

คุณสมบัติในการเป็นพรีไบโอติกส์ และสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในสัตว์น้ำจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ

Prebiotics and antimicrobial fish pathogen properties of coffee silver skin

ณัฐธิดา งามเมือง¹, ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน² และ อุดมลักษณ์ สมพงษ์^{1*}

Nattikan Ngammueang¹, Pairote Wongputtisin² and Udomluk Sompong^{1*}

¹ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

¹ Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University

² สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

² Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University

บทคัดย่อ: การศึกษาคุณสมบัติในการใช้เป็นพรีไบโอติกส์และสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในสัตว์น้ำจากน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผง (CSSp) และแบบสกัดสารออกฤทธิ์ (CSSE) หลังการบ่มด้วยเอนไซม์เซลลูเลส Cellusoft® L Ultra conc และ Cellusoft® CR conc วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ และชนิดน้ำตาลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) รวมถึงการทดสอบคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกส์ จากการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์พรีไบโอติกส์ รวมทั้งการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่าเมื่อทำการบ่มเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟด้วยเอนไซม์เซลลูเลส Cellusoft® L Ultra conc ได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมากที่สุด ในช่วงเวลาการบ่มที่ 24 ชั่วโมง (0.202 g/ml) นำสารที่ได้ทดสอบคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกส์ สามารถกระตุ้นการเจริญของพรีไบโอติกส์ *Bacillus subtilis* ในอาหารที่เติมสารละลายน้ำตาลเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผง (CSSp) และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในสัตว์น้ำ เมื่อทดสอบด้วยวิธีการ Agar well diffusion พบว่าสาร metabolite ที่ได้จากพรีไบโอติกส์ *B. subtilis* ในอาหาร CSSp: L Ultra conc มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae* สูงที่สุด แต่ยังไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Amoxicillin* (10 ug) ($P < 0.05$) ผลการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลวัยอ่อน พบว่าปลานิลในชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g และเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5% เป็นเวลา 1 เดือน มีความต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* สูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดตาย 93.33 และ 100.00 % ($P < 0.05$)

คำสำคัญ: เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ; พรีไบโอติกส์; ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค

ABSTRACT: The study of prebiotics and active-antimicrobial-pathogen substances in aquatic animals from oligosaccharides, obtained from coffee silver skin powder (CSSp), and active ingredient extraction (CSSE) after fermented by cellulase enzymes Cellusoft® L Ultra conc and Cellusoft® CR conc was carried out. The phenolic compounds, total sugar, reducing sugar and types of sugar were analyzed by using thin layer chromatography (TLC) technique; the prebiotic properties of sugars from silver skin coffee were investigated as well. The growth of probiotics and inhibition of pathogenic microorganisms were examined. The coffee silver skin was fermented with cellulase enzyme, Cellusoft® L Ultra conc. It was obtained the highest total sugar content after 24-hour fermentation (0.202 g/ml). The probiotic *Bacillus subtilis* provided optimal growth in the CSSp: L Ultra conc sugar-added diet and inhibited the growth of pathogenic microorganisms ($P < 0.05$). The efficacy of silver skin coffee in growth inhibition to fish pathogens by Agar well diffusion method showed that probiotics *B. subtilis* cultured in CSSp: L Ultra conc was shown to inhibit fish pathogens, *A. hydrophila* and *S. agalactiae*, but it produced less inhibition than the antibiotic Amoxicillin (10 ug) ($P < 0.05$). The effect in term of prebiotics to inhibit pathogens in Nile tilapia fry showed that tilapia cultured with *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g and 5 % silver skin coffee supplement (*B. subtilis* + CSS5%) for a month

* Corresponding author: udomluk.sompong@gmail.com

Received: date; May 11, 2021 Accepted: date; August 13, 2021 Published: date; December 29, 2021

were resistant to *A. hydrophila* and *S. agalactiae* in fry Nile tilapia. They had the highest survival rate (93.33 and 100.00 %) ($P < 0.05$).

Keywords: coffee silver skin; prebiotics; antipathogen activity

บทนำ

ปัจจุบันกาแฟเป็นเครื่องดื่มที่นิยมดื่มกันมาก ประชากรโลกจะบริโภคกาแฟวันละ 1,000 ล้านถ้วยเป็นอย่างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องดื่มชนิดอื่น (คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2537) การผลิตกาแฟทำให้มีเศษเหลือทิ้งจำนวนมาก ซึ่งผลพลอยได้หลักที่เกิดขึ้นในกระบวนการคั่วเมล็ดกาแฟคือกากกาแฟที่ใช้แล้ว (Coffee spent grounds) และเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (Coffee silver skin) เมื่อเกิดการการเน่าเสีย จะส่งผลให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษต่อพืชและจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน (Jiménez-Zamora et al., 2015) ในรายงานการวิจัยพบว่า มีประโยชน์ต่อสุขภาพสำหรับผู้บริโภคกาแฟ อันเป็นผลเนื่องมาจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) ของสารโพลีฟีนอลที่มีในส่วนประกอบของกาแฟ (Butt and Sultan, 2011; Vignoli et al., 2011) เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟอุดมไปด้วยเส้นใยและปริมาณแคลอรีสูง อีกทั้งยังมีปริมาณแร่ธาตุบางชนิดสูงได้แก่ โพแทสเซียม 5 %, แมกนีเซียม 2 % และแคลเซียม 0.5 % (Costa et al., 2018) มีเปอร์เซ็นต์โปรตีนสูง และไขมันต่ำ (Borrelli et al., 2004; Pourfarzad et al., 2013) นอกจากนี้เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟยังประกอบไปด้วยน้ำตาลเซลลูโลส 18 % และเฮมิเซลลูโลส 13 % (ได้แก่ ไซโลส 4.7 %, อะราบิโนส 2.0 %, กาแลคโตส 3.8 % และแมนโนส 2.6 %) (Costa et al., 2014; Narita and Inouye, 2012) และสารประกอบทางชีวภาพที่สำคัญอื่น ๆ ที่มีอยู่ในเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ ได้แก่ กรดคลอโรจีนิก (1 – 6 %) ซึ่งมีระดับคาเฟอีนอยู่ในช่วง 0.8 - 1.4 % ขึ้นอยู่กับแหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์ในการปลูกกาแฟ (Bessada et al., 2018)

กระบวนการหมักเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ โดยเชื้อรา *Aspergillus japonicus* สามารถผลิตน้ำตาลฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (FOS) โดยการทำงานของเอนไซม์ฟรุคโตฟูราโนซิเดส (Fructofuranosidase) ภายใต้การหมักแบบ Solid-state (Mussatto and Teixeira, 2010) นอกจากนี้ยังมีความสำคัญในการเป็นพรีไบโอติกส์สารต้านอนุมูลอิสระ (Borrelli et al., 2004) และสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Rufian-Henares and de la Cueva, 2009) พรีไบโอติกส์เป็นสารอาหารที่ไม่ถูกดูดซึมหรือย่อยสลายได้ในระบบทางเดินอาหาร แต่จะถูกย่อยได้โดยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ภายในลำไส้หรือจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ ซึ่งพรีไบโอติกส์จะช่วยกระตุ้น การเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ (ขยายพันธุ์, 2560) จึงทำให้มีการศึกษาการนำเยื่อหุ้มของเมล็ดกาแฟ ในการนำไปใช้เป็นพรีไบโอติกส์โดยกระบวนการหมักด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) ซึ่งผลผลิตที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์คือน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในภาคอุตสาหกรรมได้ นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์กลุ่มที่ย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นน้ำตาลชนิดต่าง ๆ น้ำตาลเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมได้ เช่น อุตสาหกรรมพลังงาน อุตสาหกรรมอาหาร คนและสัตว์ เป็นต้น (ขยายพันธุ์, 2560) การใช้พรีไบโอติกส์ช่วยสร้างภูมิคุ้มกันในตัวสัตว์ ช่วยสร้างภูมิคุ้มกันต้านทานในสัตว์น้ำได้ 2 ช่องทางคือช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะโดยตรง โดยพรีไบโอติกส์จะทำปฏิกิริยากับ Protein receptors บนผนังเซลล์สร้างภูมิคุ้มกันของเยื่อเมือก ลำไส้ ยังส่งผลให้มีการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น (Chesson, 1993; Savage et al., 1997) และเพิ่มจำนวนของเซลล์ Goblet ซึ่งเป็นเซลล์สร้างเยื่อเมือก (mucins) ของผนังลำไส้เล็กช่วยป้องกันลำไส้จากการติดเชื้อ (Savage et al., 1997) อีกช่องทางหนึ่ง พรีไบโอติกส์ช่วยเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่ช่วยเสริมภูมิคุ้มกันต้านทานในลำไส้มากขึ้น ซึ่งพรีไบโอติกส์สามารถกระตุ้นการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ อีกทั้งสามารถจับเกาะกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (Pathogenic bacteria) ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคไม่สามารถยึดเกาะกับเยื่อเมือกได้ (Aniansson et al., 1990; เฉลิมขวัญ และมัลลิกา, 2548) พบรายงานการใช้พรีไบโอติกส์ Fructooligosaccharide (FOS) จะช่วยทำให้แบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้เพิ่มจำนวนขึ้นได้ (Losada and Ollerios., 2002) การเสริมพรีไบโอติกส์ลงในอาหารเลี้ยงสัตว์น้ำสามารถช่วยเสริมความต้านทานโรค ลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและยังช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำได้อีกด้วย (Li and Gatlin, 2005)

ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกส์จากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อราบิก้า หลังการหมักด้วยเอนไซม์เซลลูเลส การวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ในเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟหลังการหมัก และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำ โดยทดสอบการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์

โปรไบโอติกส์ และทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งเป็นแนวทางในการลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และเสริมความต้านทานโรคในสัตว์น้ำได้อีกด้วย

วิธีการศึกษา

การวิเคราะห์องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ

นำตัวอย่างเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟสายพันธุ์ราบิก้า มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางโภชนาการ ตามวิธีการของ (AOAC, 1990) วิเคราะห์หาสารฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu's assay โดยดัดแปลงจาก (Noridayu et al., 2011) วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol-sulfuric acid method ดัดแปลงจาก (DuBois et al., 1956) และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid method (DNS method) ดัดแปลงจาก (Miller, 1959) จากนั้นนำตัวอย่างเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผง (Coffee silver skin powder; CSSp) และเยื่อหุ้มเมล็ดแบบสกัดน้ำ (Coffee silver skin extract; CSSe) ตามวิธีการของอนุมลและคณะ (2562) มาบ่มด้วยเอนไซม์เซลลูเลส Cellusoft® L Ultra conc และ Cellusoft® CR conc อัตราส่วน 1 : 100 (V/V) (ดัดแปลงจาก Apiraksakorn et al., 2008) เติมยาปฏิชีวนะ Ampicillin ให้มีความเข้มข้น $1 \mu\text{g/ml}$ เพื่อยับยั้งเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อน บ่มไว้ในเครื่อง Incubator shakers ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง โดยแต่ละครั้ง ทำการเก็บตัวอย่างละ 1 ml ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml นำตัวอย่างเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำไปวิเคราะห์หาสารฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu's assay วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol-sulfuric acid method วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี 3, 5-dinitrosalicylic acid method (DNS method) และวิเคราะห์หาชนิดน้ำตาลโดยวิธีทางโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) ดัดแปลงจาก (Harwood and Moody, 1989)

ทดสอบการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์และกลุ่มก่อโรคในสัตว์น้ำ

ทดสอบจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ ในเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal medium และเติมแหล่งคาร์บอน 1% ที่แตกต่างกันได้แก่ (P1) ชุตควบคุม (ไม่เติมแหล่งคาร์บอน), (P2) FOS, (P3) ผงบุก (Glucomanan), (P4) เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบสารสกัดน้ำ (CSSe: L Ultra conc) และ (P5) เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผง (CSSp: L Ultra conc) จากนั้นนำจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ *Bacillus subtilis* และเชื้อก่อโรค *Streptococcus agalactiae* และ *Aeromonas hydrophila* ที่ปริมาณเชื้อ 1×10^8 CFU/ml ปริมาตรเชื้อ 1 ml เลี้ยงในอาหารทั้ง 5 สูตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่มีการให้อาหารด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์หลังการบ่มด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm วัดที่ระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง คำนวณจำนวนโคโลนี (CFU/ml) จากกราฟมาตรฐานที่สร้างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ที่ระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง คำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน

ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *Streptococcus agalactiae* และ *Aeromonas hydrophila*

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรค โดยสาร metabolite ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบโปรไบโอติกส์แต่ละชนิด ทำการเพาะเชื้อโปรไบโอติกส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal medium และเติมแหล่งคาร์บอน 1% ที่แตกต่างกัน แบ่งชุดการทดลองเป็น 11 ชุดการทดลอง ได้แก่ (T1) ชุตควบคุม (โปรไบโอติกส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน), (T2) โปรไบโอติกส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม FOS, (T3) โปรไบโอติกส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมผงบุก (Glucomanan), (T4) โปรไบโอติกส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบสารสกัดน้ำที่ผ่านการบ่มด้วยเอนไซม์ และ (T5) โปรไบโอติกส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผง ที่ผ่านการบ่มด้วยเอนไซม์ เปรียบเทียบกับชุดที่ไม่เติมเชื้อโปรไบโอติกส์และยาปฏิชีวนะ (T6-T11) (T6) อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม FOS 1%, (T7) อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมผงบุก 1%, (T8) อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัดน้ำจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบที่ผ่านการบ่มด้วยเอนไซม์, (T9) อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผงที่ผ่านการบ่มด้วยเอนไซม์, (T10) อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัดน้ำจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบที่ไม่ผ่านการบ่มด้วยเอนไซม์ และ (T11) ยาปฏิชีวนะ Amoxicillin $10 \mu\text{g}$ ด้วยวิธี Agar well diffusion ดัดแปลงจาก (Schillinger and Lucke, 1989)

ทดสอบผลของการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ ร่วมกับเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผง (CSSp: L Ultra conc) ในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลานิล ทำการเสริมลงในอาหารสำหรับเลี้ยงลูกปลานิลวัยอ่อนขนาด 0.5 ± 0.1 g จำนวน 30 ตัว (ได้รับอนุญาตการใช้สัตว์ทดลอง) ในตู้ทดลองขนาด $30 \times 65 \times 40$ cm เป็นเวลา 1 เดือน แบ่งการทดลองเป็น 5 ชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ ได้แก่ (F1) ชุดควบคุม, (F2) ชุดการทดลองที่เสริม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g, (F3) ชุดการทดลองที่เสริมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผงบ่มด้วยเอนไซม์เซลลูเลส Cellusoft® L Ultra conc 5 %, (F4) ชุดการทดลองที่เสริม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g และเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผงบ่มด้วยเอนไซม์เซลลูเลส Cellusoft® L Ultra conc 5% และ (F5) ชุดการทดลองที่เสริม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g และฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 1% หลังจากเลี้ยงให้อาหารทดลองครบ 1 เดือน ฉีดเชื้อก่อโรค *S. agalactiae* และ *A. hydrophila* ความเข้มข้น 1×10^6 CFU/ml ฉีดเข้าช่องท้อง 0.1 ml สังเกตลักษณะอาการและพฤติกรรมของปลานิลหลังจากการฉีดเชื้อทุกวัน เป็นระยะเวลา 7 วัน (ปณรัตน์, 2552)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างแต่ละชุดการทดลอง ด้วยวิธีการของ Duncan's multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างค่าเฉลี่ยโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 16.0 ข้อมูลทั้งหมดถูกนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาค่าประกอบทางโภชนาการของเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟพบว่าในเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟประกอบไปด้วยโปรตีน 19.4 % ไขมัน 1.8 % ความชื้น 6.8 % เถ้า 7.3 % และคาร์โบไฮเดรต 64.8 % (Table 1)

Table 1 Coffee sliver skin nutritional composition (g/100 g) (mean $\pm$ SD)

Component	Coffee silver skin					
	This study	A*	B*	C*	D*	E*
Protein	19.4 $\pm$ 2.1	18.6 $\pm$ 0.6	18.6 $\pm$ 0.3	15.4 $\pm$ 0.2	18.8 $\pm$ 0.3	17.3 $\pm$ 1.8
Fat	1.8 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.5	4.6 $\pm$ 0.0	2.4 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.4
Moisture	6.8 $\pm$ 1.1	7.3 $\pm$ 0.4	7.1 $\pm$ 0.2	5.4 $\pm$ 0.2	4.8 $\pm$ 0.1	N.A.
Mineral (Ash)	7.3 $\pm$ 0.2	7.0 $\pm$ 0.4	7.0 $\pm$ 0.2	7.6 $\pm$ 0.0	8.3 $\pm$ 0.0	5.4 $\pm$ 0.9
Carbohydrate	64.8 $\pm$ 0.7	62.1 $\pm$ 1.6	65.1 $\pm$ 1.2	66.9 $\pm$ 0.4	N.A.	62.7 $\pm$ 5.9
Total dietary fiber	N.A.	62.4 $\pm$ 0.6	62.4 $\pm$ 0.5	N.A.	56.4 $\pm$ 0.7	61.6 $\pm$ 5.2

* From Borrelli et al. (2004) (A), Pourfarzad et al. (2013) (B), Ates and Elmaci (2018) (C), Costa et al. (2018) (D) and Jiménez-Zamora et al. (2015) (E).

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกในเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ พบว่า C1 มีสารฟีนอลิกเท่ากับ 169.3 ± 1.0 mg GAE/g ซึ่งมีค่าสูงสุด พบความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ C2, C3, C4 และ C5 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใน C2 เท่ากับ 0.202 ± 0.005 และ 0.025 ± 0.001 g/ml ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงสุด พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟก่อนการหมัก (Table 2)

Table 2 Phenolic compounds (mg GAE/g), Total sugar (g/ml) and reducing sugar (g/ml) of Coffee silver skin (mean $\pm$ SD)

	Phenolic compounds (mg GAE/g)	Total sugar (mg/ml)	Reducing sugar (mg/ml)
C1	169.3 $\pm$ 0.15 ^d	0.028 $\pm$ 0.005 ^a	0.004 $\pm$ 0.001 ^a
C2	14.73 $\pm$ 0.10 ^b	0.202 $\pm$ 0.006 ^d	0.025 $\pm$ 0.001 ^d
C3	18.61 $\pm$ 0.10 ^c	0.065 $\pm$ 0.001 ^c	0.017 $\pm$ 0.001 ^c
C4	10.57 $\pm$ 0.11 ^a	0.056 $\pm$ 0.001 ^b	0.009 $\pm$ 0.001 ^b
C5	18.61 $\pm$ 0.12 ^c	0.053 $\pm$ 0.003 ^b	0.017 $\pm$ 0.001 ^c
P-value	0.00	0.00	0.00

* C1: Coffee silver skin before, C2: Coffee silver skin powder (L Ultra conc), C3: Coffee silver skin extract (L Ultra conc), C4: Coffee silver skin powder (CR conc) and C5: Coffee silver skin extract (CR conc).

* Values represent means $\pm$ S.D. Different superscript letters within a column indicate significant ($p < 0.05$) differences as evaluated by Duncan's multiple range test.

เทคนิค TLC ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เกิดจากการหมักเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟด้วยสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส Cellusoft® L Ultra conc และ Cellusoft® CR conc พบว่า CSSe: L Ultra conc พบน้ำตาลกลูโคส (Glucose) และน้ำตาลกลุ่มโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ระยะเวลา 2 ถึง 24 ชั่วโมง น้ำตาลกลูโคสมีจำนวนลดลงสังเกตจากแถบสีที่ขึ้นบนแผ่น TLC (Figure 1) ใน CSSp: L Ultra conc มีน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลกลุ่มโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ระยะเวลา 2 ถึง 24 ชั่วโมง มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นและที่ระยะเวลา 8 ถึง 24 ชั่วโมง พบน้ำตาลฟรุคโตส (Fructose), น้ำตาลซูโครส (Sucrose) และน้ำตาลนิสตอส (Nystose) เพิ่มขึ้น (Figure 1) ในขณะทำการทดลอง CSSe: CR conc และ CSSp: CR conc พบเฉพาะน้ำตาลโมเลกุลขนาดใหญ่และพบในปริมาณน้อยสังเกตจากแถบสีที่ขึ้นบนแผ่น TLC

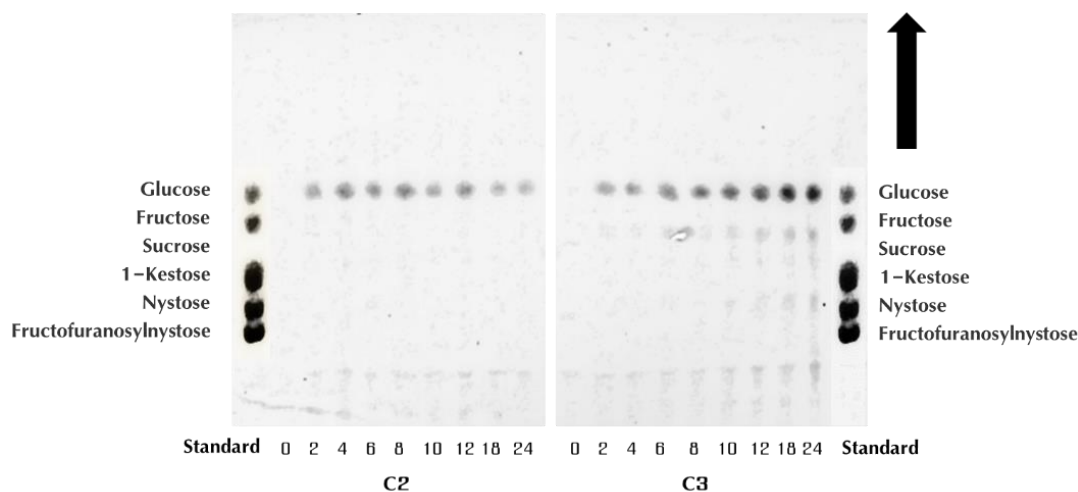


Figure 1 The types of sugar analyzed by TLC technique of CSSp: L Ultra conc, CSSe: L Ultra conc.

CSSp: coffee silver skin powder, CSSe: active ingredient extraction

การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ (*B. subtilis*) ในอาหาร P2, P3, P4 และ P5 มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่ากับ 2.50×10^6 , 1.09×10^8 , 2.50×10^8 และ 1.67×10^8 CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณจุลินทรีย์สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร P1 ซึ่งพบเพียง 3.90×10^5 CFU/ml (Figure 3) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังจากเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *B. subtilis* มีปริมาณลดลงทั้ง 5 ชุดการทดลองเมื่อเทียบกับเริ่มต้นมีปริมาณ 1 กรัม เมื่อเลี้ยง 24 ชั่วโมงมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในชุดการทดลอง P2, P3, P4 และ P5 เท่ากับ 311.00, 71.00, 71.00 และ 7.00 mg/ml ตามลำดับ ในขณะที่สูตรอาหารชุดควบคุมมีปริมาณเริ่มต้นเพียง 11.00

mg/ml เนื่องจากชุดควบคุมไม่มีการเติมน้ำตาลในอาหารปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารทดลองเริ่มต้นของชุดการทดลอง P2, P3, P4 และ P5 เท่ากับ 3.00, 23.00, 11.00 และ 18.00 mg/ml ตามลำดับ เมื่อเลี้ยง 24 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเท่ากับ 0.00, 2.00, 4.00 และ 18.00 mg/ml ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมมีปริมาณเริ่มต้นเพียง 3.00 mg/ml ลดลงเหลือ 2.00 mg/ml

การเจริญของเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ในอาหารที่ผสม P5 มีปริมาณเชื้อน้อยที่สุด พบเพียง 7.19×10^6 และ 3.16×10^6 CFU/ml ตามลำดับ พบปริมาณเชื้อน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารอื่น ๆ (Table 3) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารทดลองหลังจากเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* พบว่าในอาหารที่ผสม P5 มีค่าเท่ากับ 218.00 และ 202.00 mg/ml ซึ่งมีปริมาณมากกว่าสูตรอาหารอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารที่เลี้ยงจุลินทรีย์ก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* พบว่าในอาหาร P5 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 1.00 และ 9.00 mg/ml ซึ่งมีปริมาณมากกว่าสูตรอาหารอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

Table 3 Probiotics (*B. subtilis*) and bacterial fish pathogens (*A. hydrophila* and *S. agalactiae*) growth in five cultured formulas. (24-hr period)

	<i>B. subtilis</i> (CFU/ml)	<i>A. hydrophila</i> (CFU/ml)	<i>S. agalactiae</i> (CFU/ml)
P1	0.004 ± 0.000^a	0.008 ± 0.001^a	0.025 ± 0.000^a
P2	0.026 ± 0.001^a	0.002 ± 0.000^a	0.094 ± 0.002^b
P3	1.395 ± 0.267^b	12.523 ± 0.231^b	0.753 ± 0.028^c
P4	2.452 ± 0.049^d	0.058 ± 0.003^a	0.048 ± 0.002^a
P5	1.653 ± 0.033^c	0.001 ± 0.000^a	0.031 ± 0.001^a
P-value	0.000	0.000	0.000

* P1: Basal medium, P2: FOS 1%, P3: Glucomanan 1%, P4: CSSe L Ultrar conc and P5: CSSp L Ultrar conc.

FOS: Fructooligosaccharide, CSSp: coffee silver skin powder, CSSe: active ingredient extraction

* Values represent means $\pm$ S.D. Different superscript letters within a column indicate significant ($p < 0.05$) differences as evaluated by Duncan's multiple range test.

ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรค โดย metabolite ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของพรีไบโอติกส์แต่ละชนิด (Table 4) พบว่าสาร metabolite ในชุดการทดลอง T5 (อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพรีไบโอติกส์และเติมเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผง ที่ผ่านการบ่มด้วยเอนไซม์) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคมากที่สุด สามารถยับยั้ง *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ซึ่งวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนของการยับยั้ง (Inhibition zone) เท่ากับ 1.10 ± 0.30 และ 1.20 ± 0.10 cm รองลงมาได้แก่ ชุด T2, T10, T3 และ T4 ตามลำดับ ($P > 0.05$) แต่สาร metabolite ในชุดการทดลองข้างต้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคน้อยกว่าชุด T11 (ยาปฏิชีวนะ Amoxicillin 10 ug) ซึ่งมีความการยับยั้งเท่ากับ 1.70 ± 0.10 และ 0.90 ± 0.10 cm ตามลำดับ ($P < 0.05$) ในขณะที่ชุดการทดลอง T1 (*B. subtilis*) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน) T6-T9 (อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเพียงสารประกอบพรีไบโอติกส์แต่ละชนิด) ไม่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ได้ (Table 4)

Table 4 Fish pathogenic inhibition activity of metabolite in each probiotic-containing culture medium

	<i>A. hydrophila</i> (cm)	<i>S. agalactiae</i> (cm)
T1	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
T2	0.9 ± 0.2 ^b	1.0 ± 0.1 ^{cd}
T3	0.7 ± 0.1 ^b	0.8 ± 0.1 ^{bc}
T4	0.7 ± 0.2 ^b	0.7 ± 0.1 ^b
T5	1.1 ± 0.3 ^b	1.2 ± 0.1 ^d
T6	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
T7	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
T8	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
T9	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
T10	0.8 ± 0.1 ^b	0.9 ± 0.1 ^{bc}
T11	1.7 ± 0.1 ^c	1.9 ± 0.1 ^e
P-value	0.00	0.00

* T1: Control (Probiotics), T2: Pro+FOS, T3: Pro+Glucmannan, T4: Pro+CSSe, T5: : Pro+CSSp, T6: FOS, T7: Glucmannan, T8: CSSe, T9: CSSp, T10: : CSS and T11: Amoxicillin 10 ug.

Pro: probiotics, CSS: coffee silver skin, CSSp: coffee silver skin powder, CSSe: active ingredient extraction

* Values represent means ± S.D. Different superscript letters within a column indicate significant ($p < 0.05$) differences as evaluated by Duncan's multiple range test.

การทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค นำลูกปลานิลมาฉีดเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ที่ปริมาณเชื้อ 1×10^6 CFU/ml พบว่าความต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* ในปลานิลวัยอ่อน ชุดการทดลอง F3, F4 และ F5 มีเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดตาย เท่ากับ 93.33 ± 6.67 % พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *S. agalactiae* ในปลานิลวัยอ่อนของชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม *B. subtilis* + CSS5% มีเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดตายมากที่สุดที่ 100% (ไม่มีการตาย) พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Table 5)

Table 5 Fry Nile tilapia survival rate against pathogenic bacteria (*A. hydrophila* and *S. agalactiae*).

	<i>A. hydrophila</i> (%)	<i>S. agalactiae</i> (%)
F1	46.67 ± 6.67 ^a	33.3 ± 6.67 ^a
F2	86.67 ± 6.67 ^b	73.33 ± 6.67 ^b
F3	93.33 ± 6.67 ^b	86.67 ± 6.67 ^c
F4	93.33 ± 6.67 ^b	100.00 ± 0.00 ^d
F5	93.33 ± 6.67 ^b	86.67 ± 6.67 ^c
P-value	0.00	0.00

* F1: Control, F2: *B. subtilis*, F3: CSS 5%, F4: CSS 5% + *B. subtilis* and F5: FOS 1% + *B. subtilis*.

FOS: Fructooligosaccharide, CSS: coffee silver skin

* Values represent means ± S.D. Different superscript letters within a column indicate significant ($p < 0.05$) differences as evaluated by Duncan's multiple range test.

วิจารณ์

ผลการศึกษาค้นคว้าประกอบทางโภชนาการของเยื่อหุ้มเมลิ็ดกาแพพบว่าในเยื่อหุ้มเมลิ็ดกาแพสายพันธุ์ราบีเก้าประกอบไปด้วยโปรตีน 19.4 ± 2.1 % ไขมัน 1.8 ± 0.1 % ความชื้น 6.8 ± 1.1 % เกลือ 7.3 ± 0.2 % และคาร์โบไฮเดรต 64.8 ± 0.7 % ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Borrelli et al. (2004); Pourfarzad et al. (2013); Ates and Elmaci (2018); Costa et al. (2018) และ Jiménez-Zamora et al. (2015) ได้กล่าวว่าในเยื่อหุ้มเมลิ็ดกาแพประกอบไปด้วยโปรตีนอยู่ในช่วง 15.4 - 18.8 % ไขมันอยู่ในช่วง 2.1 - 4.6 % ความชื้นอยู่ในช่วง 4.8 - 7.6 % คาร์โบไฮเดรตอยู่ในช่วง 62.1 - 66.9 % และเส้นใยอาหารทั้งหมดอยู่ในช่วง 52.4 - 62.4 % (ซึ่งประกอบด้วยเส้นใยละลายน้ำ 7.1 - 8.8 % และเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำ 49.1- 54.2 %)

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) พบว่าหลังจากบ่มเยื่อหุ้มเมลิ็ดกาแพด้วยเอนไซม์เซลลูเลส Cellusoft® L Ultra conc เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณน้ำตาลมีค่าสูงขึ้นตามเวลาการบ่มที่มากขึ้น ในขณะที่การบ่มด้วยเอนไซม์เซลลูเลส Cellusoft® CR conc ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าสูงขึ้นเพียงเล็กน้อย (Table 1) จากการย่อยด้วยเอนไซม์ L Ultra conc พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส และนิสโตสเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการบ่มมีคุณสมบัติที่สามารถทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ได้ น้ำตาลรีดิวซ์ที่พบมากที่สุด ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส และกาแลคโตส ในรูปของโมโนแซ็กคาไรด์ แลคโตส และมอลโทส ในรูปของไดแซ็กคาไรด์ (Pratt and Cornely, 2013; Scully et al., 2016) หากใช้เอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ในการบ่ม เช่น เอนไซม์แมนนาเนส ผลผลิตน้ำตาลที่ได้ก็อาจจะมีความแตกต่างกันออกไปดังงานวิจัยของชยาภรณ์ (2560) ทำการทดสอบการบ่มกากกาแพด้วยแมนนาเนสจาก *Bacillus* sp. GA2(1) พบว่าน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่พบในผลิตภัณฑ์จากการย่อยกากกาแพประกอบด้วย น้ำตาลแมนโนส แมนโนไบโอส แมนโนไตรโอส และแมนโนเพนตะโอส ซึ่งน้ำตาลฟรุคโตสโอลิโกแซ็กคาไรด์ และฟรุคโตฟูราโนไซด์ที่ได้จากการบ่มเยื่อหุ้มเมลิ็ดกาแพ (Mussatto and Teixeira, 2010) มีศักยภาพในการเป็นพรีไบโอติกส์ สารต้านอนุมูลอิสระ (Borrelli et al., 2004) และสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Antimicrobial) (Rufian-Henares and de la Cueva, 2009) ได้เป็นอย่างดี จากงานวิจัยของ Costa et al. (2018) พบว่าเยื่อหุ้มเมลิ็ดกาแพมีสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยสามารถยับยั้งการสร้าง DPPH (DPPH* inhibition) และ Ferric-reducing antioxidant power และยังพบว่าสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมลิ็ดกาแพ (0.20 - 25 g/l) สามารถยับยั้งการเกิด Hemolysis อย่างไรก็ดีหากใช้สารสกัดจากเยื่อหุ้มเมลิ็ดกาแพในปริมาณที่มากเกินไป (50 และ 100 g/l) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะหายไป นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมลิ็ดกาแพสามารถป้องกันเซลล์จากการบาดเจ็บจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน

สมบัติในการเป็นสารพรีไบโอติกส์จากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ พบว่าชนิดและปริมาณน้ำตาลที่วิเคราะห์ได้จากการบ่มด้วยเอนไซม์เซลลูเลส L Ultra conc มีค่ามากที่สุดในช่วงการทดลองเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผง (CSSp) ซึ่งในผงเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟมีสารประกอบ Melanoidins ถึง 17-23 % ของสารออกฤทธิ์ชีวภาพทั้งหมด (Bioactive compounds) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหารและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ (Costa et al., 2018; Oliveira and Fransca, 2014; Iriundo-DeHond et al., 2019; Iriundo-DeHond et al., 2020) เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟมีเส้นใยอาหาร (Dietary fiber) สูง (50 – 60 %) ประกอบด้วยเส้นใยอาหารที่ละลายน้ำได้ 15 % และเส้นใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ 85 % (Narita and Inouye, 2014) นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบของลิกนินประมาณ 30 % รวมทั้งโพลีแซ็กคาไรด์ต่าง ๆ ได้แก่ กลูแคน 17.8 %, ไซแลน 4.7 %, อาราบิแนน 2 %, กาแลคแทน 3.8 % และแมนแนน 2.6 % Jiménez-Zamora et al. (2015) รายงานว่าเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟสามารถเพิ่มปริมาณโปรไบโอติกส์ เช่น *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) อีกทั้งไม่เพิ่มปริมาณแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Bacteroides* spp. และ *Clostridium* spp. ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Borrelli et al. (2004) ที่พบการเพิ่มขึ้นของระดับโปรไบโอติกส์ Bifidobacteria และการลดลงของเชื้อ *Clostridium* spp. ในขณะที่เชื้อกลุ่ม *Lactobacillus* spp. สามารถเจริญขึ้นได้อย่างจำกัด (ปริมาณไม่สูงเท่ากับ Bifidobacteria) ผลการทดสอบการเป็นสารพรีไบโอติกส์จากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่ได้ มีความคล้ายคลึงกับงานวิจัยนี้ที่พบว่าสารออกฤทธิ์จากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟสามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อโปรไบโอติกส์ในสัตว์น้ำ (*B. subtilis*) โดยทำให้ *B. subtilis* เพิ่มปริมาณสูงขึ้น ในขณะที่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อก่อโรค (*A. hydrophila* และ *S. agalactiae*) ได้ดี (Figure 3)

ผลการศึกษาการส่งเสริมการเจริญจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ *B. subtilis* น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์จาก CSSe: L Ultra และ CSSp: L Ultra สามารถช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ได้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Pan et al. (2009) ที่กล่าวว่าการเติมโอลิโกแซคคาไรด์ 4 ชนิด คือ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ และแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ ส่งเสริมการเจริญของ *L. plantarum* NIT202 และ *L. acidophilus* NIT200 ซึ่งพบว่าโอลิโกแซคคาไรด์ทั้ง 4 ชนิดนี้ถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ดี แม้ว่าจากการทดลองแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จะส่งเสริมการเจริญเติบโตได้ไม่ดีกว่าฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์หรือไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มีการเติมน้ำตาล พบว่าแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้มากกว่าอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ของ CSSp: L Ultra สามารถช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้ โดยเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และในเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟมีน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ เช่นเดียวกับการศึกษาของชยาภรณ์ (2560) รายงานว่าการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค *B. cereus* ถูกยับยั้งได้โดยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก *L. casei* และ *L. plantarum* ที่เลี้ยงในอาหารที่มีการเติมโอลิโกแซคคาไรด์นอกจากนี้ยังพบว่าสารออกฤทธิ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. casei* และ *L. plantarum* ที่เลี้ยงในอาหาร MRS ที่มีการเติมโอลิโกแซคคาไรด์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค *Salmonella paratyphi* ได้เช่นเดียวกันและผลิตภัณฑ์โอลิโกแซคคาไรด์จากกากกาแฟช่วยส่งเสริม *L. plantarum* ในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ได้ดีเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Jimenez-Zamora et al. (2015) ที่รายงานว่าเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟสามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *E. coli* ได้เทียบเท่ากับสารละลายยาปฏิชีวนะออกซิเตตระไซคลิน 2.3 และ 0.9 mg/l ตามลำดับ และจากงานวิจัยของ Rufián-Henares and de la Cueva (2009) ที่กล่าวว่าสารเมลานอยดินที่เกิดจากกระบวนการคั่วเมล็ดกาแฟมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยสารเมลานอยดินจะไปดึงแมกนีเซียมออกจากผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรค และไปจับกับเหล็ก ทำให้เซลล์ของเชื้อก่อโรคเสียสมดุลและตายในที่สุด จากงานวิจัยต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกส์ที่มีประสิทธิภาพดีมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหารทำให้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เพิ่มมากขึ้นและแย่งการใช้สารอาหารของเชื้อก่อโรค รวมถึงการแย่งจับผนังลำไส้กับเชื้อก่อโรคเพื่อป้องกันและลดการอักเสบของลำไส้ นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันในทางเดินอาหารให้สร้างชนิด T-cell และ B-cell และเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ยังสร้างสารเพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดียิ่งขึ้น (Borrelli et al., 2004)

ผลการศึกษาการเสริม *B. subtilis* 5×10^7 CFU/g และพรีไบโอติกส์จากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5 % ในอาหารลูกปลานิลวัยอ่อนเป็นระยะเวลา 1 เดือน สามารถเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุด ($P < 0.05$) หลังจากทดสอบด้วยการฉีดเชื้อ *A. hydrophila*

และ *S. agalactiae* ลูกปลาที่มีอัตราการรอดตาย 93.33 ± 6.67 และ 100.00 ± 0.00 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ และพรีไบโอติกส์ ($P < 0.05$) ซึ่งมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับวิจัยของ Lee et al. (2018) ที่พบว่า ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม *B. subtilis* 1×10^7 CFU/g และแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 0.5 % (MOS) ทดสอบเป็นเวลา 60 วัน หลังจากทดสอบด้วยการฉีดเชื้อ *A. hydrophila* พบเปอร์เซ็นต์อัตราการตายสะสมต่ำกว่าชุดควบคุมที่ไม่เสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Mohammadian et al. (2019) พบว่า ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 1 % β -glucan และ MOS ผสม *Lactobacillus casei* 5×10^7 CFU/kg⁻¹ ทดสอบเป็นเวลา 60 วัน ส่งผลให้ปลาที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* มีอัตราการตายต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ และจากงานวิจัยของ Hasan et al. (2018) พบว่า การเสริมซินไบโอติกส์ (*Bacillus* sp. SJ-10 1×10^8 CFU/g และ β -glucanooligosaccharides 1 %) หลังการฉีดเชื้อ *Streptococcus iniae* 1×10^8 CFU/ml ส่งผลให้อัตราการรอดตายของปลา Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) สูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่เสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์

สรุป

เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟมีฤทธิ์ในการเป็นพรีไบโอติกส์ เมื่อผ่านการบ่มด้วยเอนไซม์เซลลูเลส L Ultra conc พบน้ำตาลฟรุคโตส (Fructose) ซูโครส (Sucrose) และน้ำตาลนิสโตส (Nystose) รวมถึงน้ำตาลรีดิคซ์ในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลในกระตุ้นการเจริญของเชื้อโปรไบโอติกส์ *B. subtilis* จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* แสดงให้เห็นว่าสาร metabolite ที่ผลิตจากเชื้อโปรไบโอติกส์และเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟแบบผงที่ผ่านการบ่มด้วยเอนไซม์ สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำได้ดีที่สุด และเมื่อลูกปลานิลได้รับที่อาหารเสริมโปรไบโอติกส์ (*B. subtilis* 5×10^7 CFU/g) ร่วมกับพรีไบโอติกส์จากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ 5 % ร่วมกับพรีไบโอติกส์จากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ ส่งผลให้ลูกปลามีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* มีอัตราการรอดตายเท่ากับ 93.33 ± 6.67 และ 100.00 ± 0.00 % จึงสรุปได้ว่าการใช้เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟเมื่อผ่านการบ่มด้วยเอนไซม์เซลลูเลส L Ultra conc มีศักยภาพในการเป็นพรีไบโอติกส์ และมีแนวโน้มในการนำไปเสริมหรือทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในสัตว์น้ำ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตรมหาลย์แม่โจ้ สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2563 และทุนศิษย์ก้นกุฏิ ประจำปีการศึกษา 2562 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบริษัทอีลส์คอฟจำกัดสำหรับเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ และคณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์บางอย่างที่ใช้ในการทำวิจัยในการดำเนินการวิจัยให้เสร็จสิ้นสมบูรณ์เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

- คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2537. การปลูกและผลิตกาแฟอาราบิก้าบนที่สูง = Highland Arabica coffee production / ศูนย์วิจัยและพัฒนากาแฟบนที่สูง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. พี.อาร์.คอมพิวเตอร์, เชียงใหม่.
- เฉลิมขวัญ คำคำ และ มัลลิกา ชมนาวัง. 2548. คุณรู้จัก Prebiotics แล้วหรือยัง?. อาหาร. 35: 96-101.
- ชยาภรณ์ วงศ์ศิริเดชชัย. 2560. สมบัติการเป็นพรีไบโอติกของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตจากกากกาแฟด้วยแมนแนนเนสจาก *Bacillus* sp. GA2(1). วิทยานิพนธ์หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ). มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- นฤมล บุญมีนกรบ นาคประสม ขนวิวัฒน์ นิทัศน์วิจิตร พัฒนา เพื่องฟู จริยาพร สังข์ภิรมย์ และ กาญจนา นาคประสม. 2561. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิติก ในระหว่างกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูจากเนื้อผลกาแฟ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 27: 1038-1053.
- ปณรัตน์ ผาดี. 2552. โรคและการวินิจฉัยโรคปลา. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

- Aniansson, G., B. Andersson, R. Lindstedt, and C. Svanborg. 1990. Anti-adhesive activity of human casein against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *Microbial Pathogenesis*. 8(5): 315-323.
- A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis. 15th Edition. Association of Official Analytical Chemist, Washington DC.
- Apiraksakorn, J., S. Nitisinprasert, and E.L. Robert. 2008. Grass degrading β -1, 3-1, 4-Dglucanases from *Bacillus subtilis* GN156: Purification and characterization of glucanase J1 and pJ2 extremely acidic pl. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 149: 53–66.
- Ateş, G., and Y. Elmaci. 2018. Coffee silverskin as fat replacer in cake formulations and its effect on physical, chemical and sensory attributes of cakes. *LWT - Food Science and Technology*. 90: 519-529.
- Bessada, S.M.F., R.C.A. Alves, S.G. Costa, M.A. Nunes, and M.B.P.P. Oliveira. 2018. *Coffea canephora* silverskin from different geographical origins: A comparative study. *Science of the Total Environment*. 645: 1021-1028.
- Borrelli, R.C., F. Esposito, A. Napolitano, A. Ritieni, and V. Fogliano. 2004. Characterization of a new potential functional ingredient: Coffee silverskin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 1338–1343.
- Butt, M.S., and M.T. Sultan. 2011. Coffee and its consumption: benefits and risks. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 51: 363-373.
- Costa, A.S.G., R.C. Alves, A.F. Vinha, S.V.P. Barreira, M.A. Nunes, L.M. Cunha, and M.B.P.P. Oliveira. 2014. Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. *Industrial Crops and Products*. 53: 350–357.
- Costa, A.S.G., R.C. Alves, A.F. Vinha, E. Costa, C.S.G. Costa, M.A. Nunes, A.A. Almeida, A. Santos-Silva, and M.B.P.P. Oliveira. 2018. Nutritional, chemical and antioxidant/pro-oxidant profiles of silverskin, a coffee roasting by-product. *Food Chemistry*. 267: 28-35.
- Chesson, A. 1993. Feed enzymes. *Animal Feed Science and Technology*. 45: 65-79.
- DuBois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28: 350–356.
- Harwood, L.M., and C.J. Moody. 1989. *Experimental Organic Chemistry: Principles and Practice*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Hasan, M.T., W.J. Janga, H. Kim, B. Lee, K.W. Kim, A.W. Hur, S.C. Lim, S.C. Bai, and I.S. Kong. 2018. Synergistic effects of dietary *Bacillus* sp. SJ-10 plus β -glucan oligosaccharides as a synbiotic on growth performance, innate immunity and streptococcosis resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish and Shellfish Immunology*. 82: 544-553.
- Iriondo-DeHond, A., M. Iriondo-DeHond, and M.D. del Castillo. 2020. Applications of Compounds from Coffee Processing By-Products. *Biomolecules*. 10: 1009-1219.
- Iriondo-DeHond, A., M.B. Rios, T. Herrera, A. Rodriguez-Bertos, F. Nuñez, M.I. San Andres, S. Sanchez-Fortun, and M.D. del Castillo. 2019. Coffee silverskin extract: nutritional value, safety and effect on key biological functions. *Nutrients*. 11: 2693.
- Jiménez-Zamora, A., S. Pastoriza, and J.A. Rufián-Henares. 2015. Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*. 61: 12-18.
- Lee, S., K. Katya, A. Hamidoghli, J. Hong, D.J. Kim, and S.C. Bai. 2018. Synergistic effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* WB60 and mannan oligosaccharide (MOS) on growth performance, immunity and disease resistance in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish and Shellfish Immunology*. 83: 283-291.
- Li, P., and D.M. Gatlin. 2005. Evaluation of prebiotic GroBiotic® - A and brewer's yeast as dietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (*Morone chrysops* X *M. saxatilis*) challenged in situ with *Mycobacterium marinum*. *Aquaculture*. 248: 197-205.

- Losada, M.A., and T. Olleros. 2002. Towards a healthier diet of the colon: The influence of fructooligosaccharides and lactobacilli on intestinal health. *Nutrition Research*. 22: 71-84.
- Machado, E.M.S., R.M. Rodriguez-Jasso, J.A. Teixeira, and S.I. Mussatto. 2012. Growth of fungal strains on coffee industry residues with removal of polyphenolic compounds. *Biochemical Engineering Journal*. 60: 87–90.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*. 31: 426–428.
- Mohammadian, T., M. Nasirpoura, M.R. Tabandehb, and M. Mesbaha. 2019. Synbiotic effects of β -glucan, mannan oligosaccharide and *Lactobacillus casei* on growth performance, intestine enzymes activities, immune-hematological parameters and immune-related gene expression in common carp, *Cyprinus carpio*: An experimental infection with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*. 511: 634197.
- Mussatto, S.I., and J.A. Teixeira. 2010. Increase in the fructooligosaccharides yield and productivity by solid-state fermentation with *Aspergillus japonicus* using agro-industrial residues as support and nutrient source. *Biochemical Engineering Journal*. 53: 154-157.
- Narita, Y., and K. Inouye. 2012. High antioxidant activity of coffee silverskin extracts obtained by the treatment of coffee silverskin with subcritical water. *Food Chemistry*. 135: 943–949.
- Narita, Y., and K. Inouye. 2014. Review on utilization and composition of coffee silverskin. *Food Research International*. 61: 16–22.
- Noridayu, A.R., Y.F. Hii, F. Abas, K. Shaari, and N. Lajis. 2011. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of *Pluchea indica* Less. *International Food Research Journal*. 18 (3): 925-929
- Oliveira, L.S. and A.S. Franca. 2014. An Overview of the Potential Uses for Coffee Husks. In *Coffee in Health and Disease Prevention*; Elsevier Inc., London, UK.
- Pan, X., T. Wu, L. Zhang, L. Cai, and Z. Song. 2009. Influence of oligosaccharides on the growth and tolerance capacity of lactobacilli to simulated stress environment. *Letters in Applied Microbiology*. 48(3): 362-367.
- Pourfarzad, A., H. Mahdavian-Mehr, and N. Sedaghat. 2013. Coffee silverskin as a source of dietary fiber in bread-making: Optimization of chemical treatment using response surface methodology. *LWT- Food Science and Technology*. 50: 599-606.
- Pratt, C. W., and K. Cornely. 2013. *Essential Biochemistry*. 3rd Edition.). John Wiley&Sons, New York. USA.
- Rufián-Henares, J.A., and S.P. de la Cueva. 2009. Antimicrobial activity of coffee melanoidins e a study of their metal-chelating properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 432-438.
- Savage, T.F., E.I. Zakrzewska, and J.R. Andreasen. 1997. The effects of feeding mannanoligosaccharide supplemented diets to poults on performance and the morphology of small intestine. *Poultry Science*. 76(1): 139.
- Scully E.D., T. Gries, G.S. arath, N.A. Palmer, L. Baird, M.J. Serapiglia, B.S. Dien, A.A. Boateng, Z. Ge, D.L. Funnell-Harris, P. Twigg, T.E. Clemente, and S.E. Sattler. 2016. Overexpression of SbMyb60 impacts phenylpropanoid biosynthesis and alters secondary cell wall composition in *Sorghum bicolor*. *Plant Journal*. 8: 378-395.
- Schillinger, U., and F. Lucke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* Isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*. 1901-1906.
- Vignoli, A., D.G. Bassoli, and M.T. Benassi. 2011. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: the influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*. 124: 863-868.