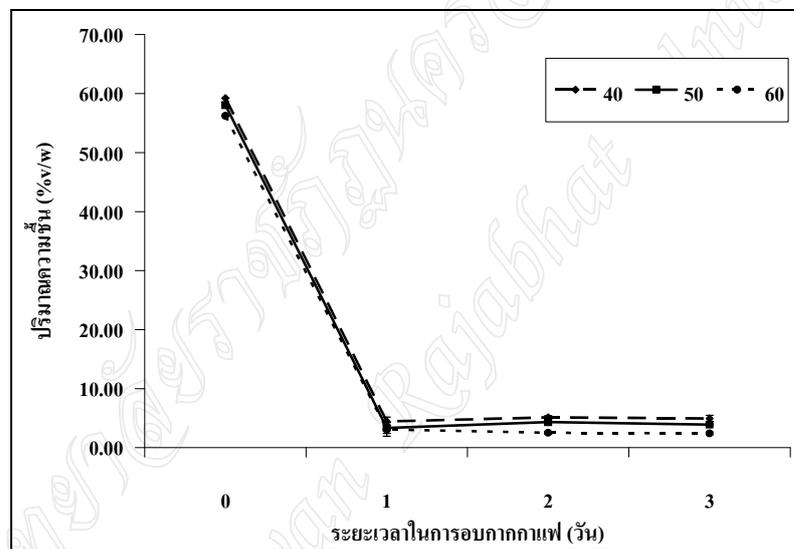


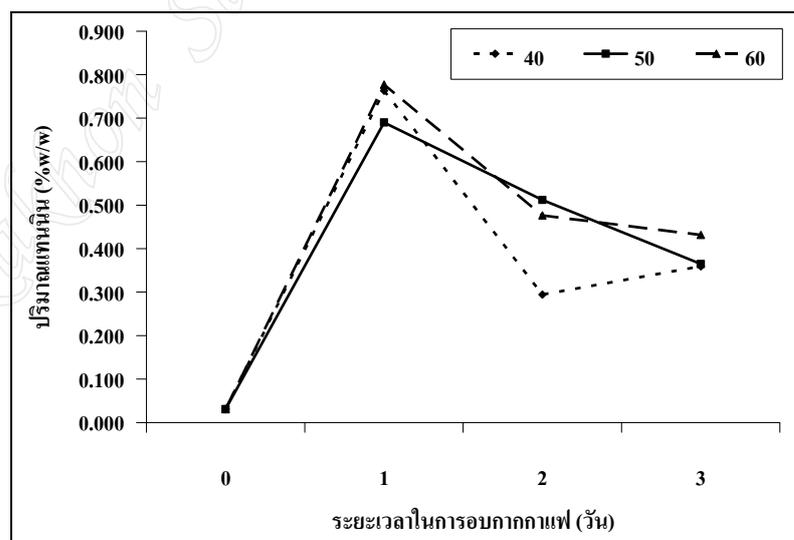
## บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

### 4.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการอบแห้งกากกาแฟสด

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการอบแห้งกากกาแฟสดได้แก่ อุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในการอบแห้ง โดยอุณหภูมิที่ใช้ได้แก่ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ส่วนระยะเวลาที่ใช้ในการอบแห้งได้แก่ 1, 2 และ 3 วัน ผลการวิเคราะห์ความชื้น และปริมาณแทนนิน แสดงในรูปที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ



รูปที่ 4.1 ปริมาณความชื้นของการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการอบแห้งกากกาแฟสด

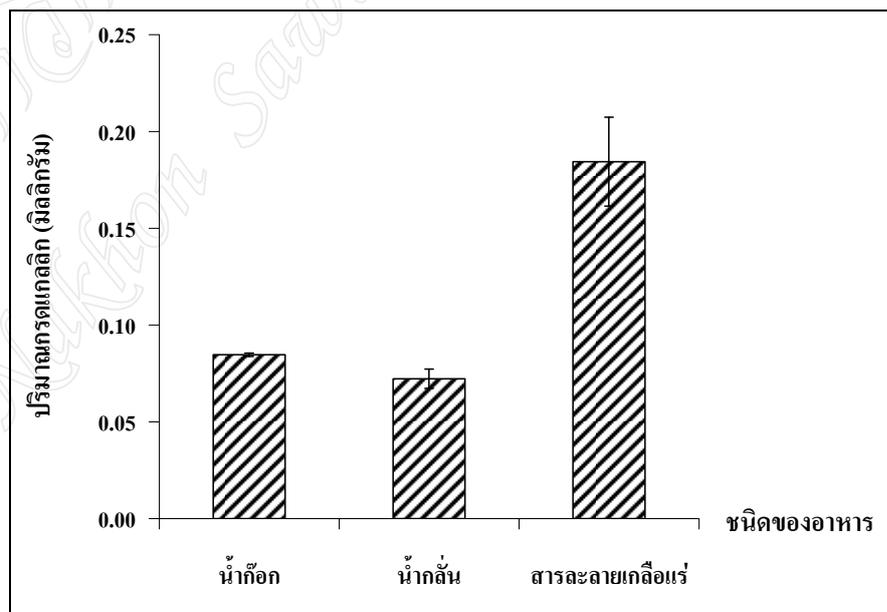


รูปที่ 4.2 ปริมาณแทนนินของการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการอบแห้งกากกาแฟสด

จากผลการทดลองพบว่า คุณหนุมิและระยะเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการอบแห้งกากกาแฟสด คือ 60 องศาเซลเซียส และ 1 วัน ตามลำดับ เนื่องจากปริมาณความชื้นมีปริมาณน้อยที่สุดและมีปริมาณแทนนินเหลืออยู่มากที่สุด ซึ่งจากงานวิจัยของ Harbourne และคณะ (2009) ได้รายงาน ว่า ปริมาณของสารฟีนอลิกใน meadowsweet และ willow จะมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ หากทำการอบแห้งพืชทั้งสองที่คุณหนุมิ 70 องศาเซลเซียส ถึงแม้ว่าจะทำให้ปริมาณความชื้นลดลงอย่างรวดเร็วก็ตาม ดังนั้น หากต้องการอบแห้งพืชดังกล่าวซึ่งมีสารฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบครอบที่ คุณหนุมิต่ำกว่า 70 องศาเซลเซียส และใช้ระยะเวลาอบให้น้อยลง จะช่วยทำให้รักษาปริมาณของสารฟีนอลิกในพืชได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่า ณ คุณหนุมิ 60 องศาเซลเซียส เกิดการสูญเสียปริมาณแทนนินซึ่งจัดเป็นสารประกอบฟีนอลิกชนิดหนึ่งน้อยมาก และจากรูปที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าการอบแห้งกากกาแฟระยะเวลาสั้น ก็จะทำให้สูญเสียแทนนินไปมากยิ่งขึ้น แต่ ณ เวลาที่ 0 วัน มีปริมาณแทนนินอยู่น้อย เนื่องจาก กากกาแฟเริ่มต้นยังมีความชื้นสูงมาก (รูปที่ 4.1) ดังนั้นกากกาแฟที่ซึ่งมาวิเคราะห์จึงมีปริมาณแทนนินอยู่น้อยแต่มีน้ำปนอยู่มากจึงทำให้เมื่อวิเคราะห์ปริมาณแทนนินแล้วจึงมีแทนนินอยู่น้อยนั่นเอง สำหรับที่คุณหนุมิอื่นนั้น แม้จะทำให้ปริมาณแทนนินสูญเสียไปน้อยแต่ความชื้นยังคงมีสูงกว่า ณ คุณหนุมิ 60 องศาเซลเซียส

#### 4.2 ศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแกลลิกจากกากกาแฟสด

จากการศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสม ได้แก่ สารละลายเกลือแร่ น้ำก๊อก และน้ำกลั่น ผลการทดลองพบว่า สารละลายเกลือแร่เป็นชนิดของอาหารที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตกรดแกลลิกจากกากกาแฟสด (รูปที่ 4.3)

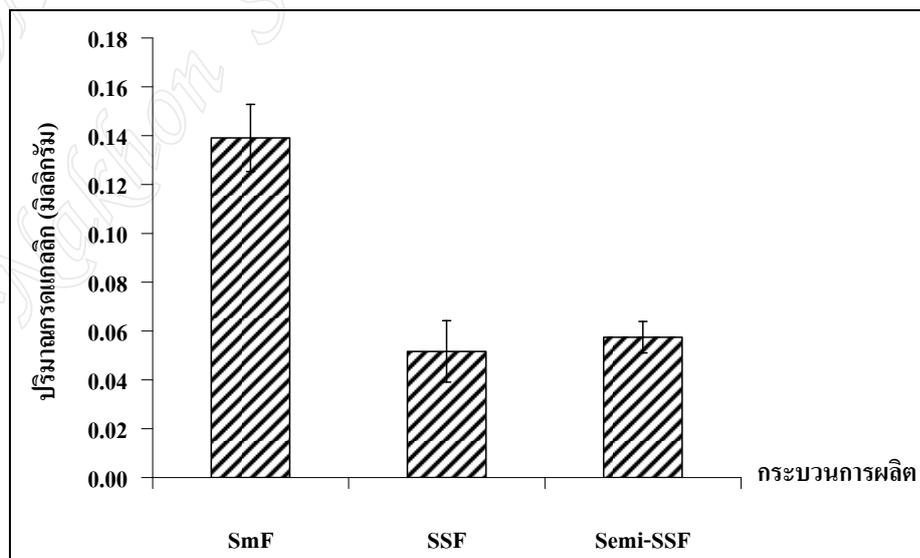


รูปที่ 4.3 ชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแกลลิกจากกากกาแฟสด

จากการที่สารละลายเกลือแร่เป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแกลลิกที่สูงสุดก็เนื่องมาจาก ธาตุที่เป็นองค์ประกอบในอาหารนั่นเอง โดยประกอบด้วย  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  และ  $\text{KCl}$  ซึ่งจะเห็นได้ว่าประกอบด้วยธาตุอาหารเสริมที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อเชื้อจุลินทรีย์เจริญได้ดีก็ย่อมจะมีการผลิตกรดแกลลิกได้ดีด้วยเช่นกัน แต่สำหรับน้ำก็อกจะมีธาตุเพียงแค่  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  และ  $\text{HCO}_3^-$  และน้ำกลั่นนั้นไม่มีธาตุใดเป็นองค์ประกอบเลย (Kumar และคณะ, 2007) แต่สาเหตุที่งานวิจัยนี้ได้เลือกน้ำก็อกและน้ำกลั่นมาศึกษาเปรียบเทียบก็เนื่องมาจาก ทั้งสองเป็นแหล่งอาหารที่หาได้ง่าย ราคาถูก และไม่ต้องใช้สารเคมีใดๆ เพิ่มเติมนั่นเอง และในบางรายงานการวิจัยพบว่า น้ำก็อกเป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสม แต่เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นคนละสายพันธุ์ (*A. ruber*) กับเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ (*A. oryzae*) ดังนั้น เชื้อจุลินทรีย์จึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้มีความต้องการของแร่ธาตุอาหารที่แตกต่างกันไป แต่อย่างไรก็ตาม สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในสารละลายเกลือแร่ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นนั้นก็มีราคาที่ไม่สูงนัก รวมถึงใช้ในปริมาณที่น้อยด้วย เพราะฉะนั้นสารละลายเกลือแร่จึงเป็นอีกแหล่งอาหารหนึ่งที่มีราคาถูก ถึงแม้จะน้อยกว่าน้ำประปาและน้ำกลั่นก็ตาม แต่ก็มีราคาถูกกว่าอาหารอื่นๆ ที่นิยมใช้ในการผลิตกรดแกลลิก อาทิ Czapek Dox's minimal medium ที่ประกอบด้วย  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  และ  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Bradoo และคณะ, 1996) เป็นต้น

#### 4.3 ศึกษากระบวนการผลิตกรดแกลลิกที่เหมาะสม

จากการศึกษากระบวนการผลิตกรดแกลลิก ได้แก่ การผลิตบนอาหารแข็ง (SSF) การผลิตในอาหารแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว (Semi-SSF) และการผลิตในอาหารเหลว (SmF) ผลการทดลองพบว่าผลิตในอาหารเหลวเป็นกระบวนการผลิตกรดแกลลิกจากกากกาแฟสดที่เหมาะสมที่สุด (รูปที่ 4.4)



รูปที่ 4.4 กระบวนการผลิตกรดแกลลิกที่เหมาะสม

จากผลการทดลองในห้องปฏิบัติการขณะที่ทำการผลิตกรดแลคติกโดยเปรียบเทียบทั้ง 3 กระบวนการดังกล่าว พบว่า กระบวนการผลิตแบบ SmF และ Semi-SSF เชื้อรา *A. oryzae* จะมีการเจริญอยู่โดยรอบเป็นวงกลมเกาะข้างพลาสติกเหนือผิวหน้าของอาหาร โดยสังเกตเห็นได้จากเกิดสปอร์สีเขียวของเชื้อดังกล่าวเกิดขึ้นโดยรอบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากมีการให้อากาศโดยการเขย่าด้วยแล้ว จะพบการเจริญของสปอร์ในปริมาณที่สูง ซึ่งตรงกันข้ามกับการผลิตกรดแลคติกโดยใช้กระบวนการ SSF ที่เชื้อราจะเจริญแค่เพียงผิวหน้าของกากกาแพที่มีอาหารผสมอยู่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น จึงอาจเป็นไปได้ว่าการที่มีเชื้อราเกาะอยู่ด้านข้างภายในพลาสติกเป็นวงกลมเปรียบเทียบกับกับการตรึงเซลล์หรือสปอร์ของเชื้อรา เมื่อมีการเขย่าอาหารที่มีกากกาแพผสมอยู่ กากกาแพก็จะไปสัมผัสกับเชื้อรา และเชื้อราก็จะย่อยสลายแทนนินในกากกาแพให้เป็นกรดแลคติกมากขึ้น พร้อมกันกับกากกาแพโดยส่วนใหญ่ที่ผสมอยู่ในอาหารจะสัมผัสกับเชื้อราได้สูง เพราะการเขย่าเป็นการช่วยเพิ่มอากาศและทำให้อาหารเกิดการหมุนเวียนหรือผสมกันได้ดีขึ้น ซึ่งหากเปรียบเทียบกับ SSF เชื้อราจะเจริญแค่เพียงผิวหน้าของกากกาแพ ไม่สามารถเข้าถึงภายในได้อย่างทั่วถึง เนื่องจาก กากกาแพที่มีอาหารอยู่เพียงเล็กน้อยไม่เกิดการผสมกันหรือเกิดการหมุนเวียนของกากกาแพภายในพลาสติก จึงทำให้ปริมาณของกากกาแพที่จะสัมผัสกับเชื้อราย่อมมีน้อย ส่งผลให้มีการย่อยสลายแทนนินในกากกาแพเป็นกรดแลคติกในปริมาณที่น้อยกว่านั่นเอง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Banerjee และคณะ (2007) ที่รายงานว่า การเขย่าอาหารจะช่วยทำให้สารอาหารเข้าไปในไมซีเลียมของเชื้อราได้ดี แต่ต้องใช้อัตราเร็วที่เหมาะสม เพราะหากสูงเกินไปจะทำให้อัตราการเจริญของเส้นใยไมซีเลียมลดลง เนื่องจากผนังเซลล์ของเส้นใยถูกทำลาย

แต่เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการระหว่างกระบวนการผลิตแบบ SmF และ Semi-SSF แล้วนั้นจะพบว่า ลักษณะของการเจริญของเชื้อราจะมีแตกต่างกันเล็กน้อยตรงที่ว่า ในกระบวนการ Semi-SSF จะมีเชื้อราที่เจริญทั้งภายในพลาสติกดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น พร้อมกับมีเชื้อราเจริญในกากกาแพที่อยู่ภายในอาหารด้วย ซึ่งส่งผลให้เกิดการจับตัวกันเป็นก้อนระหว่างเส้นใยของเชื้อรากับกากกาแพ และทำให้การที่เชื้อราจะสัมผัสกับกากกาแพที่อยู่ภายในก้อนนั้นมีน้อยลง อาจเป็นผลมาจากกระบวนการดังกล่าวเป็นแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว แม้จะมีการเขย่าด้วย แต่ปริมาณของอาหารที่เติมลงไปมีไม่มากพอที่จะช่วยในการละลายกากกาแพให้เป็นอนุภาคที่เล็กลงได้จึงทำให้ยังคงมีอนุภาคใหญ่ และสามารถจับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนได้นั่นเอง ซึ่งต่างจากกระบวนการ SmF ที่มีเฉพาะเชื้อราเป็นวงกลมเกาะรอบภายในพลาสติกเท่านั้น ไม่มีเชื้อราเจริญในอาหาร เนื่องจาก ปริมาณอาหารมีมากพอที่จะช่วยละลายกากกาแพให้มีอนุภาคที่เล็กลง และทำให้เชื้อราสามารถย่อยสลายให้เป็นกรดแลคติกได้ง่ายขึ้น เพราะฉะนั้น กระบวนการที่เหมาะสม

สำหรับการผลิตกรดแกลลิกจากกากกาแฟสดด้วยเชื้อรา *A. oryzae* สำหรับงานวิจัยนี้จึงเป็นกระบวนการหมักในอาหารเหลว หรือ SmF นั่นเอง

#### 4.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแกลลิก

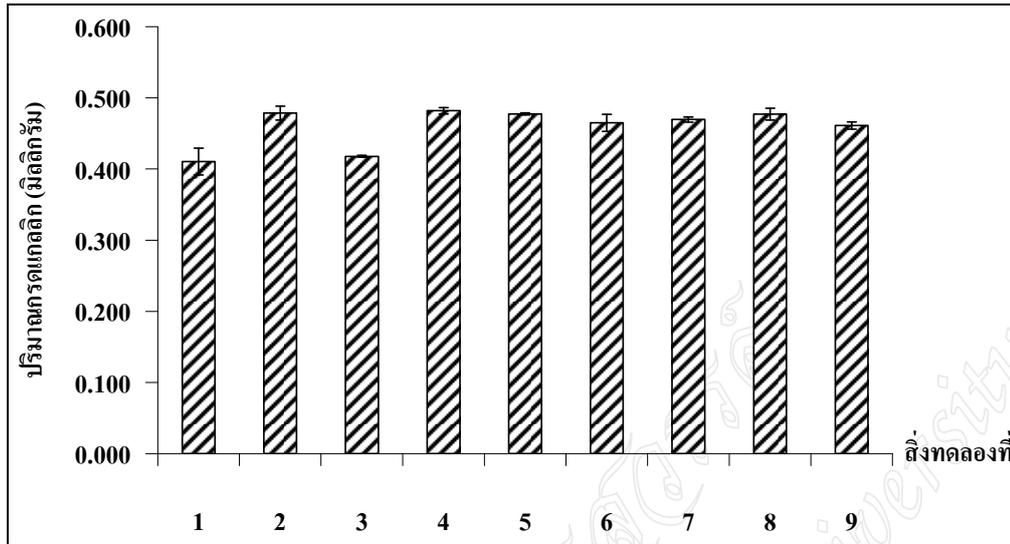
##### 4.4.1 ศึกษาค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตกรดแกลลิก

จากการศึกษาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตกรดแกลลิกโดยสร้างแผนการทดลองแบบ  $2^2$  Factorial ที่ทำการทดลองซ้ำที่จุดกึ่งกลาง พบว่า อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมคือ 35 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1, รูปที่ 4.5) เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากตารางที่ 4.1 ไปวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม Statistix software version 7 (ภาคผนวก ง) (Analytical Software, Inc., Tallahassee, FL, USA) สามารถสร้างสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ (X) และพีเอช (Y) ได้ดังสมการที่ 1

ตารางที่ 4.1 การศึกษาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตกรดแกลลิก

สิ่งทดลองที่	ปัจจัยที่ศึกษา		ปริมาณกรดแกลลิกที่เกิดขึ้น (มิลลิกรัม)
	พีเอช	อุณหภูมิ	
1	4.0	25	0.411 ± 0.019
2	4.0	35	0.478 ± 0.010
3	6.0	25	0.418 ± 0.001
4	6.0	35	0.482 ± 0.004
5	5.0	30	0.477 ± 0.001
6	5.0	5.0	0.465 ± 0.012
7	5.0	5.0	0.470 ± 0.004
8	5.0	5.0	0.477 ± 0.008
9	5.0	5.0	0.461 ± 0.005

$$\text{ปริมาณกรดแกลลิก (มิลลิกรัม)} = 0.46 + 0.033X + 0.0027Y \quad (1)$$



รูปที่ 4.5 อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตกรดแกดลิกโดยสร้างแผนการทดลองแบบ  $2^n$  Factorial ที่ทำการทดลองซ้ำที่จุดกึ่งกลาง

จากรายงานวิจัยส่วนใหญ่ พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์แทนเนส และกรดแกดลิกโดยเชื้อราจะอยู่ในช่วง 30 – 35 องศาเซลเซียส (Yamada และคณะ, 1968; Rajakumar และ Nandy, 1983; Barthomeuf และคณะ, 1994; Lekha และ Lonsane, 1997; Kar และ Banerjee, 2000; Mondal และคณะ, 2000; 2001; Ayed และ Hamdi, 2002; Belmares-Cerda และคณะ, 2003; Belmares และคณะ, 2004; Banerjee และคณะ, 2005; Sabu และคณะ, 2006) เนื่องจาก ช่วงอุณหภูมิดังกล่าวไม่ทำให้เอนไซม์แทนเนสที่ถูกผลิตขึ้นโดยเชื้อราถูกทำลาย รวมถึงเอนไซม์ไม่ถูกยับยั้งปฏิกิริยา เซลล์ของเชื้อราก็ไม่ถูกทำลายด้วย ตลอดจนอัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ก็เพิ่มสูงขึ้น เพราะอยู่ในอุณหภูมิที่เหมาะสม ซึ่งโดยส่วนใหญ่ปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเกิดได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส เมื่อเอนไซม์แทนเนสที่ถูกผลิตออกมามากเพราะอยู่ในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม พร้อมกับไม่ถูกทำลาย ก็ย่อมที่จะเกิดการย่อยสลายแทนนินในกากกาแฟสดให้เป็นกรดแกดลิกในปริมาณมากนั่นเอง (Ainsworth และ Sussman, 1965; Sabu และคณะ, 2006)

สำหรับค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์แทนเนสและกรดแกดลิกด้วยเชื้อราส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 4.0-6.0 เพราะหากพีเอชสูงกว่านี้จะทำให้แอกติวิตี้ของเอนไซม์แทนเนสลดลง เอนไซม์ก็จะทำงานได้น้อยลงทำให้ย่อยแทนนินให้เป็นกรดแกดลิกได้น้อยลงตามไปด้วย และช่วงพีเอชดังกล่าวเป็นช่วงพีเอชที่ค่อนข้างจะเป็นกรด ซึ่งเชื้อราส่วนใหญ่ที่คัดเลือกมาจะมา จากแหล่งที่ค่อนข้างจะเป็นกรดนั่นเอง จึงทำให้พีเอชที่เหมาะสมในการผลิตและการทำงานของเชื้อราอยู่ในช่วงดังกล่าว (Barthomeuf และคณะ, 1994; Hadi และคณะ, 1994; Bradoo และ

คณะ, 1996 ; Chatterjee และคณะ, 1996; Kar และ Banerjee, 2000; Belmares-Cerda และคณะ, 2003; Banerjee และคณะ, 2005)

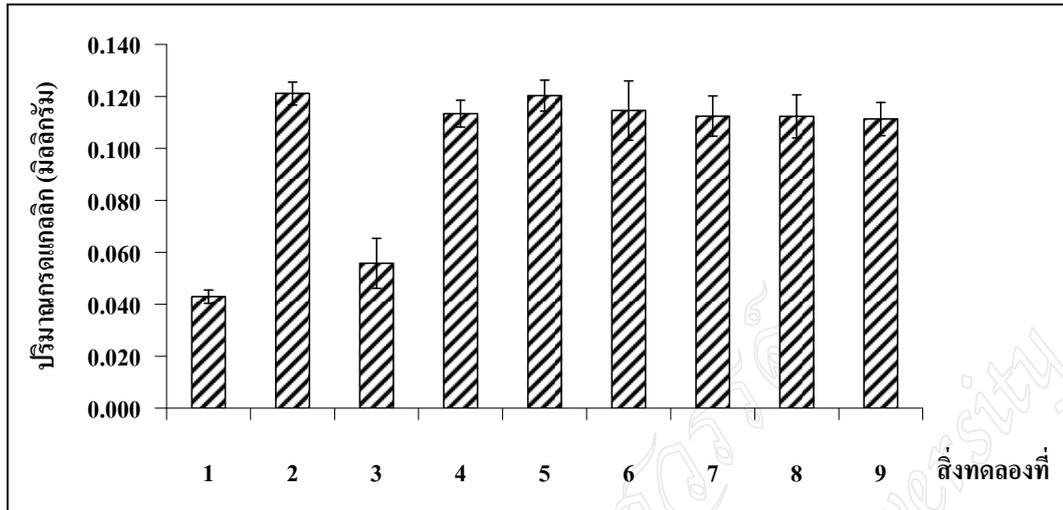
#### 4.4.2 ศึกษาอัตราส่วนของกากกาแฟสดอบแห้งต่อปริมาณของอาหาร และความเร็วในการเขย่าที่เหมาะสมในการผลิตกรดแกลลิก

จากการศึกษาอัตราส่วนของกากกาแฟสดอบแห้ง (กรัม) ต่อปริมาณอาหาร (มิลลิลิตร) ที่เหมาะสมในการผลิตกรดแกลลิกโดยสร้างแผนการทดลองแบบ  $2^n$  Factorial ที่ทำการทดลองซ้ำที่จุดกึ่งกลาง พบว่า อัตราส่วนของกากกาแฟสดอบแห้ง (กรัม) ต่อปริมาณอาหาร (มิลลิลิตร) ที่เหมาะสม คือ 5 : 60 และ 160 rpm ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2, รูปที่ 4.6) เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากตารางที่ 4.2 ไปวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม Statistix software version 7 (ภาคผนวก ง) (Analytical Software, Inc., Tallahassee, FL, USA) สามารถสร้างสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของกากกาแฟสดอบแห้ง (X) ต่อปริมาณอาหาร (Y) ได้ดังสมการที่ 2

ตารางที่ 4.2 การศึกษาอัตราส่วนของกากกาแฟสดอบแห้งต่อปริมาณของอาหารที่เหมาะสม และความเร็วในการเขย่าที่เหมาะสมในการผลิตกรดแกลลิก

สิ่งทดลองที่	ปัจจัยที่ศึกษา		ปริมาณกรดแกลลิกที่เกิดขึ้น (มิลลิกรัม)
	อัตราส่วน	ความเร็วในการเขย่า (rpm)	
1	5 : 60	80	0.043 ± 0.003
2	5 : 60	160	0.121 ± 0.004
3	5 : 100	80	0.056 ± 0.010
4	5 : 100	160	0.113 ± 0.005
5	5 : 80	120	0.120 ± 0.006
6	5 : 80	120	0.115 ± 0.011
7	5 : 80	120	0.112 ± 0.008
8	5 : 80	120	0.112 ± 0.008
9	5 : 80	120	0.111 ± 0.006

$$\text{ปริมาณกรดแกลลิก (มิลลิกรัม)} = 0.094 + 0.015X + 0.019Y \quad (2)$$



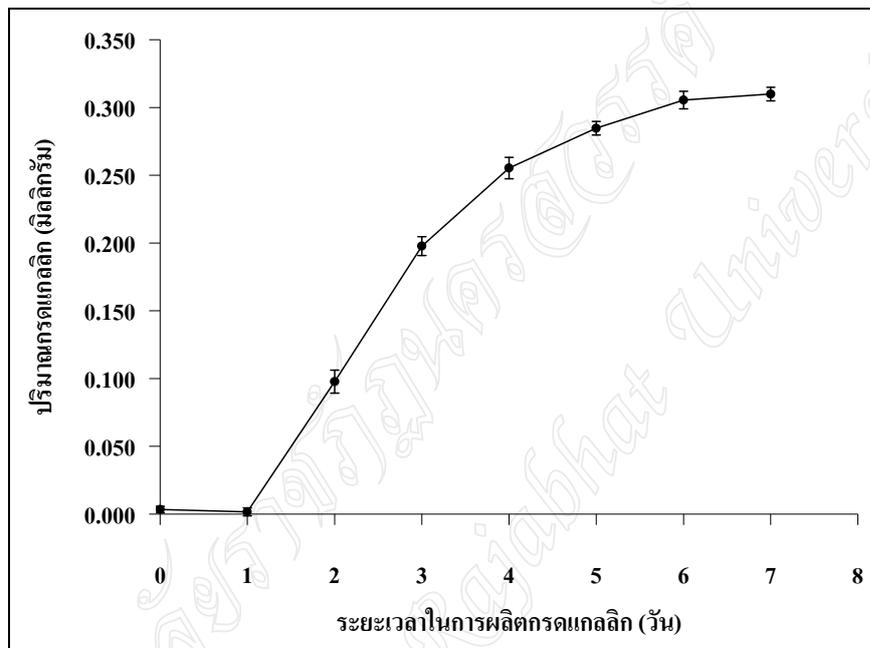
**รูปที่ 4.6** อัตราส่วนของกากกาแฟสดอบแห้งต่อปริมาตรของอาหารและความเร็วในการเขย่าที่เหมาะสมโดยสร้างแผนการทดลองแบบ  $2^n$  Factorial ที่ทำการทดลองซ้ำที่จุดกึ่งกลาง

จากผลการทดลองการหาอัตราส่วนกาแฟสดอบแห้งต่อปริมาตรของอาหารที่เหมาะสมนั้นเกี่ยวข้องกับระดับของความชื้น โดยจะส่งผลโดยตรงต่อการเจริญของเชื้อราและการผลิตเอโนไซม์ หากระดับความชื้นต่ำเกินไปก็จะส่งผลให้การเจริญของเชื้อราและการสร้างผลผลิตออกมาได้น้อย เพราะความชื้นเกี่ยวข้องกับการแพร่ผ่านของสารอาหารเข้าสู่เซลล์ รวมถึงการแพร่ผ่านของแก๊ส และสารอื่นๆ ที่ละลายน้ำได้ หากความชื้นต่ำการแพร่ผ่านของสารต่างๆ ย่อมเกิดได้น้อย เชื้อราก็เจริญได้ไม่ดีส่งผลให้สร้างผลผลิตออกมาได้ต่ำนั่นเอง แต่ในทางตรงกันข้ามหากความชื้นสูงเกินไปจะทำให้สารตั้งต้นมีลักษณะเป็นรูปพรุณลดลง ออกซิเจนก็เข้าไปในอาหารได้น้อย ดังนั้นกระบวนการต่างๆ ก็จะหยุดชะงักลงในที่สุด (Pandey และคณะ, 1999) โดยเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ย่อมมีความต้องการระดับความชื้นที่แตกต่างกันไป

สำหรับความเร็วในการเขย่านั้นส่งผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า อัตราเร็วในการเขย่าที่เหมาะสมที่สุดคือ 160 rpm สำหรับอาหาร 60 มิลลิลิตร ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 ซึ่งเป็นความเร็วสูงที่สุดสำหรับแผนการทดลองที่ได้ออกแบบไว้ แสดงว่าเชื้อ *A. oryzae* มีผนังเซลล์ของเส้นใยไมซีเลียมที่ค่อนข้างแข็งแรง จึงจำเป็นต้องใช้ความเร็วในการเขย่าที่สูง เพื่อให้สารอาหาร ออกซิเจน และสารอื่นๆ แพร่ผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ โดยจะเห็นได้ชัดเจนจากสิ่งทดลองที่ 2 ในตารางที่ 4.2 ว่าที่อัตราเร็ว 80 rpm มีการผลิตกรดแกแลคติกในปริมาณที่ต่ำมาก ดังนั้น อัตราเร็วในการเขย่าจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการแพร่ผ่านของสารอาหาร ออกซิเจน และสารอื่นๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อรานั่นเอง (Purwanto และคณะ, 2009)

#### 4.4.3 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตกรดแกลลิก

จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตกรดแกลลิก โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมทั้งหมดที่ได้ศึกษามาก่อนหน้านี้ทั้งหมด พบว่า กรดแกลลิกเริ่มมีการผลิตตั้งแต่วันที่ 2 เป็นต้นไป และเริ่มจะคงที่ในวันที่ 4 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกวันที่ 4 เป็นระยะเวลาการผลิตที่เหมาะสม เพราะเป็นระยะเวลาที่ไม่ยาวนานเกินไป และได้ผลผลิตในปริมาณที่ค่อนข้างสูง (รูปที่ 4.7)

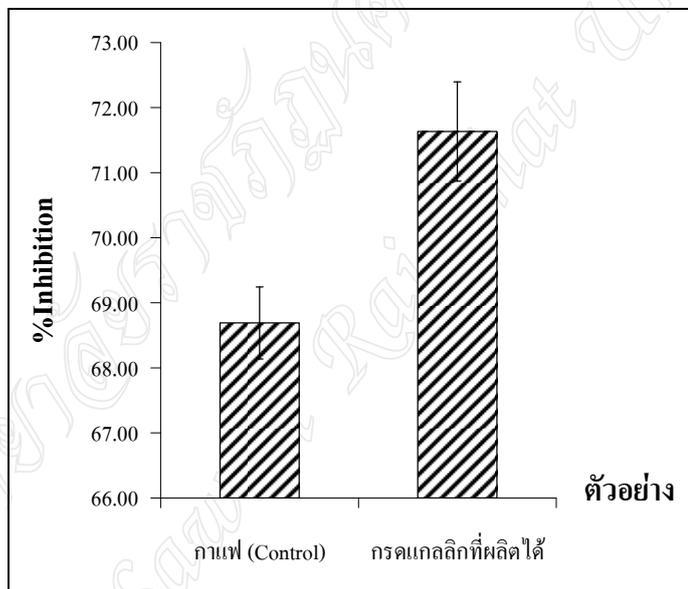


รูปที่ 4.7 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตกรดแกลลิก

จากผลการวิจัยดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Duangban (2007) ที่พบว่า เอนไซม์แทนเนสเริ่มมีการผลิตที่ชั่วโมงที่ 12 และเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยสูงสุดที่ 156 ชั่วโมง หรือ 6.5 วันนั่นเอง จากนั้นก็จะเริ่มคงที่ไปเรื่อยๆ เพราะแอกติวิตี้ของเอนไซม์เริ่มถูกยับยั้ง หรือทำงานได้น้อยลง เนื่องจาก Product Inhibition (Gautam และคณะ, 2002) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นที่ว่ากรดแกลลิกจะเริ่มผลิตในวันที่ 1 (24 ชั่วโมง) และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากนั้นก็จะเริ่มคงที่ เพราะกรดแกลลิกเป็นผลผลิตมาจากการทำงานของเอนไซม์แทนเนสที่ถูกผลิตขึ้นโดยเชื้อ *A. oryzae* โดยเอนไซม์จะย่อยสลายแทนนินในกากกาแฟให้เป็นผลผลิตที่ต้องการ เมื่อแอกติวิตี้ของเอนไซม์ถูกจำกัด ก็จะทำให้ปริมาณกรดแกลลิกเริ่มคงที่ และจะลดลงในที่สุด

#### 4.5 ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระกรดแกลลิก

จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถของตัวอย่างในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH โดยได้ศึกษาร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของกรดแกลลิกที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับกากกาแฟสดที่ไม่มีการเติมเชื้อ (control) พบว่า กรดแกลลิกที่ผลิตได้และกากกาแฟสดมีร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 71.63 และ 68.69 ตามลำดับ (รูปที่ 4.8) โดยกลไกการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารพวกฟีนอลเกิดจากการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH จากเดิมที่ DPPH ในสารละลายมีสีม่วง เมื่อสารจำพวกฟีนอลให้อิเล็กตรอนจะได้เป็นสาร DPPH ที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระซึ่งจะเห็นเป็นสีเหลืองนวล ส่วน phenoxy radical ที่เกิดขึ้นจะจับกันทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระหมดไป (Amic และคณะ, 2003)



รูปที่ 4.8 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของกรดแกลลิกที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับกากกาแฟสดที่ไม่ได้เติมเชื้อรา (control)

โดยจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่ากากกาแฟสดมีร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระน้อยกว่ากรดแกลลิกที่ผลิตได้ ซึ่งจากงานวิจัยของ Naidu และคณะ (No date) พบว่าเมล็ดกาแฟสดอาราบิก้ามีร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระถึง 92 แต่ในกากกาแฟที่ใช้ในงานวิจัยเป็นกาแฟสดที่ผ่านการคั่วบด พร้อมกับผ่านน้ำร้อนมาแล้วจึงทำให้กรดคลอโรเจนิคซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในกาแฟลดลงไปนั่นเอง สำหรับกรดแกลลิกที่ผลิตได้แม้มีร้อยละของการยับยั้งสูงกว่ากากกาแฟ แต่ก็ไม่สามารถยืนยันได้ชัดเจนว่าร้อยละดังกล่าวเป็นความสามารถที่แท้จริงของเฉพาะกรดแกลลิก เนื่องจากยังคงมีสารอื่นปนเปื้อนอยู่ ดังนั้นหากต้องการทราบความสามารถที่แท้จริงของกรดแกลลิกที่ผลิตได้จึงควรมีการแยกและทำบริสุทธิ์กรดแกลลิกที่ผลิตได้ในอันดับต่อไป