วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 26 (ฉบับที่ 1) มกราคม – เมษายน พ.ศ. 2564
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 26 (No.1) January – April 2021 บทความวิจัย

การศึกษาสภาวะการสกัดกรดคลอโรจีนิกที่เหมาะสมจากผลเชอร์รีกาแฟเขียว โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบเร่งด่วน

Optimization of Chlorogenic Acid Extraction Condition from Green Coffee Cherry Using Accelerated Solvent Extraction

อัญชลิสา จิตตะลม[1] และ เอกสิทธิ์ จงเจริญรักษ์[2*]

Anchalisa Jittalom[1] and Akkasit Jongjareonrak[2*]

[1]*สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*

[2]*สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*

[1]*Division of Food Science and Technology, Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University*

[2]*Division of Food Engineering, Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University*

Received : 2 July 2020

Revised : 29 July 2020

Accepted : 31 July 2020

บทคัดย่อ

ผลเชอร์รีกาแฟเขียวเป็นวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมผลิตกาแฟซึ่งอุดมไปด้วยกรดคลอโรจีนิก (Chlorogenic acid, CGA) ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถยับยั้งแบคทีเรียและกิจกรรมการต้านออกซิเดชันได้ การนำผลเชอร์รีกาแฟเขียวมาสกัด CGA จึงเป็นแนวทางการใช้ประโยชน์ และเพิ่มมูลค่าจากวัสดุเศษเหลือได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด CGA จากผลเชอร์รีกาแฟเขียวโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบเร่งด่วน (Accelerated solvent extraction, ASE) จากการศึกษาสภาวะการสกัด CGA โดย ASE จากผลเชอร์รีกาแฟเขียวโดยแปรผันความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอล (ร้อยละ 50 60 และ 70) และอุณหภูมิในการสกัด (90 120 และ 150 องศาเซลเซียส) พบว่าการสกัดผลเชอร์รีกาแฟเขียวโดย ASE ด้วยเอทานอลร้อยละ 70 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณ CGA สูงที่สุด ภายหลังการทำบริสุทธิ์สารสกัดผลเชอร์รีกาแฟเขียวบางส่วน (Partial purified green coffee cherry extract, PGCE) พบว่ามีร้อยละผลผลิตของสารสกัด PGCE เท่ากับ 4.28 ต่อน้ำหนักผลเชอร์รีกาแฟเขียวอบแห้ง โดยสารสกัด PGCE ที่ได้ประกอบด้วย ปริมาณ CGA เท่ากับ 72.52 g CGAE/100g PGCE ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 90.67 g CGAE/100g PGCE กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และกิจกรรม FRAP เท่ากับ 3430.78 3515.30 และ 3534.55 μmol TE/g PGCE ตามลำดับ การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัด PGCE พบว่าสามารถยับยั้ง *Escherichia coli Vibrio parahaemolyticus Salmonella typhimurium* และ *Staphylococcus aureus* ได้ ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้ ASE ด้วยสภาวะที่เหมาะสมสามารถสกัด CGA จากผลเชอร์รีกาแฟเขียวได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสารสกัด PGCE เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทางเลือกที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และยับยั้งแบคทีเรียได้

คำสำคัญ : กรดคลอโรจีนิก ; ผลเชอร์รีกาแฟเขียว ; การสกัดด้วยตัวทำละลายแบบเร่งด่วน ; กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน ; กิจกรรมการต้านแบคทีเรีย

Abstract

Green coffee cherry, a by-product from coffee production industry, is a rich source of chlorogenic acid (CGA) which is a bioactive compound with antibacterial and antioxidant activities. Using of green coffee cherry for CGA extraction is therefore a guideline for utilizing and value-adding of this by-product. This study aims to investigate the optimal condition for CGA extraction from green coffee cherry by using accelerated solvent extraction (ASE). Extraction of CGA from green coffee cherry using ASE by varying ethanol concentrations (50, 60 and 70%) and extraction temperatures (90, 120 and 150 °C) found that extraction of green coffee cherry using ASE with 70% ethanol and extraction temperature of 90 °C gave the highest CGA content. After the partial purified of green coffee cherry extract (PGCE), the yield of PGCE was observed at 4.51% of dried green coffee cherry. The PGCE contained CGA content of 72.04 g CGAE/100g PGCE, total phenolic content of 89.23 g CGAE/100g PGCE and exhibited DPPH- and ABTS-radical scavenging activities and FRAP at 3412.77, 3493.92 and 3530.69 μmol TE/g PGCE, respectively. The antibacterial activity analysis of PGCE found that *Escherichia coli, Vibrio parahaemolyticus, Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* were inhibited by PGCE. These results suggested that using of ASE with optimum condition could effectively extract CGA from green coffee cherry. The PGCE obtained was an alternative bioactive compound with antioxidant and antibacterial activities.

Keywords : chlorogenic acid ; green coffee cherry ; accelerated solvent extraction ; antioxidant activities ; antibacterial activities

***Corresponding author. E-mail :** jakkasit@gmail.com

บทนำ

กรดคลอโรจีนิก (Chlorogenic acid, CGA) เป็นสารประกอบฟีนอลิกในพืชที่ได้จากปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันระหว่างกรดทรานซินนามิก (trans-cinnamic acids) ได้แก่ กรดคาเฟอิก (caffeic acid) กรดเฟอรูลิก (ferulic acid) และกรดพาราคูมาริก (*p*-coumaric acid) กับกรดควินิก ((-)-quinic acid) (Clifford *et al*., 2003; Farah & Ferreira dos Santos, 2015) ซึ่งพืชที่มี CGA มากที่สุด คือกาแฟ (Oestreich-Janzen, 2013) กรดคลอโรจีนิกเป็นสารที่ให้รสขม และฝาดในเมล็ดกาแฟ (Farah *et al*., 2005) กรดคลอโรจีนิกมีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ เช่น ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ต้านมะเร็ง (antineoplastic) ฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial) และมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ (Farah, 2012 ; Kabir *et al*., 2014)

กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์กาแฟมักมีวัสดุเศษเหลือในกระบวนการผลิต ได้แก่ เนื้อผลกาแฟร้อยละ 55 ของผลสด และเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟร้อยละ 29 ของผลสด (Ploypradub *et. al*., 2010) ซึ่งผลเชอร์รีกาแฟเขียวเป็นวัสดุเศษเหลือหลังจากการคัดคุณภาพกาแฟที่มักมีการปะปนมากับผลเชอร์รีกาแฟที่สุกแล้วร้อยละ 5 ถึง 10 ซึ่งผลเชอร์รีกาแฟเขียวไม่สามารถนำไปแปรรูปได้เนื่องจากระยะเวลาการเก็บเกี่ยวไม่เหมาะสม หากนำไปแปรรูปจะได้เป็นกาแฟตกเกรดที่มีมูลค่าต่ำและไม่มีคุณภาพซึ่งอาจไม่คุ้มค่าในการแปรรูป ซึ่งนอกเหนือจากเมล็ดกาแฟเขียวที่อุดมไปด้วย CGA ส่วนประกอบของผลเชอร์รีกาแฟอื่น ๆ ยังมี CGA เป็นสารประกอบหลักเช่นกัน กาแฟพันธุ์อาราบิกา (*Coffea arabica* L.) เป็นกาแฟสายพันธุ์ที่ปลูกมากในเขตภาคเหนือ (ARDA, 2020) ปริมาณ CGA ในเมล็ดกาแฟพันธุ์อาราบิกาพบร้อยละ 4.1 ถึง 7.9 ต่อน้ำหนักแห้ง (Farah & Donangelo, 2006) ส่วนประกอบอื่น ๆ ของผลเชอร์รีกาแฟพันธุ์อาราบิกา ได้แก่ เนื้อผลกาแฟ (Coffee pulp) เปลือกผลสด (Cherry husk) และเยื่อหุ้มเมล็ด (Silver skin) มีปริมาณ CGA ร้อยละ 2.40 2.50 และ 3.00 ต่อน้ำหนักแห้ง (Murthy & Naidu, 2012) จะเห็นว่าส่วนประกอบทุกส่วนของผลเชอร์รีกาแฟอุดมไปด้วย CGA ดังนั้นการนำผลเชอร์รีกาแฟเขียวมาใช้ในการสกัด CGA จึงเป็นวิธีหนึ่งที่นำผลเชอร์รีกาแฟเขียวกลับมาใช้ประโยชน์เพื่อลดวัสดุเศษเหลือจากการคัดคุณภาพเมล็ดกาแฟ

การสกัดด้วยตัวทำละลายแบบเร่งด่วน (Accelerated solvent extraction, ASE) คือกระบวนการสกัดของแข็งของเหลว (Solid-liquid extraction) ที่อุณหภูมิสูง (50 ถึง 200 องศาเซลเซียส) และความดันสูง (10 ถึง 15 เมกะปาสคาล) แบบอัตโนมัติโดยใช้เครื่องสกัด ASE ใช้ระยะเวลาในการสกัดทั้งหมด 15 ถึง 25 นาที การสกัดภายใต้การใช้อุณหภูมิและความดันสูง เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด เนื่องจากการใช้อุณหภูมิสูงเป็นการเพิ่มสมรรถนะในการทำละลายของ ตัวทำละลาย เพิ่มอัตราการแพร่กระจายของตัวทำละลาย ทำให้ตัวทำละลายเคลื่อนย้ายรวดเร็วขึ้นจากบริเวณชั้นนอกสู่พื้นผิวของตัวอย่าง และการสกัดภายใต้ความดันสูงยังช่วยให้กระบวนการสกัดเร็วขึ้น ซึ่งความดันช่วยรักษาสถานะของตัวทำละลายขณะที่อุณหภูมิการสกัดมากกว่าจุดเดือดของตัวทำละลาย ระหว่างกระบวนการสกัดเมื่อความดันสูงสามารถปั๊มตัวทำละลายผ่านเซลล์ที่บรรจุตัวอย่างง่ายขึ้น แรงดันจะบังคับตัวทำละลายให้เข้าไปในรูพรุนของตัวอย่าง ส่งผลให้ตัวทำละลายสัมผัสกับสารที่ต้องการสกัดภายในเซลล์สกัดมากขึ้น (Mottaleb & Sarker, 2012) การสกัดโดย ASE เป็นการสกัดที่ลดการใช้ปริมาณตัวทำละลาย และระยะเวลาในการสกัด เมื่อเทียบกับวิธีการสกัดของแข็ง-ของเหลวอื่น ๆ ที่นิยมใช้ ได้แก่ การสกัดด้วยซอกเลต (Soxhlet extraction) และการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ (Microwave-assisted

extraction) (Moldoveanu & David, 2016) ปัจจุบันการสกัดโดย ASE เป็นเทคนิคที่น่าสนใจ และเป็นทางเลือกสำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากของแข็งของพืช วัตถุดิบชีวภาพ และการประยุกต์ใช้ในอาหาร ประโยชน์ของการสกัดโดย ASE คือ ได้ปริมาณการสกัดต่อครั้งสูง สกัดได้อัตโนมัติ ใช้ตัวทำละลายในการสกัดต่ำ และรวดเร็ว เทคนิคการสกัดนี้จึงมีความสำคัญสำหรับการวิเคราะห์ และเตรียมตัวอย่างมาก (Sun *et al*., 2012) Herrero *et al.* (2005) ศึกษาการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่ายสไปรูลินาโดย ASE พบว่าเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสม ให้ปริมาณผลผลิตที่สูง และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระปานกลาง นอกจากนี้ Barros *et al.* (2013) ทำการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากรำข้าวฟ่างโดยวิธี ASE เปรียบเทียบกับการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม โดยใช้ตัวทำละลายเป็นเอทานอลกับน้ำ (อัตราส่วน 50 ต่อ 50 และ 70 ต่อ 30) กรดซิตริกกับน้ำ และน้ำ พบว่าการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลกับน้ำทั้งสองอัตราส่วนโดยวิธี ASE ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด การเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชจำเป็นต้องทราบถึงคุณสมบัติของตัวทำละลาย โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพืชมักถูกละลายได้ดีด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วใกล้เคียงกัน โดยอาศัยหลักการ like dissolve like (Neelapong *et al*., 2018) ซึ่งตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ เอทิลอะซิเตท (Neelapong *et al*., 2018) เอทานอล และเมทานอล (Pandey & Tripathi, 2014) ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิก คือ เอทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีความปลอดภัย ราคาไม่แพง จึงเหมาะสมในการนำมาสกัดผลเชอร์รีกาแฟเขียว การทำบริสุทธิ์โดยการสกัดแบบปกติโดยใช้ตัวทำละลายเป็นการสกัดด้วยเครื่องเขย่า หรือเครื่องกวนสาร หรือการแยกสารละลายโดยใช้กรวยแยก และอาศัยการแยกชั้นของตัวทำละลายโดยอาศัยความแตกต่างของความหนาแน่นของสารละลายกับตัวทำละลายที่ถูกนำมาใช้แยก โดยกรดคลอโรจีนิกจากสารสกัดจากพืชมักใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการทำบริสุทธิ์ ได้แก่ ปิโตรเลียมอีเทอร์ เอทิลอะซิเตท คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน เอทานอล และอื่น ๆ (Azevedo *et al*., 2007; Memon *et al*., 2010)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะสกัดที่เหมาะสมสำหรับสกัดกรดคลอโรจีนิกจากผลเชอร์รีกาแฟเขียวโดย ASE ทำการแปรผันความเข้มข้นของเอทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลาย และอุณหภูมิในการสกัดที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ร้อยละผลผลิต ปริมาณ CGA ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และกิจกรรมการต้านออกซิเดชันในสารสกัด PGCE สูงที่สุด และศึกษากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย ซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางในการสกัดกรดคลอโรจีนิกจากผลเชอร์รีกาแฟเขียวเพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิตกาแฟ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เภสัชกรรม และเครื่องสำอางต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมผลเชอร์รีกาแฟเขียว

ผลเชอร์รีกาแฟเขียว (Green Coffee Cherry) พันธุ์อาราบิกา (*Coffea arabica* L.) ซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากบริษัท ฮิลล์คอฟฟ์ จำกัด จังหวัดเชียงใหม่ นำมาอบแห้งด้วยตู้อบแห้งแบบลมร้อน (Hot air oven, Bind, ED 53, vacuum pump V_700, Germany) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมีความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 10 (ภาพที่ 1) นำไปบดให้ละเอียด

มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 0.60 มิลลิเมตร (ภาพที่ 2) จากนั้นจึงบรรจุในถุงฟอยล์แล้วปิดผนึกแบบสุญญากาศ เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการทดลองต่อไป

ภาพที่ 1 ผลเซอร์รีกาแฟเขียวอบแห้ง

ภาพที่ 2 ผลเซอร์รีกาแฟเขียวอบแห้งบดละเอียด

2. การศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของผลเซอร์รีกาแฟเขียว

นำผลเซอร์รีกาแฟเขียวอบแห้งบดละเอียด วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า และคาร์โบไฮเดรต ตามวิธีมาตรฐาน AOAC (2012) ปริมาณกรดคลอโรจีนิก (Chlorogenic acid content, CGA) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content, TPC) และกิจกรรมการต้านออกซิเดชันซึ่งทดสอบด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP

3. การศึกษาสภาวะการสกัดผลเซอร์รีกาแฟเขียวโดย ASE

การศึกษาสภาวะการสกัดผลเซอร์รีกาแฟเขียวโดย ASE โดยทำการศึกษาปัจจัยของการสกัดจำนวน 2 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับ ได้แก่ ความเข้มข้นของเอทานอล (ร้อยละ 50 60 และ 70) และอุณหภูมิในการสกัด (90 120 และ 150 องศาเซลเซียส) ทำการสกัดด้วยเครื่องสกัด ASE รุ่น Dionex™ ASE™ 350 (Thermo Fisher Scientific, USA) ที่ความดัน 10.34 เมกะปาสคาล โดยผสมผลเซอร์รีกาแฟอบแห้งบดละเอียดกับทรายสกัด (อัตราส่วน 4 ต่อ 1) บรรจุลงในเซลล์สกัดขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 50 กรัม กำหนดสภาวะการสกัดตามวิธีของ Barros *et al.* (2013) ใช้ระยะเวลาในการสกัดทั้งหมดต่อ 1 เซลล์สกัด 20 นาที เมื่อทำการสกัดเสร็จนำสารละลายที่สกัดได้ไปเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge, Velocity 18R, Dinamica, UK) ที่ 4032 ×g เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสไปกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman™ Grade 4 filter paper, GE Healthcare, UK) แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนเหวี่ยง (Rocket synergy evaporator, SP. Scientific, UK) ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้สารสกัดหยาบเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการทดลองต่อไป

นำสารสกัดหยาบอบแห้งที่ได้มาทำบริสุทธิ์บางส่วน โดยดัดแปลงวิธีของ Ky *et al.* (1997) และ Naidu *et al.* (2008) คือ ละลายสารสกัดหยาบด้วยน้ำกลั่น เติมแอมโมเนียมซัลเฟตจำนวนร้อยละ 2 ต่อปริมาตรทั้งหมด ตั้งทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกตะกอนที่ 4032 ×g เป็นเวลา 15 นาที เติมกรดฟอสฟอริกลงในสารละลายส่วนใสร้อยละ 4 ต่อปริมาตรทั้งหมด เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 1.5 เท่า ของปริมาตรสารละลายสกัด นำไปสกัดบน

เครื่องกวนสารละลาย (V. go stirring hot plate, SP131320-33-v, China) เป็นเวลา 30 นาที เก็บชั้นสารละลายสารสกัดแล้วทำการสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์อีกครั้ง จากนั้นแยกชั้นสารละลายสารสกัดมาล้างด้วยคลอโรฟอร์มปริมาตร 1.5 เท่า แยกชั้นสารละลายสารสกัดมาล้างด้วยเอทิลอะซิเตทปริมาตรเท่ากับปริมาตรสารละลายสกัดด้วยกรวยแยก เก็บชั้นเอทิลอะซิเตทไว้ในขวดสีชา แล้วนำชั้นน้ำมาทำการล้างด้วยเอทิลอะซิเตทอีก 3 ครั้ง และนำชั้นอะซิเตทมาระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนเหวี่ยงอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้สารสกัดผลเชอร์รีกาแฟเขียวที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน (Partial purified green coffee cherry extract, PGCE) เป็นผงสีขาวเหลือง เก็บรักษาในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการทดลองต่อไป

นำสารสกัด PGCE ไปวิเคราะห์และคำนวณหาร้อยละผลผลิตของสารสกัด PGCE โดยคำนวณจากน้ำหนักของสารสกัด PGCE ที่สกัดได้เปรียบเทียบกับน้ำหนักของผลเชอร์รีกาแฟเขียวอบแห้งบดละเอียดที่ใช้เริ่มต้น วิเคราะห์ปริมาณ CGA ปริมาณ TPC กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และกิจกรรม FRAP และวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดที่ให้ร้อยละผลผลิต ปริมาณ CGA ปริมาณ TPC และกิจกรรมการต้านออกซิเดชันที่สูงที่สุดด้วยโปรแกรม Minitab Version 16 (Minitab Pty Ltd., Sydney, Australia) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แล้วนำสภาวะการสกัดที่เหมาะสมที่ได้จากการประมวลผลทางสถิติที่ให้ค่าการทำนายสูงที่สุด (Prediction value) ไปใช้เพื่อทำการศึกษาสกัดจริง แล้วนำค่าการวิเคราะห์ยืนยัน (Verified value) ที่ได้ มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับค่าการทำนาย และนำสารสกัด PGCE ที่สกัดด้วยสภาวะที่คัดเลือกไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย

4. การวิเคราะห์ปริมาณกรดคลอโรจีนิก

นำสารสกัด PGCE มาวิเคราะห์หาปริมาณกรดคลอโรจีนิก ด้วยวิธีมาตรฐาน AOAC (2012) ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer, Specord ® 50 plus UV-Vis, Analytik-jena, Germany) และคำนวณหาปริมาณ CGA จากกราฟมาตรฐานของกรดคลอโรจีนิก (Chlorogenic acid equivalent : CGAE) ในรูปกรัมสมมูลของกรดคลอโรจีนิกต่อน้ำหนักแห้งสารสกัด PGCE 100 กรัม (g CGAE/100g PGCE)

5. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

นำสารสกัด PGCE มาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) ด้วยวิธีของ Murthy & Naidu (2012) ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate reader, Spectea Max ® i3x, Moleculardevices, USA) และคำนวณหาปริมาณ TPC จากกราฟมาตรฐานของกรดคลอโรจีนิก (Chlorogenic acid equivalent : CGAE) ในรูปกรัมสมมูลของกรดคลอโรจีนิกต่อน้ำหนักแห้งสารสกัด PGCE 100 กรัม (g CGAE/100g PGCE)

6. การวิเคราะห์กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน

นำสารสกัด PGCE มาวิเคราะห์หากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ตามวิธีของ Huang *et al*. (2005) อนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ตามวิธีของ Marcucci *et al*. (2017) และกิจกรรม Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ตามวิธีของ Vignoli *et al*. (2011) อ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate reader, Spectea Max ® i3x, Molecular devices, USA) และคำนวณหาการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และกิจกรรม FRAP

โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ (Trolox equivalent : TE) รายงานผลในรูปไมโครโมลสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้งสารสกัด PGCE (μmol TE/g PGCE)

7. การวิเคราะห์กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย

นำสารสกัด PGCE จากสภาวะสกัดที่เหมาะสมมาวิเคราะห์หากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* (TISTR 527) *Vibrio parahaemolyticus* (TISTR 1596) *Salmonella enterica subsp. Enterica serovar. Typhimurium* (TISTR 2519) และ *Staphylococcus aureus* (TISTR 2329) ด้วยวิธี Agar disc diffusion ตามวิธีของ Suárez-Quiroz *et al.* (2013) โดยใช้ buvard paper discs ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อชุบสารละลายสารสกัด PGCE ความเข้มข้น 1.50 และ 2.25 mg/disc (ละลายด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) ตัวควบคุมลบ คือน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ และตัวควบคุมบวก คือ ดิสก์ยาปฏิชีวนะ Tetracyclines สำเร็จรูป (Tetracycline antimicrobial susceptibility test discs, Oxoid, UK) วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Muller-Hinton agar (MHA) ที่ทำการสเปรดแบคทีเรีย 10^6 CFU/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใสซึ่งแสดงโซนการยับยั้งแบคทีเรีย (Inhibition zone) หน่วยมิลลิเมตร (เส้นผ่าศูนย์กลางโซนใสมากกว่า 8 มิลลิเมตร แสดงว่าสารสกัดยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียนั้น) ทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัด PGCE ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration, MIC) ด้วยวิธีการทดสอบความไวของสารยับยั้งแบคทีเรียเจือจางต่อแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน (CLSI, 2012) ทำการเจือจางสารละลายสารสกัด PGCE ลงครั้งละสองเท่าในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Muller-Hinton broth (MHB) ใน 96-well plate (ความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดที่ได้อยู่ระหว่าง 100 ถึง 0.003 mg/ml) แล้วเติมแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละหลุม 5×10^5 CFU/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นที่เกิดขึ้นหลังบ่ม โดยหลุมสุดท้ายที่ไม่เกิดความขุ่นแสดงว่าสารละลายตัวอย่างสามารถยับยั้งแบคทีเรียนั้นได้ แสดงว่าเป็นค่า MIC เพื่อยืนยันความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ โดยทำการ ทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัด PGCE ต่อการฆ่าแบคทีเรีย (Minimal bactericidal concentration, MBC) นำอาหารเลี้ยงเชื้อหลังบ่มหาค่า MIC มาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MHA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หากความเข้มข้นสุดท้ายที่ไม่มีการเจริญบน MHA แสดงว่าเป็นค่า MBC ของแบคทีเรียนั้น

ผลการวิจัย

1. องค์ประกอบเบื้องต้นของผลเชอร์รีกาแฟเขียว

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบด้านเคมีเบื้องต้น และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ปริมาณ CGA ปริมาณ TPC กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และกิจกรรม FRAP ของผลเชอร์รีกาแฟเขียวอบแห้งบดละเอียด แสดงดังตารางที่ 1 พบว่าองค์ประกอบด้านเคมีเบื้องต้นของผลเชอร์รีกาแฟเขียวอบแห้งบดละเอียด ประกอบด้วย ความชื้นร้อยละ 7.48 โปรตีนร้อยละ 11.03 ไขมันร้อยละ 6.33 เถ้าร้อยละ 4.81 และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 70.36 และมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ปริมาณ CGA เท่ากับ 5.35 g CGAE/100g ผลเชอร์รีกาแฟเขียวอบแห้ง ปริมาณ TPC เท่ากับ 5.60 g CGAE/100g ผลเชอร์รีกาแฟเขียวอบแห้ง กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และกิจกรรม FRAP เท่ากับ 90.08 158.13 และ 93.68 μmol TE/g ผลเชอร์รีกาแฟเขียวอบแห้ง ตามลำดับ

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีและกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของผลเชอร์รีกาแฟเขียวอบแห้งบดละเอียด

องค์ประกอบทางเคมี	ค่าการวิเคราะห์
ความชื้น (ร้อยละ)[a]	7.48 ± 0.24*
โปรตีน (ร้อยละ)[a]	11.03 ± 0.20
ไขมัน (ร้อยละ)[a]	6.33 ± 0.11
เถ้า (ร้อยละ)[a]	4.81 ± 0.10
คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ)[a]	70.36 ± 0.30
CGA content (g CGAE/100g ผลเชอร์รีกาแฟเขียวอบแห้ง)[b]	5.35 ± 0.12
TPC content (g CGAE/100g ผลเชอร์รีกาแฟเขียวอบแห้ง)[b]	5.60 ± 0.08
กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน	
- DPPH (μmol TE/g ผลเชอร์รีกาแฟเขียวอบแห้ง)[b]	90.08 ± 2.15
- ABTS (μmol TE/g ผลเชอร์รีกาแฟเขียวอบแห้ง)[b]	158.13 ± 3.77
- FRAP (μmol TE/g ผลเชอร์รีกาแฟเขียวอบแห้ง)[b]	93.68 ± 14.88

หมายเหตุ * ค่าของข้อมูลแสดงในรูปของ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

[a] คำนวณในรูปฐานเปียก

[b] คำนวณในรูปฐานแห้ง

2. ผลการศึกษาสภาวะการสกัดกรดคลอโรจีนิกที่เหมาะสมโดย ASE

การศึกษาสภาวะการสกัดกรดคลอโรจีนิกที่เหมาะสมจากผลเชอร์รีกาแฟเขียวโดย ASE โดยแปรผันความเข้มข้นของเอทานอล (ร้อยละ 50 60 และ 70) และอุณหภูมิสกัด (90 120 และ 150 องศาเซลเซียส) โดยใช้ตัวชี้วัดการคัดเลือกสภาวะคือร้อยละผลผลิต ปริมาณ CGA ปริมาณ TPC กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และกิจกรรม FRAP ของสารสกัด PGCE โดยในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมทำการออกแบบการทดลองแบบ 3^2 Factorial in CRD จำนวน 9 สิ่งทดลอง สกัดสิ่งทดลองละ 3 ซ้ำ โดยร้อยละผลผลิต ปริมาณ CGA และปริมาณ TPC แสดงดังตารางที่ 2 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และกิจกรรม FRAP ของสารสกัด PGCE แสดงดังตารางที่ 3 พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลและอุณหภูมิ มีผลต่อร้อยละผลผลิต ปริมาณ CGA ปริมาณ TPC กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และกิจกรรม FRAP โดยความเข้มข้นเอทานอลร้อยละ 70 สามารถสกัดสารสกัด PGCE ได้สูงที่สุดมีค่าเท่ากับร้อยละ 4.28 – 4.43 ต่อน้ำหนักผลเชอร์รีกาแฟเขียวอบแห้ง ซึ่งผลของอุณหภูมิในการสกัดให้ปริมาณผลผลิตไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) การใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 สามารถสกัดสารสกัด PGCE โดย ASE ได้ปริมาณ CGA ปริมาณ TPC กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และกิจกรรม FRAP สูงที่สุด รองลงมาคือ การใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 60 และ 50 ตามลำดับ แต่ผลของอุณหภูมิสกัด พบว่าอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส สามารถสกัดสารสกัด PGCE โดย ASE ได้ปริมาณ CGA

ปริมาณ TPC และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และกิจกรรม FRAP สูงที่สุด ซึ่งสารสกัด PGCE โดย ASE โดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 และอุณหภูมิสกัดที่ 90 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณ CGA เท่ากับ 72.52 g CGAE/100g PGCE ปริมาณ TPC เท่ากับ 90.67 g CGAE/100g PGCE กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และกิจกรรม FRAP เท่ากับ 3430.78 3515.30 และ 3534.55 μmol TE/g PGCE ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการสกัดสูงที่สุด

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัด PGCE โดย ASE ทำการแปรผันความเข้มของของเอทานอล และอุณหภูมิในการสกัด มาทำการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมโดยกำหนดเลือกสภาวะที่ทำให้ได้ร้อยละผลผลิต ปริมาณ CGA ปริมาณ TPC กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และกิจกรรม FRAP สูงที่สุด พบว่าได้สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดกรดคลอโรจีนิกจากผลเชอร์รีกาแฟเขียวโดย ASE คือ การใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 และอุณหภูมิในการสกัด 90 องศาเซลเซียส มีค่าความพึงพอใจโดยรวม (Composite desirability: D) เท่ากับ 0.93 (ภาพที่ 3) แสดงว่าสภาวะการสกัดที่เหมาะสมระหว่างความสัมพันธ์ของค่าปัจจัย และค่าตอบสนองที่มีความสัมพันธ์กันร้อยละ 93.02 เมื่อทำการสกัดซ้ำที่สภาวะที่เหมาะสมพบว่าค่าที่ได้จากการวิเคราะห์มีความใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทำนาย (% Accuracy) โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 97.56 – 99.89 แสดงว่าสภาวะสกัดโดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 และอุณหภูมิในการสกัด 90 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสม และสามารถสกัดกรดคลอโรจีนิกจากผลเชอร์รีกาแฟเขียวโดย ASE อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 2 ร้อยละผลผลิต ปริมาณ CGA และปริมาณ TPC ของสารสกัด PGCE จากการศึกษาสภาวะการสกัดที่เหมาะสมโดย ASE ทำการแปรผันความเข้มข้นของเอทานอล และอุณหภูมิสกัด

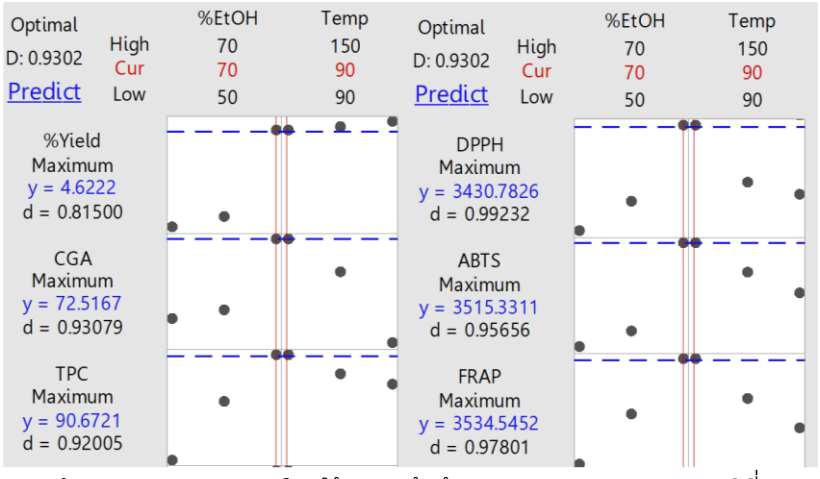
สภาวะการสกัด		ร้อยละผลผลิตสารสกัด PGCE	CGA content	TPC content
Ethanol (%)	Temp (°C)		(g CGAE/100g PGCE)	(g CGAE/100g PGCE)
50	90	2.60 ± 0.13^{b}	69.11 ± 0.16^{c}	82.98 ± 0.39^{de}
50	120	2.67 ± 0.09^{b}	70.13 ± 0.02^{c}	81.63 ± 1.39^{e}
50	150	2.71 ± 0.09^{b}	67.76 ± 0.16^{e}	80.58 ± 0.56^{e}
60	90	2.78 ± 0.25^{b}	70.36 ± 0.14^{c}	87.26 ± 1.10^{bc}
60	120	3.19 ± 0.08^{b}	70.64 ± 0.09^{c}	85.26 ± 0.70^{cd}
60	150	3.36 ± 0.55^{b}	67.55 ± 0.31^{e}	82.62 ± 1.04^{de}
70	90	4.28 ± 0.15^{a}	72.52 ± 0.41^{a}	90.67 ± 0.90^{a}
70	120	4.35 ± 0.34^{a}	71.52 ± 0.33^{b}	89.34 ± 0.22^{ab}
70	150	4.43 ± 0.31^{a}	69.41 ± 0.07^{d}	88.50 ± 1.92^{ab}

หมายเหตุ ค่าของข้อมูลแสดงในรูปของ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ และอักษรภาษาอังกฤษกำกับในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 3 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และกิจกรรม FRAP ของสารสกัด PGCE โดย ASE ทำการแปรผันความเข้มข้นของเอทานอล และอุณหภูมิสกัด

สภาวะการสกัด		กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน (μmol TE/g PGCE)		
Ethanol (%)	Temp (˚C)	DPPH	ABTS	FRAP
50	90	2709.15 ± 1.79^{g}	3242.91 ± 28.19^{c}	3301.73 ± 28.42^{d}
50	120	2663.03 ± 5.28^{h}	3226.49 ± 26.30 ^{cd}	3298.10 ± 23.75^{d}
50	150	2616.44 ± 2.17^{i}	3180.27 ± 20.16^{d}	3207.47 ± 3.39^{e}
60	90	2912.42 ± 3.83^{d}	3286.93 ± 15.10^{c}	3410.67 ± 31.35^{c}
60	120	2818.13 ± 13.05^{e}	3249.72 ± 9.46^{c}	3376.34 ± 29.23^{c}
60	150	3045.72 ± 8.05^{f}	3231.79 ± 25.39^{cd}	3367.94 ± 13.69^{c}
70	90	3430.78 ± 5.49^{a}	3515.30 ± 16.70^{a}	3534.55 ± 7.50^{a}
70	120	3045.72 ± 8.05^{b}	3435.99 ± 24.84^{b}	3448.23 ± 14.95^{b}
70	150	2953.64 ± 1.19^{c}	3382.06 ± 21.84^{b}	3379.59 ± 26.84^{bc}

หมายเหตุ ค่าของข้อมูลแสดงในรูปของ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ และอักษรภาษาอังกฤษกำกับในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 3 ค่าจากการทำนายสภาวะการสกัดโดยใช้ความเข้มข้นของเอทานอล และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดกรดคลอโรจีนิกจากผลเชอร์รีกาแฟเขียวโดย ASE ด้วยโปรแกรมทางสถิติ

หมายเหตุ Y คือ ค่าที่ได้จากการทำนาย D คือ ค่าความพึงพอใจโดยรวม (Composite desirability, D)
%Yield คือ ร้อยละผลผลิตสารสกัด PGCE DPPH คือ กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH
CGA คือ ปริมาณกรดคลอโรจีนิก ABTS คือ กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS
TPC คือ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก FRAP คือ กิจกรรม FRAP

ตารางที่ 4 ค่าการทำนาย (Prediction value) และค่าการวิเคราะห์ยืนยัน (Verified value) ของสภาวะการสกัดที่คัดเลือกของสารสกัด PGCE โดย ASE

การวิเคราะห์	ค่าการทำนาย	ค่าการวิเคราะห์ยืนยัน	% Accuracy
ร้อยละผลผลิตสารสกัด PGCE	4.62	4.51 ± 0.13[1]	97.56
CGA content (g CGAE/100g PGCE)	72.52	89.23 ± 1.33	98.41
TPC content (g CGAE/100g PGCE)	90.67	72.04 ± 0.10	99.35
กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน			
- DPPH (μmol TE/g PGCE)	3430.78	3412.77 ± 15.56	99.48
- ABTS (μmol TE/g PGCE)	3515.33	3493.92 ± 24.37	99.39
- FRAP (μmol TE/g PGCE)	3534.55	3530.69 ± 19.23	99.89

หมายเหตุ [1]ค่าของข้อมูลแสดงในรูปของ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

3. ผลการศึกษากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย

3.1 ผลการศึกษากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion

ผลการศึกษากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion ทดสอบกับแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *E. coli V. parahaemolyticus S. typhimurium* และ *S. aureus* แสดงผลดังตารางที่ 5 หากบริเวณใสซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรีย (Inhibition zone) มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 8 มิลลิเมตร แสดงว่าสารตัวอย่างมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (Suárez-Quiroz *et al.*, 2013) จากผลการวิเคราะห์พบว่าความเข้มข้นของสารสกัด PGCE 1.50 และ 2.25 mg/disc มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งมากกว่า 8 มิลลิเมตร โดยความเข้มข้นของสารสกัด PGCE ความเข้มข้น 1.50 mg/disc เป็นความเข้มข้นเริ่มต้นในการทดสอบนี้ ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10.17 มิลลิเมตร ซึ่งแสดงการยับยั้งการเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบซึ่งสารสกัด PGCE สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *V. parahaemolyticus* ดีที่สุด รองลงมาคือ *S. typhimurium* และ *E. coli* โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 9.67 9.33 และ 9.67 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยตัวควบคุมบวกที่ใช้คือ Tetracyclines ความเข้มข้น 0.03 mg/disc มีเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* เท่ากับ 41.33 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *V. parahaemolyticus* และ *S. typhimurium* เท่ากับ 27.42 มิลลิเมตร และ *E. coli* เท่ากับ 25.42 มิลลิเมตร ตามลำดับ แสดงว่าสารสกัด PGCE สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ศึกษาได้ และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ

ตารางที่ 5 ผลการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัด PGCE

แบคทีเรีย	Inhibition zone (mm)	
	ความเข้มข้นของสารสกัด PGCE (mg/disc)	
	2.25	1.50
Escherichia coli	10.17 ± 0.29	9.08 ± 0.14
Vibrio parahaemolyticus	11.17 ± 0.29	9.67 ± 0.29
Salmonella typhimurium	9.67 ± 0.29	9.33 ± 0.58
Staphylococcus aureus	12.50 ± 0.50	10.17 ± 0.29

หมายเหตุ ค่าของข้อมูลแสดงในรูปของ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2 ผลการศึกษาค่า MIC และค่า MBC ของสารสกัด PGCE

ผลการศึกษาค่า MIC และค่า MBC ของสารสกัด PGCE จากการสกัดด้วยสภาวะที่เหมาะสม โดยทดสอบกับแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *E. coli V. parahaemolyticus S. typhimurium* และ *S. aureus* แสดงดังตารางที่ 6 พบว่าค่า MIC ของสารสกัด PGCE ต่อเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ 3.13 mg/ml โดยค่า MIC ต่อเชื้อ *E. coli V. parahaemolyticus* และ *S. typhimurium* มีค่าเท่ากับ 6.25 mg/ml และเมื่อนำไปทดสอบค่า MBC บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งพบว่าค่า MBC ของ *E. coli V. parahaemolyticus* และ *S. aureus* มีค่ามากกว่า 6.25 mg/ml และค่า MBC ของ *S. typhimurium* มีค่ามากกว่า 12.50 mg/ml

ตารางที่ 6 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัด PGCE ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย

แบคทีเรีย	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
Escherichia coli	6.25	> 6.25
Vibrio parahaemolyticus	6.25	> 6.25
Salmonella typhimurium	6.25	>12.50
Staphylococcus aureus	3.13	>6.25

วิจารณ์ผลการวิจัย

องค์ประกอบทางเคมีของผลเชอร์รีกาแฟเขียวอบแห้งบดละเอียดพันธุ์อาราบิกาประกอบด้วย ความชื้นร้อยละ 7.48 โปรตีนทั้งหมดร้อยละ 11.03 ไขมันทั้งหมดร้อยละ 6.33 เถ้าร้อยละ 4.81 และปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 70.36 อีกทั้งมีปริมาณ CGA เท่ากับ 5.35 g CGAE/100g ผลเชอร์รีกาแฟเขียวอบแห้ง มีปริมาณ TPC เท่ากับ 5.60 g CGAE/100g ผลเชอร์รีกาแฟเขียวอบแห้ง กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และกิจกรรม FRAP เท่ากับ 90.08 158.13 และ 93.68 μmol TE/g ผลเชอร์รีกาแฟเขียวอบแห้ง ตามลำดับ โดยงานวิจัย Falah (2012) พบว่าเมล็ดกาแฟเขียวพันธุ์อาราบิกา

มีองค์ประกอบด้านเคมี ประกอบด้วย โปรตีนร้อยละ 10.00 - 11.00 ไขมันร้อยละ 15.00 - 17.00 เถ้าร้อยละ 3.00 - 4.20 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 6.00 - 9.00 และปริมาณ CGA ร้อยละ 4.10 ถึง 7.90 สำหรับองค์ประกอบด้านเคมีของผลเชอร์รีกาแฟส่วนอื่น ๆ ซึ่งรายงานโดย Esquivel and Jiménez (2012) พบว่าแกลบกาแฟจากกระบวนการสีผลเชอร์รีกาแฟอบแห้งมีส่วนประกอบหลัก คือ เนื้อผลกาแฟ เปลือกหุ้ม เมล็ดกาแฟ และกะลากาแฟ ประกอบด้วย โปรตีนร้อยละ 5.2 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 35 เส้นใยร้อยละ 30.8 และแร่ธาตุร้อยละ 10.7 จากข้อมูลดังกล่าวเห็นได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีของผลเชอร์รีกาแฟเขียวของการศึกษานี้มีปริมาณโปรตีน และเถ้าใกล้เคียงกับเมล็ดกาแฟเขียวพันธุ์อาราบิกาของงานวิจัย Falah (2012) แต่มีปริมาณไขมันน้อยกว่า เนื่องจากผลเชอร์รีกาแฟเขียวบดละเอียดประกอบด้วย เมล็ดกาแฟเขียว เปลือกหุ้มเมล็ด เนื้อเยื่อหุ้มกะลา และกะลากาแฟ ดังนั้นเมื่อบดรวมกันปริมาณสัดส่วนไขมันของวัตถุดิบจึงลดลง และปริมาณ CGA ในองค์ประกอบรวมของผลเชอร์รีกาแฟเขียวอยู่ในช่วงงานวิจัยของ Falah (2012) ทั้งนี้ปริมาณ CGA ในกาแฟมีความแตกต่างตามแหล่งปลูกกาแฟ (Narita and Inouye, 2015) การศึกษาสภาวะการสกัดกรดคลอโรจีนิกที่เหมาะสมจากผลเชอร์รีกาแฟเขียวโดย ASE แปรผันความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 50 60 และ 70 และอุณหภูมิสกัด 90 120 และ 150 องศาเซลเซียส ซึ่งออกแบบการทดลองแบบ 3^2 Factorial in CRD พบว่าการใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 ที่อุณหภูมิการสกัด 90 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดที่ทำให้ได้ร้อยละผลผลิต ปริมาณ CGA ปริมาณ TPC กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และกิจกรรม FRAP ของสารสกัด PGCE สูงที่สุด โดยมีร้อยละผลผลิตสารสกัด PGCE เท่ากับ 4.28 ต่อน้ำหนักผลเชอร์รีกาแฟเขียวอบแห้ง มีปริมาณ CGA เท่ากับ 72.52 g CGAE/100g PGCE มีปริมาณ TPC เท่ากับ 90.67 g CGAE/100g PGCE และมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และกิจกรรม FRAP เท่ากับ 3430.78 3515.30 และ3534.55 μmol TE/g PGCE ตามลำดับ การใช้เอทานอลความเข้มข้นสูงมีประสิทธิภาพในการสกัดกรดคลอโรจีนิก และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด เนื่องจากการใช้ตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วเหมือนกับตัวถูกละลายสามารถละลายสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกมาได้ (Mottaleb & Sarker, 2012) โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพืชมีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารเหล่านี้ได้ต้องมีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายไม่มีขั้ว และ/หรือตัวทำละลายกึ่งมีขั้ว (Pandey & Tripathi, 2014; Neelapong *et.al,* 2018) ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ตัวทำละลาย คือ เอทานอล มีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายกึ่งมีขั้ว (Efthymiopoulos *et al*., 2018) มีความสามารถในการทำละลายสารจำพวกสารประกอบฟีนอลิก (Limmatvapirat & Limmatvapirat, 2012) ซึ่งเป็นสารประกอบหลักในผลเชอร์รีกาแฟเขียว ดังนั้นเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลสูงขึ้นหรือมีอัตราส่วนของน้ำในตัวทำละลายน้อยลง โดยน้ำมีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูง (Neelapong *et.al,* 2018) ดังนั้นเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลสูงขึ้นทำให้สภาพความมีขั้วของตัวทำละลายลดลง จึงสามารถสกัดกรดคลอโรจีนิกออกมาได้มากขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Saewan *et al*. (2020) พบว่าการสกัดวัสดุเศษเหลือจากกาแฟด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 สามารถสกัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกได้มากที่สุด รองลงมา คือ การใช้เอทานอล และน้ำปราศจากไอออน ตามลำดับ และการใช้ตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทิลอะซิเตทให้ผลการสกัดไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ Barros *et al*. (2013) พบว่าการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากรำข้าวฟ่างโดย ASE ด้วยตัวทำละลายเอทานอลผสมกับน้ำช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีนอลิก แต่เมื่อใช้

อุณหภูมิในการสกัดสูงขึ้นส่งผลให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด PGCE ลดลง เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อการสลายตัวของ CGA ซึ่งงานวิจัยของ Vignoli *et al*. (2011) Rao & Ramalakshmi (2015) และ Cid & Peña (2016) พบว่าความร้อนจากการคั่วเมล็ดกาแฟพันธุ์อาราบิกามีผลต่อการสลายตัวของ CGA โดยการใช้ความร้อนที่สูงขึ้น และนานขึ้นมีผลให้ปริมาณ CGA ลดลง จึงอาจกล่าวได้ว่าอุณหภูมิสูงหรือความร้อนมีผลต่อการสลายตัวของ CGA TPC และมีผลต่อการลดลงของกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน จากการศึกษานี้พบว่าการใช้ ASE ทำให้สามารถใช้ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ เช่น เอทานอล สำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากผลเชอร์รีกาแฟเขียวที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดเดือด (78.37 องศาเซลเซียส) ของตัวทำละลายได้ ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการแพร่ และการสกัดของตัวทำละลายในวัตถุดิบได้ดียิ่งขึ้น ดังนั้นจึงสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้นี้ไปใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากวัสดุเศษเหลือในอุตสาหกรรมอาหารได้ต่อไป

การศึกษากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli V. parahaemolyticus S. typhimurium* และ *S. aureus* ของสารสกัด PGCE ที่สกัดด้วยสภาวะที่คัดเลือก พบว่าการทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion โดยใช้สารละลายสารสกัด PGCE ความเข้มข้น 1.50 และ 2.25 mg/disc สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งหมด โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากกลไกการยับยั้งแบคทีเรียของสารยับยั้งแบคทีเรียขึ้นอยู่กับโครงสร้างหลักของผนังเซลล์ กล่าวคือแบคทีเรียแกรมลบมีพื้นผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกซึ่งชอบน้ำ (hydrophilic surface) ผนังเซลล์ประกอบด้วยชั้นของเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) หนึ่งชั้นที่ล้อมรอบไปด้วยผนังเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ซึ่งอุดมไปด้วยโมเลกุลลิโพพอลิแซ็กคาร์ไรด์ (lipopolysaccharide) ทำให้เกิดการกีดขวางการแทรกซึมของโมเลกุลของสารยับยั้งแบคทีเรียและยังเกี่ยวกับเอนไซม์ที่อยู่ใน periplasmic space ซึ่งสามารถทำลายโมเลกุลแปลกปลอมจากภายนอกได้ (Shan *et al*., 2007; Certain-Karaca & Newman., 2015a,b) สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกไม่มีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและโครงสร้างของผนังเซลล์ ทำให้สารต้านแบคทีเรียสามารถทำลายผนังเซลล์ และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกทำให้เกิดการรั่วไหลของไซโทพลาสซึม และทำให้เซลล์แบคทีเรียเกิดความเสียหาย และเซลล์ตายในที่สุด (Shan *et al*., 2007) สำหรับกลไกการยับยั้งแบคทีเรียของสารประกอบฟีนอลิกจากพืช Cueva *et al.* (2010) กล่าวไว้ว่าสารประกอบฟีนอลิกเข้าไปทำลายผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ (Cytoplasmic membrane) และโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์ (Membrane proteins) ของแบคทีเรียทำให้เซลล์เกิดความเสียหาย โดยเกิดการรั่วไหลของไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) ออกนอกเซลล์ และทำให้เกิดการสูญเสียแรงขับเคลื่อนโปรตอน (Proton motive force) ภายในเซลล์แบคทีเรีย นำไปสู่การตายของแบคทีเรีย ซึ่ง CGA ทำหน้าที่เหมือนสารประกอบฟีนอลิก และกรดชนิดอื่น ๆ คือ สามารถซึมผ่านเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย ทำให้เซลล์เมมเบรนเกิดรอยรั่วหรือเกิดความเสียหาย สารประกอบภายในเซลล์ไหลออกจากเซลล์แบบไม่สามารถผันกลับได้ เป็นผลให้ขาดความสมดุลภายในเซลล์ เซลล์สูญเสียความสามารถในการรักษาเซลล์เมมเบรน และไซโทรพลาสซึม จึงเป็นสาเหตุให้เซลล์แบคทีเรียตายนั่นเอง (Lou *et al*., 2011) และการทดสอบค่า MIC และค่า MBC ของสารสกัด PGCE ที่สกัดด้วยสภาวะการสกัดที่เหมาะสม พบว่าค่า MIC ของสารสกัด PGCE ต่อเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ 3.13 mg/ml และค่า MIC ของสารสกัด PGCE ต่อเชื้อ *E. coli V. parahaemolyticus* และ *S. typhimurium* เท่ากับ 6.25 mg/ml เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Lou *et al.* (2011) พบว่าค่า MIC ของ CGA (ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 98) สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ความเข้มข้น 0.02 - 0.04 mg/ml

E. coli และ *S. typhimurium* ที่ความเข้มข้น 0.02 – 0.08 mg/ml และงานวิจัยของ Li *et al*. (2014) พบว่าค่า MIC ของ CGA (ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 95) ในการยับยั้ง *S. aureus* คือความเข้มข้น 2.5 – 5.0 mg/ml โดยค่า MIC ของสารสกัด PGCE จากการสกัดด้วยสภาวะการสกัดที่เหมาะสมมีผลต่อเชื้อ *S. aureus* ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Li *et al*. (2014) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Lou *et al.* (2011) พบว่ามีค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus E. coli* และ *S. typhimurium* มากกว่างานวิจัยของ Lou *et al.* (2011) ถึง 10 เท่า หรือมีฤทธิ์ยับยั้งน้อยกว่า 10 เท่า อาจเนื่องจากความบริสุทธิ์หรือปริมาณ CGA มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย ซึ่งสารสกัด PGCE มีปริมาณ CGA เป็นองค์ประกอบร้อยละ 72.52 หรือกล่าวได้ว่ามีปริมาณ CGA น้อยกว่าสารสกัดจากงานวิจัยดังกล่าว และเมื่อทำการทดสอบหาค่า MBC ของสารสกัด PGCE ต่อเชื้อ *E. coli V. parahaemolyticus* และ *S. aureus* พบว่ามีค่ามากกว่า 6.25 mg/ml และค่า MBC ต่อเชื้อ *S. typhimurium* มีค่ามากกว่า 12.50 mg/ml ซึ่งจากผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าสารสกัด PGCE สามารถใช้เป็นสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ศึกษาได้

สรุปผลการวิจัย

ความเข้มข้นของเอทานอล และอุณหภูมิสกัดมีผลต่อการสกัดกรดคลอโรจีนิกจากผลเชอร์รีกาแฟเขียวโดย ASE ส่งผลต่อร้อยละผลผลิตสารสกัด PGCE ปริมาณ CGA ปริมาณ TPC กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และกิจกรรม FRAP ซึ่งสภาวะการสกัด PGCE ที่เหมาะสม คือการใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 ที่อุณหภูมิสกัด 90 องศาเซลเซียส ได้ร้อยละผลผลิตสารสกัด PGCE เท่ากับ 4.28 ซึ่งมีปริมาณ CGA เท่ากับ 72.52 g CGAE/100g PGCE ปริมาณ TPC เท่ากับ 90.67 g CGAE/100g PGCE กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และกิจกรรม FRAP เท่ากับ 3430.78 3515.30 และ 3534.55 μmol TE/g PGCE ตามลำดับ โดยสารสกัด PGCE สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli V. parahaemolyticus S. typhimurium* และ *S. aureus* ได้ และมีค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ 3.13 mg/ml *E. coli V. parahaemolyticus* และ *S. typhimurium* เท่ากับ 6.25 mg/ml และมีค่า MBC ต่อเชื้อ *E. coli V. parahaemolyticus* และ *S. aureus* มากกว่า 6.25 mg/ml และ *S. typhimurium* มากกว่า 12.50 mg/ml ดังนั้นจากการศึกษานี้จึงกล่าวได้ว่าการสกัด CGA โดย ASE ด้วยเอทานอลความเข้มข้นสูง และอุณหภูมิที่เหมาะสมช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด CGA จากผลเชอร์รีกาแฟเขียวซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปกาแฟได้ และสารสกัดที่ได้ยังสามารถใช้เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกที่มีศักยภาพในการต้านออกซิเดชัน และสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน และสารยับยั้งแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง และทางการแพทย์ที่เหมาะสมได้ต่อไป การศึกษานี้จึงเป็นแนวทางหนึ่งของการเพิ่มมูลค่าให้กับผลเชอร์รีกาแฟเขียวได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบริษัท ฮิลล์คอฟฟ์ จำกัด จังหวัดเชียงใหม่ สำหรับความอนุเคราะห์ผลเชอร์รีกาแฟเขียวตลอดการทำงานวิจัย และขอขอบคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือ และอุปกรณ์สำหรับการดำเนินการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Agricultural Research Development Agency (ARDA). (2020). *Coffee research database*. Retrieved June 29, 2020, from http://agknowledge.arda.or.th/coffee/?page_id=548.

AOAC. (2012). Official methods of the association of official analytical chemists. *Association of Official Analytical Chemists*, Washington D.C.

Azevedo, A.B.A., Mazzafera, P., Mohamed, R.S., Vieira de Melo, S.A.B., & Kieckbusch, T.G. (2007). Extraction of caffeine, chlorogenic acid and lipids from green coffee beans using supercritical carbon dioxide and co-solvents. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *25*(3), 543-552.

Barros, F., Dykes, L., Awika, J. M., & Rooney, L. W. (2013). Accelerated solvent extraction of phenolic compounds from sorghum brans. *Journal of Cereal Science*, *58*(2), 305-312.

Cetin-karaca, H., & Newman, M. (2015a). Antimicrobial efficacy of natural phenolic compounds against gram positive foodborne pathogens. *Journal of Food Research*, *4*(6), 16-27.

Cetin-karaca, H., & Newman, M. (2015b). Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia Coli*. *Food Bioscience*, *2*, 8-16.

Clifford, M. N., Johnston, K. L., Knight, S., & Kuhnert, N. (2003). Hierarchical scheme for LC-MSn identification of Chlorogenic Acids. Journal of Agricultural and Food Chemistry, *51*(10), 2900–2911.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2012). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; second informational supplement. Document VET01-S2. Wayne, PA.

Cid, M., & Peña M.P.D. (2016). Coffee: Analysis and Composition. *Encyclopedia of Food and Health*, 225-231.

Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., Martin-Alvarez, P. J., Bills, G., Vicente, M. F., Basilio, A., Rivas, C.L., Requena, T., Juan M. Rodríguez, J.M., & Bartolome, B. (2010). Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology*, *161*, 372–382.

Efthymiopouloos, I., Hellier, P., Ladommatos, N., Russo-Profili, A., Eveleigh, A., Aliev, A. Kay, A., & Mills-Lamptey, B. (2018). Influence of solvent selection and extraction temperature on yield and composition of lipids extracted from spent coffee grounds. *Industrial Crops and Products*, *119*, 49–56.

Esquivel, P., & Jiménez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, *46*(2), 488-495.

Farah, A. (2012). Coffee constituents. In V.R. Preedy. (Ed.). (pp. 21-58). *Coffee: Emerging health effects and disease prevention*. USA: John Wiley & Sons, Ltd.

Farah, A., & Donangelo, C. M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *18,* 23-36.

Farah, A., & Ferreira dos Santos, T. (2015). The Coffee Plant and Beans. In V.R. Preedy, (Ed.). (pp. 5-10). *Coffee in Health and Disease Prevention*, San Diego: Academic Press.

Farah, A., Paulis, T.C., Trugo, L.C., & Martin, P.R. (2005). Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(5), 1505-1513.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 1841-1856.

Kabir, F., Katayama, S., Tanji, N., & Nakamura, S. (2014). Antimicrobial effects of chlorogenic acid and related compounds. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, *57*(3), 359-365.

Ky, C.L., Noirot, M., & Hamon, S. (1997). Comparison of five purification methods for chlorogenic acids in green coffee beans (Coffee Sps). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45,* 786–790.

Li, G., Wang, X., Xu, Y., Zhang, B., & Xia, X. (2014). Antimicrobial effect and mode of action of chlorogenic acid on *Staphylococcus aureus*. *European food research and technology*, *238*, 589–59.

Limmatvapirat, C., & Limmatvapirat, S. (2012). Herbal extraction by pressurized liquid extraction (PLE). *Thai Bulletin of Pharmaceutical Sciences*, *7*(1), 1-21. (in Thai)

Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Ma, C., & Wang, Z. (2011). Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *Journal of Food Science*, *76*(6), 398-403.

Marcucci, C.T., Dias, R. C. E., Almeida, M.B., & Benassi, M.T. (2017). Antioxidant activity of commercial soluble coffees. *Journal of Beverages*, *3*, 27.

Moldoveanu, S., & David, V. (2016). Solvent extraction. *Modern Sample Preparation for Chromatography*. 131- 189.

Mottaleb, M. A., & Sarker, S.D. (2012). Accelerated solvent extraction for natural products isolation. *Methods in molecular biology*, *864*, 75-87.

Memon, A.A., Memon, N. & Bhanger, M.I. (2010). Micelle-mediated extraction of chlorogenic acid from *Morus laevigata* W. leaves. *Separation and Purification Technology*, *76*(2), 179-183.

Murthy, P. S., & Naidu, M. M. (2012). Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. *Food and Bioprocess Technology*, *5*(3), 897-903.

Naidu, M.M., Sulochanamma, G., Sampathu, S.R., & Srinivas, P. (2008). Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. *Journal of Food Chemistry*, *107*(1), 377-384.

Narita, Y., & Inouye K. (2015). Chlorogenic Acids from Coffee. In V.R. Preedy. (Ed). *Coffee in health and disease prevention*. (pp. 201-207). San Diego: Academic Press.

Neelapong, W., Phonyotin, B., & Sittikijyothin, W. (2018). Extraction of active compounds from Thai herbs: Steam distillation and solvent extraction. *The Journal of King Mongkut's University of Technology North Bangkok. 28*(4), 901-910. (in Thai)

Oestreich-Janzen, S. (2013). Chemistry of coffee. *Molecular sciences and chemical engineering*.1-28.

Pandey, A., & Tripathi, S. (2014). Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *2* (5), 115-119.

Ploypradub, C., Cheamsuphakit, & B. Punbusayakul, N. (2010). Antioxidant properties of different Parts of Arabica Coffee Berry and Spent Coffee Ground. *Agricultural Science Journal*, *41*(3/1) (Suppl.), 577-580. (in Thai)

Rao, L.J.M., & Ramalakshmi, K. (2015). Use of microwaves to extract chlorogenic acids from green coffee beans. In V.R. Preedy. (Ed.). (pp. 583-590). *Processing and Impact on Active Components in Food*. San Diego: Academic Press.

Saewan, N., Vichit, W. & Jimtaisong, A. (2020). Optimization of phenolic extraction from coffee by-product using response surface methodology and their antioxidant activities. *Food and Applied Bioscience Journal*, *8*(2), 14-26.

Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2007). Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 5484–5490.

Suárez-Quiroz, M. L., Taillefer, W., Méndez, E.M.L., González-ríos, O., Villeneuve, P., & Figueroa-espinoza, M.C. (2013). Antibacterial activity and antifungal and anti-mycotoxigenic activities against *Aspergillus flavus* and *A. ochraceus* of green coffee chlorogenic acids and dodecyl chlorogenates. *Journal of Food Safety*, *33*, 360–368.

Sun, H., Ge, X., Lv, Y., & Wang, A. (2012). Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. *Journal of Chromatography A*, *1237*, 1-23.

Vignoli, J. A., Bassoli, D. G., & Benassi, M. T. (2011). Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, *124*(3), 863–868.