แผนงานวิจัย : วิจัยและพัฒนากาแฟ

โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนากระบวนการหมักกาแฟอาราบิก้าคุณภาพ

กิจกรรม : -

ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การพัฒนากระบวนการหมักกาแฟกาแฟอาราบิก้าด้วยจุลินทรีย์

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Development of Arabica coffee fermentation by using microbial fermentation

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าโครงการ นายโกเมศ สัตยาวุธ สังกัดกองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

ผู้ร่วมงาน นางสาวสุกัญญา นิติยนต์ สังกัดกองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

ผู้ร่วมงาน นางสาวฉัตรนภา ข่มอาวุธ สังกัดศูนย์วิจัยและพัฒนาเกษตรหลวงเชียงใหม่

ผู้ร่วมงาน นางสุภัทรา เลิศวัฒนาเกียรติ สังกัดสถานบันวิจัยพืชสวน

Abstracts

Wet process has been considered as a qualitative method in Arabica coffee production since it encourages the accumulation of specific aroma and unique coffee flavor. In this research we aimed to ameliorate Thai Arabica coffee fermentation and accelerate their process for the most applicable and rentable. It was performed during 2010 – 2018 at Post-Harvesting and Processing research and development office and fourth Regional Horticultural Offices using *Coffea arabica* var *Chiangmai 80* from Khun Wang (Chiang Mai province), Wawee (Chiang Rai province), Mu Ser (Tak province) and KhaoKoh (Petchabun province) located around 600 - 1,200 meters above the sea level. After harvesting, the depulped cherries were allowed to demucilage at appropriate conditions by yeast inoculation. The co-fermentation of the hybrid yeast *Sacharomyces Cerevisiae strain BAwine* and wild lactic acid bacteria promoted the demucilage fermentation qualitatively within 48 hours. In addition, the demucilage fermentation periods were accelerated from 48 hours to 18 hours when using AAF techniques which refers to (Acid-Air-Flore Techniques) by application of the acidification to pH 4.50; using the oxidative fermentation (5 ml/hr/day) at ambient temperature combing with hybrid yeast for 20 ppm. It was evident that pectinolytic activity enabled the reduction of time usage in the demucilage process observable from the pH reduction and the reducing sugar released as well as water consumed from the traditional wet process; reduce for 200%; while it is shown the mechanism of polysaccharide modification.

Furthermore, the organoleptic evaluations of these coffees stand out from the traditional fermentation coffee by using the Headspace-SPME-Gas Chromatography-Mass Spectrometry technique, it promotes that AAF techniques coffees tends to have their 'flavor profile' close to fruity-floral note with the higher cupping score of 85 – 87/100. (SCAA Cup Scoring methods)

Keywords: Arabica coffee, Wet process, AAFD techniques, demucilage fermentation, Pectinolytic enzyme, Yeast

บทคัดย่อ

กระบวนการแปรรูปกาแฟแบบเปียกถือเป็นวิธีการเชิงคุณภาพในการผลิตกาแฟอะราบิก้าที่ส่งเสริมผลิตกลิ่นที่เฉพาะเจาะจง รวมทั้งรสชาติกาแฟนุ่มนวลเป็นเอกลักษณ์ การวิจัยครั้งนี้มุ่งที่จะปรับปรุงการหมักกาแฟอะราบิก้าไทยและเร่งกระบวนการหมักกาแฟให้เหมาะสม ประหยัดทรัพยากรสู่ความคุ้มทุน ดำเนินการระหว่างปี ๒๕๕๙ – ๒๕๖๑ ณ กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตรและศูนย์วิจัยส่วนภูมิภาคจำนวน ๔ แห่งโดยใช้กาแฟสายพันธุ์ *Coffea arabica var Chiangmai 80* ซึ่งเป็นพันธุ์แนะนำจากกรมวิชาการเกษตร ในพื้นที่ขุนวาง (จังหวัดเชียงใหม่), วาวี (จังหวัดเชียงราย), ดอยมูเซอ (จังหวัดตาก) และเขาค้อ (จังหวัดเพชรบูรณ์) ตั้งอยู่สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ ๖๐๐ – ๑,๒๐๐ เมตร หลังจากเก็บเกี่ยวแล้วทำการลอกเชอร์รี่และคัดเกรดกะลากาแฟโดยการลอยน้ำเพื่อเข้ากระบวนการหมักย่อยเมือก โดยใช้หัวเชื้อสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดเลือกที่เป็นยีสต์ลูกผสมสายพันธุ์ *Sacharomyces Cerevisiae* สายพันธุ์ *BAwine* และแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหล่งผลิตนั้นโดยเมื่อหมักโดยหัวเชื้อคัดเลือก การหมักย่อยเมือกจะสิ้นสุดภายใน ๔๘ ชั่วโมง

ซึ่งหากมีการพัฒนาการเร่งการหมักโดยเทคนิคเอเอเฟ (AAF techniques) ระยะเวลาการหมัก จะถูกเร่งจาก ๔๘ ชั่วโมงเป็น ๑๘ ชั่วโมง ซึ่งเทคนิคเอเอเฟคือเทคนิคผสานระหว่างกรด การให้อากาศและการใช้เชื้อร่วม โดยการใช้ความเป็นกรดที่ pH ๔.๕๐ โดยใช้การหมักแบบออกซิเดชันที่ ๕ มิลลิลิตรต่อชัวโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิห้องกับใช้เชื้อยีสต์ลูกผสมอัตรา ๒๐ พีพีเอ็ม ซึ่งผลการหมักย่อมเมือกแสดงถึงกิจกรรมเพกติโนไลติกที่ช่วยลดการใช้เวลาในกระบวนการหมักย่อย สังเกตได้จากการลดค่าพีเอชและน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปล่อยออกมารวมถึงกรดอินทรีย์ประเภทกรดแลคติก โดยการหมักโดยวิธีเอเอเฟนี้จะใช้น้ำน้อยกว่ากระบวนการเปียกแบบดั้งเดิมถึงร้อยละ ๒๐๐ ซึ่งการหมักย่อยเมือกดังกล่าวนี้แสดงชัดเจนถึงกลไกของการปรับเปลี่ยน polysaccharide นอกจากนี้ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสของกาแฟจากเทคนิคเอเอเฟมีความโดดเด่นจากกาแฟหมักแบบดั้งเดิม โดยผลจากการทดสอบโดยใช้เทคนิค Headspace-SPME-Gas Chromatography-Mass Spectrometry ส่งเสริมว่าหากผลิตกาแฟโดยเทคนิคเอเอเฟ กาแฟมีแนวโน้มที่จะมีลักษณะใกล้เคียงกับกลิ่นของผลไม้และดอกไม้ และมีคะแนนทดสอบคุณภาพที่สูงขึ้นเป็น ๘๕ – ๘๗/๑๐๐ (ตามวิธีของสภาภัณฑ์กาแฟพิเศษ)

คำหลัก : กาแฟอะราบิก้า, การผลิตกาแฟแบบเปียก, เทคนิคเอเอเฟ, การหมักเมือกกาแฟ, เอนไซม์ย่อยเพคติน, ยีสต์

คำนำ

กาแฟ เป็นเครื่องดื่มที่มีความนิยมอย่างสูงของผู้บริโภคทั่วโลก ได้ถูกจัดเป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมและการส่งออกของประเทศไทย สายพันธุ์ที่มีการนิยมปลูกในประเทศไทยคือ พันธุ์อาราบิก้าที่ปลูกในภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ และพันธุ์โรบัสต้าที่ปลูกในภาคใต้ ซึ่งความแตกต่างของทั้งสองสายพันธุ์ในด้านกลิ่นรส จึงทำให้กาแฟพันธุ์อาราบิก้ามีกลิ่นหอมและรสชาติที่ดีกว่าพันธุ์กาแฟโรบัสต้า และได้รับความนิยมนำมาใช้ผลิตเป็นกาแฟคั่วบดมีคุณภาพและราคาสูงในท้องตลาดปัจจุบัน ในกระบวนการผลิตกาแฟจะเป็นส่วนหนึ่งที่ส่งผลต่อคุณภาพของกลิ่นและรสชาติของกาแฟ โดยทั่วไปจะมีสองวิธี คือ กระบวนการแปรรูปแบบเปียก และกระบวนการแปรรูปแบบแห้ง ซึ่งแต่ละวิธีจะให้คุณภาพของเมล็ดกาแฟและกลิ่นรสที่แตกต่างกัน โดยหลังจากการเก็บเกี่ยวกาแฟจะมีการลอกเชอร์รี่ออก จากนั้นในกระบวนการผลิตกาแฟอาราบิก้าคุณภาพจะใช้กระบวนการแปรรูปแบบเปียก (Sivetz, 1963) เป็นการนำเมล็ดกาแฟที่ผ่านการลอกเปลือกนอกออกแล้วนำมาหมักลงในถังหมัก โดยจุลินทรีย์ธรรมชาติที่มากับเมล็ดกาแฟจะทำการหมักเพื่อย่อยเมือกหุ้มเมล็ดกาแฟ ซึ่งเป็นส่วนของเพคติน น้ำตาล เฮมิเซลลูโลส และส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (Wrigley, 1988) จึงต้องอาศัยกิจกรรมจุลินทรีย์และเอนไซม์ในการย่อยสลาย จุลินทรีย์ที่พบส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียและยีสต์ (Avallone et. al., 2001) จากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการหมักเมล็ดกาแฟอาราบิก้ายังมีน้อยมากในประเทศไทยและการศึกษาที่ผ่านมาจะเป็นงานวิจัยทางด้านคุณภาพ เช่น ปัจจัยการผลิตที่มีผลต่อสารให้กลิ่นรสของกาแฟผสมแบบไทย (จิรสวัสดิ์, 2546) การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบระเหย และกรดอินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมักของกาแฟอาราบิก้าที่ปลูกในประเทศไทย (นนทวัชร, 2547) ทั้งนี้ในปัจจุบันเกษตรกรได้ละเลยกระบวนการหมักดังกล่าวไปมาก โดยเลือกที่จะใช้กระบวนการแปรรูปแบบแห้ง เนื่องมาจากข้อจำกัดด้านเวลา สถานที่ แรงงาน และค่าใช้จ่าย จึงส่งผลให้คุณภาพกาแฟอาราบิก้าลดลง ทำให้ผู้บริโภคไม่ยอมรับ เกิดสารพิษและสารให้กลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ในกาแฟตามท้องตลาด นอกจากนี้ปัญหาขยะและสิ่งเหลือใช้จากกระบวนการหมักกาแฟยังส่งผลกระทบต่อเกษตรกรและผู้ประกอบการกาแฟที่ส่งปัญหาด้านมลภาวะทางอากาศ น้ำและดินในโรงงานผลิตและแปลงกาแฟเอง

กาแฟอาราบิก้าโดยทั่วไปจะนิยมทำการกำจัดเยื่อหุ้มเมล็ดออกโดยใช้วิธีการหมัก (fermentation) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมาก ทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะ (specific flavour) ในกาแฟ เนื่องจากการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทำให้น้ำหมักกาแฟมีสภาพเป็นกรด และเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เพคตินเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการกำจัดเมือก สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างกรดคือ *Enterococcus* ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างกรดแลคติก ทำให้น้ำหมักมีค่าความเป็นกรดด่างลดลงจาก 6.8 เหลือ 4.3 (โกเมศ,2556) จากค่าความเป็นกรดที่ลดลงส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพคตินเนส แต่ก็มีผลดีในแง่ของการป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสีย (Varnam และ Sutherland, 2537) จากนั้นจะทำ

การล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆน้ำเพื่อทำความสะอาดเมล็ดกาแฟ ซึ่งเมล็ดกาแฟที่ได้ในขั้นนี้จะมีชื่อที่เรียกเฉพาะว่า “กาแฟกะลา” (Parchment coffee)

คุณภาพของกาแฟที่มีการย่อยเมือกหุ้มเมล็ดออก (digested mucilage) จะมีคุณภาพที่ดีกว่าเมล็ดกาแฟที่ล้างแบบธรรมดา (washed bean) และดีกว่าเมล็ดกาแฟที่ไม่เอาเมือกออก (mucilage bean) เนื่องจากกาแฟที่ไม่ได้นำเมือกออกนั้น เมื่อนำไปตาก เมือกจะเหนียวติดกับพื้น และเมือกจะทำให้กาแฟแห้งยาก มีโอกาสที่จะปนเปื้อนกับเชื้อจุลินทรีย์ และความร้อนจากดวงอาทิตย์ไม่เพียงพอที่จะทำลายเอนไซม์ เอนไซม์จะทำการย่อยสลายเมือกให้เป็นกรดกาแลคตูโรนิค (galacturonic acid) จากนั้นยีสต์จะเข้าไปเปลี่ยนให้เป็นแอลกอฮอล์ และแบคทีเรียจะเปลี่ยนต่อเป็นกรดอะซิติก และกรดบิวทาริก ทำให้กาแฟมีกลิ่นรสที่ไม่ดี หลังจากทำการกำจัดเยื่อหุ้มเมล็ดออกโดยการหมักกาแฟแล้ว เมล็ดกาแฟจะมีความชื้นประมาณร้อยละ 55-60 ซึ่งอาจจะใช้การตากแห้งแบบตู้อบไฟฟ้า หรือผึ่งตากแดดเกลี่ยบนพื้นปูนซีเมนต์ โดยการตากแห้งจะใช้เวลาประมาณ 7 วัน ขึ้นอยู่กับสภาพดินฟ้าอากาศว่ามีแสงแดดเพียงพอ โดยจะทำการตากกันในช่วงเช้า และกวาดเก็บเป็นกองในตอนบ่ายแล้วนำผ้าใบมาคลุมไว้เพื่อให้ความชื้นของเมล็ดกาแฟใกล้เคียงกัน เนื่องจากบางเมล็ดจะมีความชื้นต่ำเมื่อเก็บกองจะมีการถ่ายเทความชื้น ในวันต่อมาให้เกลี่ยตากใหม่ ทำแบบนี้ไปจนกว่าเมล็ดกาแฟจะมีความชื้นประมาณร้อยละ 12 หลังจากนั้นนำเมล็ดกาแฟไปทำการกะเทาะเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออก เมื่อเมล็ดกาแฟมีความชื้นร้อยละ 12 จะทำการกะเทาะออกง่าย ซึ่งจะเป็นการนำส่วนของเปลือกนอก เปลือกแข็งหุ้มเมล็ด และส่วนของเยื่อออก แต่ในการแปรรูปแบบเปียกนี้เป็นการนำส่วนของเปลือกแข็งหุ้มเมล็ด และเยื่อออกเท่านั้น เนื่องจากเปลือกนอกได้นำออกไปก่อนที่จะมีการกำจัดเมือกแล้ว จึงใช้แรงขัดสีน้อยกว่าแบบแห้ง ส่วนการแปรรูปกาแฟแบบแห้ง กาแฟจะแห้งทั้งเมล็ดจึงต้องนำส่วนของเปลือกนอก เปลือกแข็งหุ้มเมล็ด และส่วนของเยื่อออก เมล็ดกาแฟจะสีกันเอง จากนั้นใช้ลมเป่าเปลือกแข็งหุ้มเมล็ด และส่วนของเยื่อออกโดยการกะเทาะจะใช้เครื่องมือที่มีลักษณะคล้ายกับเครื่องสีข้าว แยกเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออกจากเมล็ดกาแฟ เมล็ดภายในจะขัดสีกันเองจนไม่มีเปลือกติดอยู่ คัดเมล็ดที่เสียออก จากนั้นบรรจุเมล็ดกาแฟลงกระสอบ (Clarke, 1986) การผลิตเมล็ดกาแฟด้วยกระบวนการแบบเปียกและแบบแห้งมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน การทดลองการหมักกาแฟอะราบิก้าโดยจุลินทรีย์จึงเป็นงานวิจัยที่จะพัฒนาเทคโนโลยีหมักกาแฟอาราบิก้า เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียและยีสต์ในกระบวนการหมักที่มีการเติมหัวเชื้อยีสต์ เพื่อย่อยเมือกหุ้มของเมล็ดกาแฟ และนำไปเป็นแนวทางในการควบคุมสภาวะและระยะเวลาการหมักที่มีผลต่อคุณภาพกลิ่นรสซึ่งจะประเมินจากการวัดคุณภาพของเมล็ดกาแฟที่ผ่านการคั่ว และนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเพื่อเพิ่มคุณภาพ ลดต้นทุนและเวลาการผลิต รวมทั้งเป็นการเพิ่มมูลค่าของเมล็ดกาแฟอาราบิก้า โดยมุ่งเน้นการนำไปใช้ประโยชน์จากการสกัดสารสำคัญและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารและการเกษตร

วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์

1.วัสดุทดลอง

1.1 กาแฟ สายพันธุ์ *Coffea Arabica cv. Chiangmai 80* ชั่วที่ ๗ ที่เป็นสายพันธุ์กาแฟแนะนำ ปรับปรุงพันธุ์ในประเทศไทยจากภาคเหนือและศูนย์วิจัยเกษตรหลวง จังหวัดเชียงใหม่

1.2 เชื้อจุลินทรีย์ *Saccharomyces spp.* Strain *BAwine* คัดเลือกโดยกรมวิชาการเกษตร

1.3 ตัวกรองสาร Semi-phase microextraction (SPME) ในการสกัดขั้นตอน liquid-liquid extraction ตามคู่มือ Visiprep (Supelco) โดยเปรียบเทียบระหว่าง ตัวกรอง Semi-phase extraction (SPE) C18 silicate (ENVI-18, 0.5g, 6ml) และ Copolymer Styrene-divinylbenzene (PS-DVB, Bond Elut PPL, 0.2g, 3 ml) โดยใช้ตัวทำละลายเดียวกับสารสกัดโดยใช้ความเร็วในการบีบผ่านตัวกรอง 0.5 $mL.min^{-1}$

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีเพื่อใช้ในการทดสอบการหมัก ได้แก่

(1) Tartaric Acid

(2) Diammonium sulfate

2.2 สารเคมีเพื่อใช้เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยใช้น้ำ Demineralize ในการทำละลายเตรียมที่ความเข้มข้น 10 $mg.L^{-1}$ เก็บในขวดทึบเพื่อป้องกันแสงและเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 สัปดาห์ คือ

(1) Lactic acid

3. เครื่องมือ

3.1 <u>Gas Chromatography – Mass spectrometry</u> ที่มีปั๊มแปรผันแรงดันต่ำ(ยี่ห้อ Perkins Elmers), หัวฉีดชนิด Manual injection ที่แบ่งปริมาณฉีดที่ 20 ไมโครลิตร, คอลัมน์ชนิด 5MS Elite (EnviroSep-PP-PAH (EPA Method 610) 125 x 4.6 mm), ตัวตรวจจับสัญญาณชนิด MS (Shimadzu),เครื่องแปรผล (รุ่น SPD-SAV) และโปรแกรมแปรผล (MS analyser), ความเร็วของ Mobile Phase ที่ 0.8 $mL.min^{-1}$ และใช้เวลาในการวิเคราะห์ 30 นาที

3.2 Spectroscopy Ultraviolet

3.3 Bioreacter ยี่ห้อ Infors HT ที่มีโปรแกรมควบคุม Eve

4. **กลิ่นมาตรฐาน** Scent of Wine (Nez du cafe) จากบริษัท Aromes de VIN ประกอบไปด้วย 54 กลิ่นหลักในกาแฟเพื่อใช้ในการฝึกและทดสอบ Cup tasting

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและยีสต์ต่อผลของการหมักกาแฟอาราบิก้าคุณภาพ

1.1. การเตรียมหัวเชื้อสำหรับการทดลอง

เตรียมหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* C116 คัดเลือกโดยกรมวิชาการเกษตรที่ได้มาแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยว โดยใช้เทคนิควิธี Streak plate บน จานอาหารวุ้น Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเก็บไว้บน slant Potato Dextrose Agar (PDA)

เตรียมเชื้อยีสต์ BAwine ที่เป็นยีสต์ผลิตแอลกอฮอล์ทางการค้า โดยชั่ง 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่ให้ความร้อนมีอุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส 15 นาที

1.2. ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ต่อผลของการหมักกาแฟอาราบิก้าและคุณภาพกาแฟอาราบิก้าที่ได้จากการหมักในห้องปฏิบัติการ

ทดลองนำผลมากาแฟสุกมาแช่น้ำ ทำการลอกส่วนเปลือกนอกออกด้วยมือ คัดเลือกเมล็ดเสียและ เมล็ดที่ลอยน้ำออก ล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด บรรจุเมล็ดกาแฟลงในขวดหมักที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จำนวน 500 กรัม ทำการหมัก 3 วิธีคือ หมักโดยเติมหัวเชื้อของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* C116 ยีสต์ BAwine และไม่เติมหัวเชื้อเป็นตัวควบคุมหรือการหมักตามธรรมชาติ

แผนการทดลอง ออกแบบการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 กรรมวิธี 5 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม ไม่เติมหัวเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 ใส่หัวเชื้อ C116 ร้อยละ 2

กรรมวิธีที่ 3 ใส่หัวเชื้อ BAwine ร้อยละ 2

จากนั้นนำขวดหมักที่บรรจุเมล็ดกาแฟมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปิดฝา ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเริ่มทำการหมัก ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมงเพื่อนำมาทำการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบผลการทดสอบกับการแปรรูปแบบแห้ง(Dry process) เพื่อแสดงความสำคัญของกระบวนการหมักกาแฟอาราบิก้า

การบันทึกข้อมูล ลักษณะเมือกหุ้มผิวเมล็ดที่ลดลงโดยวัดปริมาณค่าความขุ่น (turbidity), ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Acids), ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และ การเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์

- ตรวจสอบสายพันธ์เชื้อแบคทีเรียและวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีระหว่างการหมักกาแฟอาราบิก้า โดยการทดสอบด้วยชุดทดสอบ API และการทดสอบวิเคราะห์สายพันธ์แบคทีเรียตลอดระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง
- ตรวจสอบคุณภาพของกาแฟอาราบิก้า โดยใช้การคั่วเมล็ดกาแฟแบบคั่วกลาง หลังจากหมักเสร็จแล้วล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไปตากแดดบนลานปูนซีเมนต์ปูด้วยผ้าใบหรือสแลน ประมาณ 3-4 วัน คอยพลิกกลับเมล็ดจนเมล็ดแห้ง สุ่มตัวอย่างไปวัดความชื้นให้มี

เหลือประมาณไม่เกิน 12 % นำไปสีเปลือกกาแฟออกโดยใช้มือแกะเปลือกแห้งออก ทำการบรรจุเก็บในถุงพลาสติกสุญญากาศนำเมล็ดกาแฟที่ผ่านการสีเปลือกออกแล้ว มาคั่วด้วยเครื่องคั่วเมล็ดกาแฟ Home coffee roaster CR-100 โดยทำการคั่วในระดับปานกลาง (medium roast) ใช้เวลาการคั่วประมาณ 8-9 นาที เมื่อคั่วเสร็จแล้วจะได้เมล็ดกาแฟคั่วที่มีสีน้ำตาลดำ คัดเลือกเมล็ดที่คั่วไม่หมดซึ่งจะยังมีเปลือกสี น้ำตาลอ่อนบางๆอยู่ออกจากเมล็ดที่คั่วได้หมดซึ่งจะได้เมล็ดกาแฟที่มีสีน้ำตาลดำทั้งเมล็ด เก็บตัวอย่าง เมล็ดกาแฟที่ผ่านการคั่วใส่ถุงพลาสติกสุญญากาศ นำตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่วไปทำการวิเคราะห์ด้าน กายภาพ วิเคราะห์ด้านเคมี และการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญที่ให้กลิ่นในกาแฟ

การบันทึกข้อมูล

- การวิเคราะห์การหมักเมล็ดกาแฟ ได้แก่ ลักษณะเมือกหุ้มผิวเมล็ด, ความเป็นกรด-ด่าง (pH), ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Acidity : AOAC, 2000), วิเคราะห์การเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์

- การวิเคราะห์เมล็ดกาแฟหลังคั่ว ได้แก่ ความชื้นจากเมล็ดกาแฟโดยใช้วิธีของ The Official Analytical Chemists (AOAC, 2000), ค่าสีของเมล็ดกาแฟโดยใช้เครื่องวัดสี Chroma Meter, ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH), ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity : AOAC, 2000), ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solids), ปริมาณเถ้าของเมล็ดกาแฟ (Ash), น้ำหนักเมล็ดกาแฟ ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีเจลดาห์ล, ปริมาณสารคาเฟอีน (Caffeine) และธีโอโบรมีน (Theobromine) ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC), วิเคราะห์สารสำคัญที่ให้กลิ่นในกาแฟด้วยเครื่องจมูกอิเล็กทรอนิกส์ (Electronic nose : E-nose), การทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยให้ผู้ทดสอบชิมที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 5 คน ทดสอบชิมประเมินความชอบในคุณลักษณะของกาแฟในแต่ละด้าน คือ ลักษณะปรากฏ (Visuel) กลิ่น (Olfactive) รสชาติ (Gustative) และความพึงพอใจ (General Impression)

- การวิเคราะห์ทางสถิติ ใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวิธี CRD one way ANOVA ใช้การเปรียบเทียบแบบ Tukey และโปรแกรม XLSTAT

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาการพัฒนาการหมักกาแฟอาราบิก้าด้วยจุลินทรีย์ในแปลงทดสอบ

2 ศึกษาการพัฒนาการหมักกาแฟอาราบิก้าด้วยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกและคุณภาพกาแฟอาราบิก้าที่ได้จากการหมักในแปลงทดสอบ

2.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและยีสต์ระหว่างการหมักเมือกกาแฟโดยวิธีปกติในสถานีทดลองอย่างน้อย 4 สถานี

2.2 ทดลองนำผลมากาแฟสุกมาแช่น้ำ ทำการลอกส่วนเปลือกนอกออกด้วยมือ คัดเลือกเมล็ดเสียและ   เมล็ดที่ลอยน้ำออก ล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด บรรจุเมล็ดกาแฟลงในขวดหมักที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จำนวน 500 กรัม ทำการหมัก 3 วิธีคือ หมักโดยเติมหัวเชื้อของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่คัดเลือกและไม่เติมหัวเชื้อเป็นตัวควบคุมหรือการหมักตามธรรมชาติ จาก 4 สถานี

แผนการทดลอง ออกแบบการทดลองแบบ CRD จำนวน 2 กรรมวิธี 5 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม ไม่เติมหัวเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 ใส่หัวเชื้อ BAwine ร้อยละ 2

จากนั้นนำขวดหมักที่บรรจุเมล็ดกาแฟมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปิดฝา ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเริ่มทำการหมัก ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมงเพื่อนำมาทำการวิเคราะห์ผล เปรียบเทียบผลการทดสอบกับการแปรรูปแบบแห้ง(Dry process) เพื่อแสดงความสำคัญของกระบวนการหมักกาแฟอาราบิก้า

การบันทึกข้อมูล ลักษณะเมือกหุ้มผิวเมล็ดที่ลดลงโดยวัดปริมาณค่าความขุ่น (turbidity), ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Acids), ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และ การเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์

2.3 ตรวจสอบสายพันธ์เชื้อแบคทีเรียและวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีระหว่างการหมักกาแฟอาราบิก้า โดยการทดสอบด้วยชุดทดสอบ API และการทดสอบวิเคราะห์สายพันธ์แบคทีเรียตลอดระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง

2.4 ตรวจสอบคุณภาพของกาแฟอาราบิก้า โดยใช้การคั่วเมล็ดกาแฟแบบคั่วกลาง หลังจากหมักเสร็จแล้วล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไปตากแดดบนลานปูนซีเมนต์ปูด้วยผ้าใบหรือสแลน ประมาณ 3-4 วัน คอยพลิกกลับเมล็ดจนเมล็ดแห้ง สุ่มตัวอย่างไปวัดความชื้นให้มีเหลือประมาณไม่เกิน 12 % นำไปสีเปลือกกาแฟออกโดยใช้มือแกะเปลือกแห้งออก ทำการบรรจุเก็บ ในถุงพลาสติกสุญญากาศนำเมล็ดกาแฟที่ผ่านการสีเปลือกออกแล้ว มาคั่วด้วยเครื่องคั่วเมล็ดกาแฟ Home coffee roaster CR-100 โดยทำการคั่วในระดับปานกลาง (medium roast) ใช้เวลาการคั่วประมาณ 8-9 นาที เมื่อคั่วเสร็จแล้วจะได้เมล็ดกาแฟคั่วที่มีสีน้ำตาลดำ คัดเลือกเมล็ดที่คั่วไม่หมดซึ่งจะยังมีเปลือกสี น้ำตาลอ่อนบางๆอยู่ออกจากเมล็ดที่คั่วได้หมดซึ่งจะได้เมล็ดกาแฟที่มีสีน้ำตาลดำทั้งเมล็ด เก็บตัวอย่าง เมล็ดกาแฟที่ผ่านการคั่วใส่ถุงพลาสติกสุญญากาศ นำตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่วไปทำการวิเคราะห์ด้าน กายภาพ วิเคราะห์ด้านเคมี และการวิเคราะห์ปริมาณสาระสำคัญที่ให้กลิ่นในกาแฟ

การบันทึกข้อมูล ด้านการวิเคราะห์คุณภาพเมล็ดกาแฟจากการหมัก , ด้านการวิเคราะห์เมล็ดกาแฟหลังคั่ว และการวิเคราะห์ทางสถิติ ใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ

ขั้นตอนที่ 3 การศึกษากระบวนการเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้า

3 ศึกษากระบวนการเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้า

3.1 ทดลองแปรผันปัจจัยในการหมักเพื่อเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้าในห้องทดลอง

แผนการทดลอง ออกแบบการทดลองแบบ 3x3+1 Factorial in RCBD จำนวน 3 ซ้ำ ในอุณหภูมิตลอดระยะเวลาการหมัก 2 ระดับได้แก่ 30 และ 40 องศาเซลเซียส

ปัจจัยที่ 1 หมักโดยการปรับปริมาณเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 3%,2.5% และ 2%

ปัจจัยที่ 2 หมักโดยการเพิ่มปริมาณออกซิเจนตลอดระยะเวลาการหมักปริมาณ 30, 40, 50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

การบันทึกข้อมูล ลักษณะเมือกหุ้มผิวเมล็ดที่ลดลงโดยวัดปริมาณค่าความขุ่น (turbidity), ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Acids), ความเป็นกรด-ด่าง(pH), การเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ และปริมาณเกลือ

3.2 ทดลองแปรผันปัจจัยในการหมักเพื่อเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้าในห้องทดลอง

แผนการทดลอง ออกแบบการทดลองแบบ 3x3+1 Factorial in RCBD จำนวน 3 ซ้ำ ในอุณหภูมิตลอดระยะเวลาการหมัก 2 ระดับได้แก่ 30 และ 40 องศาเซลเซียส

ปัจจัยที่ 1 หมักโดยการปรับปริมาณกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 3%, 5% และ 10%

ปัจจัยที่ 2 หมักโดยการเพิ่มปริมาณออกซิเจนตลอดระยะเวลาการหมักปริมาณ 30, 40, 50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

การบันทึกข้อมูล ลักษณะเมือกหุ้มผิวเมล็ดที่ลดลงโดยวัดปริมาณค่าความขุ่น (turbidity), ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Acids), ความเป็นกรด-ด่าง(pH)และ การเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์

3.3 ทดสอบควบคุมปัจจัยต่อปริมาณเชื้อโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบควบคุมได้เพื่อศึกษาปัจจัยอื่นที่ส่งผลและควบคุมปริมาณแก๊สที่ผลิต

3.4 ทดลองหมักกาแฟอาราบิก้าในบ่อหมักจริงอย่างน้อย 2 สถานีวิจัยโดยใช้การแปรผันปัจจัยที่ได้จากการพัฒนาการเร่งการหมัก

การบันทึกข้อมูล การวิเคราะห์การหมักเมล็ดกาแฟ ได้แก่ ลักษณะเมือกหุ้มผิวเมล็ด, ความเป็นกรด-ด่าง (pH), ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Acidity : AOAC, 2000), วิเคราะห์การเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ คุณภาพเมล็ดกาแฟหลังคั่วและการทดสอบทางประสาทสัมผัส

3.5 ทดสอบคุณภาพกาแฟเปรียบเทียบกับวิธีปกติและคำนวนต้นทุนการทดลองเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักแบบเดิม แบบใช้เครื่องจักร แบบการใช้สารเคมีและวิธีที่พัฒนามาใหม่

ขั้นตอนที่ 4 การศึกษากระบวนการหมักเพคตินในการย่อยเมือกกาแฟและการประยุกต์ใช้ในแปลงทดลอง

4 ศึกษาการพัฒนาการหมักกาแฟอาราบิก้าด้วยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกและคุณภาพกาแฟอาราบิก้าที่ได้จากการหมักในแปลงทดสอบ

4.1 ศึกษากระบวนการย่อยเมือกโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่งกราด

4.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและยีสต์ระหว่างการหมักเมือกกาแฟโดยวิธีปกติในสถานีทดลองอย่างน้อย 4 สถานี

4.3 ทดลองนำผลมากาแฟสุกมาแช่น้ำ ทำการลอกส่วนเปลือกนอกออกด้วยมือ คัดเลือกเมล็ดเสียและ เมล็ดที่ลอยน้ำออก ล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด บรรจุเมล็ดกาแฟลงในขวดหมักที่ผ่าน

การฆ่าเชื้อ จำนวน 500 กรัม ทำการหมัก 3 วิธีคือ หมักโดยเติมหัวเชื้อของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่คัดเลือกและไม่เติมหัวเชื้อเป็นตัวควบคุมหรือการหมักตามธรรมชาติ จาก 4 สถานี

แผนการทดลอง ออกแบบการทดลองแบบ CRD จำนวน 2 กรรมวิธี 5 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม ไม่เติมหัวเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 การใช้เทคนิคใหม่ที่ได้จากขั้นตอนที่ 3

จากนั้นนำขวดหมักที่บรรจุเมล็ดกาแฟมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปิดฝา ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเริ่มทำการหมัก ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมงเพื่อนำมาทำการวิเคราะห์ผล เปรียบเทียบผลการทดสอบกับการแปรรูปแบบแห้ง(Dry process) เพื่อแสดงความสำคัญของกระบวนการหมักกาแฟอาราบิก้า

การบันทึกข้อมูล ลักษณะเมือกหุ้มผิวเมล็ดที่ลดลงโดยวัดปริมาณค่าความขุ่น (turbidity), ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Acids), ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และ การเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์

4.4 ตรวจสอบสายพันธ์เชื้อแบคทีเรียและวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีระหว่างการหมักกาแฟอาราบิก้า โดยการทดสอบด้วยชุดทดสอบ API และการทดสอบวิเคราะห์สายพันธ์แบคทีเรียตลอดระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง

4.5 ตรวจสอบคุณภาพของกาแฟอาราบิก้า โดยใช้การคั่วเมล็ดกาแฟแบบคั่วกลาง หลังจากหมักเสร็จแล้วล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไปตากแดดบนลานปูนซีเมนต์ปูด้วยผ้าใบหรือสแลน ประมาณ 3-4 วัน คอยพลิกกลับเมล็ดจนเมล็ดแห้ง สุ่มตัวอย่างไปวัดความชื้นให้มีเหลือประมาณไม่เกิน 12 % นำไปสีเปลือกกาแฟออกโดยใช้มือแกะเปลือกแห้งออก ทำการบรรจุเก็บ ในถุงพลาสติกสุญญากาศนำเมล็ดกาแฟที่ผ่านการสีเปลือกออกแล้ว มาคั่วด้วยเครื่องคั่วเมล็ดกาแฟ Home coffee roaster CR-100 โดยทำการคั่วในระดับปานกลาง (medium roast) ใช้เวลาการคั่วประมาณ 8-9 นาที เมื่อคั่วเสร็จแล้วจะได้เมล็ดกาแฟคั่วที่มีสีน้ำตาลดำ คัดเลือกเมล็ดที่คั่วไม่หมดซึ่งจะยังมีเปลือกสี น้ำตาลอ่อนบางๆอยู่ออกจากเมล็ดที่คั่วได้หมดซึ่งจะได้เมล็ดกาแฟที่มีสีน้ำตาลดำทั้งเมล็ด เก็บตัวอย่าง เมล็ดกาแฟที่ผ่านการคั่วใส่ถุงพลาสติกสุญญากาศ นำตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่วไปทำการวิเคราะห์ด้าน กายภาพ วิเคราะห์ด้านเคมี และการวิเคราะห์ปริมาณสาระสำคัญที่ให้กลิ่นในกาแฟ

การบันทึกข้อมูล ด้านการวิเคราะห์คุณภาพเมล็ดกาแฟจากการหมัก , ด้านการวิเคราะห์เมล็ดกาแฟหลังคั่ว และการวิเคราะห์ทางสถิติ ใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ

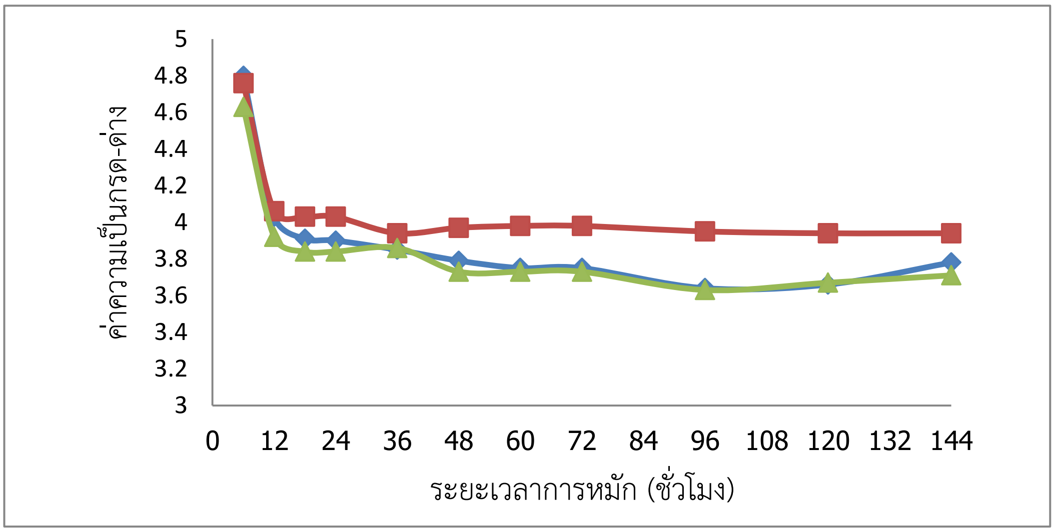
ระยะเวลา ตุลาคม 2559 – กันยายน 2561

สถานที่ดำเนินการ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่, ศูนย์วิจัยพืชสวนวาวี(เชียงราย),
ศูนย์วิจัยพืชสวนเขาค้อ(เพชรบูรณ์), ศูนย์วิจัยพืชสวนมูเซอ(ตาก)
กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

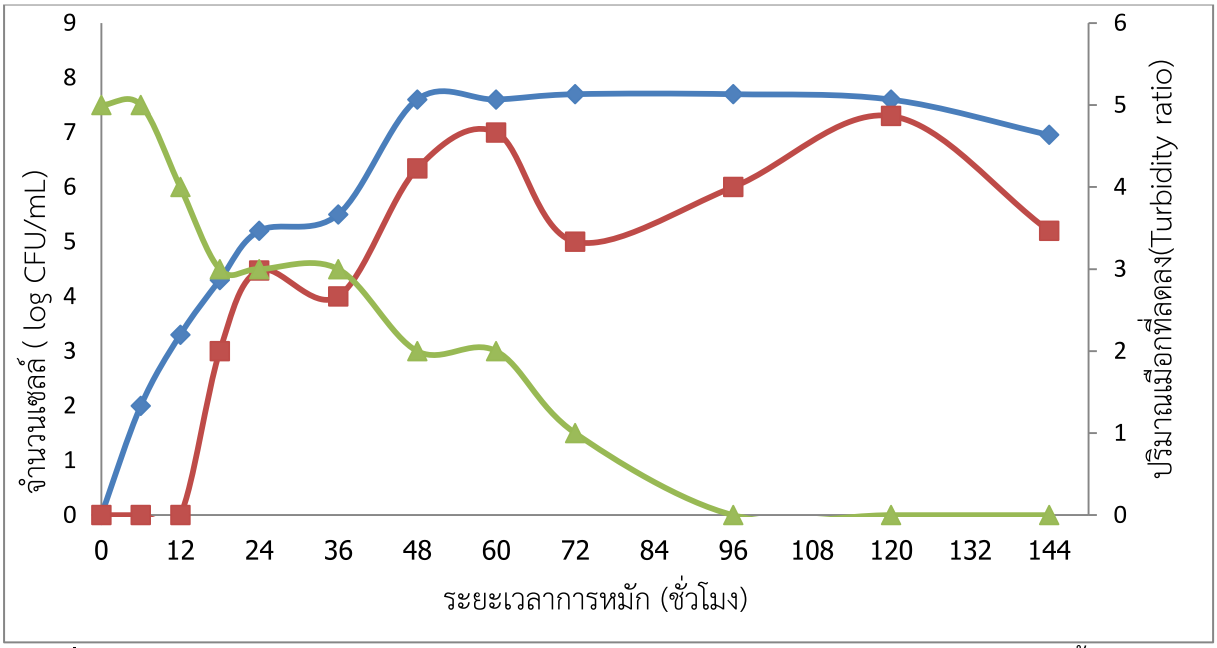
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. <u>ผลการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ต่อผลของการหมักกาแฟอาราบิก้าและคุณภาพกาแฟอาราบิก้าที่ได้จากการหมักในห้องปฏิบัติการโดยเติมหัวเชื้อของยีสต์ C116 และ BAwine</u>

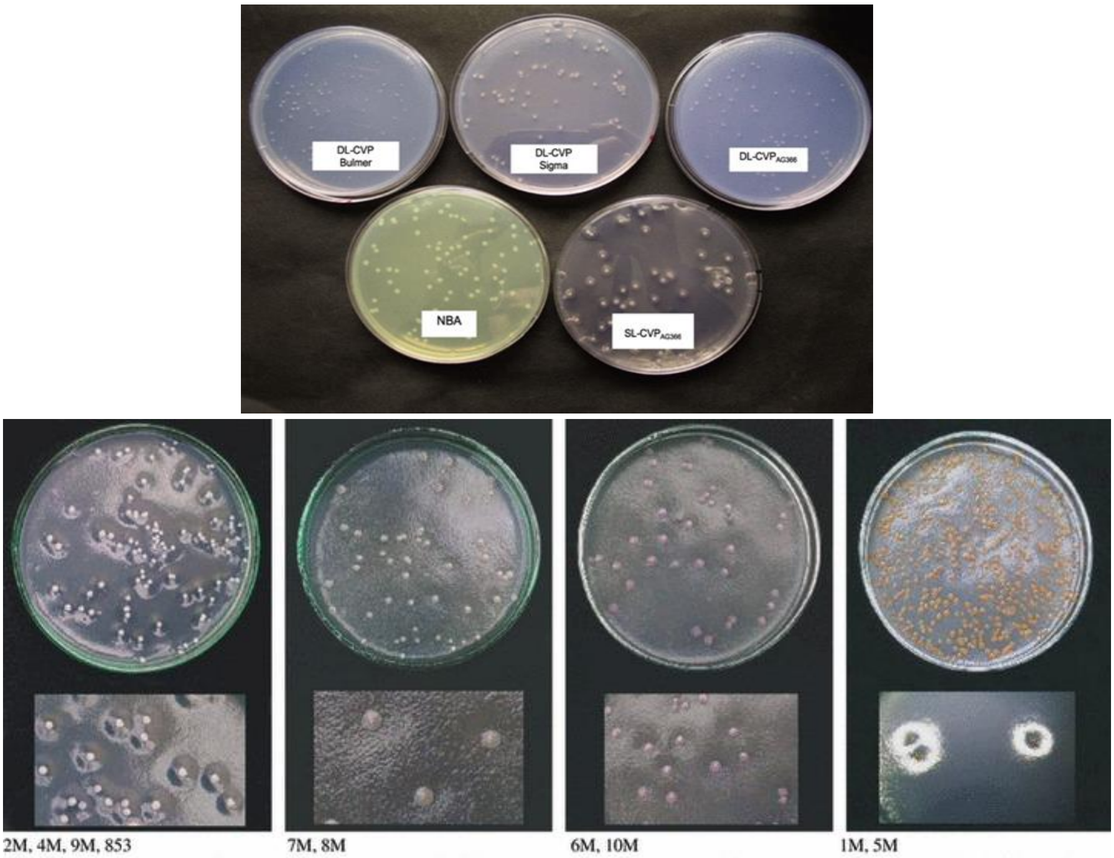
พบว่าเชื้อยีสต์จะมีการเจริญต่อร่วมกับแบคทีเรียอย่างรวดเร็วตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกของการหมักเป็นต้นไป หลังจากชั่วโมงที่มีปริมาณ pH ลดลงระหว่าง 4.0 – 3.5 ตามภาพที่ 1 และพบการลดลงของปริมาณเมือกอย่างต่อเนื่อง โดยที่ 60 ชั่วโมงเป็นต้นไปมีการลดลงของเมือกอย่างรวดเร็วและหมดลงในระยะเวลาหมักครบ 96 ชั่วโมง แสดงให้เห็นสัมพันธ์กับค่าความเป็นกรดด่างที่มีการลดลงเมื่อมีการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์เพิ่มขึ้น โดยเป็นผลมาจากแบคทีเรียในกลุ่มที่สร้างกรดทำให้น้ำหมักมีปริมาณกรดเพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงจนมีค่าเท่ากับคือ 3.64 ในขณะที่การเจริญของเชื้อแบคทีเรียจะคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 60 และลดลงในช่วงท้ายของการหมักโดยมีจำนวนเซลล์ 6.95 log CFU/ml และการเจริญของเชื้อยีสต์จะมีปริมาณลดลงในชั่วโมงที่ 72 และจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 จนถึงในช่วงท้ายของการหมัก จำนวนเซลล์จะลดลงเหลือ 5.20 log CFU/ml ดังแสดงในภาพที่ 2 และพบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* มีผลต่อการหลุดของเมือกและจากเจริญเติบโตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 โดยแบคทีเรียที่ส่งผลต่อการหลุดของเมือกนั้นเมื่อทำการทดสอบนั้นคือแบคทีเรียชนิด *Erwinia dissolvens* โดยเป็นกลุ่มเดียวกับ Enterobactor ที่ได้ทำการตรวจสอบทำให้ทราบถึงเชื้อจุลินทรีย์เฉพาะที่ช่วยในการหมักกาแฟและสามารถนำไปศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อได้



ภาพที่ 1 ค่าความเป็นกรดด่างระหว่างเวลาการหมักกาแฟอาราบิก้าโดยเติมหัวเชื้อของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* BAwine และค่าความเป็นกรดด่าง แบคทีเรีย ( )ยีสต์ ( ) และค่าความเป็นกรดด่างในเมือกที่ลดลง ( )



ภาพที่ 2 การเจริญของยีสต์และแบคทีเรียในระหว่างเวลาการหมักกาแฟอาราบิก้าโดยเติมหัวเชื้อของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* BAwine, ปริมาณเมือกที่ลดลง แบคทีเรีย (—◆—) ยีสต์ (—■—) และเมือก (—▲—)



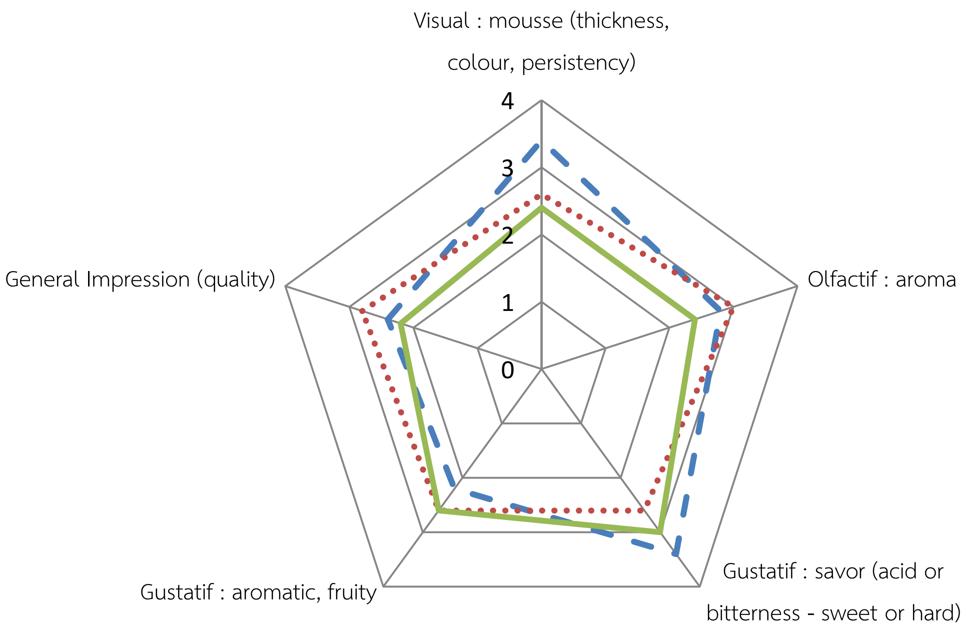
ภาพที่ 3 เปรียบเทียบเชื้อ *Enterobacteria* และเชื้อ *Erwinia dissolvens* ที่จำแนกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Cristal Violet Pectate

พบว่าเมล็ดกาแฟคั่วที่ผ่านการหมักด้วยยีสต์ BAwine มีคุณสมบัติทางกายภาพที่โดดเด่น โดยเฉพาะค่าความชื้น ค่าความเป็นกรดด่าง ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ปริมาณโปรตีน ปริมาณกรดทั้งหมด รวมทั้งค่าสีแดง ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมที่แม้จะมีปริมาณสารคาเฟอีน (Caffeine) มากกว่า 1,780±0.476 มิลลิกรัมต่อลิตรแต่สีเมล็ดจะมีค่าความสว่างสูงส่งผลต่อคุณลักษณะปรากฏของเมล็ดกาแฟที่คุณภาพต่ำกว่า ทั้งนี้ Gokulakrishnan (2005) ได้อธิบายกระบวนการลดปริมาณสารคาเฟอีนด้วยจุลินทรีย์บางกลุ่มที่เกิดระหว่าการหมักโดยเฉพาะ *Pseudomonas* sp. และ *Aspergillus* sp.

ผลทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าคะแนนจากเมล็ดกาแฟคั่วที่ผ่านการหมักด้วยยีสต์ BAwine มีคะแนนคุณภาพลักษณะทางประสาทสัมผัสความชอบโดยรวมสูงที่สุดคือ 3.2±0.45 จากคะแนนเต็ม 5 และเมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่าคะแนนเฉลี่ยการยอมรับของผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัสในทุกลักษณะทางประสาทสัมผัสต่างๆ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยกลุ่มผู้ทดสอบได้รับการฝึกฝนมาแล้วเป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 60 ชั่วโมงในการทดสอบคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของกาแฟกับสารมาตรฐาน

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบคุณภาพของเมล็ดกาแฟคั่วที่ผ่านการหมักโดยยีสต์ 3 กรรมวิธี

คุณภาพ ทางกายภาพ	*Saccharomyces cerevisiae* C116	BAwine	ชุดควบคุม
ความชื้น	1.14±0.19	1.69±0.43	1.06±0.24
เถ้า	3.39±0.35	3.17±0.06	3.29±0.13
สี - L* (ความสว่าง)	36.79±0.92	36.57±1.19	37.34±0.92
- a* (สีแดง-สีเขียว)	4.56±0.16	4.72±0.19	4.74±0.14
- b* (สีเหลือง-สีน้ำเงิน)	3.28±0.61	3.44±0.47	3.74±0.34
ปริมาณกรดทั้งหมด	0.005±0.00	0.006±0.00	0.006±0.00
ความเป็นกรดด่าง	5.32±0.17	5.41±0.20	5.31±0.17
ปริมาณของแข็งละลายได้	0.70±0.10	0.87±0.21	0.73±0.12
น้ำหนัก	6.17±0.15	6.07±0.20	6.08±0.38
โปรตีน	2.25±0.01	2.28±0.04	2.27±0.04
Caffeine	1,330±0.167	930±0.516	1,780±0.476
Theobromine	1,540±0.128	1,230±0.395	1,890±0.364

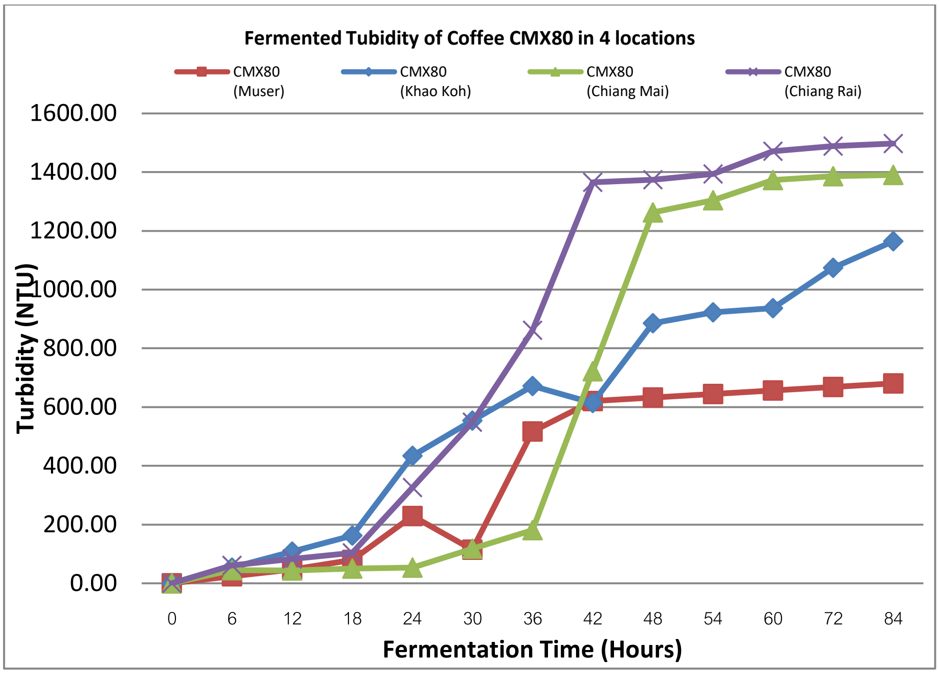


ภาพที่ 4 แผนภูมิแสดงคะแนนการประเมินอย่างง่ายทั้งหมดกาแฟคั่วที่ผ่านการหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* C116 (—)กาแฟคั่วที่ผ่านการหมักด้วยยีสต์ BAwine(....) กาแฟคั่วที่เป็นชุดควบคุม(---)

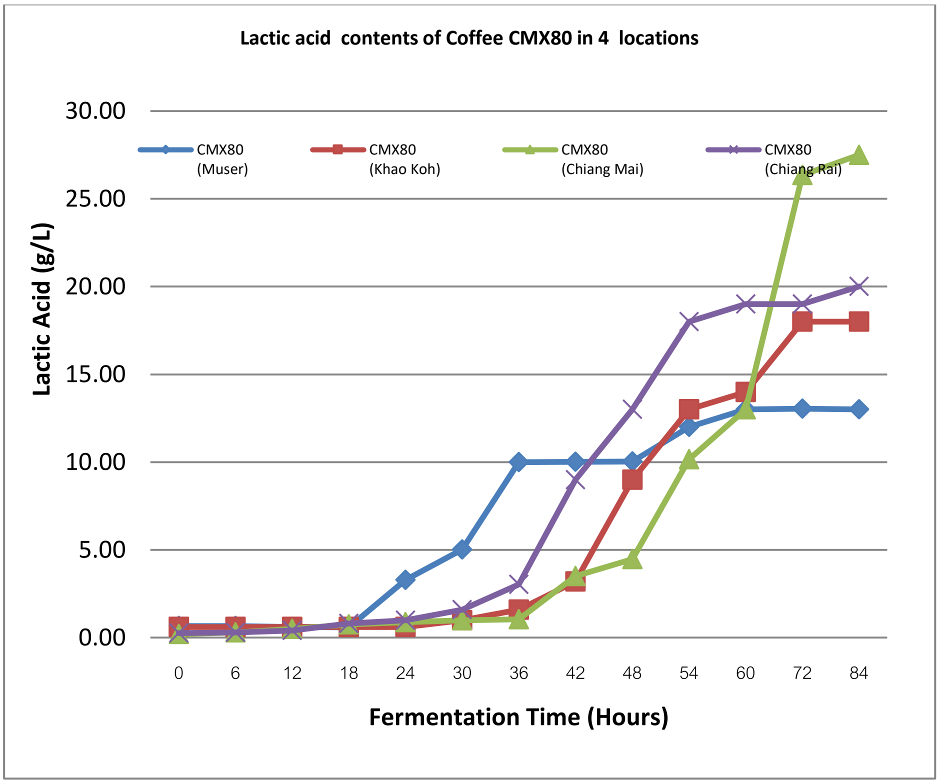
2. ผลการศึกษาการพัฒนาการหมักกาแฟอาราบิก้าด้วยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกและคุณภาพกาแฟอาราบิก้าที่ได้จากการหมักในแปลงทดสอบ

ผลกระบวนการหมักเพื่อรวบรวมข้อมูลการหมักเมือกของจุลินทรีย์และผลการทดลองหมักเมือกกาแฟเพื่อลำดับความสำคัญในแหล่งเพาะปลูกกาแฟของกรมวิชาการเกษตรทั้งหมด 4 แหล่ง ได้แก่ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ ศูนย์วิจัยเกษตรที่สูงเชียงราย ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเพชรบูรณ์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจังหวัดตากในเวลาทั้งสิ้น 84 ชั่วโมง

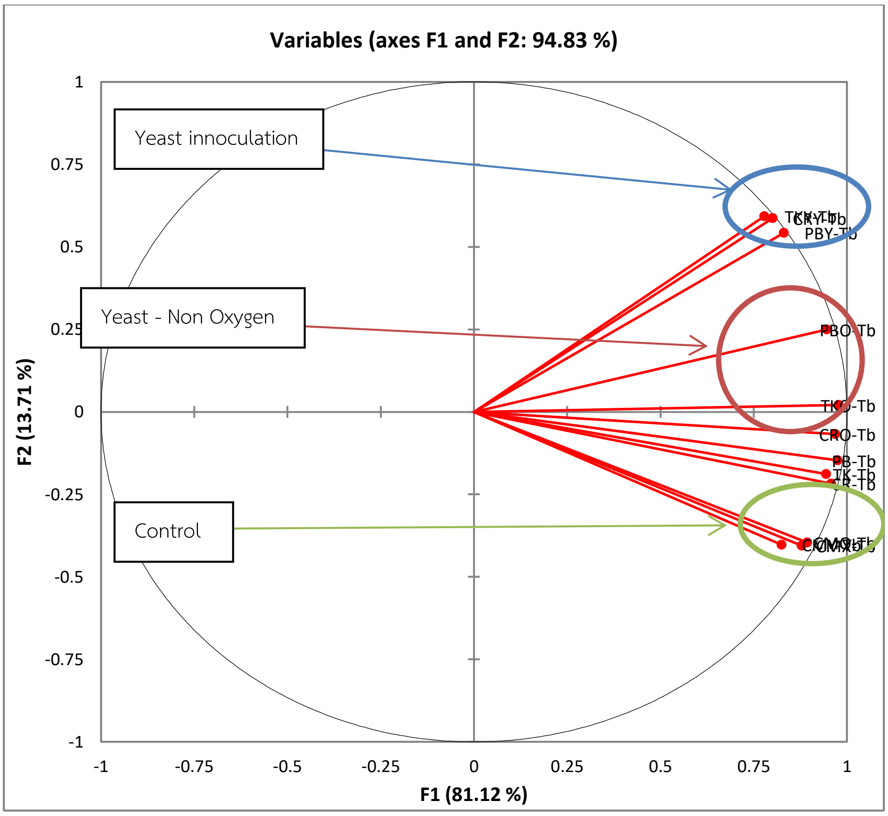
พบว่าผลวิเคราะห์ทางสถิติ Principal Component Analysis (PCA) จากการทดสอบหมักใน 4 แหล่งผลิตกาแฟอาราบิก้า สามารถแบ่งผลการหลุดลอกของเมือก (Turbidity, IC = 94.83%) แบ่งออกเป็นสามกลุ่มได้แก่กลุ่มที่ใช้ยีสต์ช่วยหมัก กลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจนและกลุ่มควบคุม และปริมาณการผลิตกรดแลคติก (Lactic Acid, IC 96.98%) ที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญแต่มีความแตกต่างกันที่ปริมาณกรดแลคติก



ภาพที่ 5 ผลการหมักกาแฟต่อผลการหลุดของเมือกแสดงในรูปผลของค่าความขุ่น (NTU) ของกาแฟอาราบิก้าสายพันธ์เชียงใหม่ 80 จากพื้นที่ทดสอบ 4 พื้นที่ได้แก่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย เพชรบูรณ์ และจังหวัดตาก



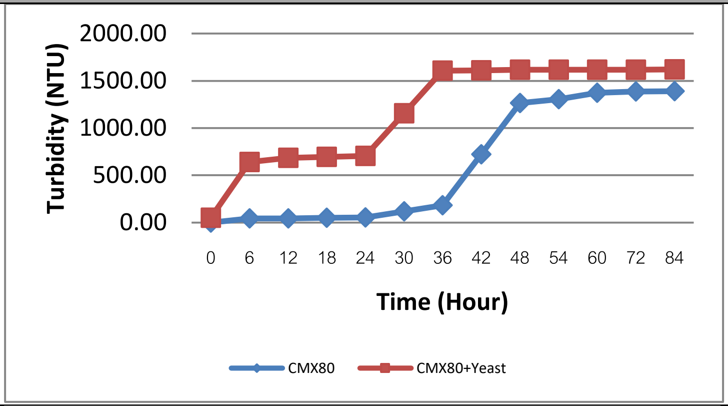
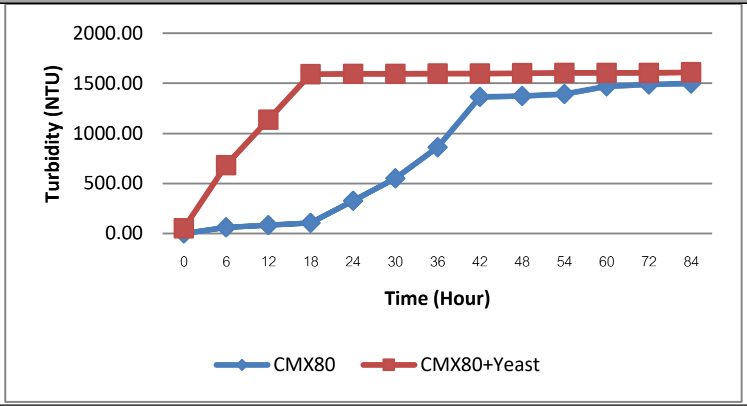
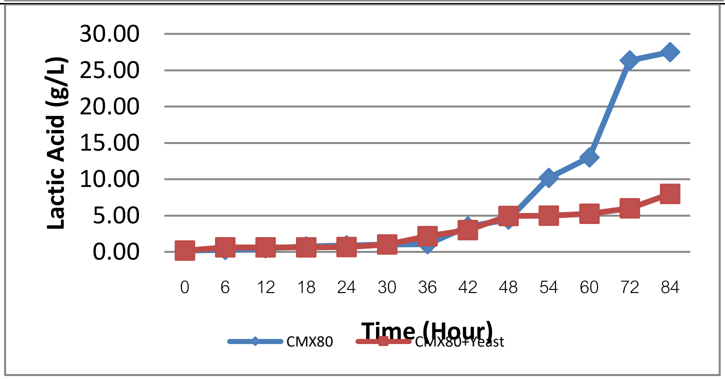
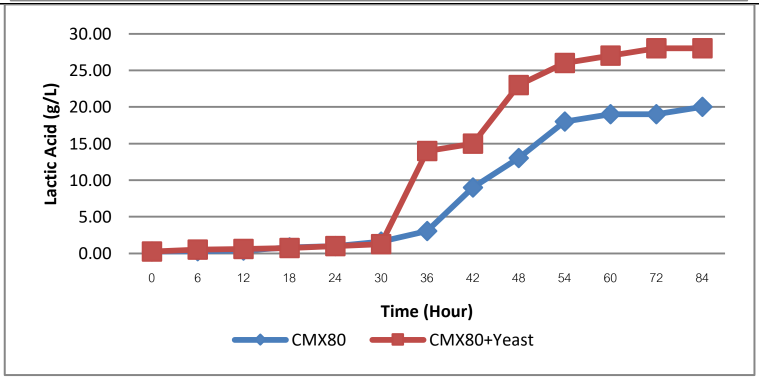
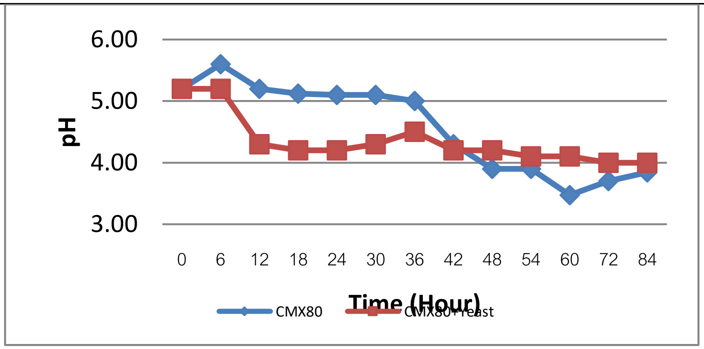
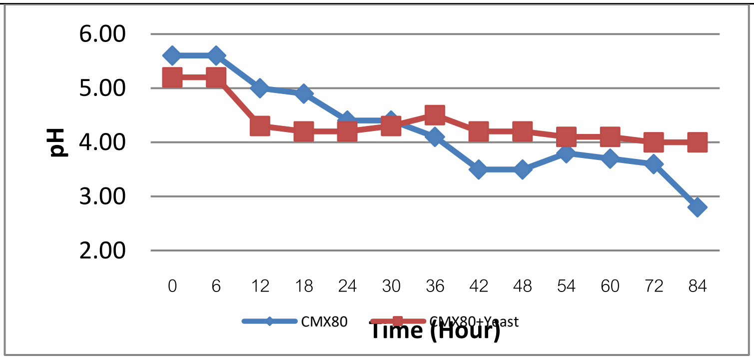
ภาพที่ 6 ผลการหมักกาแฟต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดแลคติก(กรัมต่อลิตร) ของกาแฟอาราบิก้าสายพันธ์เชียงใหม่ 80 จากพื้นที่ทดสอบ 4 พื้นที่ได้แก่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย เพชรบูรณ์ และจังหวัดตาก

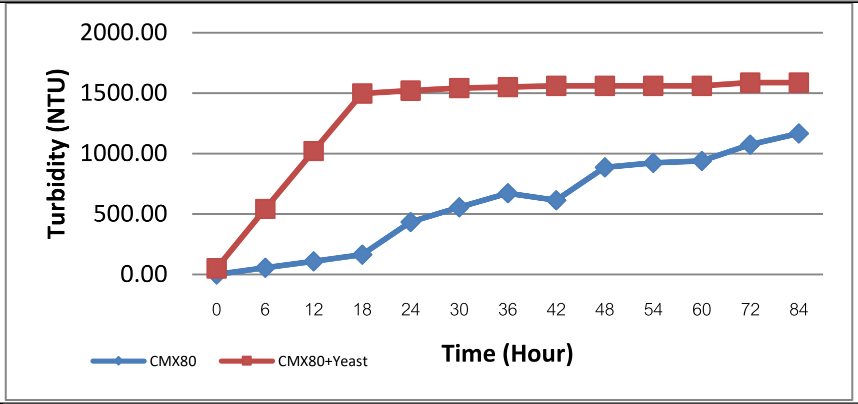
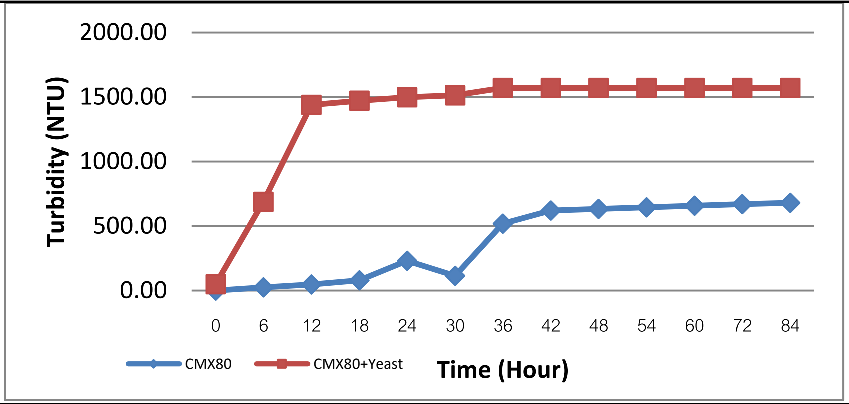
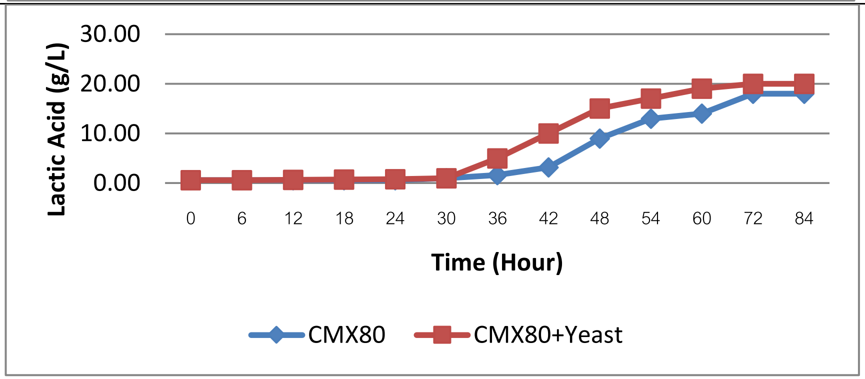
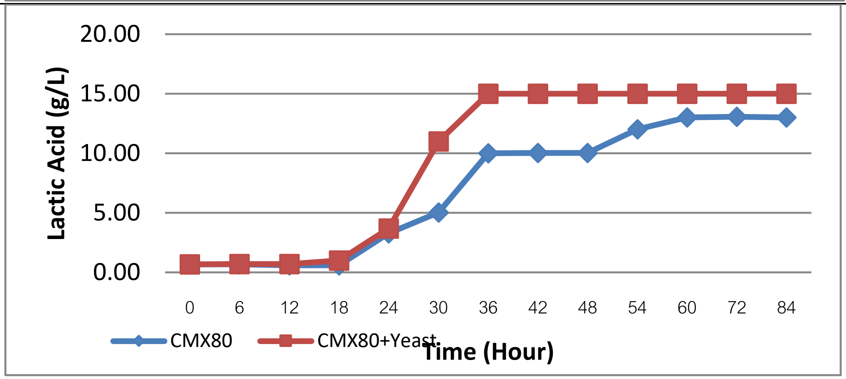
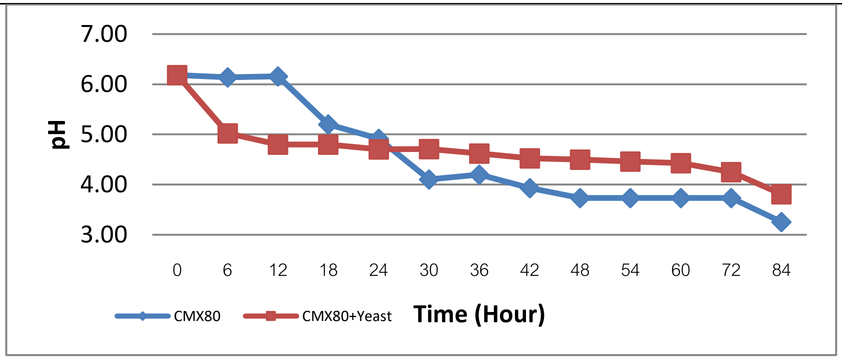
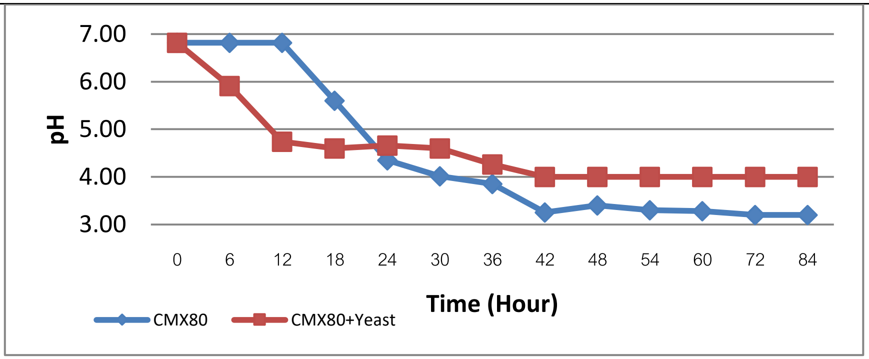


ภาพที่ 7 ผลวิเคราะห์ทางสถิติ Principal Component Analysis (PCA) จากการทดสอบหมักใน 4 แหล่งผลิตกาแฟอาราบิก้า แบ่งออกเป็นสามกลุ่มตามผลการหลุดลอกของเมือก (Turbidity, IC = 94.83%) ได้แก่กลุ่มที่ใช้ยีสต์ช่วยหมัก กลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจนและกลุ่มควบคุม และปริมาณการผลิตกรดแลคติก (Lactic Acid, IC 96.98%) ที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติจาก 4 แหล่งผลิตกาแฟ

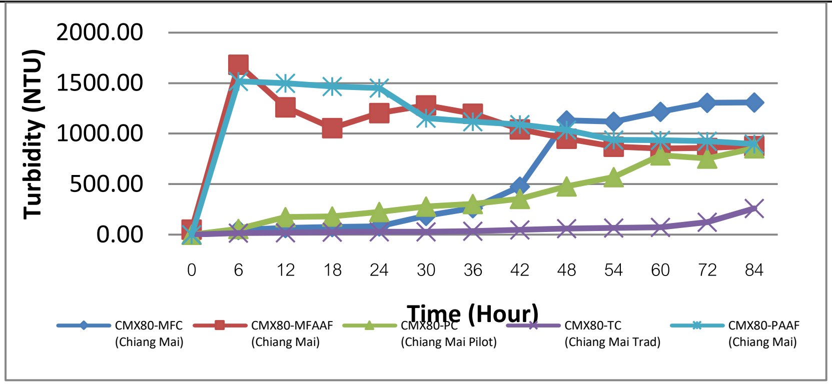
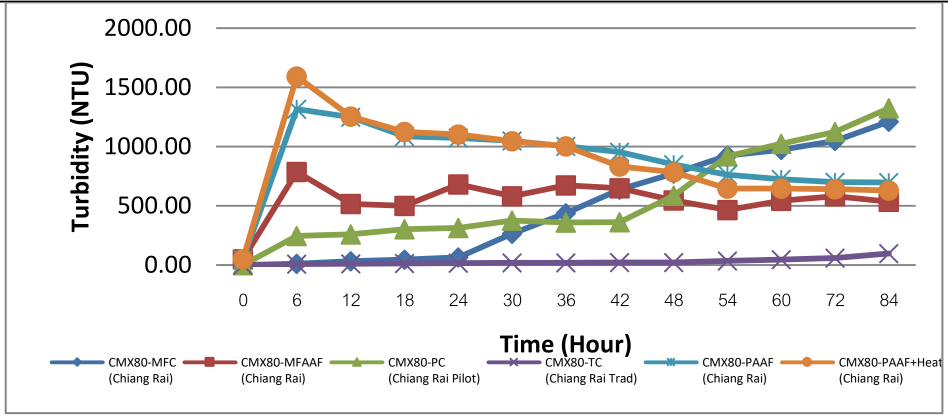
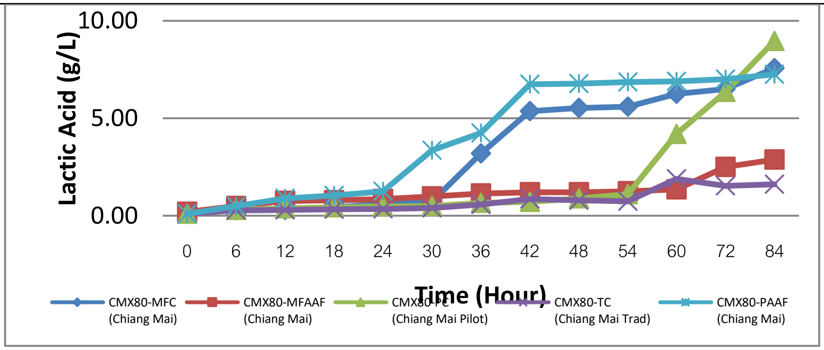
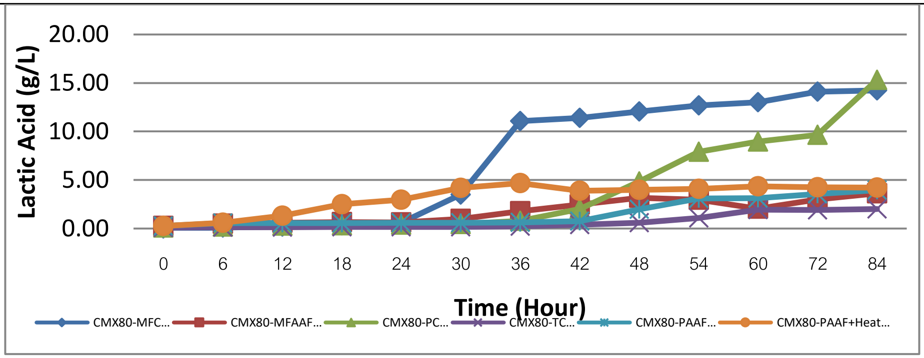
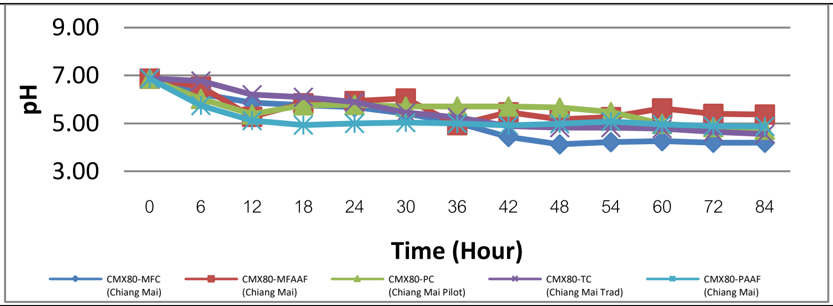
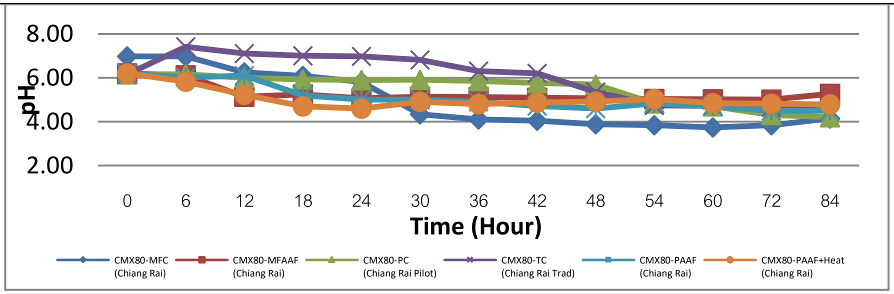
จากผลการทดสอบการหมักเมือกกาแฟในสภาวะจริง ผลการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์และผลการทดลอง innoculation ในสภาวะจริงจาก 4 แหล่งผลิตกาแฟอาราบิก้าโดยเปรียบเทียบจาก 3 กรรมวิธีสามารถแบ่งคุณภาพการหมักได้ออกเป็น 2 กลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ กลุ่มควบคุม (ไม่เติมเชื้อยีสต์) กลุ่มเติมเชื้อยีสต์ แต่ไม่พบว่ามีผลต่อการผลิตกรดแลคติกจาก 2 กรรมวิธีเช่นเดียวกับการทดลองแรก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเติมเชื้อยีสต์ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มหรือลดของปริมาณกรดแลคติกที่ได้จากการหมักเมือกกาแฟแต่ส่งผลต่อการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก อัตราการหลุดลอกของเมือก และการเริ่มทำงานของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ส่งผลต่อคุณภาพของกาแฟและเมือกกาแฟ โดยทุกพื้นที่ผลิต (จังหวัดเชียงใหม่, จังหวัดเชียงราย, จังหวัดเพชรบูรณ์และจังหวัดตาก) เมื่อทำการทดสอบในการแฟอาราบิก้าสายพันธุ์เชียงใหม่ 80 แหล่งผลิตกาแฟไม่ส่งผลต่อการหลุดลอกของเมือกดังนั้น**ผลของการเติมเชื้อยีสต์ส่งผลต่อการหมักเมือกกาแฟให้มีการหลุดลอกของเมือกที่สมบูรณ์อย่างมีนัยสำคัญและส่งผลต่อเวลาที่มีความรวดเร็วขึ้นจาก 72 ชั่วโมงเหลือ 24 ชั่วโมงและคุณภาพของการหมักกาแฟทำให้สารกาแฟมีคุณภาพทางประสาทสัมผัสที่ดี**

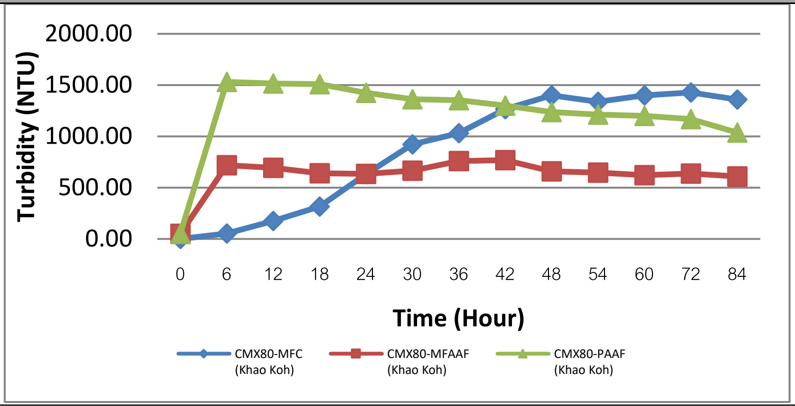
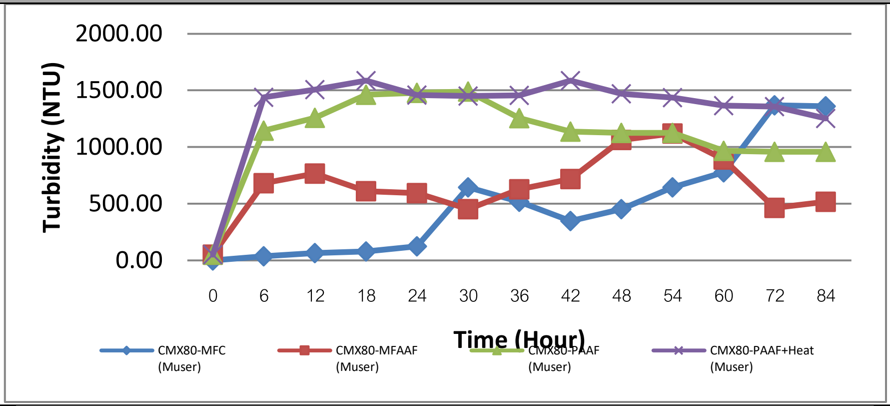
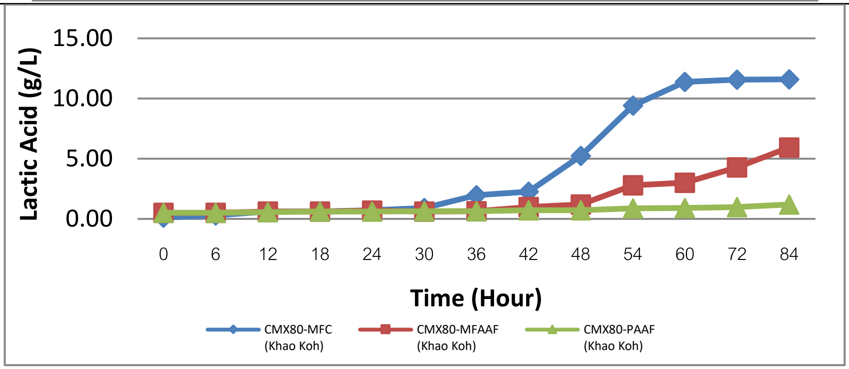
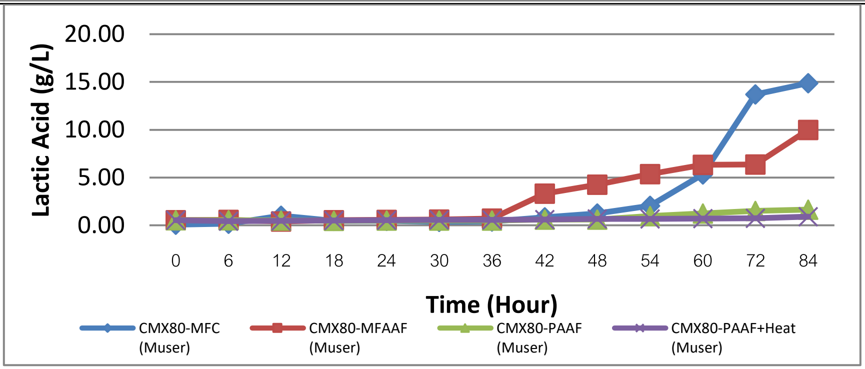
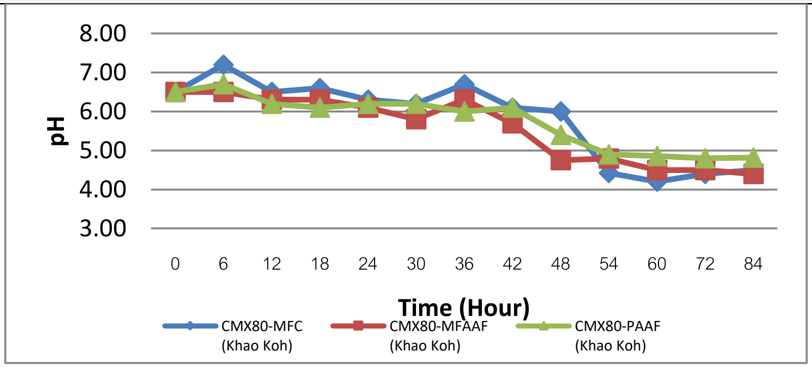
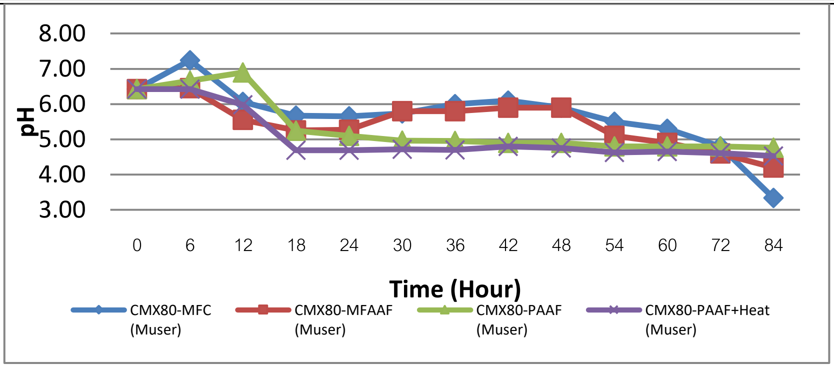
ภาพที่ 8 ผลการหมักกาแฟอาราบิก้าจากผลการหลุดของเมือกแสดงในรูปผลของค่าความขุ่น (NTU) ปริมาณกรดแลคติก(กรัมต่อลิตร)และค่าความเป็นกรดด่างที่เพิ่มขึ้นสายพันธ์เชียงใหม่ 80 จากพื้นที่ทดสอบ 4 พื้นที่ได้แก่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงรายเพชรบูรณ์และจังหวัดตาก ในปี 2560

<table>
<tr><th></th><th>Chiang Mai</th><th>Chiang Rai</th></tr>
<tr><td>Turbidity (NTU)</td><td>
</td><td>
</td></tr>
<tr><td>Lactic Contain (g/l)</td><td>
</td><td>
</td></tr>
<tr><td>pH</td><td>
</td><td>
</td></tr>
</table>

	Petchabun	Tak
Turbidity (NTU)		
Lactic Contain (g/l)		
pH		

ภาพที่ 9 ผลการหมักกาแฟอาราบิก้าจากผลการหลุดของเมือกแสดงในรูปผลของค่าความขุ่น (NTU) ปริมาณกรดแลคติก(กรัมต่อลิตร)และค่าความเป็นกรดด่างที่เพิ่มขึ้นสายพันธ์เชียงใหม่ 80 จากพื้นที่ทดสอบ 4 พื้นที่ได้แก่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงรายเพชรบูรณ์และจังหวัดตากในปี 2561

	Chiang Mai	Chiang Rai
Turbidity (NTU)		
Lactic Contain (g/l)		
pH		

	Petchabun	Tak
Turbidity (NTU)		
Lactic Contain (g/l)		
pH		

ภาพที่ 9 ภาพแสดงการเก็บตัวอย่างและการทดสอบหมักกาแฟจากสถานีทดลองทั้งสิ้น 4 สถานี

3. ศึกษากระบวนการเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้า

3.1 ผลการทดลองแปรผันปัจจัยในการหมักเพื่อเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้าในห้องทดลองที่อุณหภูมิการหมักตลอดระยะเวลาการหมัก 2 ระดับได้แก่ 30 และ 40 องศาเซลเซียสและแปรผันปริมาณเกลือไดแอมโมเนียมในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 3%,2.5% และ 2% ต่อการเพิ่มปริมาณออกซิเจนตลอดระยะเวลาการหมักปริมาณ 30, 40, 50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงพบว่าได้ผลวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธี one way ANOVA ต่อการหลุดของเมือกหุ้มผิวเมล็ดที่ลดลงโดยวัดปริมาณค่าความขุ่น (turbidity) ดังนี้

ตารางที่ 2 แสดงการกำหนด treatment ใน 2 ปัจจัย (DA= เติมเกลือไดแอมโมเนียม, TA=เติมกรดทาทาริก, O= เติมออกซิเจน)

Factor	DA 3%/ TA 3%	DA 2.50%/ TA 5%	DA 2%/TA 10%	control
O 30 ml/hr	T1	T2	T3	C
O 40 ml/hr	T4	T5	T6	
O 50 ml/hr	T7	T8	T9	

ในการทดลองที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าผลวิเคราะห์ทางสถิติเป็นที่ยอมรับเนื่องจากมีค่าความน่าเชื่อถือที่ <0.0001 ($p<0.05$) และเมื่อพิจารณาตาราง Correlation matrix พบว่าชุดควบคุมมีค่าแปรผันตรงกับ Treatment ที่ 7 – 9 ที่ใช้ปริมาณออกซิเจนที่ 50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้กระบวนการ Tukey Analysis และ Fisher Analysis พบ treatment ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญคือ Treatment ที่ 9 ที่ใช้ปริมาณเกลือเพียง ร้อยละ 2 แต่ใช้ปริมาณออกซิเจนที่ 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตาราง Correlation matrix พบว่าชุดควบคุมมีค่าแปรผันตรงกับ Treatment ที่ 6 – 9 ผลวิเคราะห์โดยใช้กระบวนการ Tukey Analysis และ Fisher Analysis พบ treatment ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกลับเป็น Treatment ที่ 7 และ 8 ที่ใช้ปริมาณเกลือไม่เกินร้อยละ 3 แต่ใช้ปริมาณออกซิเจนที่ 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงแสดงให้เห็นว่าปริมาณ

ออกซิเจนที่อัตรา 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงส่งผลต่อการหลุดของเมือกกาแฟแต่ไม่พบความแตกต่างต่อปริมาณเกลือแอมโมเนียม

ตารางที่ 3 ผลวิเคราะห์ที่สถิติโดยวิธี ANOVA ของการทดลองปริมาณเกลือและอุณหภูมิ

Treatment	SOMT 30C	SOMT 40C	AOMT 30C	AOMT 40C
T1	1248e	1220f	1610d	1720d
T1	1249e	1221f	1615d	1719d
T1	1250e	1222f	1620d	1719d
T2	1221f	1220g	1625d	1720d
T2	1225f	1220g	1621d	1720d
T2	1223f	1220g	1625d	1720d
T3	1250e	1250ef	1650c	1749c
T3	1251e	1247ef	1650c	1748c
T3	1251e	1249ef	1651c	1750c
T4	1280c	1220c	1681d	1820d
T4	1279c	1220c	1680d	1822d
T4	1278c	1221c	1680d	1825d
T5	1254de	1251e	1655c	1850c
T5	1254de	1250e	1652c	1851c
T5	1255de	1250e	1655c	1852c
T6	1260d	1285d	1660b	1851c
T6	1260d	1280d	1659b	1850b
T6	1258d	1281d	1659b	1850b
T7	1370b	1300b	1870a	2011a
T7	1378b	1300b	1869a	2011a
T7	1378b	1302b	1865a	2012a
T8	1380b	1305b	1880a	2015a
T8	1375b	1301b	1878a	2015a
T8	1372b	1305b	1879a	2014a
T9	1385a	1280a	1985b	1985b
T9	1380a	1289a	1986b	1984b
T9	1382a	1285a	1989b	1985b
C	1248e	1248f	1248c	1248c
C	1249e	1249f	1249c	1249c
C	1250e	1250f	1250c	1250c

Tukey (HSD) / Analysis of the differences between the categories with a confidence interval of 95%

3.2 ผลการทดลองแปรผันปัจจัยในการหมักเพื่อเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้าในห้องทดลองอุณหภูมิการหมักตลอดระยะเวลาการหมัก 2 ระดับได้แก่ 30 และ 40 องศาเซลเซียสและแปรผันปริมาณกรดทาทาริกในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 3%, 5% และ 10% ต่อต่อการเพิ่มปริมาณออกซิเจนตลอดระยะเวลาการหมักปริมาณ 30, 40, 50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงพบว่าได้ผลวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธี one way ANOVA ต่อการหลุดของเมือกหุ้มผิวเมล็ดที่ลดลงโดยวัดปริมาณค่าความขุ่น (turbidity) ดังนี้

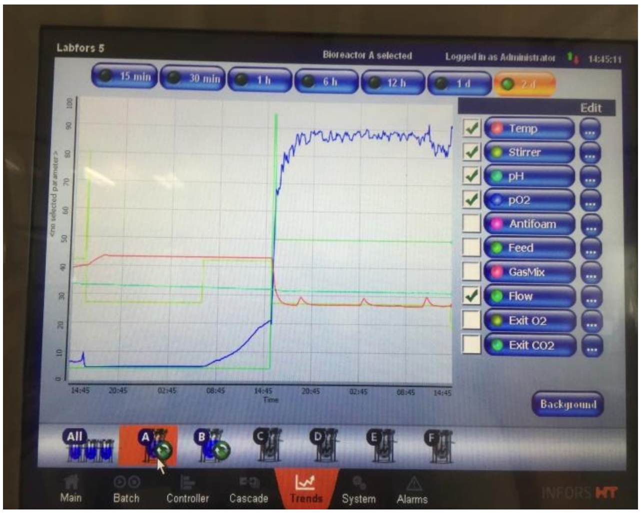
ในการทดลองที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าผลวิเคราะห์ทางสถิติเป็นที่ยอมรับเนื่องจากมีค่าความน่าเชื่อถือที่ <0.0001 ($p<0.05$) และเมื่อพิจารณาตาราง Correlation matrix พบว่าชุดควบคุมมีค่าแปรผันตรงกับ Treatment ที่ 7 – 9 ที่ใช้ปริมาณออกซิเจนที่ 50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้กระบวนการ Tukey Analysis และ Fisher Analysis พบ treatment ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญคือ Treatment ที่ 9 ที่ใช้ปริมาณกรดทาทาริกที่ร้อยละ 10 แต่ใช้ปริมาณออกซิเจนที่ 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตาราง Correlation matrix พบว่าชุดควบคุมมีค่าแปรผันตรงกับ Treatment ที่ 4 – 9 ผลวิเคราะห์โดยใช้กระบวนการ Tukey Analysis และ Fisher Analysis พบ treatment ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกลับเป็น Treatment ที่ 8 ที่ใช้ปริมาณกรดทาทาริกไม่เกินร้อยละ 5 แต่ใช้ปริมาณออกซิเจนที่ 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงแสดงให้เห็นว่า **ปริมาณออกซิเจนที่อัตรา 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงส่งผลต่อการหลุดของเมือกกาแฟโดยใช้ปริมาณกรดทาทาริกไม่น้อยกว่าร้อยละ 5**

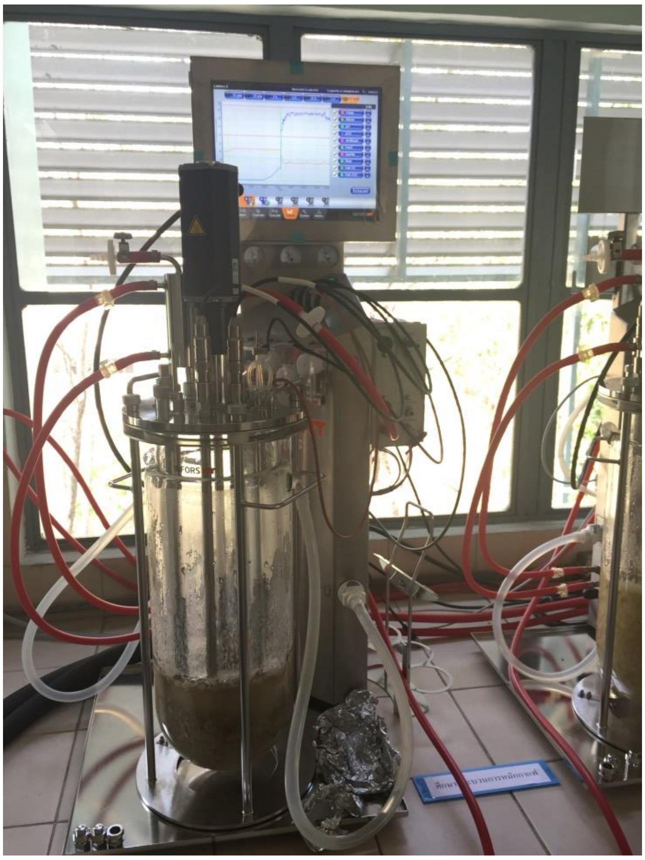
ตารางที่ 4 ระยะเวลาที่ใช้ในการหมักเมือกกาแฟเพื่อให้ได้ค่า Max Turbidity ในแต่ละ Batch คำนวณเวลาเป็นชั่วโมง (DA= เติมเกลือไดแอมโมเนียม, TA=เติมกรดทาทาริก, O= เติมออกซิเจน)

Factor	DA 3%	DA 2.50%	DA 2%	control
O 30 ml/hr	60	65	62	72
O 40 ml/hr	42	33	35	
O 50 ml/hr	36	32	32	

Factor	TA 3%	TA 5%	TA 10%	control
O 30 ml/hr	42	36	48	72
O 40 ml/hr	30	24	26	
O 50 ml/hr	10	6	12	

ภาพที่ 10 แสดงผลการทดสอบหมักในแต่ละการทดลองโดยการใช้ถังหมักควบคุมปัจจัย (Bioreactor) ชนิด LABFORS 5 INFORS โดยใช้โปรแกรม IRIS 6.0 ในการติดตามกระบวนการการหมัก โดยควบคุมปัจจัยแต่ติดตามต่อเนื่องเป็นเวลา 0 – 120 ชั่วโมง ก่อนนำกาแฟที่ได้จากการหมักไปประเมินคุณภาพโดยวิธีการคั่วระดับ Full city roast



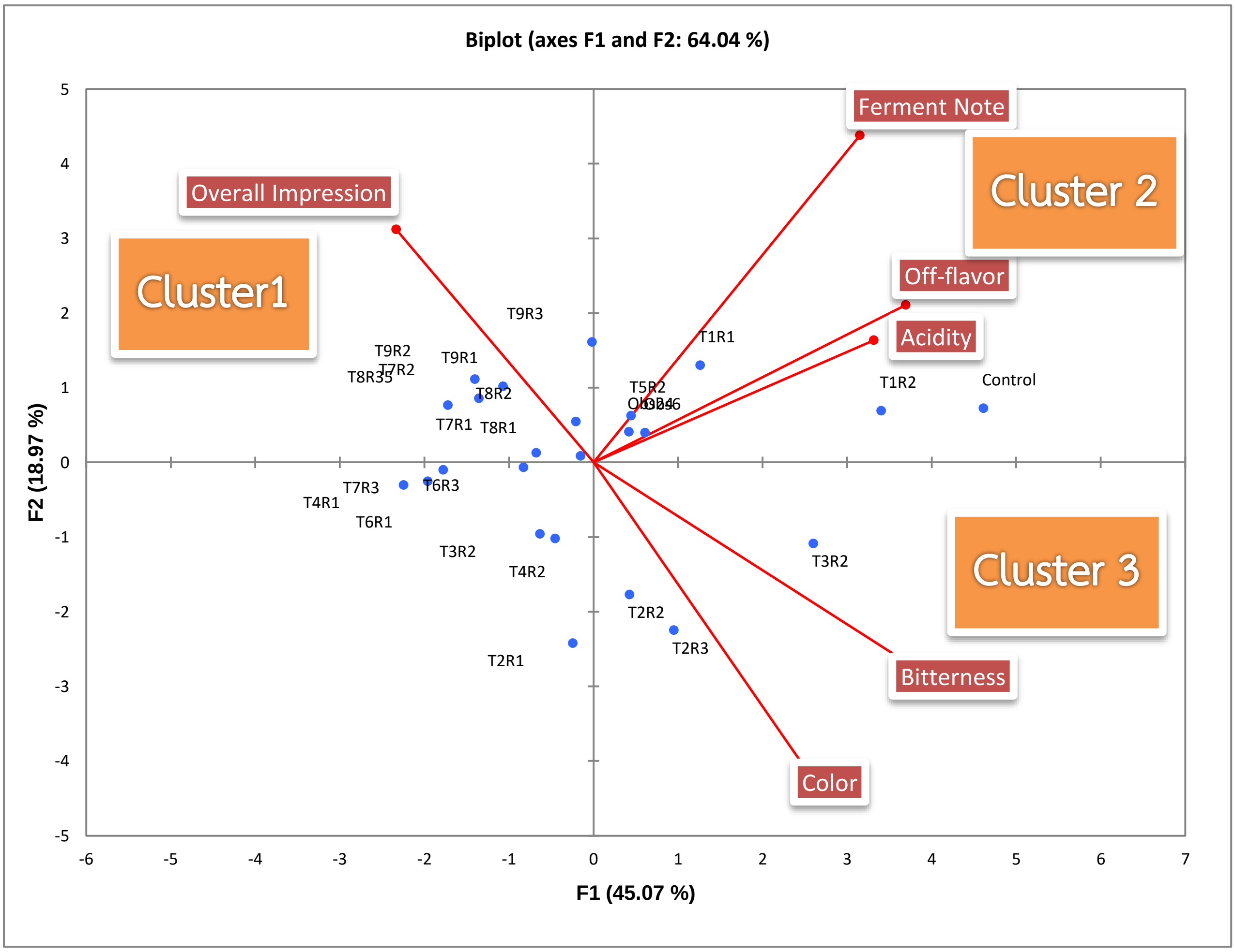


3. ศึกษากระบวนการเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้า

3.1 ผลการทดลองแปรผันปัจจัยในการหมักเพื่อเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้าในห้องทดลองโดยการแปรผันอุณหภูมิ พบว่า**ปริมาณออกซิเจนที่อัตรา 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงส่งผลต่อการหลุดของเมือกกาแฟ แต่ไม่พบความแตกต่างต่อปริมาณเกลือแอมโมเนียม**

3.2 ผลการทดลองแปรผันปัจจัยในการหมักเพื่อเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้าในห้องทดลองควบคุมอุณหภูมิการหมักและแปรผันปริมาณออกซิเจน พบว่า**ปริมาณออกซิเจนที่อัตรา 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงส่งผลต่อการหลุดของเมือกกาแฟโดยใช้ปริมาณกรดทาทาริกไม่น้อยกว่าร้อยละ 5**

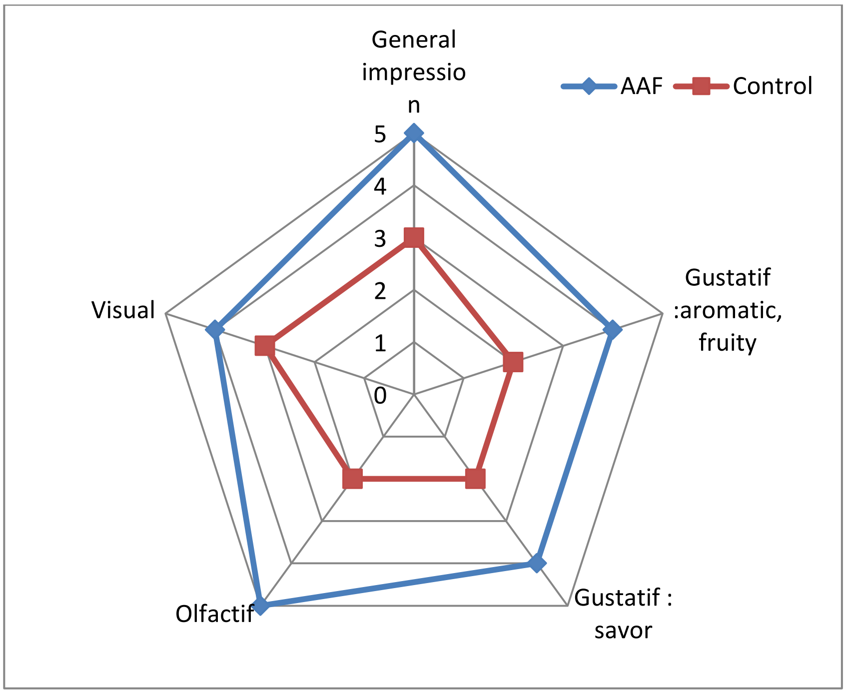
ภาพที่ 11 ผลวิเคราะห์ Principle component analysis ของผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสกาแฟใน 36 batch



ผลการทดลองวัดระยะเวลาในการหมักเมือกกาแฟก่อนจะได้ค่า Max Turbidity จากการทดลองทั้ง 36 batch นั้นพบค่าเฉลี่ยอัตราการหมัก 35 ชั่วโมง โดยพบอัตราการหมักเร็วที่สุดอยู่ที่ 6 ชั่วโมง เทียบกับชุดควบคุมที่ 72 ชั่วโมง ถือว่าเร็วกว่าระยะเวลาปกติถึง 66 ชั่วโมง (12 เท่า) โดยมีการควบคุมปัจจัยต่างๆ โดยเมื่อนำผลการหลุดลอกของเมือกสูงสุดมาเทียบกับเวลาพบว่า ชุดการทดลองที่ 8 (treatment 8) ให้ผลที่น่าพอใจที่สุดและเมื่อทำการวิเคราะห์ผลทางประสาทสัมผัสยังพบว่าในชุดการทดลองดังกล่าวมีผลความชอบโดยรวม (overall impression) อยู่ใน Cluster ที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบ

กับชุดควบคุมที่ผู้ทดสอบจะได้รับรสชาติกาแฟที่มีค่า Acidity สูงและกลิ่น off-flavor ทั้งนี้เนื่องมาจากการหมักเป็นเวลานานถึง 72 ชั่วโมงและทำให้เกิดกลิ่น Ferment (หมัก) อย่างชัดเจนเมื่อพิจารณาปริมาณ Volatile acid ที่เป็นกลุ่มกรดอาซีติกจักมีค่าสูงมากกว่า 3.5 กรัมต่อกิโลกรัมถือเป็นกลิ่นน้ำส้มสายชูที่ไม่ก่อให้เกิดผลดีต่อคุณภาพกาแฟ เมื่อพิจารณากลุ่ม Cluster ที่ให้ผลต่อการคั่วที่มีสีเข้มและความขมสูงเช่นชุดการทดลองที่ 2 (treatment 2) ถือเป็นกลุ่มที่น่าสนใจอีกกลุ่มโดยเฉพาะการผลิตกาแฟเพื่อลด Acidity และ ให้ค่าความขมและสีที่สูง ซึ่งนำไปสู่ต้นแบบการผลิตเพื่อผลิตกาแฟที่ต้องการคุณลักษณะเฉพาะของสีและรสชาติขมได้

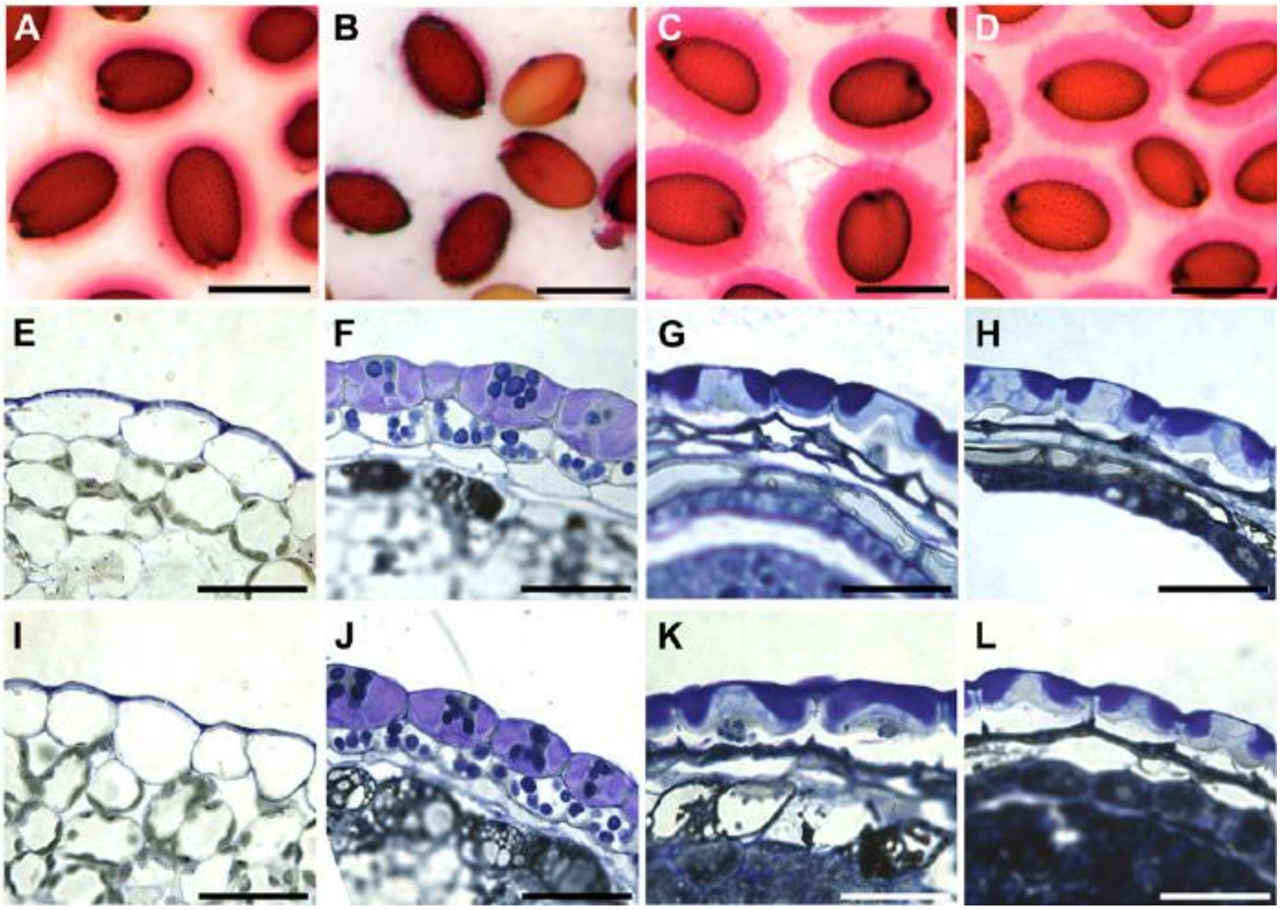
ผลการพัฒนากระบวนการหมักโดยพบว่าการหมักกาแฟให้ได้คุณภาพดีต้องใช้ **เชื้อจุลินทรีย์ Saccharomyces cerevisae ที่อัตรา 20 ไมโครกรัมต่อเฮกโตลิตร(Flore Fermentation) รวมกับปริมาณออกซิเจนที่อัตรา 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง (Oxygenation) และใช้ปริมาณกรดทาทาริกไม่น้อยกว่าร้อยละ 5 (Acidification)** ทำให้เกิดกระบวนการใหม่ที่เรียกว่า “AAF technique” (Acelerated Arabica Fermentation “Acid-Air-Flore Fermentation”)



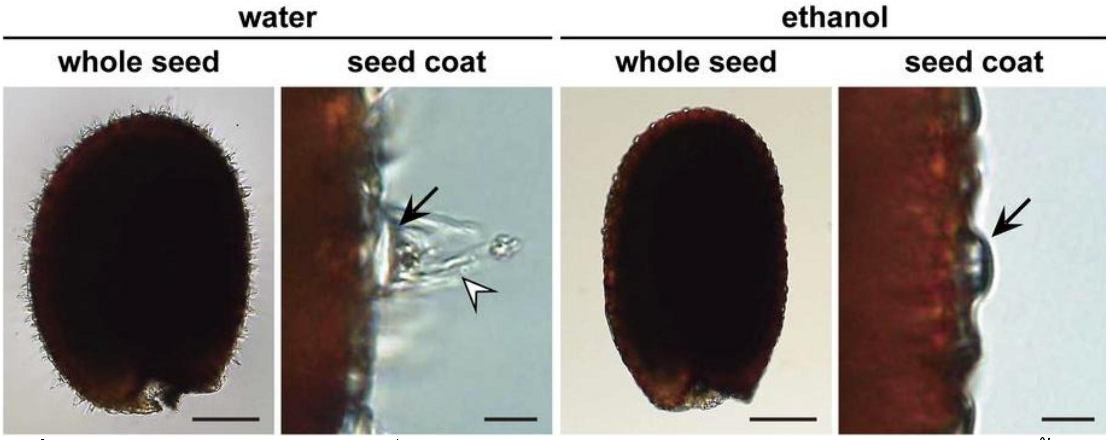
ภาพที่ 12 แผนภูมิแสดงคะแนนการประเมิน Cup tasting กาแฟอาราบิก้าเชียงใหม่ 80 คั่วที่ผ่านการหมักด้วยเทคนิค Acid-Air-Flore Technique เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

4. การหมักกาแฟแบบ AAF techniques

4.1 ผลการศึกษาการหมักเพคตินในถังหมักในสภาวะห้องปฏิบัติการโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) เคลือบเมือกโดยใช้สาร Ruthidiam Red เพื่อศึกษาการหลุดลอกของเมือกโดยการใช้เทคนิค AAF พบการหลุดลอกของเมือกโดยกระบวนการ “Polysaccharide modification” จากการ dehydration ด้วยจุลินทรีย์และสภาพสารละลายที่มีความเป็นกรดสูงทำให้น้ำที่อยู่ในเมือกกาแฟหลุดออกออกมาและการเปลี่ยนแปลงสภาพของโพลีแซคคาไรท์ทำให้เกิดการหลุดลอกของเมือกจากเมล็ดกาแฟ โดยมีการทดสอบต่อเนื่องกับการเปลี่ยนแปลงสภาพสารละลายเป็นสารละลายเอทานอลพบว่าการหลุดลอกของเมือกช้ากว่าการใช้การหมักด้วยน้ำดังนั้นจึงยืนยันได้ว่าเมือกของเมล็ดกาแฟมีส่วนประกอบของน้ำเป็นปริมาณมาก



ภาพที่ 13 แสดงการโครงสร้างและการหลุดลอกของเมือกในตัวอย่างเมล็ดกาแฟที่ทำการสุ่มมาในเวลาทั้งสิ้น 48 ชั่วโมง โดยภาพ A แสดงเมล็ดกาแฟในสภาวะที่มีเมือกเกาะและ B แสดงเมล็ดกาแฟที่เมือกหลุดลอกแล้ว ในภาพ C และ D แสดงขั้นตอนการหลุดลอกของเมือกโดยเทคนิค AAF โดยเมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด ส่องด้วยกำลังขยายสูง (ภาพ E-L) พบว่าเมือกกาแฟมีการเปลี่ยนสภาพเรียกว่ากระบวนการ polysaccharide modification โดยกระบวนการ dehydration



ภาพที่ 14 เปรียบเทียบการทดลองเปลี่ยนสารละลายในการใช้หมักเมือกโดยเปรียบเทียบระหว่างน้ำและเอทานอลโดยการใช้เทคนิค AAF พบว่ามีการหลุดลอกของเมือกที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนโดยในน้ำจะมีการหลุดลอกของเมือกและในเอทานอลจะมีการหลุดลอกของเมือกที่ช้าหรือแทบไม่หลุดเลย

4.2 ผลการทดลองการหมักเมือกของจุลลินทรีย์ *S. cerevisiae* strain BAwine ที่คัดเลือกเปรียบเทียบกับเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการย่อยเพคติน (Pectolytic activity) ได้แก่ *S. bayanus, S. marxianus, Schizosaccharomyces sp.* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Crystal Violet Pectate Modified ภายในเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้ยีสต์ในการหมักกาแฟสายพันธ์ *S. cerevisiae* strain BAwine มีศักยภาพในการหมักเพคตินเทียบเคียงได้กับจุลินทรีย์ Pectinolytic สายพันธ์ที่ใช้ทั่วไปและเหมาะสมในการควบคุมคุณภาพกาแฟ โดยเฉพาะเมื่อมีการทดสอบการใช้เชื้อร่วมกันศักยภาพในการหมักมีการดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในสภาวะ pure culure (ตารางที่ 6) จึงถือว่า BAwine เป็นสายพันธ์ที่เหมาะสมในการนำไปทดสอบในพื้นที่ทดสอบนอกจากนี้คุณภาพการหลุดของเมือก ลักษณะเมือกและกลิ่นยังเป็นที่น่าพึงพอใจในการนำไปใช้ในพื้นที่ทดสอบ

ตารางที่ 5 Pectinolytic Activity of isolated using in mucilage fermentation on cystal violet pectate media

Isolate	*Enzyme Activity*					*Pectin decomposed (%)*
	PG[1]		PE	PTE	PATE	
	P[2]	PA[2]	P	P	PA	
S. cerevisiae strain BAwine	0.55	2.2	0.45	0	0	55.3
S. bayanus	0.31	3.0	0.42	0	0	65.5
S. marxianus [3]	0.45	3.5	0.5	0	0	90.5
Schizosaccharomyces sp.	0.1	0.3	0.1	0	0	10.6

[1] PG measured as increase in reducing power in terms of milliters of 0.5N sodium thiosulfate. PE as milliliters of 0.02 N sodium hydroxide and PTE/PATE as units of optical density at 230 to 235 mμ

[2] P= Pectin; PA = Polygalacturonic acid

[3] isolate from coffee natural fermentation (Chiangrai site)

ตารางที่ 6 Fermentation of coffee cherries by pure cultures of yeasts selected

Sample	Yeast tested	Criteria observed			Pectin decomposed (%)
		External appearance of beans	Flavor of ferment	Disappearance of stickiness	
1	*S. cerevisiae* strain BAwine	White till 48hr, black after 70hr	Cheesy	Nil	47.6
2	*S. bayanus*	Cream to yellow	Vinegar-like	Partial	59.0
3	*S. marxianus*	Grayish-brown	Pungent	Almost complete	86.4
4	Mixture of 1 and 2	Brownish-black	Vinegar-like	Nil	58.5
5	Mixture of 2 and 3	Grayish	Pungent	Partial	33.3
6	Mixture of 1 and 3	Yellowish-brown	Vinegar-like	Almost complete	70.8
7	Mixture of 1,2 and 3	Blackish	Vinegar-like	Complete	94.6
8	Natural process	Original color retained with brown tinge	Vinegar-like	Complete	98.2

ตารางที่ 7 Effect of pectic enzymes on coffee fermentation

Enzyme	Criteria observed			Percentage of pectin decomposed at				
	External appearance of beans	Flavor of the ferment	Disappearance of stickiness	2hr	4hr	6hr	8hr	10hr
Yeast Enzyme	White to cream yellow	Vinegar-like	Complete	20.5	46.3	78.4	95.0	96.2
Benefax®	Brownish-black	Nil	Complete	23.3	48.5	69.6	94.5	98.0
Pectinase	No-change	Nil	Partial	8.3	20.4	36.7	43.3	56.9
Machine	Black to bean damage	Machine	Partial	60.5	-	-	-	-
No added Enzyme	Original color retained with brown tinge	Vingar-like	Slight	3.8	4.4	5.6	8.9	13.7

พบการเปลี่ยนแปลงการหมักในสถานีทดลองทั้ง 4 สถานีอย่างชัดเจนเมื่อเทียบจากผลการหมักโดยจุลินทรีย์เพียงอย่างเดียวที่ได้ดำเนินการในปี 2560 โดยเมื่อวิเคราะห์ปัจจัยที่สำคัญในการหมักพบว่า AAF technique สามารถปรับปรุงการหมักกาแฟอาราบิก้าได้อย่างเห็นได้ชัดกล่าวคือ

(1.) ค่าความขุ่น (Turbidity) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นปัจจัยสำคัญในการหมักโดยค่าความขุ่นที่เหมาะสมในการหลุดลอกของเมือกอยู่ที่ 1,000 NTU ขึ้นไป ในปี 2560 ต้องใช้เวลากว่า 19.5 ชั่วโมงเพื่อทำระดับความขุ่นให้ได้ระดับต่างกับในปี 2561 ที่ได้ใช้ **AAF technique พบว่าสามารถพัฒนาค่าความขุ่นได้ที่เวลา 6 ชั่วโมงซึ่งดีกว่าชุดควบคุมถึง 8 เท่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุม** (ปี 2560 ชุดควบคุมใช้เวลา 48.5 ชั่วโมงและ 2561 ชุดควบคุมใช้เวลา 50 ชั่วโมง)

(2.) ปริมาณกรดแลคติก (Lactic acid) บ่งบอกถึงการทำงานของเชื้อแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ย่อยเมือกกาแฟโดยหากมีปริมาณกรดแลคติกมากแสดงให้เห็นว่ามีการหมักย่อยเมือกกาแฟอย่างไรก็ตามได้พบปัญหาที่เรียกว่า “Lactic Sting” หรือเปรี้ยวแลคติกเกิดขึ้นในชุดทดลองที่มีการย่อยเมือกในเวลานานเกินไปทำให้กาแฟมีรสเปรี้ยวจัดไม่เป็นที่ยอมรับ อย่างไรก็ตาม AAF technique สามารถแก้ไขปัญหาการผลิตกรดแลคติกเกินความจำเป็นและควบคุมปริมาณกรดแลคติกโดยพบว่า ในการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ในปี 2560 มีปริมาณกรดแลคติกเฉลี่ย 17.5 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อใช้ **AAF technique พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติกเฉลี่ย 5.88 กรัมต่อลิตรแม้ทิ้งการหมักไว้ในเวลาเท่ากับชุดควบคุมและมีปริมาณเท่ากันในชุดทดสอบ Pilot plant process ซึ่งดีกว่าชุดควบคุมกว่า 2 เท่าตัว** (ปี 2560 ชุดควบคุมมีปริมาณกรดแลคติกเฉลี่ย 20.63 กรัมต่อลิตรและ 2561 ชุดควบคุมมีปริมาณกรดแลคติกเฉลี่ย 10.75 กรัมต่อลิตร)

(3.) ค่าความเป็นกรดด่าง (pH value) ส่งเสริมสภาวะแวดล้อมของการหมักย่อยเมือกกาแฟโดยหากค่า pH มีค่าต่ำกว่า 4.5 เชื้อแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ย่อยเมือกจะเริ่มทำงานโดยเวลาในการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างให้ต่ำกว่า 4.5 นั้นโดยปกติกใช้เวลานานมากและในบางการหมักพบว่าค่าความเป็นกรดด่างไม่ลดลงต่ำกว่า 4.5 ทำให้เกิดกระบวนการหมักกรดอาซีติกและการหมักคู่ขนานทำให้เกิดสารและกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ อย่างไรก็ตามปัจจัยสำคัญในการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างคือคุณภาพน้ำที่ใช้ในการหมักพบว่าน้ำในแต่ละสถานีทดสอบมีค่าความเป็นกรดด่างแตกต่างกันและในปี 2561 พบว่าในสถานีวิจัยพืชสวนเพชรบูรณ์น้ำมีค่าความเป็นด่างสูงมากโดยเมื่อนำมาวิเคราะห์ค่า BOD กว่า 200 มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่าคุณภาพน้ำไม่เหมาะสำหรับดื่ม น้ำมีคุณภาพกระด้างส่งผลต่อการหมักกาแฟและเมื่อตรวจสอบค่า TDS (Total Dissolved Solid) พบค่าสูงกว่า 300 มิลลิกรัมต่อลิตรและมีค่า PO2 ในปริมาณต่ำ จึงไม่นำผลการทดสอบจากสถานีดังกล่าวมาใช้ในการวิเคราะห์

ตารางที่ 8 วิเคราะห์คุณภาพน้ำที่ใช้ในการหมักจากสถานีทดลอง 4 สถานีใน 2 ปีการทดลอง

	เชียงใหม่		*เชียงราย*		*ตาก*		*เพชรบูรณ์*	
	2560	**2561**	**2560**	**2561**	**2560**	**2561**	**2560**	**2561**
pH	6.00	6.87	7.19	7.06	6.7	6.53	7.61	8.20*
TDS (ppm)	20	15.6	32	24	96	98	98	215*
Turbidity (NTU)	20	12	13	12	25	20	35	51
BOD	95	90	85	91	125	132	136	256*
DO	7.6	8.7	5.6	5.5	6.3	6.0	4.0	1.2*
Microbes	None	None	None	None	None	None	None	None

ค่าความเป็นกรดด่างของการหมักกาแฟโดยจุลินทรีย์ในปี 2560 พบว่ามีค่า pH ต่ำกว่า 4.5 ในชั่วโมงที่ 12 และหากใช้ **AAF technique จะได้ผลในชั่วโมงที่ 10 ซึ่งดีกว่าชุดควบคุมถึง 4 เท่าตัว** (ปี 2560 ชุดควบคุมมีค่าความเป็นกรดด่างลดลงที่ชั่วโมงที่ 36 และปี 2561 ในชั่วโมงที่ 44)

วิจารณ์คุณภาพน้ำที่เหมาะสำหรับการหมักย่อยเมือก : ปัจจัยสำคัญของน้ำตั้งต้นที่ใช้ในการหมักของเชื้อจุลินทรีย์คือ ความกระด้างของน้ำ (Water Hardness), ค่าความเป็นกรดด่าง(pH) และปริมาณเกลือแร่ของน้ำ (Alkalinity) โดยความกระด้างของน้ำและค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นสำคัญในการเจริญเติบโต โดนสามารถใช้ค่า TDS(Total dissolved solid) เป็นตัวประเมินโดยค่าที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 0 – 80 ppm โดยหากมีค่า TDS ระหว่าง 80 – 120 ถือว่าความกระด้างกลางถึงสูง และหากมีค่า TDS >120ppm น้ำจะถือว่ากระด้างมากกล่าวคือปริมาณเกลือและแร่ธาตุที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มีมากเกินไปทำให้ขัดขวางการพัฒนาและการหมัก ส่วนค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมอยู่ที่ 4.5 – 6.0 โดยหากค่า pH สูงกว่า 7.5 นั้นถือว่ามีค่าความเป็นด่างสูงทำให้ขัดขวางการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

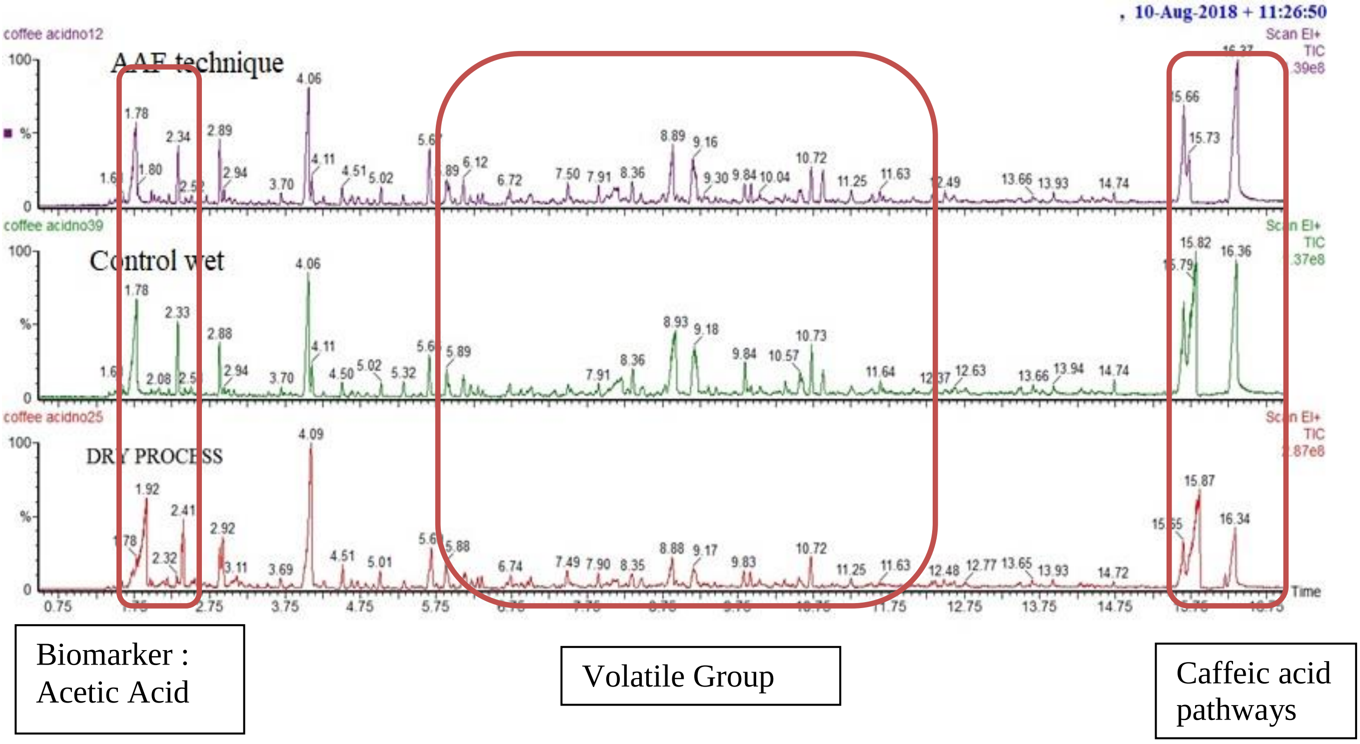
แนวทางการแก้ปัญหาน้ำกระด้างและค่าความเป็นกรดด่างไม่เหมาะสมจะเติมเกลือแคลเซียมหรือแอมโมเนี่ยมซัลเฟสเพื่อให้จุลินทรีย์มีธาตุอาหารมากพอที่ใช้ในการดำเนินกิจกรรมอย่างไรก็ตาม กระบวนการดังกล่าวถือเป็นการแก้ปัญหาที่ปลายเหตุที่ไม่สามารถจัดการกับคุณภาพน้ำต้นทางได้ดังนั้น หากจัดการคุณภาพน้ำได้ตั้งแต่แหล่งผลิตจักลดต้นทุนในการเพิ่มสารเคมีที่ใช้ในการหมัก

ผลการทดสอบคุณภาพเมล็ดกาแฟจากวิธี AAF technique เปรียบเทียบกับ ชุดควบคุม

- สารกาแฟที่ทำการทดลองมีค่าความชื้นหลังคั่วเฉลี่ยร้อยละ 9.00 และค่าสีหลังคั่วอยู่ที่ระดับ Agtron 53.33 เท่ากันทุกตัวอย่างทดสอบ

- ผลการทดสอบลักษณะทางกายภาพของกาแฟจากแหล่งเพาะปลูกทั้ง 4 สถานีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกล่าวคือกาแฟมีค่าความเป็นกรดโดยรวม (Total Acidity in tartaric acid) เฉลี่ยร้อยละ 0.02 (STD: 0)ในขณะที่ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) 5.20 (STD: 0.10) ค่าความเค็ม (Salinity) อยู่ที่ 4.29 (STD:0.57)และมีปริมาณเถ้าอยู่เฉลี่ย 4.68 (STD: 0.20)

- ผลปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสพบว่า ค่าองศาบริกซ์ในกาแฟที่ใช้เทคนิค AAF technique จะอยู่ที่ 8.77 และส่งผลให้น้ำกาแฟมีค่า Total dissolved solid อยู่ที่ 251.91 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในกาแฟที่ผ่านเทคนิคดังกล่าวมีการผลิตสารให้กลิ่นรสเพิ่มขึ้นมาโดยเมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันในเมล็ดกาแฟกลุ่มนี้พบว่ามีปริมาณน้ำมันสูงถึงร้อยละ 13.76 (STD : 1.78) แต่ต่างกับชุดควบคุมที่ไม่หมักที่ร้อยละ 8.00 หรือประมาณ 1.2 เท่า



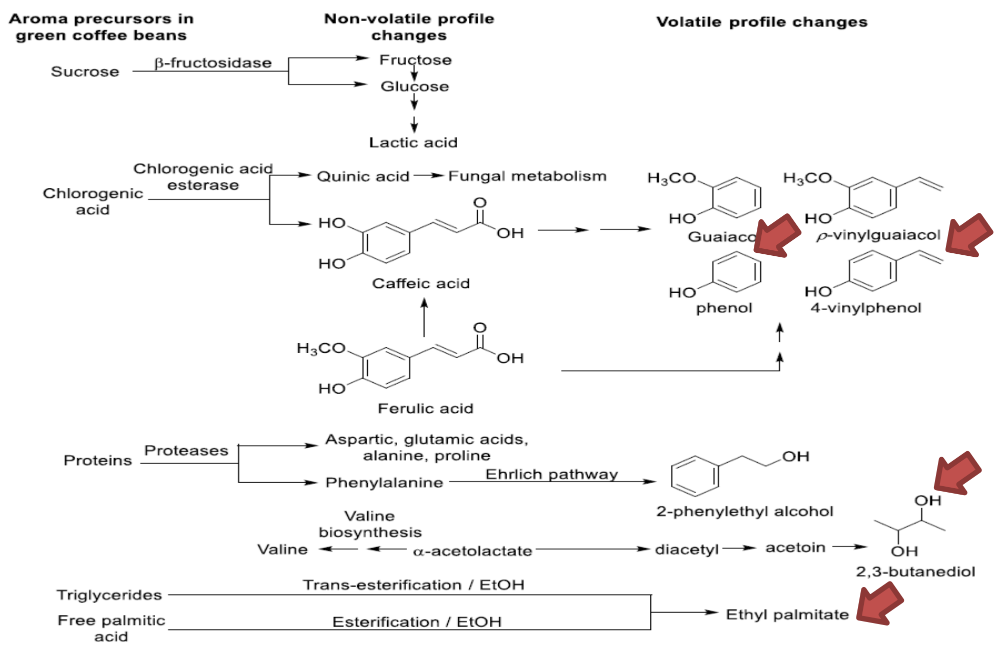
ภาพที่ 15 แสดงผลการเปรียบเทียบ Chromatogram ของ coffee flavor profile จากการหมักแบบแห้ง แบบเปียกและ AAF technique โดยเมื่อสังเกตกลุ่ม volatile ที่เกิดขึ้นพบว่า AAF technique ทำให้เกิดกลิ่นรสที่มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคเดิม และเมื่อทำการทดสอบชิม (Cupping test) พบว่าผลการทดสอบชิมอยู่ที่ 85 – 87 /100 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีหมักแบบเปียกปกติที่ 75/100

ตารางที่ 9 ผลการตรวจสอบสารสำคัญในเมล็ดกาแฟที่พบสามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่มโดยแบ่งเป็นกรดอินทรีย์ (Organic acid) น้ำตาล (Sugar) และกรดฟีนอลลิก (Phenolic acid) ซึ่งใช้เปรียบเทียบกระบวนการหมักในวิธีมาตรฐานได้ดังนี้ โดยเมื่อตรวจสอบกับวัฏจักรการเชื่อมโยงของสารเคมีดังกล่าวสามารถระบุที่มาของสารสำคัญที่เกิดขึ้นจากการหมักได้

Compounds	Mg/g dry wt. of green coffee beans		
	Control	Dry process	AAF technique
Organic acids			
Oxalic acid	-	-	-
Citric acid	10.30 ± 0.22a	10.97 ± 0.27a	6.65 ± 0.19b
Alpha-ketoglutaric acid	-	-	-
Malic acid	5.92 ± 0.10a	4.25 ± 0.14b	3.67 ± 0.14c
Quinic acid	5.35 ± 0.28a	2.15 ± 0.08b	Trace
Succinic acid	5.07 ± 0.50a	3.46 ± 0.06b	3.71 ± 0.54b
Lactic acid	Trace	1.96 ± 0.18a	4.12 ± 0.28b
Total	**26.64 ± 0.26a**	**22.79 ± 0.59b**	**18.16 ± 0.87c**
Sugars			
Fructose	Trace	0.79 ± 0.02	Trace
Glucose	22.24 ± 1.55a	10.34 ± 1.00b	7.70 ± 0.42c
Sucrose	51.17 ± 2.36a	33.46 ± 3.04b	16.03 ± 0.93c
Total	**73.41 ± 1.10a**	**44.59 ± 4.01b**	**23.73 ± 0.94c**
Phenolic acids			
Chlorogenic acid	**36.91 ± 1.53a**	**23.33 ± 0.98b**	**19.61 ± 0.77c**
Caffeic acid	**0.21 ± 0.01a**	**0.18 ± 0.01b**	**0.12 ± 0.00c**
***P*-coumaric acid**	**-**	**-**	**-**
Ferulic acid	**0.04 ± 0.00**	**Trace**	**-**
Total	**37.15 ± 1.55a**	**23.51 ± 0.99b**	**19.73 ± 0.77c**

**Mean values with different letters (a-c) in the same row indicate statistical differences at the 0.05 level (p<0.05); -, not detectable (concentration below LOD); trace, concentration below LOQ; blank, green coffee beans from the same batch from four DOA's coffee research station.

ภาพที่ 16 Summary of the proposed metabolic pathways occurring during green coffee bean fermentation by S. carevisiae Str. BAwine and the corresponding changes to the volatile and non-volatile profiles (modified after Krogerus and Gibson (2013), Etschmann et al. (2002), Mathew and Abraham (2006) and Magnuson and Lasure (2004)).



ตารางที่ 10 การคำนวณต้นทุนการผลิต (จากกาแฟ 1 กิโลกรัม)

Process	ต้นทุน	เวลา	ข้อเสีย
Machine	35 บาท	1 นาทีต่อกิโลกรัม	- เมือกหลุดไม่หมด - เมล็ดกาแฟแตก
Enzyme	250 บาท	24 ชั่วโมง ขึ้นไป	- มีราคาแพงและหาซื้อยาก
Chemical	135 บาท	24 ชั่วโมง ขึ้นไป	- มีสารตกค้างในเมล็ดกาแฟ - มีกลิ่นไม่พึงประสงค์เมือกอาจไม่หลุดในบางกรณี
Original Wet process	55 บาท	60 ชั่วโมงขึ้นไป	- ใช้เวลานาน - ใช้น้ำมากและเมือกไม่หลุดในบางกรณี
AAF technique	25 บาท	18 ชั่วโมง	

ตารางที่ 11 Effect of AAF techniques on the volatile profiles of light, medium and dark roasted coffee beans

Compounds	*LRI*		*FID peak area (10^4)*						*Identification*
	FFAP	Ref	Light Roast		Medium Roast		Dark Roast		
			LC	LAAF	MC	MAAF	DC	DAAF	
Acids									
Acetic acid[1]	1452	1468	3799 ± 146	3453 ± 520	3116 ± 552	3558 ± 190	3064 ± 373	2832 ± 300	MS,LRI
3-Methyl-2-butanoic acid[1]	1804	1819	340 ± 245	317 ± 16	363 ± 122	342 ± 164	171 ± 16	177 ± 14	MS,LRI
Benzoic acid[1]	2454	2465	219 ± 54	231 ± 94	-	264 ± 107	-	-	MS,LRI
Alcohols									
2-phenylethyl alcohol[1]	1951	1921	294 ± 55	384 ± 101	153 ± 36	155 ± 98	-	-	MS, LRI
Benzyl alcohol	2014		-	-	508 ± 66	526 ± 31	84 ± 8	52 ± 8	MS
Alkanes									
Tridecane[1]	1301		9 ± 0	-	-	-	-	-	MS
Hexadecane[1]	1601		-	32 ± 14	-	-	-	-	MS
Carbonyls									
2,3-butanedione[1]			450 ± 26	350 ± 33	446 ± 12	397 ± 24	413 ± 32	392 ± 18	MS
2,3-pentadione[1]	1063	1067	840 ± 38	510 ± 6	541 ± 70	347 ± 43	316 ± 35	218 ± 36	MS, LRI
Hexanal[1]	1084	1079	48 ± 4	36 ± 3	33 ± 4	34 ± 2	30 ± 0	27 ± 1	MS, LRI
Acetoin[1]	1293	1291	469 ± 42	401 ± 12	392 ± 37	342 ± 21	319 ± 11	272 ± 23	MS, LRI
1-hydroxy-2-propanone[1]	1311	1300	1794 ± 29	1476 ± 68	1321 ± 170	1183 ± 87	1107 ± 164	1222 ± 160	MS, LRI
2-cyclopenten-1-one[1]	1371	1372	-	17 ± 3	34 ± 5	29 ± 8	49 ± 18	95 ± 11	MS
∂-butyrolactone[1]	1653	1637	722 ± 214	453 ± 130	1377 ± 384	1252 ± 453	2348 ± 175	2524 ± 411	MS, LRI

Compounds	*LRI*		*FID peak area (10^4)*						*Identification*
	FFAP	Ref	Light Roast		Medium Roast		Dark Roast		
			LC	LAAF	MC	MAAF	DC	DAAF	
Carbonyls (cont.)									
ß-damascenone[1]	1833	1828	25 ± 17	77 ± 7	10 ± 1	10 ± 1	-	-	MS,LRI
Ethanone, 1-(3-aminophenyl)-	1846		-	25 ± 3	40 ± 6	26 ± 4	30 ± 6	25 ± 10	MS
Esters									
Methyl salicyate[1]	1798	1801	411 ± 262	173 ± 6	210 ± 19	134 ± 15	97 ± 20	129 ± 51	MS, LRI
Ethyl palmitate	2257		-	-	-	34 ± 0	-	37 ± 3	MS
Methyl linoleate	2500		-	-	-	-	357 ± 51	30 ± 24	MS
Furans									
2-methylfuran[1]			165 ± 15	150 ± 18	422 ± 76	368 ± 79	838 ± 178	891 ± 239	MS
2,5-dimethylfuran[1]			60 ± 4	52 ± 2	85 ± 4	82 ± 6	123 ± 23	112 ± 13	MS
2-vinyl-5-methylfuran[1]	1156	1158	88 ± 4	56 ± 5	90 ± 4	85 ± 19	107 ± 32	74 ± 7	MS,LRI
2-vinylfuran[1]	1178		17 ± 1	15 ± 1	18 ± 0	-	13 ± 1	-	MS
Furfural[1]	1478	1473	12839 ± 536	8324 ± 406	8258 ± 1339	5824 ± 908	3884 ± 433	2974 ± 721	MS, LRI
5-methylfurfural[1]	1591	1582	12980 ± 441	8392 ± 260	9142 ± 1300	5963 ± 1045	3924 ± 394	2343 ± 864	MS, LRI
Furfuryl alcohol[1]	1673	1671	16093 ± 878	18042 ± 1088	18229 ± 436	20414 ± 1005	17804 ± 445	18408 ± 1551	MS, LRI
Furanones									
Dihydro-2-methyl-3(2H)-furanone[1]	1270	1282	505 ± 32	217 ± 9	327 ± 42	141 ± 18	200 ± 12	96 ± 22	MS, LRI
3,4-dimethyl-2,5-furandione[1]	1757	1764	157 ± 10	66 ± 7	151 ± 12	65 ± 2	117 ± 18	53 ± 10	MS, LRI
Phenols									
Guaiacol[1]	1876	1871	360 ± 45	277 ± 20	345 ± 58	332 ± 40	439 ± 46	503 ± 119	MS, LRI
Phenol[1]	2019	2030	244 ± 123	357 ± 47	163 ± 62	232 ± 201	258 ± 76	278 ± 69	MS, LRI
4-vinylphenol[1]	2413		50 ± 1	82 ± 12	45 ± 1	56 ± 2	-	45 ± 1	MS

Compounds	LRI		FID peak area (10^4)						Identification
	FFAP	Ref	Light Roast		Medium Roast		Dark Roast		
			LC	LAAF	MC	MAAF	DC	DAAF	
Pyrazines									
Pyrazine[1]	1220	1215	408 ± 17	672 ± 59	493 ± 72	850 ± 83	598 ± 24	1049 ± 103	MS, LRI
2-methylpyrazine[1]	1274	1267	4972 ± 520	7188 ± 391	4239 ± 327	6115 ± 622	3696 ± 254	5167 ± 397	MS, LRI
Pyridines									
Pyridine[1]	1191	1182	1507 ± 199	2037 ± 434	2856 ± 361	3387 ± 395	4318 ± 372	5383 ± 1105	MS, LRI
3-pyridinol	2446	2450	522 ± 21	594 ± 35	1286 ± 345	1029 ± 104	1653 ± 210	1570 ± 65	MS, LRI
Pyrroles									
2-acetylpyrrole[1]	1989	1983	1140 ± 67	1204 ± 99	1362 ± 141	1344 ± 296	1175 ±88	1192 ± 426	MS, LRI
1H-pyrrole-2-carboxyaldehyde[1]	2047	2038	2483 ± 35	2429 ± 97	1900 ± 192	1924 ± 432	1236 ± 168	1100 ± 297	MS, LRI
Sulfur containing compounds									
4-methyl thiazole[1]	1288		15 ± 2	39 ± 4	18 ± 5	39 ± 6	18 ± 1	42 ± 3	MS
2-furfurylthiol[1]	1442		-	26 ± 4	29 ± 5	50 ± 22	18 ± 9	13 ± 3	MS, LRI
2-formylthiophene[1]	1716	1679	183 ± 16	264 ± 33	119 ± 18	127 ± 23	56 ± 9	60 ± 28	MS, LRI
Miscellaneous									
Neophytadiene	1376		57 ± 6	53 ± 6	38 ± 3	34 ± 2	35 ± 23	-	MS, LRI
Maltol[1]	1989	2004	887 ± 157	1019 ± 163	1288 ± 60	1115 ± 222	1332 ±136	1063 ± 366	MS, LRI
Indole[1]	2475	2476	64 ± 9	112 ± 18	107 ± 18	151 ± 12	166 ± 48	215 ± 31	MS, LRI

[1]Compounds reported in Flament (2002); LC = Light roasted unfermented coffee; LAAF = Light roasted AAF fermented coffee; MC = Medium roasted unfermented coffee; MAAF = Medium AAF fermented coffee; DC = Dark roasted unfermented coffee; DAAF = Dark roasted AAF fermented coffee. Identification method : MS = Mass spectrum; LRI = Linear Retention Indices obtained from references or literature values (LRI referred to the value in Mondello et al. (2005); Moon and Shibamoto (2009); Nebesny, Budryn, Kula and Majda(2007); Gonzalez-Rios et al.(2007); Lopez-Gaililea et al.(2006)); "-" = undetected

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การหมักเมือกกาแฟจากจุลินทรีย์ถือเป็นการผลิตกาแฟอะราบิก้าให้ได้คุณภาพที่ควบคุมได้ โดยภาวะการหมักที่เหมาะสมรวมทั้งปัจจัยที่จำเป็นต้องควบคุมเพื่อการพัฒนาการหมักกาแฟอะราบิก้าคุณภาพนี้สามารถประยุกต์ใช้ทคนิคใหม่ที่ได้จากการทดลองได้แก่ AAF technique ที่ใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae strain BAwine* และการเติมอากาศในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการหมักที่ 5 มิลลิตรต่อนาทีและควบคุมความเป็นกรดด่างให้อยู่ที่ pH 4.5 โดยเทียบกับกรดทาทาริกทั้งนี้การหมักโดยเทคนิคใหม่นี้ช่วยลดทรัพยากรในการหมักได้แก่ เวลา น้ำที่เป็นต้นทุนสำคัญในการผลิตกาแฟอะราบิก้าและยังสามารถเพิ่มกลิ่นรสที่ควบคุมได้ให้กาแฟอะราบิก้าที่ได้จากเทคนิคเอเอเอฟอีกด้วยโดยเมื่อทดสอบโดยเทคนิค HS-SPME-GC-MS พบสารให้กลิ่นที่น่าสนใจในกลุ่มผลไม้ที่เกิดจากการหมักได้แก่กลุ่มกรดอินทรีย์และกลิ่นกลุ่มเอสเทอร์ปริมาณมากกว่าการหมักแบบปกติ โดยเมื่อทดสอบโดยวิธี SCAA cupping score methods คะแนนการทดสอบชิมสูงถึง 83 -85/100 จัดเป็นเกรดกาแฟพิเศษ (Specialty coffee)

การนำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ด้านวิชาการและเศรษฐกิจ ได้แก่ กระบวนการหมักกาแฟแบบใหม่โดยเทคนิค AAF (Acid-Air-Flore Fermentation) และเชื้อจุลินทรีย์สายพันธ์ใหม่ได้แก่ *S. cerevisiae* strain BAwine

2. ด้านสังคม ได้แก่ นำเทคโนโลยีการหมักกาแฟไปเผยแพร่เพื่อให้เกษตรกรสามารถพัฒนากระบวนการหมักกาแฟอาราบิก้าคุณภาพได้ เพื่อพัฒนากรรมวิธีการหมักกาแฟอาราบิก้าคุณภาพที่รวดเร็ว ต้นทุนต่ำและนำไปใช้ประโยชน์และยอมรับในวงกว้าง พร้อมทั้งนำเสนอความคิดใหม่ในการพัฒนากาหมักกาแฟอาราบิก้าคุณภาพดังกล่าวเพื่อเป็นทางเลือกที่ทำรายได้ให้กับเกษตรกรต่อไป (ผลสำเร็จระดับ P)

แผนการนำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

กลุ่มเป้าหมาย	แผนการดำเนินการ	ระยะเวลา
1. ศูนย์วิจัยด้านกาแฟ (จำนวน 4 ศูนย์)	นำเทคโนโลยีไปใช้ในบ่อหมักของศูนย์	ทดสอบอย่างน้อย 2 ปี
2. ภาคเอกชน **-มูลนิธิโครงการหลวง** **-โครงการในพระราชดำริฯ (ไทย, ลาว)**	นำเทคโนโลยีไปใช้ในบ่อหมักของศูนย์และประยุกต์ใช้กับถังหมัก (ถังปูน, ถัง PVC) ที่ทางโครงการมีอยู่แล้ว	ทดสอบอย่างน้อย 2 ปี (ธ.ค. 61 – ก.พ. 62)
3. ภาคเอกชน **- บริษัท Hillkoff** **- บริษัท มีวนาคอฟฟี่** **- บริษัท PANAcoffee** **(ศูนย์เรียนรู้ the Coffenery)**	1.นำเทคโนโลยีทดสอบบ่อหมักต้นแบบจากอิตาลี (บ่อสแตนเลส) 2.นำเทคโนโลยีทดสอบในบ่อปูน (ทดสอบในกาแฟอินทรีย์) 3.นำเทคโนโลยีทดสอบในบ่อหมักหลายขนาดและเกษตรกรเครือข่าย (ขนาดใหญ่ 500 กิโลกรัม)	ทดสอบอย่างน้อย 2 ปี (ธ.ค. 61 – มี.ค. 62)

4. การขยายผล **-ทดสอบในแปลงเกษตรกรโรบัสต้า**	นำเทคโนโลยีทดสอบกับผลผลิตกาแฟโรบัสต้าในจังหวัดชุมพร	ทดสอบอย่างน้อย 2 ปี
5. การต่อยอด **- นำเทคนิค AAF ไปใช้กับถังหมักต้นแบบ**	นำเทคโนโลยีทดสอบในถังหมักขนาด 100 กิโลกรัม	ทดสอบอย่างน้อย 2 ปี

เอกสารอ้างอิง

โกเมศ สัตยาวุธ, ปิยนุช นาคะ, มาโนช หาญเทวี, (2554) ปริมาณสารไพรีนและผลต่อความ ขมของกาแฟคั่วบดในประเทศไทย; ประชุมวิชาการกาแฟแห่งชาติครั้งที่ ๑ โรงแรมฮอล์ลิเดย์อินน์ จังหวัดเชียงใหม่

โกเมศ สัตยาวุธ, วิมลวรรณ วัฒนวิจิตร, ปิยนุช นาคะ, มาโนช หาญเทวี, สรัญญา อุปรักขิตานนท์, (2556) การผลิตกาแฟที่มีสารกลุ่ม Polycyclic Aromatic Hydrocarbon ต่ำ; รายงานการประชุมวิชาการสำนักวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร โรงแรมชะอำบีสรีสอร์ท จังหวัดเพชรบุรี

จิรสวัสดิ์ ภูวิภิรมย์. (2546). *ปัจจัยการผลิตที่มีผลต่อสารให้กลิ่นรสของกาแฟผสมแบบไทย*. บัณฑิตวิทยาลัย, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร, ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นนทวัชร ชิตวิลัย. (2547). *การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบระเหย และกรดอินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมักของกาแฟอาราบิก้าที่ปลูกในประเทศไทย.* บัณฑิตวิทยาลัย, สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร, ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร, มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ปิยะมาศ ศรีรัตน์, ปิยะนุช นาคะ และ อรพิน ภูมิภมร. (2551). ผลของการสีเปลือกนอกของผลกาแฟและการสลายเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟด้วยเอนไซม์เพคติเนสต่อระยะเวลาการอบแห้งและคุณภาพของเมล็ดกาแฟพันธุ์โรบัสต้า. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร.* 39(3), 401-404.

พิทักษ์ อาภาศิริผล. (2529). *คำแนะนำการปลูกกาแฟ*. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเ ก ษ ต ร , กรุงเทพฯ.

พงษ์ศักดิ์ อังกสิทธิ์ และบัณฑูรย์ วาฤทธิ์. (2542). *การปลูก และผลิตกาแฟอาราบิก้าบนที่สูง*. เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พัชนี สุวรรณวิศาลกิจ. (2545). กาแฟคั่ว. *วารสารอาหาร*. 32(1), 17-22. เรื่องของกาแฟที่คุณไม่อาจรู้. วันที่ค้นข้อมูล 10 กุมภาพันธ์ 2556, เข้าถึงจาก http://www.nescafe.co.th/coffee_abc_th_th.axcms

ศูนย์วิจัยและพัฒนากาแฟบนที่สูง. (2542). *การปลูกกาแฟและผลิตกาแฟอาราบิก้าบนที่สูง.* คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

สาวิตรี ลิ่มทอง. (2549). *ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ*. (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมเจตน์ ซิ้มเจริญ. (2546). *ผลการวิเคราะห์ดินจากแปลงปลูกกาแฟโรบัสต้าในประเทศ ไทย.* วารสารกาแฟ เนสท์เล่, ฉบับที่ 2, หน้า 2-7.

Avallone, S., Brillouet, J.M., Guyot, B., Olguin, E. & Guiraud, J.P. (2001). Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. *Current Microbiology*, 42, 252-256.

Avallone, S., Brillouet, J.M., Guyot, B., Olguin, E. & Guiraud, J.P. (2002). Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation. *International Journal of Food Science and Technology,* 37, 191-198.

Bartlett, M.C., Gerhardt, P. (1989) Continuous Antibiotic Fermentation – Design of a 20 litre, Single-stage Pilot plant and trials with two contrasting process, *journal of Biochemical and microbiological technology and engineering*, Vol I, No.4: 359-377.

Clarke, R.J. 1986. The Flavour of Coffee. *Department of Food Science*. University of Reading, UK. 1-47 p.

Franca, A.S., Mendonca, JCF., & Oliveira, SD. (2005). Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *LWT*, 38, 709–715.

Gokulakrishnan, S., Chandraraj, K., & Gummadi, SN. (2005). Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 225–232.

Gordon, R.E., & Mihm, J.M. (1962). Identification of Nocardia caviae (Erickson) nov. comb. Annals of the New York Academy of Sciences 98, 628-636.

Nasanit R.,_SATAYAWUT K. (2014). Microbial communities during wet fermentation process of *Coffea Arabica* **var. *chiangmai 80.*** Kasetsart University Journal.

Pandey, A., Soccol, CR., Nigam P., Brand, D., Mohan, R., & Roussos, S. (2000). Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. Biochemical Engineering Journal, 6, 153–162.

Silva, CF., Vilela, DM., Cordeiro, CLDS., Duarte, WF., Dias, DR., & Schwan, RF. (2013). Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. *World J Microbiol Biotechnol*, 29, 235–247.

Sivetz, M., & Foote, H.E. (1963). Coffee Processing Technology. Vol 1: Fruit-Green, Roast and soluble Coffee. London. 598 p.

Smith, A.W. (1985). Introduction. in coffee, chapter 1. *In* R.J. Clarke and R. Macrae, eds. *Coffee Volume 1: Chemistry*. Elvevier Applied Sience Publisher Ltd.

Varnam, H.A., & Sutherland, P.J. (1994). Beverage Technology Chemistry and Microbiology. New York: *Chapman&Hall*. 191-254 p.

Viencent, J.C. (1989). Green coffee processing. In R.J. Clarke and R. Macrae, eds. *Coffee Vol. 2: Technology*. Elsevier Applied Science PublisherLtd.