฟที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองในหัวข้อที่ **2.3.1.1, 2.3.1.2, 2.3.1.3** และ **2.3.1.4** ตามลำดับ โดยเมื่อได้สารสกัดหยาบแล้ว จึงดำเนินการทดลองดังแสดงไว้ข้างล่างต่อไปนี้

1. นำสารสกัดที่ได้ไประเหยเอาเอทิลแอลกอฮอล์ออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) จากนั้นจึงนำสารสกัดที่เหลือเข้าเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย

(Mini spray dryer) โดยกำหนดอุณหภูมิขาเข้าเท่ากับ 110 องศาเซลเซียส เพื่อทำให้สารสกัดหยาบกลายเป็นผง ทำให้สะดวกต่อการนำไปวิเคราะห์ และประยุกต์ใช้งานมากยิ่งขึ้น

2. นำผงสารสกัดหยาบจากกากกาแฟที่ได้ไปละลายด้วยเอทิลแอลกอฮอล์และน้ำในอัตราส่วน 1:1 ให้ได้ความเข้มข้น 10, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
3. หยดสารละลายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากข้อ 2. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษกรองขนาด 1x1 เซนติเมตร ซึ่งเป็นตัวแทนของกระดาษห่อผลไม้ รอให้แห้งเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides*

2.3.3.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Agar disc diffusion

1. นำอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมไว้ไปอุ่นด้วยไมโครเวฟจนกระทั่งละลาย
2. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ละลายแล้วใส่จานเพาะเชื้อภายในตู้ปลอดเชื้อ และรอให้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แข็งตัวประมาณ 20 นาที
3. ตัดเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่โตเต็มที่ (มีลักษณะเป็นสีดำ สปอร์สีขาว) ขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร มาวางไว้ตรงกลางจานเพาะเชื้อ
4. นำกระดาษกรองชุดควบคุมที่มีตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์และน้ำในอัตราส่วน 1:1 และกระดาษกรองที่มีสารตัวอย่าง วางลงไปสี่มุมของจานเพาะเชื้อ ล้อมรอบเชื้อราดัง**รูปที่ 1.5** โดยกำหนดให้ระยะห่างระหว่างกระดาษกรองกับเชื้อราเท่ากันทั้งสี่มุม
5. พันพาราฟิล์มตามขอบฝาจานเพาะเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น
6. เก็บไว้ในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 3 วัน สังเกต ถ่ายรูป บันทึกผล และคำนวณ %Inhibition
7. ทำซ้ำอีก 2 เพลท

บทที่ 3
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

โครงการนี้มุ่งศึกษาวิธีการสกัดกากกาแฟเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา เพื่อนำมาพัฒนาเป็นบรรจุภัณฑ์ที่สามารถยับยั้งหรือลดการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนสได้ โดยแบ่งการศึกษาออกเป็นสองส่วนหลัก ได้แก่ การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกากกาแฟ และการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ

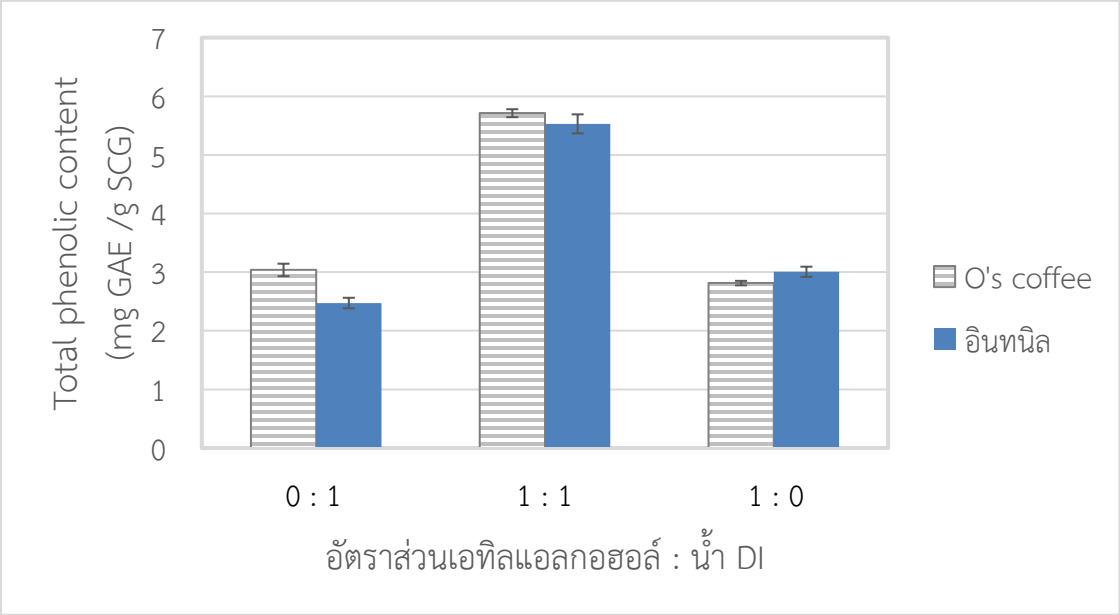
3.1 การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกากกาแฟ

ตามที่ได้กล่าวในข้างต้นว่าในการหาภาวะการสกัดสารจากกากกาแฟของโครงการนี้จะติดตามปริมาณสารประกอบฟีนอล และกาเฟอีนในสารสกัดหยาบ โดยปัจจัยที่ทำการศึกษา ได้แก่ อัตราส่วนเอทิลแอลกอฮอล์ : น้ำ DI ที่ใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัด, อัตราเร็วของเครื่อง Overhead mixer, ระยะเวลาในการสกัด, อัตราส่วนระหว่างกากกาแฟและตัวทำละลาย และอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดระหว่าง Overhead mixer กับ การกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก (stirrer bar) ซึ่งในการหาปริมาณ Total phenolic content และกาเฟอีนจะใช้วิธี external standard โดยกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของ Gallic acid และกาเฟอีนแสดงใน**รูปที่ 1** และ**รูปที่ 2** ของภาคผนวกตามลำดับ

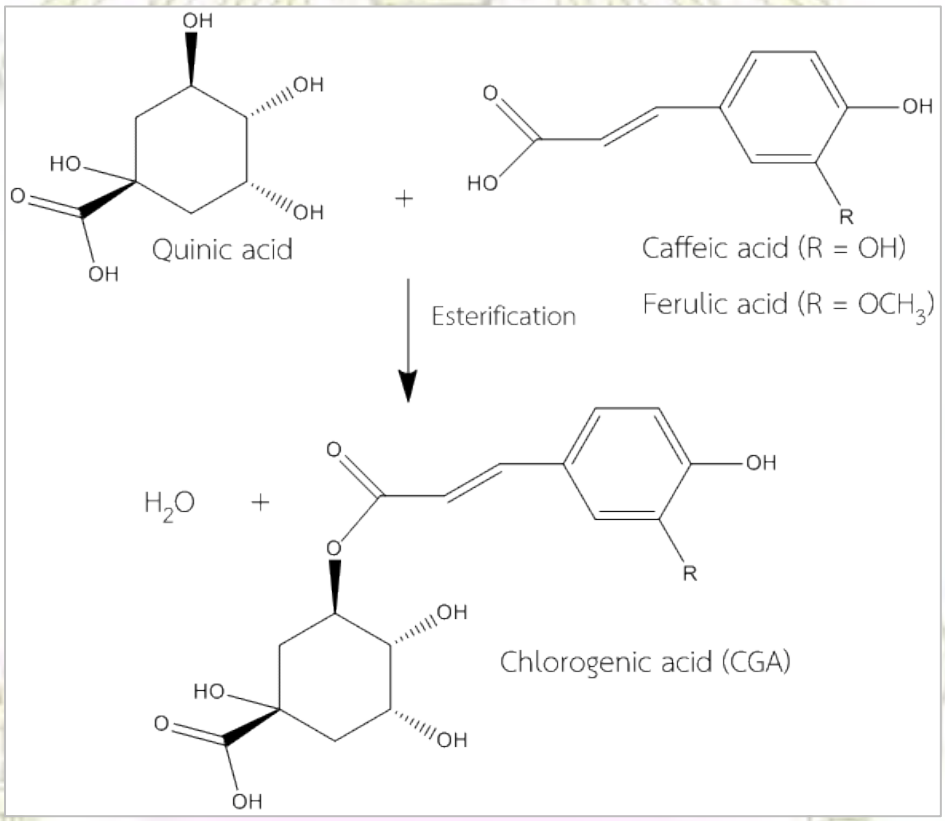
3.1.1 การศึกษาอัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสม

จากการทดลองสกัดกากกาแฟด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ และน้ำในอัตราส่วน 0:1, 1:1 และ 1:0 ดังแสดงใน**รูปที่ 3.1** พบว่าการใช้เอทิลแอลกอฮอล์ และน้ำที่อัตราส่วน 1:1 ในการสกัดกากกาแฟให้ค่า Total phenolic content สูงที่สุด ส่วนการสกัดด้วยน้ำหรือเอทิลแอลกอฮอล์เดี่ยว ๆ พบว่ามีค่า Total phenolic content ที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งผลการทดลองของโครงการนี้สอดคล้องกับผลการทดลองจากงานวิจัยของ Makom และคณะ ที่สรุปว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอล คือ เอทิลแอลกอฮอล์และน้ำที่อัตราส่วน 1:1[41]

ซึ่งอาจเนื่องมาจากกากกาแฟมีสารประกอบฟีนอลชนิด chlorogenic acid (CGA) เป็นหลัก ซึ่ง CGA นี้เป็นสารประกอบเอสเทอร์ ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของ caffeic acid หรือ ferulic acid กับหมู่ไฮดรอกซิลของ quinic acid (3-caffeoylquinic acid)[42] ตาม**รูปที่ 3.2** โดยสารประกอบเอสเทอร์นั้นมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดีประกอบกับเอทิลแอลกอฮอล์นั้นเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีนอล[43] ดังนั้นเอทิลแอลกอฮอล์ และน้ำที่อัตราส่วน 1:1 จึงสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลจากกากกาแฟได้มากที่สุด



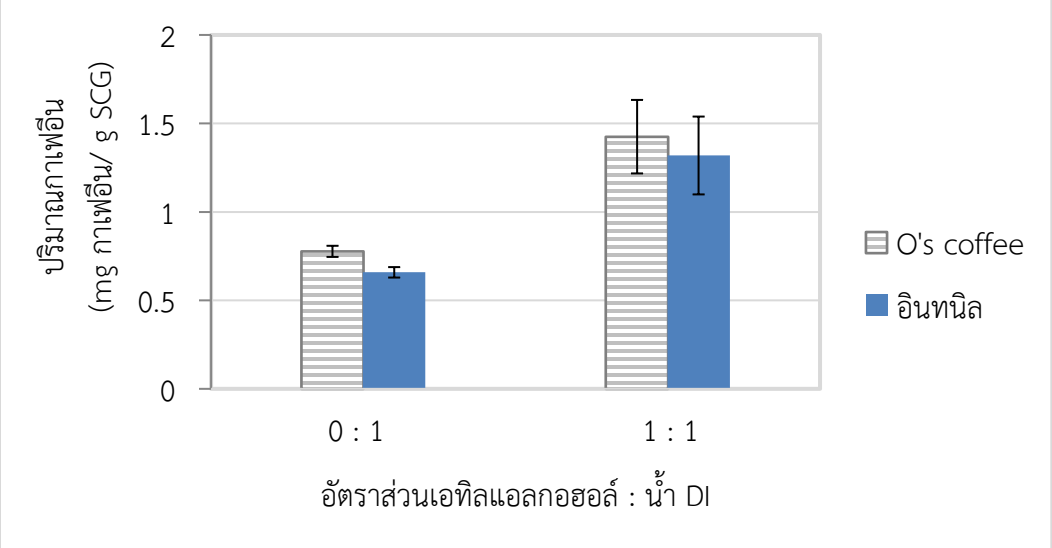
รูปที่ 3.1 Total phenolic content ของสารสกัดหยาบกากกาแฟที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์และน้ำที่สัดส่วนต่าง ๆ



รูปที่ 3.2 ปฏิกิริยาการเกิด Chlorogenic acid

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณกาเฟอีนในสารสกัดหยาบ นั้นพบว่าปริมาณกาเฟอีนในสารสกัดหยาบที่ใช้สารละลายผสมเอทิลแอลกอฮอล์และน้ำที่อัตราส่วน 1:1 เป็นตัวสกัด จะมีค่าสูงกว่าเมื่อใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดเพียงอย่างเดียว **(รูปที่ 3.3)** ทั้งนี้ในการศึกษานี้ไม่สามารถหาปริมาณกาเฟอีนที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ได้เนื่องจากไม่สามารถแยกสารได้ด้วยภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ RPLC ดัง**รูปที่ 6** แสดงในภาคผนวก

จากรูปที่ 3.1 และ 3.3 จะเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบจากกากกาแฟต่างชนิดกัน จะให้ค่า Total phenolic content แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ โดยร้าน O's coffee ใช้กาแฟพันธุ์ Arabica ส่วนร้านอินทนิลใช้กาแฟพันธุ์ Arabica ผสมกับ Robusta ผู้ทดลองจึงเลือกใช้กากกาแฟจากอินทนิลเพียงร้านเดียวในการศึกษาทดลองต่อไป ซึ่งสะดวกกว่าเนื่องจากร้านค้าอยู่ในอาคารเดียวกันกับห้องปฏิบัติการและเปิดให้บริการยาวนานตั้งแต่ 7.00 น. ถึง 19.00 น. ในวันจันทร์ถึงศุกร์



รูปที่ 3.3 ปริมาณกาเฟอีนของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์และน้ำที่สัดส่วนต่าง ๆ

3.1.2 การศึกษาอัตราเร็วของการเขย่าที่เหมาะสม

เมื่อพิจารณา**ตารางที่ 3.1** พบว่าค่า Total phenolic content และความเข้มข้นกาเฟอีนของสารสกัดทั้งสามความเร็วรอบต่อนาทีมีค่าไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อพิจารณาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า Total phenolic content และความเข้มข้นกาเฟอีนแล้ว พบว่าที่อัตราเร็ว 30 รอบต่อนาทีมีค่าน้อยสุด ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่ของแข็ง คือ กากกาแฟสัมผัสกับตัวทำละลายได้ดียิ่งขึ้นเมื่อมีความเร็วรอบต่อนาทีเพิ่มขึ้น ทำให้ตัวถูกละลายในกากกาแฟ เช่น กาเฟอีน, สารประกอบฟีนอล, melanoidin เป็นต้น

เกิดการถ่ายเทมวลสาร หรือเกิดการแพร่เข้าสู่ตัวทำละลายได้ดียิ่งขึ้น ส่งผลให้ค่าที่วิเคราะห์ได้ในสารสกัดหยาบกากกาแฟมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานน้อยสุด

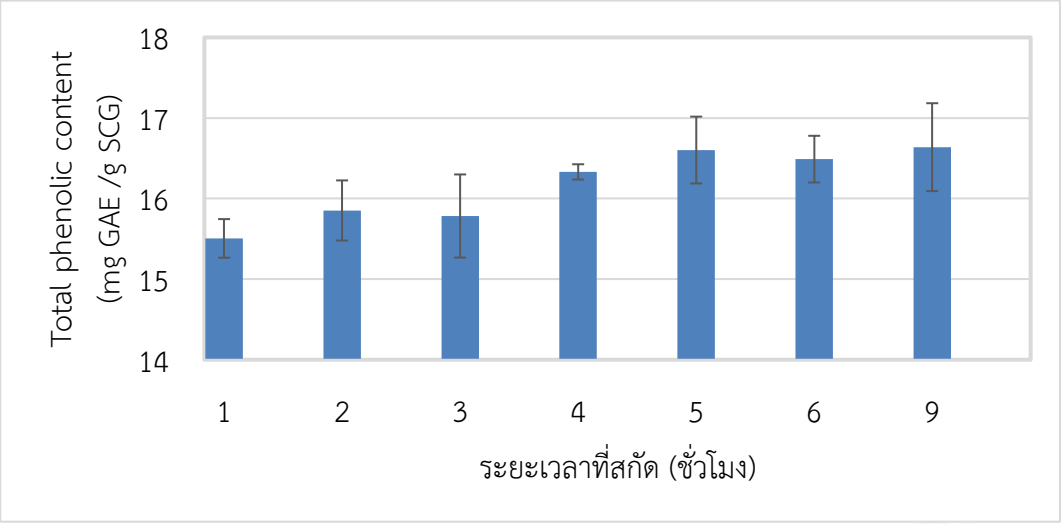
จากผลการทดลองขั้นนี้ผู้ทดลองจึงเลือกใช้อัตราเร็วในการเขย่าเครื่อง Overhead mixer ที่ 30 รอบต่อนาทีในการศึกษาทดลองต่อไป

ตารางที่ 3.1 แสดงค่า Total phenolic content และกาเฟอีนของสารสกัดหยาบกากกาแฟที่สกัดด้วยอัตราเร็วรอบต่อนาทีต่าง ๆ

อัตราเร็วรอบต่อนาที	Total phenolic content (mg GAE/g SCG)		กาเฟอีน (mg กาเฟอีน/g SCG)	
	ค่าเฉลี่ย	N	ค่าเฉลี่ย	N
10	4.71 ± 0.27	3	1.20 ± 0.14	3
20	4.79 ± 0.12	3	1.23 ± 0.05	3
30	4.74 ± 0.03	3	1.18 ± 0.05	3

3.1.3 การศึกษาระยะเวลาในการสกัดที่เหมาะสม

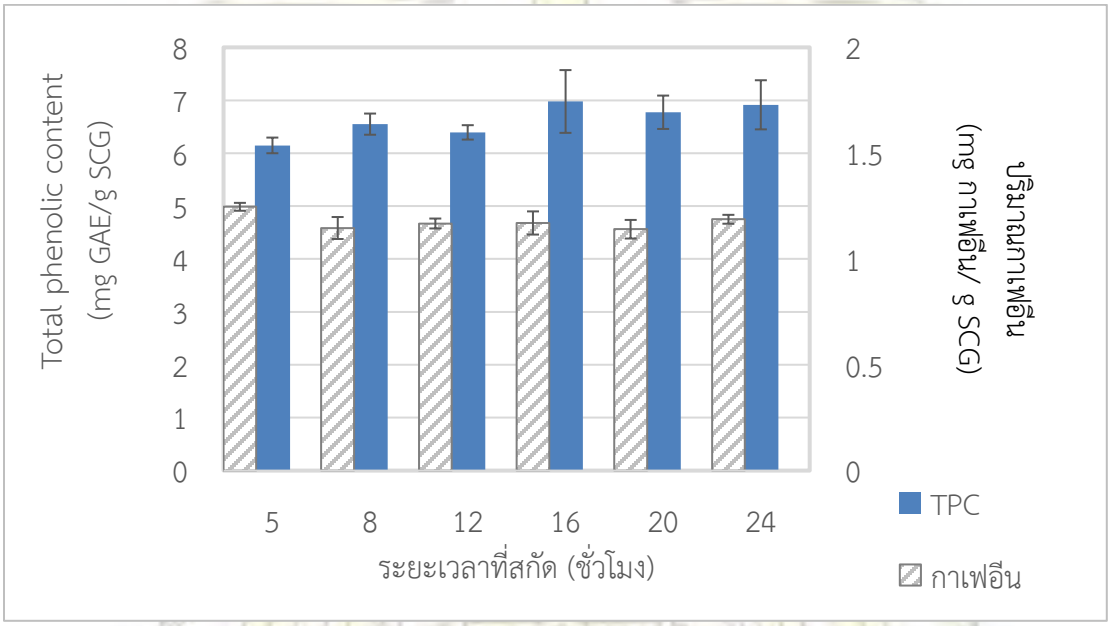
ในการศึกษาส่วนนี้มุ่งหาระยะเวลาในการสกัดที่เหมาะสม โดยใช้ตัวทำละลายระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์ และน้ำในอัตราส่วน 1:1 และใช้อัตราเร็วของเครื่อง Overhead mixer ที่ 30 รอบต่อนาที จะพบว่าเมื่อระยะเวลาในการสกัดเพิ่มมากขึ้น ค่า Total phenolic content ของสารสกัดหยาบกากกาแฟก็มีค่าสูงขึ้นเช่นกัน โดยเฉพาะตั้งแต่ระยะเวลาการสกัด 5 ชั่วโมง



รูปที่ 3.4 Total phenolic content ของสารสกัดหยาบกากกาแฟที่สกัดด้วยระยะเวลาต่างกัน

เมื่อพิจารณากราฟ**รูปที่ 3.5** จะเห็นได้ว่าเมื่อระยะเวลาการสกัดเพิ่มขึ้นจาก 5 เป็น 24 `ชั่วโมง ปริมาณสารประกอบฟีนอลและกาเฟอีนที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ในการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดกากกาแฟ คือ 5 ชั่วโมง เนื่องจากให้ปริมาณกาเฟอีนที่สูงสุด และให้ค่า Total phenolic content ที่สูงใกล้เคียงกับการสกัดที่ใช้ระยะเวลามากกว่า 5 ชั่วโมง



รูปที่ 3.5 Total phenolic content และปริมาณกาเฟอีนของสารสกัดหยาบกากกาแฟที่สกัดด้วยระยะเวลาต่างกัน

เมื่อพิจารณากราฟ**รูปที่ 3.4 และรูปที่ 3.5** พบว่าค่า Total phenolic content ที่ได้จากสารสกัดแตกต่างกัน เนื่องจากผู้ทดลองใช้กากกาแฟคนละชุด ซึ่งกากกาแฟที่ได้มาจากร้านกาแฟอินทนิลในแต่ละวันจะมีปริมาณสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ สารประกอบฟีนอลที่ต่างกัน คาดว่าน่าจะเป็นผลมาจากการที่ในแต่ละวันลูกค้าจะสั่งเมนูกาแฟที่ต่างกัน อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าภาวะการสกัดที่เหมาะสมจะต้องไม่ขึ้นกับลักษณะของกากกาแฟ เช่น ระดับการคั่วเมล็ดกาแฟ

ซึ่งจากงานวิจัยของ Somporn และคณะ[44] รายงานว่าระดับการคั่วเมล็ดกาแฟจะส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอล ถ้าระดับการคั่วยิ่งมาก (คั่วเข้ม หรือ คั่วลึก) ก็จะทำให้สารสกัดกาแฟมีค่า Total phenolic content ลดลง เนื่องจากสารประกอบฟีนอลเกิดการสลายตัวที่อุณหภูมิสูง ในทางกลับกัน Cuong และคณะ[45] ได้รายงานว่าถ้าระดับการคั่วยิ่งมาก จะทำให้สารสกัดกาแฟมีปริมาณกาเฟอีนที่มากขึ้น อีกทั้งพันธุ์ของกาแฟก็มีผลต่อปริมาณสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยกาแฟพันธุ์ Robusta จะมีปริมาณ CGA และกาเฟอีนมากกว่าพันธุ์ Arabica[46] ด้วยเหตุผลต่าง ๆ ที่กล่าวไปข้างต้นจึงทำให้ผู้

ทดลองสรุปได้ว่ากากกาแฟที่ได้ในแต่ละวันน่าจะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอล และปริมาณกาเฟอีนที่ต่างกัน

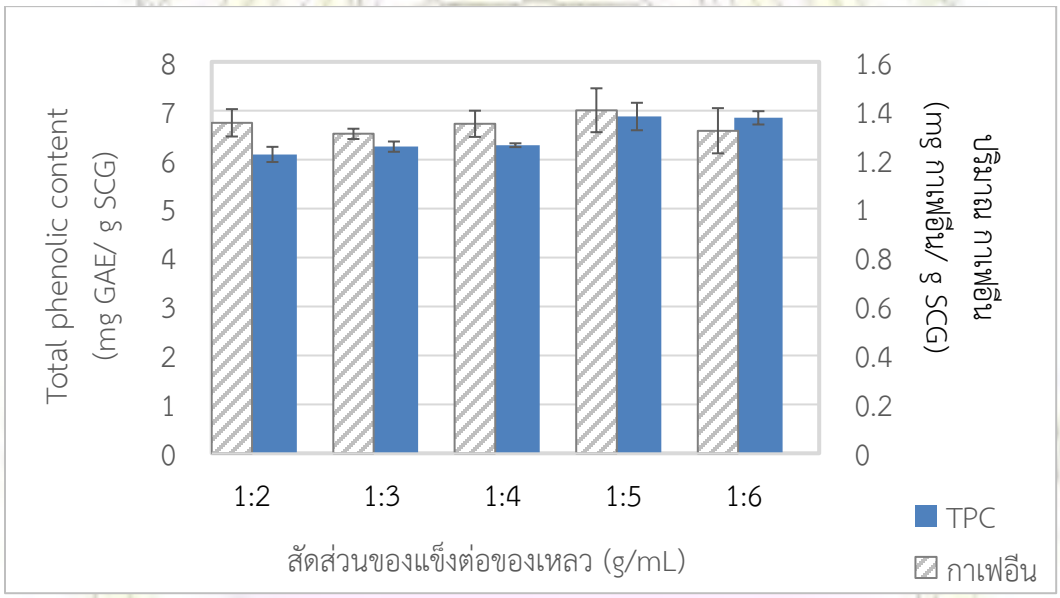
3.1.4 การศึกษาอัตราส่วนระหว่างกากกาแฟตัวทำละลายที่เหมาะสม

a) การศึกษาอัตราส่วนระหว่างกากกาแฟและตัวทำละลายที่เหมาะสม

ในการศึกษาส่วนนี้ จะทำการหาอัตราส่วนระหว่างกากกาแฟและตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด โดยทำการศึกษาที่อัตราส่วนกากกาแฟต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 และ 1:6 กรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองตามกราฟ**รูปที่ 3.6** พบว่าในแต่ละสัดส่วนกากกาแฟต่อตัวทำละลายจะให้ค่า Total phenolic content ของสารสกัดไม่ต่างกันมากนัก โดยที่สัดส่วนของแข็งต่อของเหลวที่ 1:5 และ 1:6 กรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า Total phenolic content สูงสุด เท่ากับ 6.88 ± 0.28 และ 6.86 ± 0.14 mg GAE/g SCG ตามลำดับ

ในขณะเดียวกันจากกราฟ**รูปที่ 3.6** พบว่าในแต่ละสัดส่วนของแข็งต่อของเหลวก็ให้ปริมาณกาเฟอีนที่ใกล้เคียงกัน และพบว่าสัดส่วนกากกาแฟต่อตัวทำละลายที่ให้ปริมาณกาเฟอีนสูงสุดคือที่สัดส่วน 1:5 กรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดลองนี้จึงสามารถสรุปได้ว่าสัดส่วนของกากกาแฟต่อตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดก็คือที่สัดส่วน 1:5 กรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งที่สัดส่วนนี้มีแนวโน้มให้ค่า Total phenolic content และกาเฟอีนสูงสุด



รูปที่ 3.6 Total phenolic content และกาเฟอีนของสารสกัดหยาบกากกาแฟที่สกัดด้วยสัดส่วนของแข็งต่อของเหลวต่างกัน

b) การศึกษาจำนวนครั้งในการสกัด

ในการทดลองส่วนนี้ ทำการสกัดกากกาแฟซ้ำครั้งที่สองหลังจากสกัดไปครั้งแรก จาก**ตารางที่ 3.2** จะเห็นได้ว่า ปริมาณของ Total phenolic content และกาเฟอีนในการสกัดครั้งที่ 2 มีค่าน้อยกว่า 50% ของการสกัดครั้งแรก ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการสกัดกากกาแฟนั้น ๆ เพียงครั้งเดียวเพื่อลดของเหลือทิ้ง และปริมาณตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

ตารางที่ 3.2 Total phenolic content และกาเฟอีนของสารสกัดหยาบกากกาแฟที่สกัดในแต่ละครั้ง

สกัดครั้งที่	Total phenolic content (mg GAE/g SCG)		กาเฟอีน (mg กาเฟอีน/g SCG)	
	ค่าเฉลี่ย	N	ค่าเฉลี่ย	N
1	4.53 ± 0.05	2	0.73 ± 0.07	2
2	1.53 ± 0.02	2	0.19 ± 0.08	2

3.1.5 การศึกษาผลของอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด

การทดลองในขั้นนี้มุ่งเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดเมื่อใช้เทคนิคการกวนสารที่แตกต่างกัน โดยอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดหรือการกวน คือ Overhead mixer ที่ความเร็ว 30 รอบต่อนาที และแท่งแม่เหล็ก (stirrer bar) ที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาที โดยการเลือกความเร็วที่ต่างกันนั้น เนื่องจากเครื่อง Overhead mixer มีความเร็วสูงสุดเพียง 30 รอบต่อนาที ส่วนความเร็วของแท่งแม่เหล็กเลือกศึกษาที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาที

จากผลการทดลอง พบว่าจากกราฟ**ตารางที่ 3.3** เมื่อใช้อุปกรณ์ในการสกัดต่างกันจะทำให้ค่า Total phenolic content ต่างกันเพียงเล็กน้อย คือ ที่ระยะเวลาสกัด 5 ชั่วโมง การใช้เครื่อง Overhead mixer และการใช้แท่งแม่เหล็กกวนจะให้ค่า Total phenolic content ต่างกันเพียง 0.51 mg GAE ที่ระยะเวลาสกัด 8 ชั่วโมง ค่าที่ได้ต่างกัน 0.07 mg GAE/g SCG แต่เมื่อสกัดที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าค่า Total phenolic content ที่ได้ของทั้งสองอุปกรณ์ต่างกันมากขึ้นเท่ากับ 0.80 mg GAE/g SCG ซึ่งถ้าหากพิจารณาแนวโน้มของค่า Total phenolic content จะพบว่าการกวนด้วยแท่งแม่เหล็กในการสกัดจะให้ค่าที่สูงกว่าการใช้เครื่อง Overhead mixer เล็กน้อย ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการที่การสกัดด้วยแท่งแม่เหล็กนั้นจะใช้ความเร็วรอบต่อนาทีที่สูงกว่าเครื่อง Overhead mixer แต่อย่างไรก็ตามการสกัดด้วยแท่งแม่เหล็กอาจจะทำให้กากกาแฟสัมผัสกับตัวทำละลายได้ไม่ทั่วถึงเท่าเครื่อง Overhead mixer เนื่องจากจะมีกากกาแฟบางส่วนติดอยู่ตามขอบบีกเกอร์ที่ใช้สกัดขณะทำการกวน อาจจะทำให้การสกัดเป็นไปอย่างไม่เต็มประสิทธิภาพ

ตารางที่ 3.3 Total phenolic content และปริมาณกาเฟอีนของสารสกัดหยาบกากกาแฟที่สกัดด้วยอุปกรณ์และระยะเวลา ในการสกัดต่างกัน (N=3)

ระยะเวลาสกัด (ชั่วโมง)	การเขย่าด้วย Overhead mixer		การกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก	
	TPC (mg GAE/g SCG)	ปริมาณกาเฟอีน (mg กาเฟอีน/g SCG)	TPC (mg GAE/g SCG)	ปริมาณกาเฟอีน (mg กาเฟอีน/g SCG)
5	6.15 ± 0.15	1.25 ± 0.02	6.66 ± 0.16	1.20 ± 0.04
8	6.55 ± 0.20	1.15 ± 0.05	6.48 ± 0.05	1.20 ± 0.01
12	6.39 ± 0.14	1.17 ± 0.02	7.19 ± 0.43	1.22 ± 0.23

ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณกาเฟอีนจาก**ตารางที่ 3.3** พบว่าค่าที่ได้จากทั้งสองอุปกรณ์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน

จากการทดลองนี้ จึงทำให้สรุปได้ว่าการสกัดด้วยเครื่อง Overhead mixer ที่ความเร็ว 30 รอบต่อนาที และการกวนด้วยแท่งแม่เหล็กที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาทีจะส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลและกาเฟอีนเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

3.2 ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ของกระดาษชุบสารสกัดจากกากกาแฟด้วยวิธี Agar disc diffusion

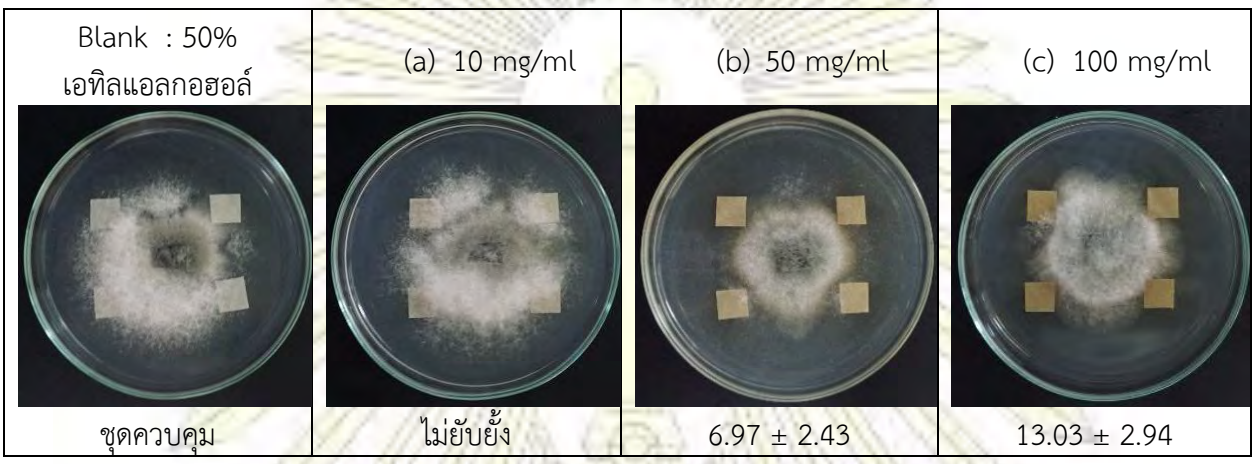
ในส่วนการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟจะมุ่งหาปริมาณสารสกัดหยาบกากกาแฟที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ เพื่อดูแนวโน้มว่าต้องใช้ปริมาณสารสกัดหยาบกากกาแฟเท่าใดถึงจะเห็นฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อที่ศึกษาได้

การหาปริมาณสารสกัดหยาบกากกาแฟที่ยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากกากกาแฟที่ระเหยเอทิลแอลกอฮอล์ออกแล้วไปเข้าเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าได้สารสกัดหยาบจากกากกาแฟออกมาเป็นผงละเอียดสีน้ำตาลอ่อนน้ำหนัก 9.3147 กรัม ซึ่งไวต่อความชื้นต้องเก็บไว้ในเดซิเคเตอร์ และพบว่ายังมีผงของสารสกัดจำนวนมากติดอยู่ตามภาชนะที่ใช้ในเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย

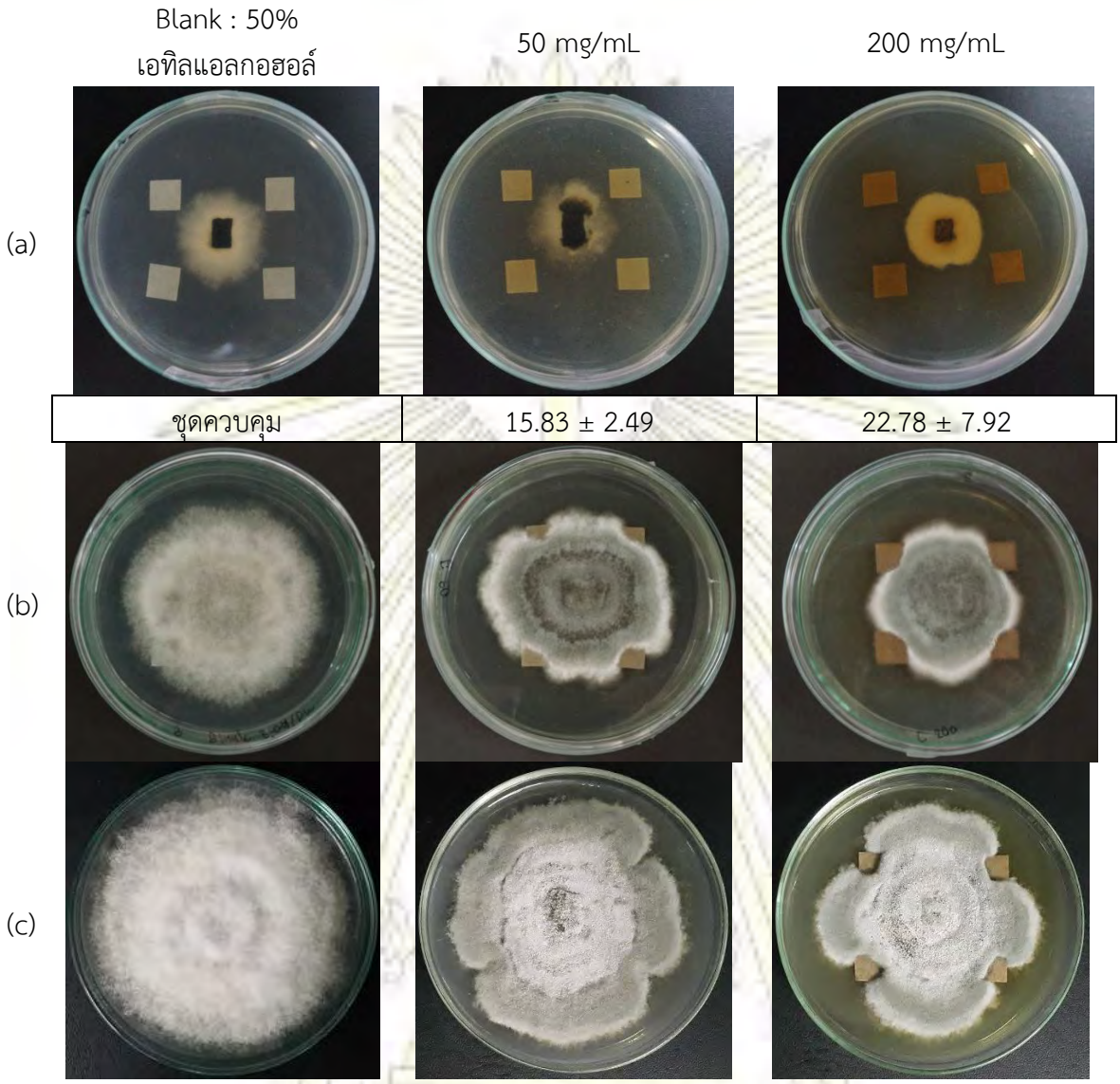
ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของสารสกัดหยาบกากกาแฟที่ความเข้มข้น 10, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็นสองชุดซึ่งทำการทดลองต่างวันกัน ชุดแรกศึกษาที่ช่วงความเข้มข้น 10, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และชุดที่สองศึกษาสารสกัดหยาบจากกากกาแฟที่ความเข้มข้น 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดหยาบจากกากกาแฟที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีปริมาณ Total phenolic content และกาเฟอีนดัง**ตารางที่ 3.3** และเมื่อพิจารณาจากผลการ

ทดลองใน**รูปที่ 3.7** พบว่าที่ 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งเชื้อราที่ศึกษาได้สังเกตได้จากโซนยับยั้งที่เชื้อรามีการเว้าตาม**รูปที่ 3.7** (b) และ (c) โดยมี %inhibition เท่ากับ 6.97 ± 2.43 และ 13.03 ± 2.94 ตามลำดับ และเมื่อผ่านไปวันที่ 4 พบว่าสารสกัดหยาบจากกากกาแฟความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยังคงมีโซนยับยั้งอยู่



รูปที่ 3.7 ลักษณะเชื้อรา C. gloeosporioides และ %inhibition หลังทดสอบกับสารสกัดหยาบกากกาแฟที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 mg/mL เป็นเวลา 3 วัน

ในการทดลองชุดที่สองซึ่งศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งของสารสกัดหยาบกากกาแฟที่ความเข้มข้น 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าหลังจากวางกระดาษกรองที่ใช้ทดสอบทิ้งไว้ 3 วัน เชื้อราก็ยังโตไม่ถึงกระดาษกรองที่ทำการทดสอบ ซึ่งคาดว่าเกิดจากการที่ผู้ทดลองตัดเชื้อราในช่วงที่มีสปอร์น้อยทำให้เชื้อราเจริญเติบโตได้ช้า แต่อย่างไรก็ตามเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราชุดควบคุม (Blank) ก็ยังมากกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ ทำให้สามารถคำนวณ %inhibition ได้ตาม**รูปที่ 3.8** โดยที่ความเข้มข้น 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มี %inhibition เท่ากับ 15.83 ± 2.49 และ 22.78 ± 7.92 ตามลำดับ และเมื่อบ่มทิ้งไว้นาน 7 และ 11 วัน พบว่าจะเห็นโซนยับยั้งที่ชัดเจนยิ่งขึ้น ตาม**รูปที่ 3.8 (b) และ (c)** ตามลำดับโดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร **(รูปที่ 3.8 (c))** จะเห็นโซนยับยั้งได้ชัดเจนที่สุด



รูปที่ 3.8 ลักษณะเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ %inhibition หลังทดสอบกับสารสกัดหยาบกากกาแฟที่ความเข้มข้น 50 และ 200 mg/mL เป็นเวลา (a) 3 วัน, (b) 7 วัน และ (c) 11 วัน

อีกทั้งในการศึกษาขั้นนี้ ได้ทำการหาปริมาณสารประกอบฟีนอล และกาเฟอีนในสารสกัดหยาบจากกากกาแฟที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยดังแสดงใน **ตารางที่ 3.5** เมื่อพิจารณาผลดังกล่าว พบว่าที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในกระดาษกรอง 1 แผ่นจะมีปริมาณกาเฟอีนและ Total phenolic content เพียง 0.01 mg กาเฟอีนและ 0.06 mg GAE ตามลำดับ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมี %inhibition เพิ่มขึ้นจาก 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ประมาณ 5.17-14.02% โดยในกระดาษกรอง 1 แผ่นจะมีปริมาณกาเฟอีนและ Total phenolic content เพิ่มขึ้น 0.06 mg กาเฟอีนและ 0.24 mg GAE ตามลำดับ ซึ่งถ้าพิจารณาทั้งปริมาณกาเฟอีนและ Total phenolic content แล้ว พบว่าสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งน่าจะเป็นสารประกอบ

ฟีนอลเนื่องจากสารสกัดหยาบจากกากกาแฟจากความเข้มข้น 50 ไปที่ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร %inhibition จะเพิ่มขึ้น 6.96% (คำนวณจาก**รูปที่ 3.8**) ในขณะที่กระดาษกรอง 1 แผ่น จะมีปริมาณ Total phenolic content เพิ่มขึ้นถึง 0.56 mg GAE แต่ปริมาณกาเฟอีนเพิ่มขึ้นเพียง 0.06 mg กาเฟอีน เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจาก 50 เป็น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าสารประกอบฟีนอลน่าจะเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื่อรา *C. gloeosporioides* มากกว่ากาเฟอีน

ตารางที่ 3.3 แสดงปริมาณ Total phenolic content และกาเฟอีนของสารสกัดหยาบกากกาแฟที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกากกาแฟ (mg/mL)	ปริมาณ กาเฟอีน (mg กาเฟอีน/ 50 µL)	Total phenolic content (mg GAE/50 µL)
10	0.01	0.06
50	0.07	0.30
100	0.11	0.44
200	0.13	0.86

เมื่อเปรียบเทียบ %inhibition กับโครงการก่อนหน้านี้[15] พบว่าสารสกัดหยาบจากกากกาแฟมีค่า %inhibition น้อยกว่าสารสกัดหยาบขมิ้นชันถึง 37% รวมถึงสารสกัดจากงานวิจัยของวิชัย และคณะ[4] เช่น เหง้าว่านน้ำ หัวกระเทียม ใบทองพันชั่ง เหง้าขิง เป็นต้น ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm ต่างมี %inhibition มากกว่าสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ เนื่องจากสารสกัดจากงานวิจัยและโครงการอื่น ๆ เป็นสมุนไพรที่มีกลิ่นฉุน มีสารที่ระเหยสามารถให้กลิ่นที่อุณหภูมิห้องได้ (Volatile) จึงทำให้การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งด้วยวิธี disc diffusion น่าจะให้ผลได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ เพราะวิธี disc diffusion นี้จะอาศัยหลักการแพร่ของสารตัวอย่างจาก disc หรือ กระดาษกรองเข้าสู่วุ้นที่เป็นอาหารของเชื้อ ซึ่งผู้ทดลองคาดว่าหากนำสารสกัดหยาบจากกากกาแฟไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งด้วยวิธีอื่น เช่น Poisoned food method[22] ก็น่าจะให้ผลเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ดีกว่าวิธี disc diffusion

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

4.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาทดลองสองส่วนหลักของโครงการ โดยส่วนแรก คือ การศึกษาประสิทธิภาพการสกัดสารจากกากกาแฟด้วยภาวะต่าง ๆ พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกากกาแฟเป็นไปตาม**ตารางที่ 4.1** โดยปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลและกาเฟอีนมากที่สุด คือ อัตราส่วนของตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์และน้ำ

ตารางที่ 4.1 ภาวะการสกัดกากกาแฟที่เหมาะสม

ปัจจัยที่ศึกษา	ภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกากกาแฟ
อัตราส่วนตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์และน้ำ	1:1
อัตราเร็วการเขย่าด้วยเครื่อง Overhead mixer (รอบต่อนาที)	30
ระยะเวลาในการสกัด (ชั่วโมง)	5
อัตราส่วนกากกาแฟ (กรัม) ต่อตัวทำละลาย (มิลลิลิตร)	1:5

ในการทดลองส่วนที่สอง คือ การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ พบว่าสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งเชื้อราที่ศึกษาได้ แต่ที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อราที่ศึกษาได้ โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟพบว่าจะมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจะเห็นโซนยับยั้งที่ชัดเจนมากที่สุด และคาดว่าสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* น่าจะเป็นสารประกอบฟีนอล

4.2 ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยต่อในอนาคต

1. ศึกษาอุณหภูมิขาเข้าของเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ

2. ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟต่อเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่ก่อให้เกิดสารพิษ Aflatoxin ในถั่ว และพืชชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง

3. ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราด้วยวิธีอื่น เช่น Poisoned food method

เอกสารอ้างอิง

1. ตลาดผลไม้เขตร้อนในสหภาพยุโรป. http://www2.thaieurope.net/%E0%B8%95%E0%B8%A5%E0%B8%B2%E0%B8%94%E0%B8%9C%E0%B8%A5%E0%B9%84%E0%B8%A1%E0%B9%89%E0%B9%80%E0%B8%82%E0%B8%95%E0%B8%A3%E0%B9%89%E0%B8%AD%E0%B8%99%E0%B9%83%E0%B8%99%E0%B8%AA%E0%B8%AB%E0%B8%A0%E0%B8%B2/ (accessed Feb 5, 2017)

2. สถาบันระหว่างประเทศเพื่อการค้าและการพัฒนา (องค์การมหาชน). แนวทางการลดมาตรการกีดกันทางการค้าที่มิใช่ภาษี (Non–Tariff Measures: NTMs) ภาคสินค้าเกษตร ปศุสัตว์ และประมง ในกลุ่มประเทศประชาคมอาเซียน + 6 (จีน เกาหลี ญี่ปุ่น ออสเตรเลีย อินเดีย นิวซีแลนด์). นนทบุรี: บริษัท สหมิตรพริ้นติ้งแอนด์พับลิสชิ่ง จำกัด; 2559.

3. ดร.พร้อมลักษณ์ สมบูรณ์ปัญญากุล. องค์ความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์การอาหาร. การประชุมวิชาการนักกำหนดอาหาร ประจำปี 2551; 22 เม.ย. 2551; โรงแรมแอมบาสเดอร์. หน้า 10-11.

4. วิชัย กอประดิษฐ์สกุล, ชัยณรงค รัตนกรีฑากุล. ฤทธิ์ของสารสำคัญจากพืชสมุนไพรในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในมะมวง. นครปฐม : โครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว; 2548.

5. Sopee, J.; Sangchote, S. Effect of Heat Treatment on The Fungus *Colletotrichum Gloeosporioides* And Anthracnose of Mango Fruit. *Acta Hortic*. **2005**, *682*, 2049-2056.

6. Paull, R. E.; Chen, N. J. Heat Treatment and Fruit Ripening. *Postharvest Biol. Technol*. **2000**, *21*, 21–37.

7. Cheon, W.; Kim,Y. S.; Balaraju, K.; Kim, B.; Lee, B.; Jeon, Y. Postharvest Disease Control of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium expansum* on Stored Apples by Gamma Irradiation Combined with Fumigation. *Plant Pathol. J*. **2016**, *32*, 460–468.

8. Prasothong, N.; Plainsiricha, M.; Bussaman, P.; Luckanatinavong, V.; Singhthongla, P.; Wongsawas, M. Effect of Chitosan on Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) of Mango Fruit Cv. Nam Dok Mai. *Agricultural Sci. J*. **2011**, *42*, 228-231.

9. Ali, A.; Chow, W. L.; Zahid, N.; Ong, M. K. Efficacy of Propolis and Cinnamon Oil Coating in Controlling Post-Harvest Anthracnose and Quality of Chilli (*Capsicum annuum L.*) during Cold Storage. *Food Bioprocess Technol*. **2014**, *7*, 2742–2748.

10. Bosquez-Molina, E.; Jesús, E. R.; Bautista-Baños, S.; Verde-Calvo, J. R.; Morales-López, J. Inhibitory Effect of Essential Oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in Stored Papaya Fruit and Their Possible Application in Coatings. *Postharvest Biol. Technol*. **2010**, *57*, 132–137.

11. สุพัฒน คำไทย, เจิมขวัญ สังข์สุวรรณ, เปรม ทองชัย. การพัฒนากระดาษยับยั้งเชื้อราและออกแบบบรรจุภัณฑสำหรับยืดอายุการเก็บรักษามังคุด. เชียงใหม่ : ศูนย นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม โครงการวิจัยเพื่อนวัตกรรม; 2553.

12. Tuntiwiwattanapua, N.; Monono, E.; Wiesenborn, D.; Tongcumpou, C. *In-situ* Transesterification Process For Biodiesel Production Using Spent Coffee Grounds from The Instant Coffee Industry. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *102*, 23–31**.**

13. Shang, Y. F.; Xu, J. L.; Lee , W. J.; Um, B. H. Antioxidative Polyphenolics Obtained from Spent Coffee Grounds by Pressurized Liquid Extraction. *S. Afr. J. Bot.* **2017**, *109*, 75–80.

14. Yen, H. Y.; Desalin, H. S. L. Ni(II) Removal from Wastewater by Solar Energy-degreased Spent Coffee Grounds. *Water Treat.* **2016**, *57*, 15049-15056.

15. อิสริยาภรณ์ ประเสริฐวิริยะ. บรรจุภัณฑ์ห่อผลไม้ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2558.

16. Nonthakaew, A.; Matan, N.; Aewsiri, T.; Matan, N. Antifungal Activity of Crude Extracts of Coffee and Spent Coffee Ground on Areca Palm Leaf Sheath (*Areca catechu*) Based Food Packaging. *Packag. Technol. Sci.* **2015**, *28*, 633–645.

17. Nonthakaew, A.; Matan, N.; Aewsiri, T.; Matan, N. Caffeine in Foods and Its Antimicrobial Activity. *Int. Food Res. J.* **2015**, *22*, 9-14.

18. Saenthaweesuk, S.; Jongtamklang, D.; Somchan, T.; Thobunluepop, P. Total Phenolics Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Some Herbs. *Khon Kaen Agr. J.* **2012**, *40*, 480-483.

19. โรคผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว. http://www.doa.go.th/pprdo/download/text2.pdf (accessed Feb 13, 2017)

20. Campos-Vega, R.; Loarca-Pina, G.; Vergara-Castaneda, H. A.; Oomah, B. D. Spent Coffee Grounds: A Review on Current Research and Future Prospects. *Trends Food Sci. Technol*. **2015**, *45*, 24-36.

21. Caffeine. http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/4088/caffeine-%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B9%81%E0%B8%9F%E0%B8%AD%E0%B8%B5%E0%B8%99 (accessed Feb 13, 2017)

22. Ploypradub, C.; Cheamsuphakit, B.; Punbusayakul, N. Antioxidant Properties of Different Parts of Arabica Coffee Berry and Spent Coffee Ground. *Agricultural Sci. J*. **2010**, *41*, 577-580.

23. Phenolic compounds. http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2585/phenolic-compound (accessed Feb 13, 2017)

24. Classification of polyphenolic compounds. https://www.researchgate.net/figure/260647456_fig1_Fig-1-Classification-of-polyphenolic-compounds-used-to-establish-the-antioxidant (accessed Feb 13, 2017)

25. Agbor, G. A.; Vinson, J. A.; Donnelly, P. E. Folin-Ciocalteau Reagent for Polyphenolic Assay. *Int. J. Food Sci., Nutr. Diet.* **2014**, *3*, 147-156.

26. Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibnsouda, S. K. Methods for In Vitro Evaluating Antimicrobial Activity : A Review. *J. Pharm. Anal.* **2016**, *6*, 71–79.

27. ดร.พรศิริ หลีวานิช, นางสาวพรพนา นาคสิงห์. ผลการยับยั้งเชื้อราของส่วนสกัดเอทานอลจากเปลือกผลทับทิมต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก. นครปฐม :ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรคณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2550.

28. Khewkhom, N.; Sopon, B.; Kaewsuksang, S. Antifungal Activity of *Alpinia galanga* Crude Extract Against *Colletotrichum gleosporioides* of Four Fruits. *Agricultural Sci. J.* **2010**, *41*, 437-440.

29. Ballesteros, L. F.; Cerqueiraa, M. A.; Teixeira, J. A.; Mussatto, S. I. Characterization of Polysaccharides Extracted from Spent Coffee Grounds by Alkali Pretreatment. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *127*, 347–354.

30. Getachew, A. T.; Chun, B. S. Influence of Pretreatment and Modifiers on Subcritical Water Liquefaction of Spent Coffee Grounds: A Green Waste Valorization Approach. *J. Cleaner Prod*. **2017**, *142*, 3719–3727.

31. Al-Dhabi, N. A.; Ponmurugan, K.; Jeganatha, P. M. Development and Validation of Ultrasound-assisted Solid-liquid Extraction of Phenolic Compounds from Waste Spent Coffee Grounds. *Ultrason. Sonochem*. **2017**, *34*, 206–213.

32. Pavlovic, M. D.; Buntic, A. V.; Šiler-Marinkovic, S. S.; Dimitrijevic-Brankovic, S. I. Ethanol Influenced Fast Microwave-assisted Extraction for Natural Antioxidants Obtaining from Spent Filter Coffee. *Sep. Purif. Technol*. **2013**, *118*, 503–510.

33. Galanakis, C. M.; Goulas, V.; Tsakona, S.; Manganaris, G. A.; Gekas V. A Knowledge Base for the Recovery of Natural Phenols with Different Solvents . *Int. J. Food Prop.* **2013**, *16*, 382–396.

34. การแยกสารเคมีจากแหล่งธรรมชาติ http://www.chemistry.sc.chula.ac.th/course_info/2302275/chapter10.pdf (accessed Apr 6, 2017)

35. Shalmashi, A.; Golmohammad, F. Solubility of Caffeine in Water, Ethyl Acetate, Ethanol, Carbon tetrachloride, Methanol, Chloroform, Dichloromethane, and Acetone between 298 and 323 K. *Lat. Am. Appl. Res.* **2010**, *40*, 283-285.

36. Chloroform. http://www.summacheeva.org/index_thaitox_chloroform.htm (accessed Apr 6, 2017)

37. Methylene chloride MSDS. https://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9926060 (accessed Apr 6, 2017)

38. Solubility of caffeine in organic solvents. http://lxsrv7.oru.edu/~alang/onsc/solubility/allsolvents.php?solute=caffeine (accessed Apr 6, 2017)

39. บรรจุภัณฑ์แอคทีฟต้านเชื้อราเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้. http://www3.rdi.ku.ac.th/?p=32682 (accessed Apr 22, 2017)

40. Wrolstad, R. E.; Acree T. E.; Decker, E. A.; Penner, M. H.; Reid, D. S.; Schwartz, S. J.; Shoemaker, C. F.; Smith, D.; Sporns, P. Handbook of Food Analytical Chemistry . *Wiley-interscience*. **2005**, *2*, 459-470.

41. Markom, M.; Hasan, M.; Jahim, J. M.; Singh, H.; Ramli. W. Extraction of Hydrolysable Tannins from *Phyllanthus niruri Linn*.: Effects of Solvents and Extraction Methods. *Sep. Purif. Technol*. **2007**, *52*, 487–496.

42. Zuorro, A.; Lavecchia, R. Spent Coffee Grounds as A Valuable Source of Phenolic Compounds and Bioenergy. *J. Cleaner Prod.* **2011**, *34*, 49–56.

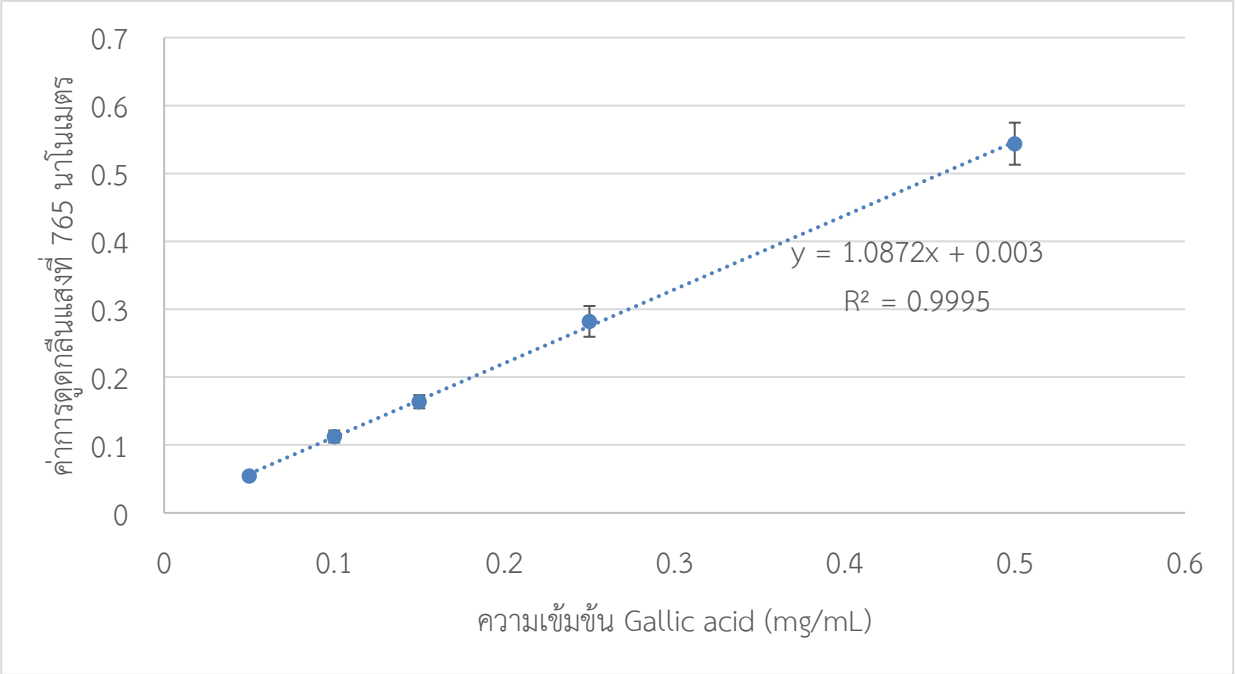
43. Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Applications; Angela, M., Meireles. A., Eds.; Contemporary Food Engineering Series; CRC Press: Florida, 2009.

44. Somporn, C.; Kamtuo, A.; Theerakulpisut, P.; Siriamornpun, S. Effects of Roasting Degree on Radical Scavenging Activity, Phenolics and Volatile Compounds of Arabica coffee beans (*Coffea arabica L. cv.* Catimor). Int. *J. Food Sci. Technol.* **2011**, *46*, 2287–2296.

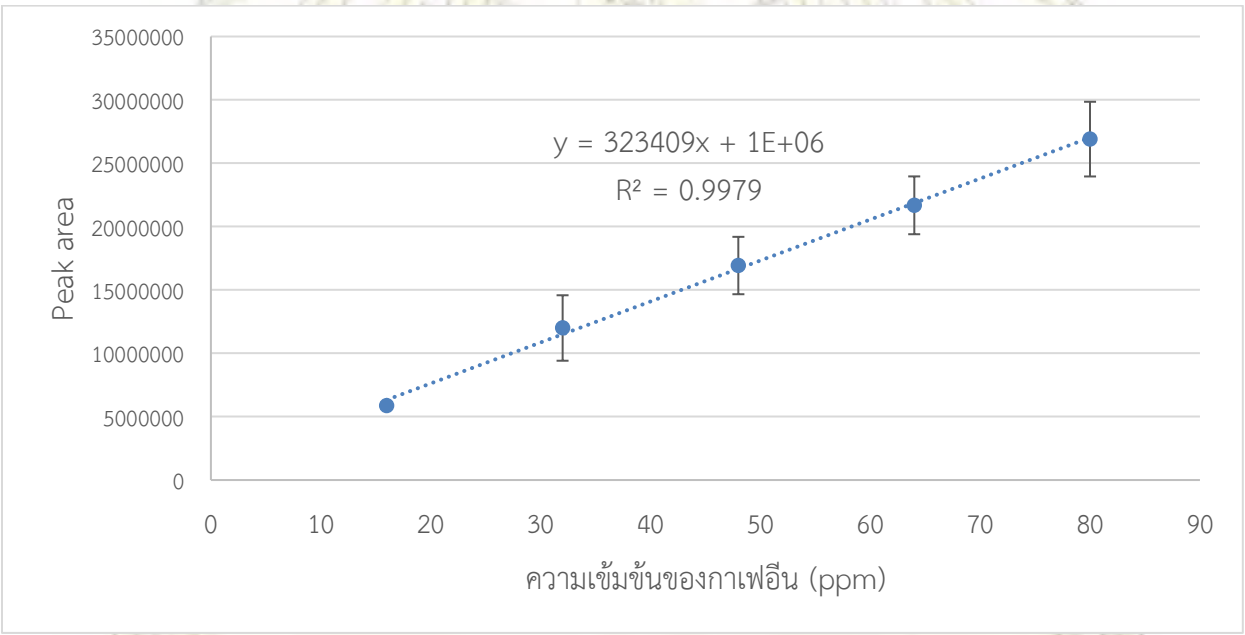
45. Cuong, T. V.; Liu, H. L.; Quan, G. K.; Tiep, T. D.; Nan, Xia.; Qing, C. X.; Linh, T. L. Effect of Roasting Conditions on Several Chemical Constituents of Vietnam Robusta Coffee. *Ann. Univ. Dunarea Jos Galati, Fasc. VI*. **2014**, *38*, 43-56.

46. Differences between Arabica and Robusta Coffee. https://www.coffeechemistry.com/general/agronomy/differences-arabica-and-robusta-coffee (accessed Apr 12, 2017)

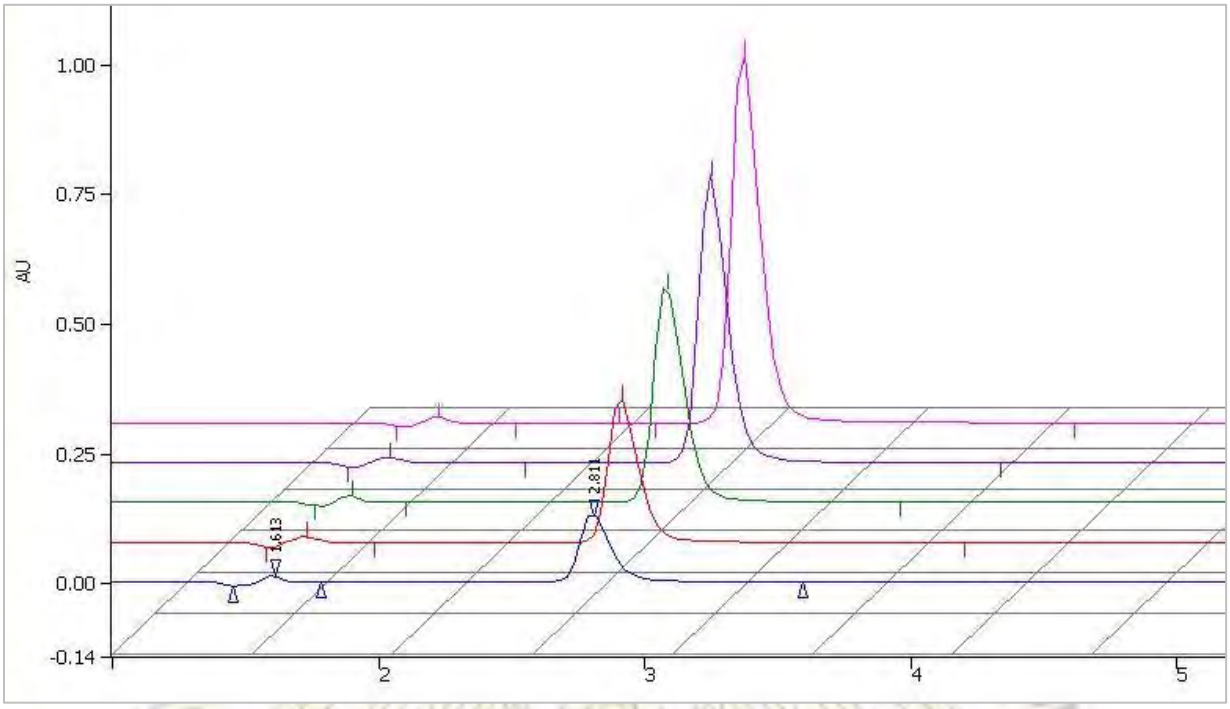
ภาคผนวก



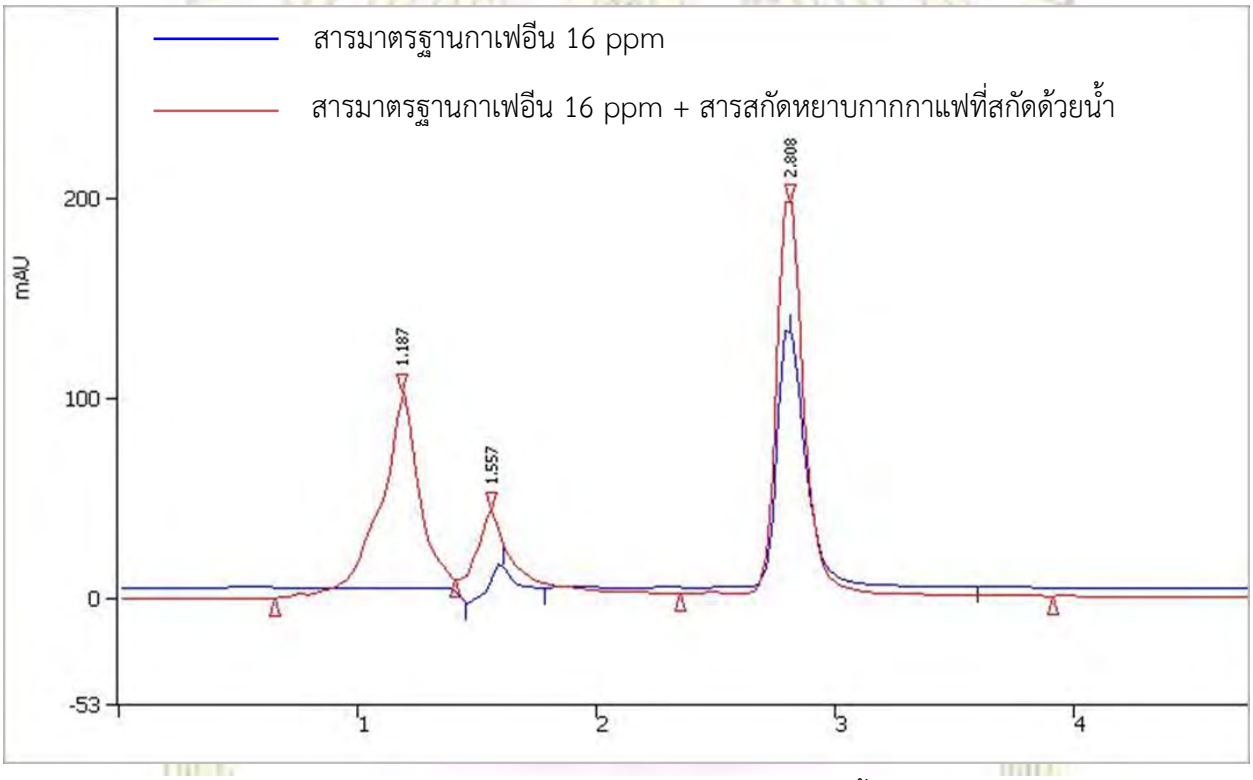
รูปที่ 1 กราฟสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



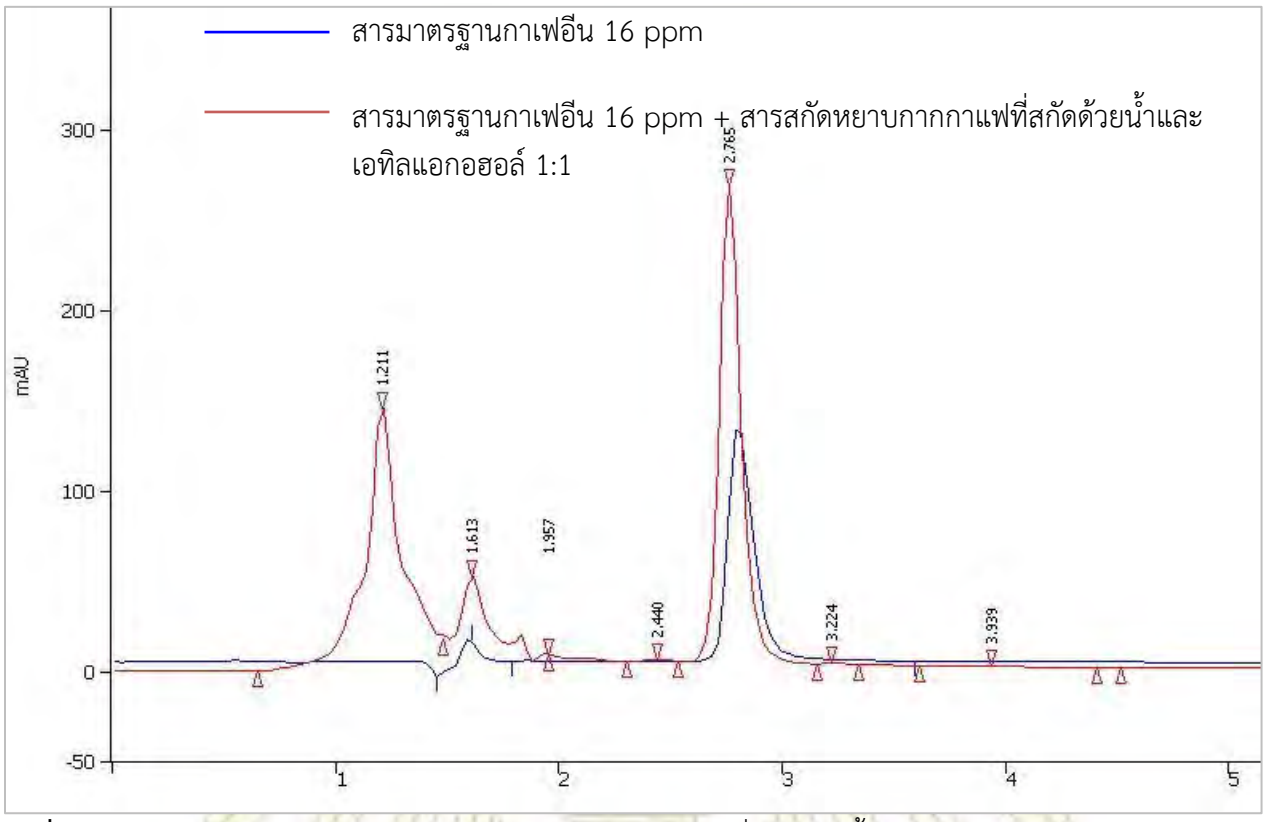
รูปที่ 2 กราฟสารละลายมาตรฐานกาเฟอีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



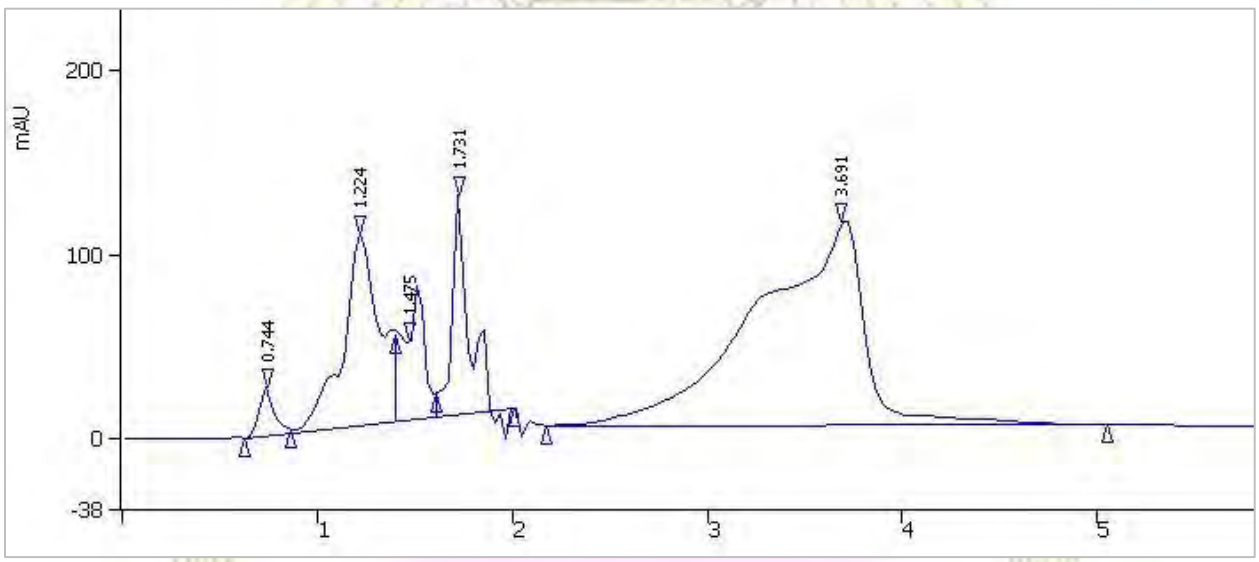
รูปที่ 3 Chromatogram ของสารมาตรฐานกาเฟอีนที่ความเข้มข้น 16, 32, 48, 64 และ 80 ppm



รูปที่ 4 Chromatogram จากการ spike สารสกัดหยาบกากกาแฟที่สกัดด้วยน้ำลงในสารมาตรฐานกาเฟอีน 16 ppm เพื่อยืนยันว่าสารที่ตรวจวัดจากตัวอย่างคือกาเฟอีนจากการทดลองที่ 3.1.1 การศึกษาอัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสม



รูปที่ 5 Chromatogram จากการ spike สารสกัดหยาบกากกาแฟที่สกัดด้วยน้ำและเอทิลแอลกอฮอล์ลงในสารมาตรฐานกาเฟอีน 16 ppm เพื่อยืนยันว่าสารที่ตรวจวัดจากตัวอย่างคือกาเฟอีนจากการทดลองที่ 3.1.1 การศึกษาอัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสม



รูปที่ 6 สารสกัดหยาบกากกาแฟที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์จากการทดลองที่ 3.1.1 การศึกษาอัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสม

ประวัติผู้วิจัย

นางสาววรรณิดา ทรัพย์เย็น เกิดเมื่อวันที่ 16 เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2537 ที่จังหวัดราชบุรี สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม จังหวัดนครปฐม เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2556 ผ่านโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 21/1 หมู่ 5 ตำบลหนองปลาหมอ อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี รหัสไปรษณีย์ 70110 อีเมล wannida.gift@gmail.com