รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : วิจัยและพัฒนากาแฟ

2. **โครงการวิจัย** : โครงการวิจัยและพัฒนากระบวนการหมักกาแฟอาราบิก้าคุณภาพ

   กิจกรรม : -

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การศึกษาการหมักกาแฟด้วยจุลินทรีย์ในระบบแอนแอโรบิก (ไม่ใช้ออกซิเจน)

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Development of microbial coffee fermentation under anaerobic condition (Oxygen-limited condition)

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง	: นางสาวสุกัญญา นิติยนต์	สังกัด กวป.
ผู้ร่วมงาน	: นายโกเมศ สัตยาวุธ	สังกัด กวป.
	ฉัตรนภา ข่มอาวุธ	สังกัด สวส.
	สุภัทรา เลิศวัฒนาเกียรติ	สังกัด สวส.

5. **บทคัดย่อ**

การพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อเร่งกระบวนการหมักกาแฟโดยใช้จุลินทรีย์ในระบบแอนแอโรบิกหรือในสภาวะที่มีอากาศน้อยได้ดำเนินการ ณ กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตรและศูนย์วิจัยส่วนภูมิภาคจำนวน 4 แห่ง ซึ่งตั้งอยู่สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 600-1,200 เมตร โดยใช้กาแฟสายพันธุ์ *Coffea arabica var Chiangmai 80* จากพื้นที่ ขุนวาง (จังหวัดเชียงใหม่), วาวี (จังหวัดเชียงราย), ดอยมูเซอ (จังหวัดตาก) และเขาค้อ (จังหวัดเพชรบูรณ์) ร่วมกับการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด ในการเร่งการหมักและการหลุดลอกของเมือกหุ้มเมล็ดกาแฟ ซึ่งการหมักกาแฟโดยใช้หัวเชื้อยีสต์ *Pichia kluyveri* PRO-Y15 ที่คัดแยกขึ้นมาใหม่จากธรรมชาตินี้สามารถเร่งการหลุดของเมือกกาแฟได้ดี โดยเมือกกาแฟจะหลุดจากเมล็ดกาแฟอย่างสมบูรณ์หลังจากเริ่มการหมักภายในเวลา 20-24 ชั่วโมง ในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิระหว่าง 14-27 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 5-8 ในการหมักกาแฟได้ ความสามารถในการย่อยเพคตินของยีสต์ PRO-Y15 ช่วยลดระยะเวลาการหมักกาแฟ การใช้ทรัพยากรน้ำและแรงงานที่ใช้ในการขัดเมือกกาแฟตามการแปรรูปกาแฟแบบดั้งเดิมลงได้ 80% กาแฟที่ได้จากการหมักโดยใช้หัวเชื้อยีสต์ดังกล่าวมี

คะแนนการชิม (Cupping score) ดีกว่าการหมักที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ โดยผลจากการทดสอบพบว่าการผลิตกาแฟโดยใช้หัวเชื้อยีสต์ PRO-Y15 ในระบบปิด ทำให้กาแฟมีแนวโน้มที่จะมีกลิ่นที่ใกล้เคียงกับกลิ่นของช๊อกโกแลตเป็นส่วนประกอบ แสดงให้เห็นว่ากระบวนการแปรรูปกาแฟโดยเทคนิค PRO-Y สามารถประยุกต์ใช้ในการแปรรูปกาแฟในประเทศไทยได้

Development of microbial coffee fermentation under anaerobic or oxygen-limited condition has been studied at Postharvest and Processing Research and Development Division and fourth Regional Horticultural Offices located around 600 - 1,200 meters above the sea level. Coffee fermentation was performed using *Coffea arabica* var *Chiangmai 80* from Khun Wang (Chiang Mai province), Wawee (Chiang Rai province), Mu Ser (Tak province) and KhaoKoh (Petchabun province) with several microbial statar cultures to acceleration of coffee bean demucilation under oxygen-limited condition. The results show that, the newly isolated yeast *Pichia kluyveri* PRO-Y15 promoted the demucilage fermentation qualitatively within 20-24 hours at wide range temperature between 14-27 degrees celsius with pH range from 5-8. It was evident that pectinolytic activity of yeast PRO-Y15 enabled the reduction of time usage in demucilage process as well as water consumed from the traditional wet process; reduce for 80%. Furthermore, the organoleptic evaluations of these coffees stand out from the traditional coffee fermentation coffee, it promotes that PRO-Y techniques coffees tends to have their ‘flavor profile’ close to chocolate with the higher cupping score than traditional wet process suggested that PRO-Y technique was sutable for application to coffee fermentation in Thailand.

6. คำนำ

กระบวนการหลังการเก็บเกี่ยวในการแปรรูปกาแฟอาราบิก้าเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อคุณภาพของกาแฟ โดยในประเทศไทยนั้นมีการแปรรูป 2 วิธีการ คือ การแปรรูปแบบเปียก (การหมัก) และการแปรรูปแบบแห้ง ซึ่งการแปรรูปกาแฟแบบเปียกถือเป็นวิธีการที่มีคุณภาพในการผลิตกาแฟอาราบิก้า โดยกาแฟที่มีการหมักเพื่อย่อยเมือกหุ้มเมล็ดออก (digested mucilage) จะมีคุณภาพที่ดีกว่าเมล็ดกาแฟที่ล้างแบบธรรมดา (washed bean) และดีกว่าเมล็ดกาแฟที่ไม่เอาเมือกออก (mucilage bean) เนื่องจากกาแฟที่ไม่ได้นำเมือกออกนั้น เมื่อนำไปตาก เมือกจะเหนียวติดกับพื้นทำให้กาแฟแห้งยากและใช้เวลาในการตากกาแฟนาน เนื่องจากกระบวนการหมักกาแฟเป็นกระบวนการที่ใช้ต้นทุนใน

การผลิตสูง ทั้งในเรื่องของแรงงาน เวลา ทรัพยากรน้ำและสถานที่สำหรับการหมักกาแฟ ทำให้เกษตรกรละเลยกระบวนการหมักและเลือกที่จะแปรรูปแบบแห้งที่ทำให้คุณภาพกาแฟด้อยกว่าและเสี่ยงต่อการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราสูงมาก

การหมักกาแฟแบบดั้งเดิมนั้นเกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์ธรรมชาติที่มากับเมล็ดกาแฟมีการเจริญและย่อยเมือกหุ้มเมล็ดกาแฟ ซึ่งเป็นส่วนของเพคติน น้ำตาล เฮมิเซลลูโลส และส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (Wrigley, 1988) โดยจุลินทรีย์ที่พบส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียและยีสต์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเพคตินได้ รวมถึงยังพบแบคทีเรียแลคติกและยีสต์กลุ่มอื่นๆที่ไม่สร้างเอนไซม์ย่อยสลายเพคตินด้วย (Avallone et. al., 2001; Avallone et. al., 2002; Silva et. al. 2013) การศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักกาแฟอาราบิก้าในประเทศไทยพบว่ามีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดได้แก่ยีสต์สายพันธ์ *Pichia, Candida, Debaryomyces, Kluyveromyces* และเชื้อแบคทีเรียชนิด Enterobacteriaceae และแบคทีเรียแลคติคได้แก่ *Enterobactor, Bacillus subtilis, Erwinia, Enterococcus* และ *Leuconostoc* มากระหว่างการหมักกาแฟในบ่อหมักปกติ (Nasanit et. al., 2008) อย่างไรก็ตามศึกษาวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการหมักเมล็ดกาแฟอาราบิก้ายังมีน้อยมากในประเทศไทย โดยและการศึกษาที่ผ่านมาจะเป็นงานวิจัยทางด้านคุณภาพ เช่น ปัจจัยการผลิตที่มีผลต่อสารให้กลิ่นรสของกาแฟผสมแบบไทย (จิรสวัสดิ์, 2546) การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบระเหย และกรดอินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมักของกาแฟอาราบิก้าที่ปลูกในประเทศไทย (นนทวัชร, 2547) การวิจัยครั้งนี้มุ่งที่จะปรับปรุงการหมักกาแฟอาราบิก้าของไทยและเร่งกระบวนการหมักกาแฟโดยใช้จุลินทรีย์ในระบบแอนแอโรบิก (ไม่ใช้ออกซิเจน) หรือในสภาวะที่มีอากาศน้อยที่เหมาะสม มีคุณภาพ ช่วยประหยัดทรัพยากรและลดต้นทุนการแปรรูปกาแฟสายพันธุ์ *Coffea arabica var Chiangmai 80* ซึ่งเป็นพันธุ์แนะนำจากกรมวิชาการเกษตร ที่ปลูกสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 600-1,200 เมตร โดยได้ดำเนินงานวิจัยระหว่างปี 2560-2562 ณ กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตรและศูนย์วิจัยส่วนภูมิภาคจำนวน 4 แห่ง ได้แก่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเพชรบูรณ์ (เขาค้อ), ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรตาก (ดอยมูเซอ), ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ (ขุนวาง), ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย (วาวี)

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. กาแฟ สายพันธุ์ *Coffea Arabica cv. Chiangmai 80*
2. เชื้อจุลินทรีย์ *Saccharomyces cerevisiae* BAwine
3. เชื้อจุลินทรีย์ *Leuconostoc oneos*
4. เชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus plantalum*
5. เชื้อจุลินทรีย์ *Pichia kluyveri* PRO-Y15
6. เครื่องวัดความชุ่น (LUTRON, TU-2016)
7. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (LUTRON, PH-230SD)
8. เครื่องวัดความชื้น (KETT, PM-450)
9. เครื่องวัดสีกาแฟคั่ว (ROAMI, TRA-300)
10. เครื่องวัดความหวานในกาแฟ (ATAGO, PAL-Coffee (BX/TDS))
11. เครื่องสเปกโตรโฟรโตมิเตอร์ (Hitachi, U5100)
12. เครื่องคั่วกาแฟ (Coffee Pro Direct, Sample pro-100))
13. เครื่องแก้วและถังสำหรับหมักกาแฟ
14. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์
15. สารเคมี ได้แก่ Tartaric Acid และ Ammonium sulfate, Sodium hydroxide, phenolphthalein

- **วิธีการ**

1. ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและยีสต์ระหว่างการหมักเมือกกาแฟในสภาวะที่มีอากาศน้อยในห้องปฏิบัติการ

1.1 คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญในระหว่างการหมักเมือกกาแฟในสภาวะที่มีอากาศน้อย

นำผลมากาแฟสุกมาแช่น้ำ ทำการลอกส่วนเปลือกนอกออกด้วยมือ คัดเลือกเมล็ดเสียและเมล็ดที่ลอยน้ำออก ล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด บรรจุเมล็ดกาแฟลงในขวดหมักที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 500 กรัม บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน หลังจากนั้นทำการ cross streak plate โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop) แตะตัวอย่างกาแฟที่หมักแล้วลาก (Streak) ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง Yeast-Malt agar (YM) และ MRS agar บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง จนปรากฏโคโลนี ทำการคัดแยกจุลินทรีย์โดยอาศัยความแตกต่างของสีและลักษณะโคโลนีที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.2 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเพคตินของจุลินทรีย์ที่แยกได้

1.2.1 ทดสอบบนอาหารแข็ง Cristal Violet Pectate Medium (CVP)

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่จะทำการทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหารแข็ง Yeast-Malt agar (YM) และเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกบนอาหารแข็ง MRS agar บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง

หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็ง Cristal Violet Pectate Medium (CVP) บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของจุลินทรีย์

1.2.2 ทดสอบการหมักเมือกกาแฟในขวดปิดสนิท

นำผลมากาแฟสุกมาแช่น้ำ ทำการลอกส่วนเปลือกนอกออกด้วยมือ คัดเลือกเมล็ดเสียและเมล็ดที่ลอยน้ำออก ล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด บรรจุเมล็ดกาแฟ 20 กรัม ลงในขวดปลอดเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 40 มิลลิลิตร ลงในขวด หลังจากนั้นถ่ายเชื้อยีสต์ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง Yeast-Malt agar (YM) หรือเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS agar อายุ 24-48 ชั่วโมง ลงในขวดบรรจุกาแฟที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 18 ชั่วโมง สังเกตการหลุดของเมือกจากเมล็ดกาแฟ

1.3 ทดสอบการหมักในสภาวะที่มีอากาศน้อยโดยการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์

1.3.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่จะทำการทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหารแข็ง Yeast-Malt agar (YM) และเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกบนอาหารแข็ง MRS agar บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อบนอาหารแข็งลงในขวดที่บรรจุน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับค่า optical density (OD) ที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 1 เพื่อใช้สำหรับการทดสอบการหมัก

1.3.2 ทดสอบการหมักภายใต้ระบบแอนแอโรบิกโดยการเติมหัวเชื้อยีสต์และแบคทีเรีย

แผนการทดลอง ออกแบบการทดลองแบบ CRD จำนวน 6 กรรมวิธี 3 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม ไม่เติมหัวเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 การทำ Acidification ด้วยกรดทาทาริก จนมีค่า pH เท่ากับ 4

กรรมวิธีที่ 3 ใส่หัวเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* BAwine

กรรมวิธีที่ 4 ใส่หัวเชื้อแบคทีเรีย *Leuconostoc oneos*

กรรมวิธีที่ 5 ใส่หัวเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus plantalum*

กรรมวิธีที่ 6 ใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากข้อ 1.2.2

นำผลมากาแฟสุกมาแช่น้ำ ทำการลอกส่วนเปลือกนอกออกด้วยมือ คัดเลือกเมล็ดเสียและเมล็ดที่ลอยน้ำออก ล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด บรรจุเมล็ดกาแฟลงในขวดหมักที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 500 กรัม จากนั้นนำขวดหมักที่บรรจุเมล็ดกาแฟมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร ทำการหมัก 6 วิธีคือ การหมักตามธรรมชาติ (ชุดควบคุม), การหมักในสภาวะกรด (Acidification) โดยเติมกรดทาทาริกในขวดหมัก จนมีค่า pH เท่ากับ 4 , การหมักโดยเติมหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* BAwine , การหมักโดยเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *Leuconostoc oneos*, *Lactobacillus plantalum* และการหมักโดยเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากข้อ 1.2.2 โดยในการทดสอบการหมักจะเติมหัวเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 1.3.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในขวดหมักหลังจากนั้นปิดฝาขวดหมักและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเริ่มทำการหมัก ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง สังเกตการหลุดของเมือกจาก

เมล็ดกาแฟโดยวิเคราะห์ค่าความขุ่น (Turbidity), ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Acids), ความเป็นกรด-ด่าง(pH)

2 ศึกษาการพัฒนาการหมักกาแฟอาราบิก้าด้วยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกสภาวะที่มีอากาศน้อยในแปลงทดสอบ

2.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่จะทำการทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหารแข็ง Yeast-Malt agar (YM) และเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกบนอาหารแข็ง MRS agar บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง เชี่ยเชื้อบนอาหารแข็งลงในขวดที่บรรจุน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับค่า optical density (OD) ที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 1 เพื่อใช้สำหรับการทดสอบการหมัก

2.2 ทดสอบการหมักกาแฟอาราบิก้าในแปลงทดสอบ 4 แห่ง

แผนการทดลอง ออกแบบการทดลองแบบ CRD จำนวน 6 กรรมวิธี 3 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม ไม่เติมหัวเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 การทำ Acidification ด้วยกรดทาทาริก จนมีค่า pH เท่ากับ 4

กรรมวิธีที่ 3 ใส่หัวเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* BAwine

กรรมวิธีที่ 4 ใส่หัวเชื้อแบคทีเรีย *Leuconostoc oneos*

กรรมวิธีที่ 5 ใส่หัวเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus plantalum*

กรรมวิธีที่ 6 ใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากข้อ 1.2.2

ทดสอบการหมักกาแฟอาราบิก้าในแปลงทดสอบ 4 แห่ง ได้แก่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเพชรบูรณ์ (เขาค้อ), ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรตาก (ดอยมูเซอ), ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ (ขุนวาง), ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย (วาวี) โดยนำผลมากาแฟสุกมาแช่น้ำ ทำการลอกส่วนเปลือกนอกออกด้วยมือ คัดเลือกเมล็ดเสียและเมล็ดที่ลอยน้ำออก ล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด บรรจุเมล็ดกาแฟลงในขวดหมักที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 500 กรัม จากนั้นนำขวดหมักที่บรรจุเมล็ดกาแฟมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร ทำการหมัก 6 วิธีคือ การหมักตามธรรมชาติ (ชุดควบคุม), การหมักในสภาวะกรด (Acidification) โดยเติมกรดทาทาริกในขวดหมัก จนมีค่า pH เท่ากับ 4 , การหมักโดยเติมหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* BAwine , การหมักโดยเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *Leuconostoc oneos*, *Lactobacillus plantalum* และการหมักโดยเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากข้อ 1.2.2 โดยในการทดสอบการหมักจะเติมหัวเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 2.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในขวดหมัก หลังจากนั้นปิดฝาขวดหมักและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเริ่มทำการหมัก ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง สังเกตการหลุดของเมือกจากเมล็ดกาแฟโดยวิเคราะห์ค่าความขุ่น (Turbidity), ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Acids), ความเป็นกรด-ด่าง(pH)

3 ศึกษากระบวนการเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้าในสภาวะที่มีอากาศน้อยโดยนำผลการทดลองในข้อที่ 2 มาศึกษาต่อ

3.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่จะทำการทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหารแข็ง Yeast-Malt agar (YM) และเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกบนอาหารแข็ง MRS agar บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมง เชี่ยเชื้อบนอาหารแข็งลงในขวดที่บรรจุน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับค่า optical density (OD) ที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 1 เพื่อใช้สำหรับการทดสอบการหมัก

3.2 ทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้าในขวดปิด

3.2.1 ศึกษาผลของปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในการหมักเพื่อเร่งการหมักเมือกกาแฟในห้องทดลอง ที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียล

แผนการทดลอง ออกแบบการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต)

กรรมวิธีที่ 2 เติม 1% แอมโมเนียมซัลเฟต

กรรมวิธีที่ 3 เติม 1.5% แอมโมเนียมซัลเฟต

กรรมวิธี่ที่ 4 เติม 2% แอมโมเนียมซัลเฟต

นำผลมากาแฟสุกมาแช่น้ำ ทำการลอกส่วนเปลือกนอกออกด้วยมือ คัดเลือกเมล็ดเสียและเมล็ดที่ลอยน้ำออก ล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด บรรจุเมล็ดกาแฟลงในขวดหมักที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จำนวน 500 กรัม จากนั้นนำขวดหมักที่บรรจุเมล็ดกาแฟมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร เติมจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากข้อ 2 ทำการหมัก 4 วิธีคือ การหมักตามธรรมชาติ (ชุดควบคุม), เติม 1% แอมโมเนียมซัลเฟต, เติม 1.5% แอมโมเนียมซัลเฟต และเติม 2% แอมโมเนียมซัลเฟต หลังจากนั้นปิดฝาขวดหมัก บ่มที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง สังเกตการหลุดของเมือกจากเมล็ดกาแฟโดยวิเคราะห์ค่าความขุ่น (Turbidity), ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Acids), ความเป็นกรด-ด่าง(pH)

3.2.2 ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในการหมักเพื่อเร่งการหมักเมือกกาแฟในห้องทดลอง ที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียล

แผนการทดลอง ออกแบบการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่ปรับความเป็นกรด-ด่าง)

กรรมวิธีที่ 2 ปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 5 ด้วยกรดทาทาริก

กรรมวิธีที่ 3 ปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 6 ด้วยกรดทาทาริก

กรรมวิธี่ที่ 4 ปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 8 ด้วยกรดทาทาริก

นำผลมากาแฟสุกมาแช่น้ำ ทำการลอกส่วนเปลือกนอกออกด้วยมือ คัดเลือกเมล็ดเสียและเมล็ดที่ลอยน้ำออก ล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด บรรจุเมล็ดกาแฟลงในขวดหมักที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จำนวน 500 กรัม จากนั้นนำขวดหมักที่บรรจุเมล็ดกาแฟมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร เติมจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากข้อ 2 ทำการหมัก 4 วิธีคือ การหมักตามธรรมชาติ (ชุดควบคุม), ปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 5 , ปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 6 และปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 8 ด้วยกรดทาทาริก หลังจากนั้นปิดฝาขวดหมัก บ่มที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศา

เซลเซียส ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง สังเกตการหลุดของเมือกจากเมล็ดกาแฟโดยวิเคราะห์ค่าความขุ่น (Turbidity), ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Acids), ความเป็นกรด-ด่าง(pH)

3.2.3 ทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้าในถังหมักในห้องปฏิบัติการ

นำผลมากาแฟสุกมาแช่น้ำ ทำการลอกส่วนเปลือกนอกออกด้วยมือ คัดเลือกเมล็ดเสียและเมล็ดที่ลอยน้ำออก ล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด บรรจุเมล็ดกาแฟลงในถังพลาสติกขนาด 9 ลิตร จำนวน 2 กิโลกรัม เติมน้ำปริมาตร 5 ลิตร เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์, เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต, ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 โดยไม่ควบคุมอุณหูมิ ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง วิเคราะห์ค่าความขุ่น (Turbidity), ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Acids), ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

3.2.4 ทดสอบผลของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ในอาหารสังเคราะห์

ทำการทดสอบผลของปัจจัยที่ได้ในข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 ต่อการเจริญของยีสต์ BAwine และ PRO-Y15 โดยเลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหารแข็ง Yeast-Malt agar (YM) นาน 24 ชั่วโมง เชี่ยเชื้อจากอาหารแข็งลงในขวดที่บรรจุน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารสังเคราะห์เพคติน ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 1% เพคติน, 0.1% ยีสต์เอกซ์แทรกซ์, สารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 6 บรรจุในขวดขนาด 50 มิลลิลิตร โดยปรับค่า optical density (OD) ที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.1 บ่มในสภาวะนิ่ง และสภาวะที่มีการกวน 100 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 18 และ 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์การเจริญของยีสต์

3.3 ทดลองหมักกาแฟอาราบิก้าในถังหมักอย่างน้อย 2 ศูนย์วิจัยโดยใช้การแปรผันปัจจัยที่ได้จากการพัฒนาการเร่งการหมัก

นำผลมากาแฟสุกมาแช่น้ำ ทำการลอกส่วนเปลือกนอกออกด้วยมือ คัดเลือกเมล็ดเสียและเมล็ดที่ลอยน้ำออก ล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด บรรจุเมล็ดกาแฟ 20 กิโลกรัม ลงในถังหมักขนาด 50 ลิตร เติมน้ำจนเต็มถังเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง และควบคุมอุณหภูมิตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 3.4 ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง วิเคราะห์ค่าความขุ่น (Turbidity), ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Acids), ความเป็นกรด-ด่าง(pH)

3.4 ตรวจสอบคุณภาพของกาแฟอาราบิก้า

ตรวจสอบคุณภาพกาแฟโดยใช้การคั่วเมล็ดกาแฟแบบคั่วกลาง หลังจากหมักเสร็จแล้วล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไปตากแดดบนลานปูนซีเมนต์ปูด้วยผ้าใบหรือสแลนประมาณ 3-4 วัน คอยพลิกกลับเมล็ดจนเมล็ดแห้ง สุ่มตัวอย่างไปวัดความชื้นให้มีเหลือประมาณไม่เกิน 12 % นำไปสีเปลือกกาแฟออกโดยใช้มือแกะเปลือกแห้งออก ทำการบรรจุเก็บ ในถุงพลาสติกสุญญากาศนำเมล็ดกาแฟที่ผ่านการสีเปลือกออกแล้ว มาคั่วด้วยเครื่องคั่วเมล็ดกาแฟ โดยทำการคั่วในระดับปานกลาง (medium roast) ใช้เวลาการคั่วประมาณ 8-9 นาที เมื่อคั่วเสร็จแล้วจะได้เมล็ดกาแฟคั่วที่มีสีน้ำตาลดำ คัดเลือกเมล็ดที่คั่วไม่หมดซึ่งจะยังมีเปลือกสี น้ำตาลอ่อนบางๆอยู่ออกจากเมล็ดที่คั่วได้หมดซึ่งจะได้เมล็ดกาแฟที่มีสีน้ำตาลดำทั้งเมล็ด เก็บตัวอย่าง เมล็ดกาแฟที่ผ่านการคั่วใส่

ถุงพลาสติกสุญญากาศ นำตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่วไปทำการวิเคราะห์ด้าน กายภาพ ได้แก่ ความชื้น สี ความหวาน ความเป็นกรดด่าง ปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำ ปริมาณกรดที่ละลายในน้ำและทดสอบการชิม (Cupping)

3.5 เปรียบเทียบคุณภาพกาแฟที่ได้จากการหมักในระบบปิดกับวิธีปกติและคำนวนต้นทุนการทดลอง เปรียบเทียบกับกระบวนการหมักแบบเดิม แบบใช้เครื่องจักร แบบการใช้สารเคมีและวิธีที่พัฒนามาใหม่

- **เวลาและสถานที่**

ระยะเวลา (เริ่มต้น – สิ้นสุด) : ตุลาคม 2560 ถึง กันยายน 2562

สถานที่ดำเนินการ : กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเพชรบูรณ์ (เขาค้อ),
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรตาก (ดอยมูเซอ)
ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ (ขุนวาง)
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย (วาวี)

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและยีสต์ระหว่างการหมักเมือกกาแฟในสภาวะที่มีอากาศน้อยในห้องปฏิบัติการ

จากการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญในระหว่างการหมักเมือกกาแฟในสภาวะที่มีอากาศน้อยเชื้อพบการเจริญของยีสต์และแบคทีเรียแลกติกแต่ไม่พบการเจริญของรา แสดงให้เห็นว่ายีสต์และแบคทีเรียแลคติกมีความเกี่ยวข้องกับการหลุดของเมือกกาแฟ โดยในระหว่างการหมักสามารถแยกเชื้อยีสต์ได้จำนวน 53 ไอโซเลต และแบคทีเรียจำนวน 48 ไอโซเลต เมื่อนำยีสต์และแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเพคตินในบนอาหารแข็ง Cristal Violet Pectate Medium (CVP) และทดสอบความสามารถในการย่อยเมือกกาแฟในขวดปิดสนิท พบยีสต์ที่ทำให้เกิดการหลุดของเมือกกาแฟภายในเวลา 18 ชั่วโมงจำนวน 16 ไอโซเลต และแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลต ซึ่งเชื้อยีสต์และแบคทีเรียที่คัดเลือกสามารถทำให้เกิดการหลุดของเมือกกาแฟได้ดีกว่าการหมักเมือกโดยวิธีธรรมชาติ จากผลการทดสอบดังกล่าวจึงได้คัดเลือกยีสต์ PRO-Y15 (Figure 1) เพื่อใช้ทดสอบการหมักเมือกกาแฟในสภาวะแอนแอโรบิกหรือในสภาวะที่มีอากาศน้อยต่อไป จากการจัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์โดยใช้อนุกรมวิธานระดับโมเลกุล (Thailand Bioresource Research Center (TBRC) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) โดนเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ PRO-Y15 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเหมือนกับ Type strain ของ *Pichia kluyveri* NRRL Y-11519^{T} (NG_055122) 99.8% โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเพียง 1 นิวคลีโอไทด์ จึงจัดจำแนกยีสต์ PRO-Y-15 เป็น *Pichia kluyveri* โดยคุณสมบัติของ *Pichia kluyveri* ได้มีการรายงานว่าเป็นยีสต์ที่สร้าง Pectinolytic Enzymes เร่งการย่อยเมือกในกาแฟและโกโก้ พบได้ใน

การหมักและช่วยเพิ่มกลิ่นรสในกาแฟและโกโก้ สามารถเพิ่มกลิ่นรสในเครื่องดื่มและสามารถใช้ในการผลิต low-alcohol beer หรือ alcohol-free beer (Batista et. al., 2015; Crafack et. al., 2013)

เมื่อทดสอบการหมักเมือกกาแฟในสภาวะแอนแอโรบิกหรือในสภาวะที่มีอากาศน้อย เปรียบเทียบกับการเติมกรด, การเติมเชื้อเชื้อยีสต์ BAwine และการเติมเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* และ *Leuconostoc oenos* การเติมยีสต์ BAwine และ PRO-Y15 มีผลต่อการหลุดของเมือกได้ดีกว่าการเติมกรดและการเติมแบคทีเรียแลคติก เมื่อหมักกาแฟเป็นเวลา 18 ชั่วโมง และสามารถทำให้เมือกกาแฟหลุดอย่างสมบูรณ์เมื่อหมักกาแฟครบ 24 ชั่วโมง (Figure 2)

2. **ศึกษาการพัฒนาการหมักกาแฟอาราบิก้าด้วยแบคทีเรียที่คัดเลือกในสภาวะที่มีอากาศน้อยในแปลงทดสอบ**

จากการทดสอบการหมักในแปลงทดสอบ 4 พื้นที่ โดยวิธีธรรมชาติ (ไม่เติมจุลินทรีย์) **(Figure 3)** พบว่าการหลุดของเมือกกาแฟซึ่งแสดงเป็นผลค่าความขุ่น (Turbidity) มีค่าเพิ่มขึ้นในน้ำหมักของทุกกรรมวิธี และเมื่อทำการหยุดการหมักที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเมือกหลุดอย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามความแตกต่างของแปลงทดสอบมีผลต่อการหลุดของเมือกกาแฟ แสดงให้เห็นว่าผลผลิตกาแฟ,อุณหภูมิที่ใช้ในการหมักและเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติส่งผลต่อความเร็วในการหลุดของเมือกกาแฟ การปรับความเป็นกรดเริ่มต้นไม่มีผลต่อการหมักเนื่องจากหลังปรับค่าความเป็นกรด (pH 4) แล้วค่าความเป็นกรดมีการเปลี่ยนแปลงสูงขึ้นจนเท่ากับชุดทดสอบอื่นๆ แล้วจึงลดลงอีกครั้งเมื่อจุลินทรีย์ธรรมชาติในการหมักกาแฟเจริญเติบโต ทั้งนี้การปรับความเป็นกรดอาจยับยั้งจุลินทรีย์ธรรมชาติทำให้การหมักเกิดขึ้นช้าลง เมื่อเติมแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* ส่งผลให้ปริมาณกรดแลคติกสูงขึ้นรวดเร็วกว่าชุดการทดสอบอื่นๆ และทำให้ค่าความขุ่นสูงขึ้นเร็วกว่าการหมักแบบธรรมชาติแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแลคติกน่าจะส่งเสริมการหลุดของเมือกกาแฟซึ่งสอดคล้องกับผลการแยกเชื้อที่พบการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในเพาะเลี้ยงเชื้อที่แยกจากตัวอย่างการหมักกาแฟ การเติมแบคทีเรีย *Leuconostoc oenos* และการเติมกรดให้ผลการเปลี่ยนแปลงของกรดแลคติกที่แตกต่างกันระหว่างการหมักกาแฟที่เก็บจากจังหวัดเพชรบูรณ์ และจังหวัดตาก แสดงให้เห็นว่าปัจจัยภายนอกเช่น จุลินทรีย์ในธรรมชาติของแหล่งปลูกกาแฟมีผลต่อปัจจัยที่นำมาทดสอบ และมีแนวโน้มว่าระบบการหมักที่เหมาะสมสำหรับการหมักเมือกกาแฟอาจแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ การเติมยีสต์ BAwine และการเติมยีสต์ PRO-Y15 ทำให้เกิดการหลุดของเมือกได้ดีในสภาวะไร้อากาศ และทำให้เกิดการหลุดของเมือกได้เร็วกว่าเมื่อเติมแบคทีเรียแลคติก (Figure 4)

3. **ศึกษากระบวนการเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้าในสภาวะที่มีอากาศน้อย**

จากการศึกษาการหมักโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์แบคทีเรียและยีสต์ พบว่ากรรมวิธีที่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (BAwine) และกรรมวิธีที่เติมยีสต์ *Pichia kluyveri* (PRO-Y15) ทำให้เกิดการหลุดของเมือกได้ดีกว่าชุดควบคุมในสภาวะไร้อากาศ (มีอากาศน้อย) จึงนำยีสต์ BAwine และ PRO-Y15 มาทำการศึกษาหาปัจจัยที่ส่งผลต่อการเร่งการหมักเมือกกาแฟ

3.1 ผลของปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในการหมักเพื่อเร่งการหมักเมือกกาแฟ

จากการทดสอบการเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้าในสภาวะที่มีอากาศน้อย โดยแปรผันปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตให้มีความเข้มข้น 1%, 1.5% และ 2% พบว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส การหลุดของเมือกกาแฟของชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้นได้ช้า ใช้เวลามากกว่า 120 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับสภาพภูมิอากาศบนยอดดอยที่มีอุณหภูมิค่อนข้างต่ำและต้องใช้ระยะเวลาในการหมักกาแฟนาน การเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปไม่ส่งผลต่อการเร่งการหลุดของเมือกกาแฟในชุดควบคุม แต่ในทางตรงกันข้ามเมื่อเติมหัวเชื้อยีสต์ BAwine และ PRO-Y15 ในระบบหมักช่วยเร่งการหมักกาแฟที่อุณภูมิ 20 องศาเซลเซียสได้ โดยยีสต์ BAwine ใช้เวลาในการทำให้เมือกหลุดอย่างสมบูรณ์ภายใน 72 ชั่วโมงและเมื่อเติม 1% แอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้ระยะเวลาในการหมักเมือกลดลง โดยเมือกจะหลุดภายใน 54 ชั่วโมง การเติมหัวเชื้อยีสต์ PRO-Y15 (*Pichia kluyveri*) ช่วยเร่งการหมักเมือกได้ดีที่สุด โดยยีสต์ PRO-Y15 ใช้เวลาในการทำให้เมือกหลุดอย่างสมบูรณ์ภายใน 36 ชั่วโมงและเมื่อเติม 1% แอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้ระยะเวลาในการหมักเมือกลดลง โดยเมือกจะหลุดภายใน 30 ชั่วโมง ซึ่งถือได้ว่าเชื้อยีสต์ PRO-Y15 มีประสิทธิภาพในการใช้เตรียมเป็นหัวเชื้อในการหมักกาแฟที่อุณหภูมิต่ำ เมื่อทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การหลุดของเมือกกาแฟของชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้นภายในเวลา 48 ชั่วโมง การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตไม่ส่งผลต่อการเร่งการหลุดของเมือกกาแฟในชุดควบคุม เมื่อเติมหัวเชื้อยีสต์ BAwine และ PRO-Y15 ในระบบหมัก ช่วยเร่งการหมักกาแฟที่อุณภูมิ 30 องศาเซลเซียสได้ โดยยีสต์ BAwine ใช้เวลาในการทำให้เมือกหลุดอย่างสมบูรณ์ภายใน 36 ชั่วโมงและเมื่อเติม 1% แอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้ระยะเวลาในการหมักเมือกลดลง โดยเมือกจะหลุดภายใน 30 ชั่วโมง การเติมหัวเชื้อยีสต์ PRO-Y15 (*Pichia kluyveri*) ช่วยเร่งการหมักเมือกได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับชุดควบคุมและชุดที่เติมยีสต์ BAwine โดยยีสต์ PRO-Y15 ใช้เวลาในการทำให้เมือกหลุดอย่างสมบูรณ์ภายใน 24 ชั่วโมงและเมื่อเติม 1% แอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้ระยะเวลาในการหมักเมือกลดลง โดยเมือกจะหลุดภายใน 18 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่สูงขึ้นไม่มีผลต่อการเพิ่มความเร็วในการหมักเมือกกาแฟ

เมื่อทำการทดสอบผลของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการเจริญของยีสต์ BAwine และ PRO-Y15 ในอาหารสังเคราะห์เพคติน พบว่า การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตส่งผลในการเพิ่มการเจริญของยีสต์ BAwine และ PRO-Y15 เล็กน้อยหลังจากบ่มในสภาวะนิ่ง 24 ชั่วโมงขึ้นไป แต่ในสภาวะที่มีการกวน 100 รอบต่อนาที การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตให้ผลการเจริญของยีสต์ PRO-Y15 น้อยกว่า ในอาหารที่ไม่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตและการเพิ่มปริมาณแก๊สที่ละลายในน้ำโดยการกวนในระบบหมัก 100 รอบต่อนาที เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ BAwine และ PRO-Y15 ที่บ่มในระบบปิด (อากาศน้อย) ในสภาวะนิ่ง (ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 0-2.5 mg/L) เปรียบเทียบกับสภาวะที่มีการกวน 100 รอบต่อนาที (ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 5 mg/L) พบว่าการกวนเพื่อเพิ่มปริมาณแก๊สที่ละลายในน้ำส่งเสริมการเจริญของยีสต์ BAwine เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ในขณะที่การกวนเพิ่มการเจริญของยีสต์ PRO-Y15 สูงขึ้นและสูงกว่าการเจริญของยีสต์ BAwine 10 เท่า (Figure 5-8)

3.2 ผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในการหมักเพื่อเร่งการหมักเมือกกาแฟ

จากการทดสอบการเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้าในสภาวะที่มีอากาศน้อยโดยแปรผันความเป็นกรด-ด่าง (pH) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส เบื้องต้นพบว่าการปรับค่าความเป็นกรดด่างในช่วง pH 5-8 ไม่มีผลต่อการเร่งการหลุดของเมือกกาแฟในทุกกรรมวิธี อาจเนื่องมาจากยีสต์และแบคทีเรียแลคติกตามธรรมชาติ รวมถึงหัวเชื้อยีสต์ BAwine และ PRO-Y15 สามารถเจริญได้ดีใกล้เคียงกันในช่วง pH 5-8 จึงอาจสรุปเบื้องต้นได้ว่าน้ำที่มีค่าความเป็นกรดด่างช่วง pH 5-8 สามารถใช้ในการหมักเมือกกาแฟได้

จากผลการทดสอบการหมักเมือกกาแฟในข้อ 3.1 และ 3.2 พบว่า ปริมาณของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการหมักกาแฟด้วยจุลินทรีย์ในระบบปิดที่มีอากาศน้อยได้ดังนี้ 1.) การเติมเกลือแอมโมเนียซัลเฟตมีผลต่อการส่งเสริมเจริญของยีสต์ BAwine และ PRO-Y15 ในสภาวะนิ่ง เพียงเล็กน้อย จึง ไม่จำเป็นต้องเติมลงในระบบการหมักกาแฟ เนื่องจากเป็นการเพิ่มต้นทุนในการหมักกาแฟ ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสำหรับการเจริญอยู่ในช่วง 5-8 จึงไม่จำเป็นต้องปรับค่าความเป็นด่างของระบบหมัก 2.) เนื่องจากการทดลองนี้เป็นการศึกษาการหมักกาแฟในแบบไม่ใช้ออกซิเจน แต่จากการทดสอบพบว่าการเพิ่มปริมาณแก๊สออกซิเจนที่ละลายในน้ำและการกระจายตัวของจุลินทรีย์ โดยการกวน 100 รอบต่อนาทีส่งผลต่อการเพิ่มการเจริญของยีสต์ PRO-Y15 สูงขึ้น 10 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการบ่มในสภาวะนิ่ง ในขณะที่การกวนไม่มีผลต่อการเพิ่มการเจริญของ BAwine แสดงให้เห็นว่ายีสต์ PRO-Y15 ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยเมือกกาแฟนั้นมียังมีความต้องการออกซิเจนในการเจริญ ดังนั้นการกวนระบบหมักจะช่วยส่งเสริมการเจริญของยีสต์ PRO-Y15 ได้ดียิ่งขึ้นและสามารถเกิดการย่อยเมือกได้เร็วขึ้นโดยไม่ต้องเติมออกซิเจนจากภายนอก (Figure 5-8)

3.3 ทดลองหมักกาแฟอาราบิก้าในถังหมักอย่างน้อย 2 ศูนย์วิจัย

เมื่อทำการทดสอบการหมักในแปลงทดสอบโดยใช้กรรมวิธีเติมหัวเชื้อยีสต์ PRO-Y15 ในระบบที่ไม่ต้องควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง (pH 5-8) และไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่เติมหัวเชื้อยีสต์ BAwine และที่ไม่เติมหัวเชื้อยีสต์ ผลการทดสอบพบว่าในระหว่างการหมักมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิแวดล้อมในช่วงเวลากลางวันและเวลากลางคืน โดยมีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 14-27 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นมีค่าอยู่ระหว่าง 6.5-7.5 แต่อย่างไรก็ตามกรรมวิธีที่เติมหัวเชื้อยีสต์ PRO-Y15 ในระบบหมักที่ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตทำให้เกิดการหลุดของเมือกกาแฟอย่างสมบูรณ์ได้เร็วที่สุดในทุกแปลงทดสอบ โดยการหลุดของเมือกกาแฟเกิดขึ้นภายใน 20-24 ชั่วโมงหลังเริ่มการหมักกาแฟ (Table 1-2) การทดสอบในแปลงทดสอบพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์เกิดการหลุดของเมือกกาแฟเร็วกว่าอาจเนื่องมาจากอุณหภูมิแวดล้อม (20-27 องศาเซลเซียส) สูงกว่าแปลงทดสอบในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย (14-23 องศาเซลเซียส)

จากเก็บข้อมูลค่าความขุ่นของการหมักกาแฟให้ผลเป็นไปในรูปแบบเดียวกันทั้ง 4 แปลงทดสอบ โดยค่าความขุ่นของกรรมวิธีที่เติมหัวเชื้อยีสต์ PRO-Y15 มีค่าสูงกว่ากรรมวิธีอื่นๆ แสดงให้เห็นถึงการเจริญของยีสต์และการหลุดของเมือกกาแฟ ซึ่งทำให้เกิดความขุ่นในน้ำหมัก ผลการทดสอบดังกล่าวสอดคล้อง

กับการทดสอบโดยการสัมผัสเมล็ดกาแฟ โดยพบว่าเมื่อเวลาของการหมักผ่านไป 12 ชั่วโมง เมือกกาแฟเกิดการอ่อนตัว ไม่เกาะแน่นที่เมล็ดกาแฟ เมื่อกวนระบบหมักหรือใช้มือถูเมล็ดเพียงเล็กน้อยก็เริ่มเกิดการหลุดร่อนของเมือกกาแฟ ในขณะที่กรรมวิธีที่ไม่มีการเติมเชื้อยีสต์เมือกกาแฟยังคงเกาะเมล็ดแน่น แม้ว่าจะล้างทำความสะอาดเมล็ดกาแฟด้วยน้ำหลังจากหยุดการหมักไม่สามารถทำให้เมือกหลุดออกจากเมล็ดกาแฟได้ ส่งผลให้ใช้ระยะเวลาในการตากกาแฟเพื่อลดความชื้นใช้เวลามากขึ้นและเกิดการปนเปื้อนของเชื้อราได้ง่าย ซึ่งส่งเสียผลต่อคุณภาพของกาแฟ

การตรวจสอบคุณภาพของกาแฟที่ได้จากการหมักโดยการไม่เติมหัวเชื้อ, เติมหัวเชื้อยีสต์ BAwine และ เติมหัวเชื้อยีสต์ PRO-Y15 ร่วมกับการเติมและไม่เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นระยะเวลา 20 ชั่วโมง ผลการทดสอบพบว่าคุณสมบัติทางกายภาพของกาแฟที่ทำการหมักในแต่ละกรรมวิธีมีค่าใกล้เคียงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อทดสอบการชิม (Cupping) พบว่ากรรมวิธีที่ไม่เติมหัวเชื้อ, เติมหัวเชื้อยีสต์ BAwine และ เติมหัวเชื้อยีสต์ PRO-Y15 มีคะแนนจากการชิม (Cupping score) คือ 68.75±1.7, 78.75±4.4 และ 78.00±5.1 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวิธี One-Way ANOVA โดยใช้การเปรียบเทียบแบบ Tukey พบว่ากรรมวิธีที่เติมหัวเชื้อยีสต์ BAwine และ PRO-Y15 มีคะแนนจากการชิมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่ทั้งสองกรรมวิธีมีคะแนนสูงกว่ากรรมวิธีที่ไม่เติมหัวเชื้อ (ชุดควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ทั้งในสภาวะที่เติมและไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต แสดงให้เห็นว่าหัวเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดนอกจากจะมีผลในการช่วยเร่งการหลุดของเมือกกาแฟแล้วยังส่งผลต่อการเพิ่มคะแนนการชิม (Cupping score) อีกด้วย (Table 3-4) โดยกลไกการพัฒนากลิ่นช็อกโกแลตของ *Pichia kluyveri* นั้นยังไม่มีการศึกษาอย่างแน่ชัด แต่สอดคล้องกับรายงานของ Crafack และคณะ (2013) ซึ่งรายงานว่า *Pichia kluyveri* นั้นช่วยเพิ่มกลิ่นรสในโกโก้ได้ และให้เพิ่มคุณภาพทางประสาทสัมผัสให้กับโกโก้ได้สูงกว่าการหมักตามธรรมชาติ

การหมักกาแฟแบบดั้งเดิมนั้นใช้เวลามากกว่า 60 ชั่วโมง เมือกจึงหลุดอย่างสมบูรณ์ โดยในบางพื้นที่มีการเปลี่ยนน้ำในบ่อหมักทุกวันเพื่อลดการเกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ในกาแฟ เช่น กลิ่นเปรี้ยว หรือลดเวลาหมักโดยการแช่เม็ดกาแฟในบ่อหมัก 1 วันและทำการขัดเมือกโดยใช้เครื่องจักร ซึ่งใช้พลังงานไฟฟ้าและน้ำมากอีกทั้งยังมีเกิดการปนเปื้อนกลิ่นเครื่องจักรในกาแฟได้ ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบต้นทุนการหมักโดยเทคนิคการหมักในระบบปิดโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์กับ กระบวนการหมักแบบเดิม แบบใช้เครื่องจักร และแบบการใช้สารเคมี (เอนไซม์) (Table 5) พบว่าการหมักกาแฟในระบบปิดโดยการเติมหัวเชื้อยีสต์ PRO-Y15 หรือการหมักกาแฟด้วยเทคนิค PRO-Y สามารถทำให้เกิดการหลุดของเมือกกาแฟภายในระยะเวลา 20-24 ชั่วโมง ช่วยลดทรัพยากรในการหมักได้แก่ เวลาและปริมาณน้ำ ซึ่งเป็นต้นทุนสำคัญในการผลิตกาแฟอาราบิก้าได้ถึง 80%

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนากระบวนการหมักกาแฟอาราบิก้าในระบบปิดซึ่งเป็นสภาวะที่มีอากาศน้อยโดยใช้หัวเชื้อยีสต์ *Pichia kluyveri* PRO-Y15 ที่คัดแยกขึ้นมาใหม่จากธรรมชาติ ในการเร่งการหมักและ

การหลุดลอกของเมือกหุ้มเมล็ดกาแฟ ซึ่งการหมักกาแฟโดยใช้หัวเชื้อยีสต์ PRO-Y15 ในสภาวะแวดล้อมธรรมชาติที่มีอุณหภูมิระหว่าง 14-27 องศาเซลเซียส และระบบหมักมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระหว่าง 5-8 สามารถทำให้เมือกกาแฟหลุดอย่างสมบูรณ์ได้ภายในเวลา 20-24 ชั่วโมง ซึ่งช่วยลดระยะเวลาการหมักกาแฟ การใช้ทรัพยากรน้ำและแรงงานที่ใช้ในการขัดเมือกกาแฟตามการแปรรูปกาแฟแบบดั้งเดิมลงได้ 80% และกาแฟที่ได้จากการหมักโดยใช้หัวเชื้อยีสต์ดังกล่าวยังมีคะแนนการชิม (Cupping score) ดีกว่าการหมักที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ โดยผลจากการทดสอบพบว่าการผลิตกาแฟโดยใช้หัวเชื้อ *Pichia kluyveri* PRO-Y15 ในระบบปิด ทำให้กาแฟมีแนวโน้มที่จะมีกลิ่นที่ใกล้เคียงกับกลิ่นของช๊อกโกแลตเป็นส่วนประกอบ แสดงให้เห็นว่ากระบวนการแปรรูปกาแฟนั้นนอกจากเพิ่มคุณภาพแล้วยังสร้างความแตกต่างและเอกลักษณ์ให้กับกาแฟได้อีกด้วย

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ด้านวิชาการและเศรษฐกิจ ได้แก่ กระบวนการหมักกาแฟแบบใหม่ในสภาวะที่มีอากาศน้อย โดยการใช้หัวเชื้อยีสต์ *Pichia kluyveri* PRO-Y15 (PRO-Y technique) ในการพัฒนาคุณภาพและลดระยะเวลาในการหมักกาแฟ

2. ด้านสังคม ได้แก่ นำเทคโนโลยีการหมักกาแฟไปเผยแพร่เพื่อให้เกษตรกรสามารถพัฒนากระบวนการหมักกาแฟอาราบิก้าคุณภาพได้ เพื่อพัฒนากรรมวิธีการหมักกาแฟอาราบิก้าคุณภาพที่รวดเร็วต้นทุนต่ำและนำไปใช้ประโยชน์และยอมรับในวงกว้าง พร้อมทั้งนำเสนอความคิดใหม่ในการพัฒนากาหมักกาแฟอาราบิก้าคุณภาพดังกล่าวเพื่อเป็นทางเลือกที่ทำรายได้ให้กับเกษตรกรต่อไป

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : -

12. เอกสารอ้างอิง

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

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

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.

Batista, N., Ramos, C., Dias, D., Pinheiro, A., Schwan, R. (2015). Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. *LWT - Food Science and Technology*. 63(1), 221-227

Crafack, M., Mikkelsen, M., Saerens, S., Knudsen, M., Blennow, A., *et. al* (2013). Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *International journal of food microbiology*. 167(1), 103-16.

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

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.

Wrigley, Gordon. (1988). *Coffee*. New York: John Wiley and Sons.

Table 1 Demucilaged time of three treatments coffee fermentation without ammonium sulfate at four regional horticultural offices

Treatment	Demucilaged time (hour)			
	Petchabun	Tak	Chiang Mai	Chiang Rai
Control	>48	>48	>48	>48
BAwine	36	36	48	48
PRO-Y15	20	22	24	24

Table 2 Demucilaged time of three treatments coffee fermentation supplemented with 1% ammonium sulfate at four regional horticultural offices

Treatment	Demucilaged time (hour)			
	Petchabun	Tak	Chiang Mai	Chiang Rai
Control	>48	>48	>48	>48
BAwine	48	48	>48	>48
PRO-Y15	24	24	32	32

Table 3 Physical properties and cupping score of roasting fermented coffee beans using three treatment without ammonium sulfate

Physical properties and Cupping score	w/o Ammonium Sulfate		
	Control	BAwine	PRO-Y15
Moisture	1.25±0.1	1.25±0.1	1.15±0.2
Color (Agtron)	53.80±4.8	55.4±2.7	57.65±1.0
Brix	1.72±0.5	1.47±0.6	1.70±0.6
pH	5.28±0.1	5.12±0.1	5.36±0.1
Total dissolved solid	1.36±0.4	1.16±0.5	1.43±0.4
Total Acid Content	0.02±0.0	0.02±0.0	0.02±0.0
Cupping score	68.75±1.7^{B}	78.75±4.4^{A}	78.00±5.1^{A}
Flavor	Herb	Fruity	Chocolate

Table 4 Physical properties and cupping score of roasting fermented coffee beans using three treatment with 1% ammonium sulfate

Physical properties and Cupping score	1% Ammonium Sulfate		
	Control	Control	Control
Moisture	1.13±0.1	1.15±0.2	1.10±0.1
Color (Agtron)	55.5±5.8	54.35±2.8	56.05±4.0
Brix	1.59±0.6	1.6±0.7	1.56±0.7
pH	5.34±0.1	5.23±0.1	5.45±0.2
Total dissolved solid	1.26±0.5	1.36±0.4	1.25±0.5
Total Acid Content	0.02±0.0	0.02±0.0	0.02±0.0
Cupping score	$66.25±4.3^{B}$	$77.25±4.9^{A}$	$76.75±4.3^{A}$
Flavor	Herb	Fruity	Chocolate

Table 5 Cost investment of different fermentation method (1 kilgrams of green cofffe beans)

Process	Cost (baht)	Time	Disadventage
Traditional Wet Process	55	Above 60 hr	- Long fermentation - Enormous water used
Machine	35	1 min/kg	- Incomplete demucilage - Broken beans
Chemical	135	Above 24 hr	- Chemical residue, unpleaseant odor
PRO-Y technique	30	Less than 24 hr	

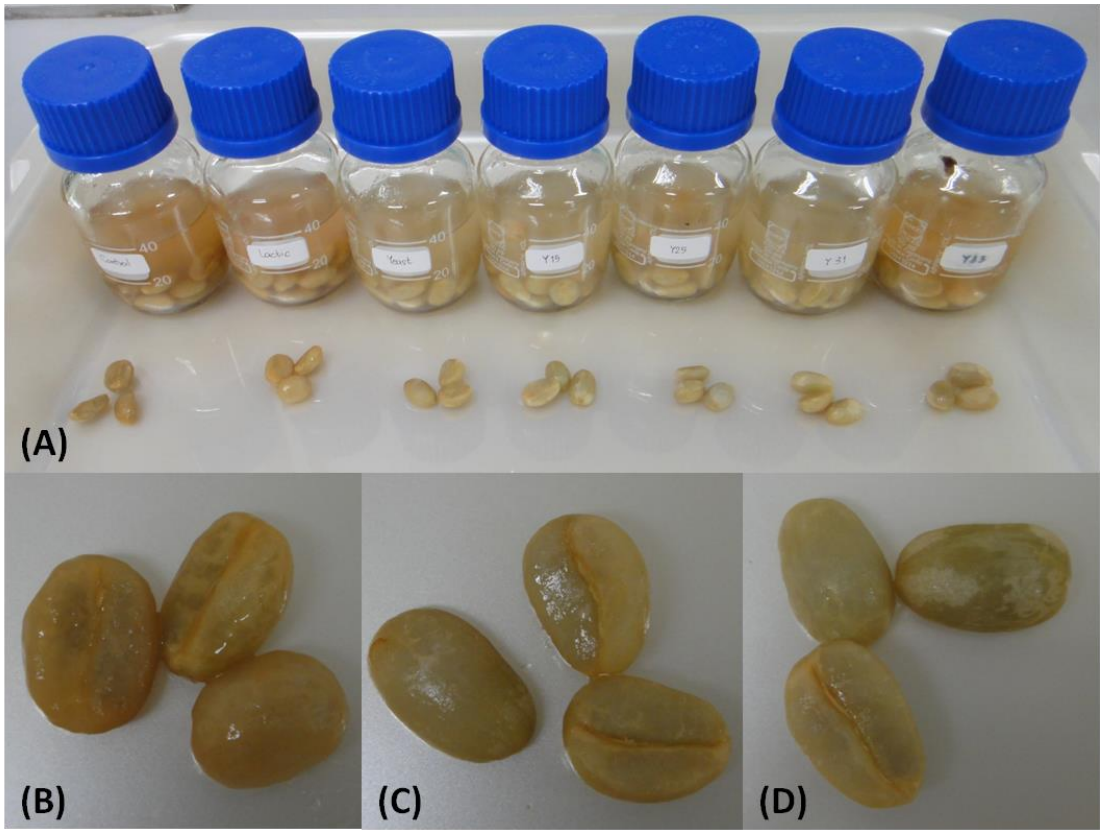
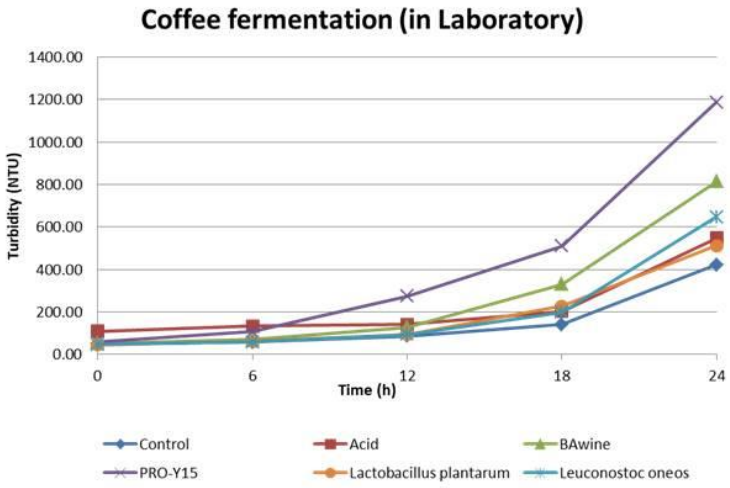
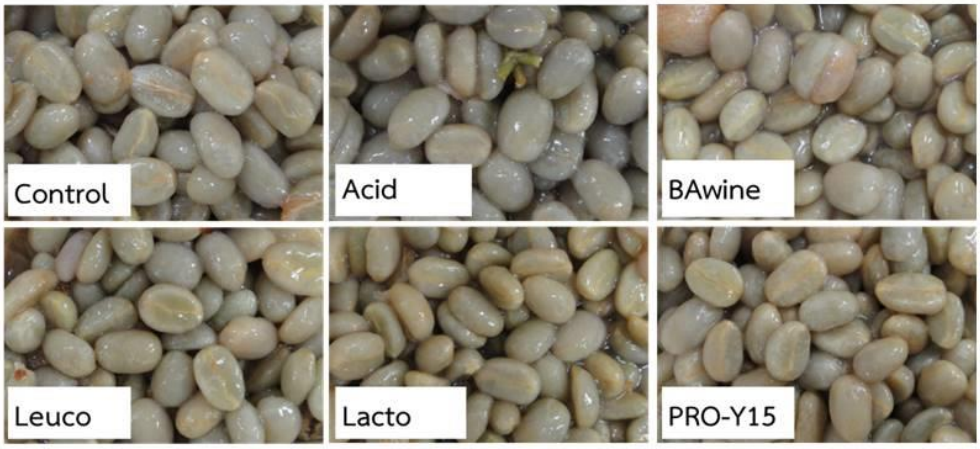


Figure 1 Screening for coffee mucilage removing of microbial (A) control (B), *Saccharomyces cerevisiae* BAwine (C) and *Pichia kluyveri* PRO-Y15 (D) at 18 hour

(A)



(B)



(C)

Figure 2 Coffee fermentation of six treatments (Control, Acid, Yeast BAwine, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc oenos* and PRO-Y15) explain in Turbidity (A), mucilage removal of coffee bean at 18 hour (B) and mucilage removal of coffee bean at 24 hour (C)

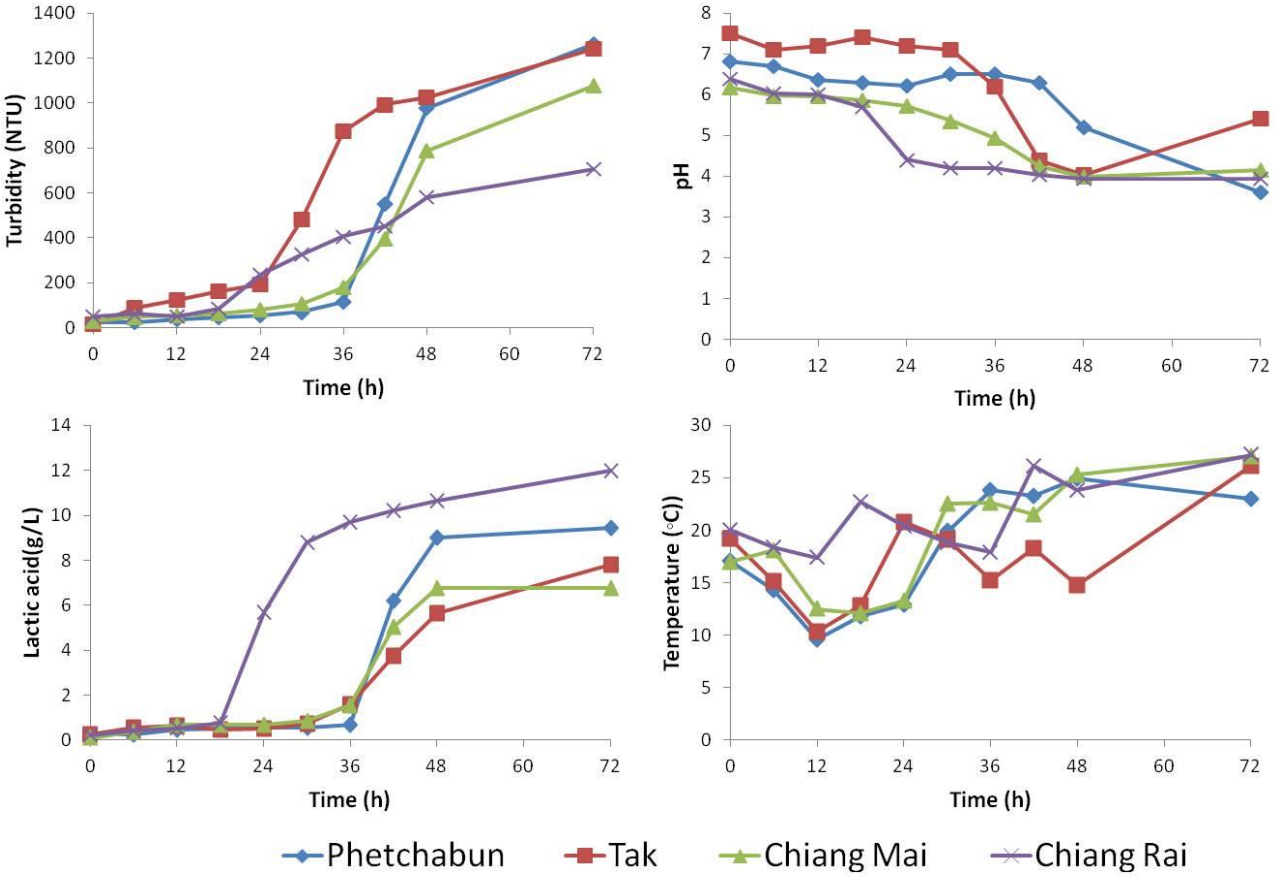


Figure 3 Coffee fermentation profiles of traditional wet process explain in Turbidity (NTU), Latic acid (g/L) and pH of six treatments at four regional horticultural offices

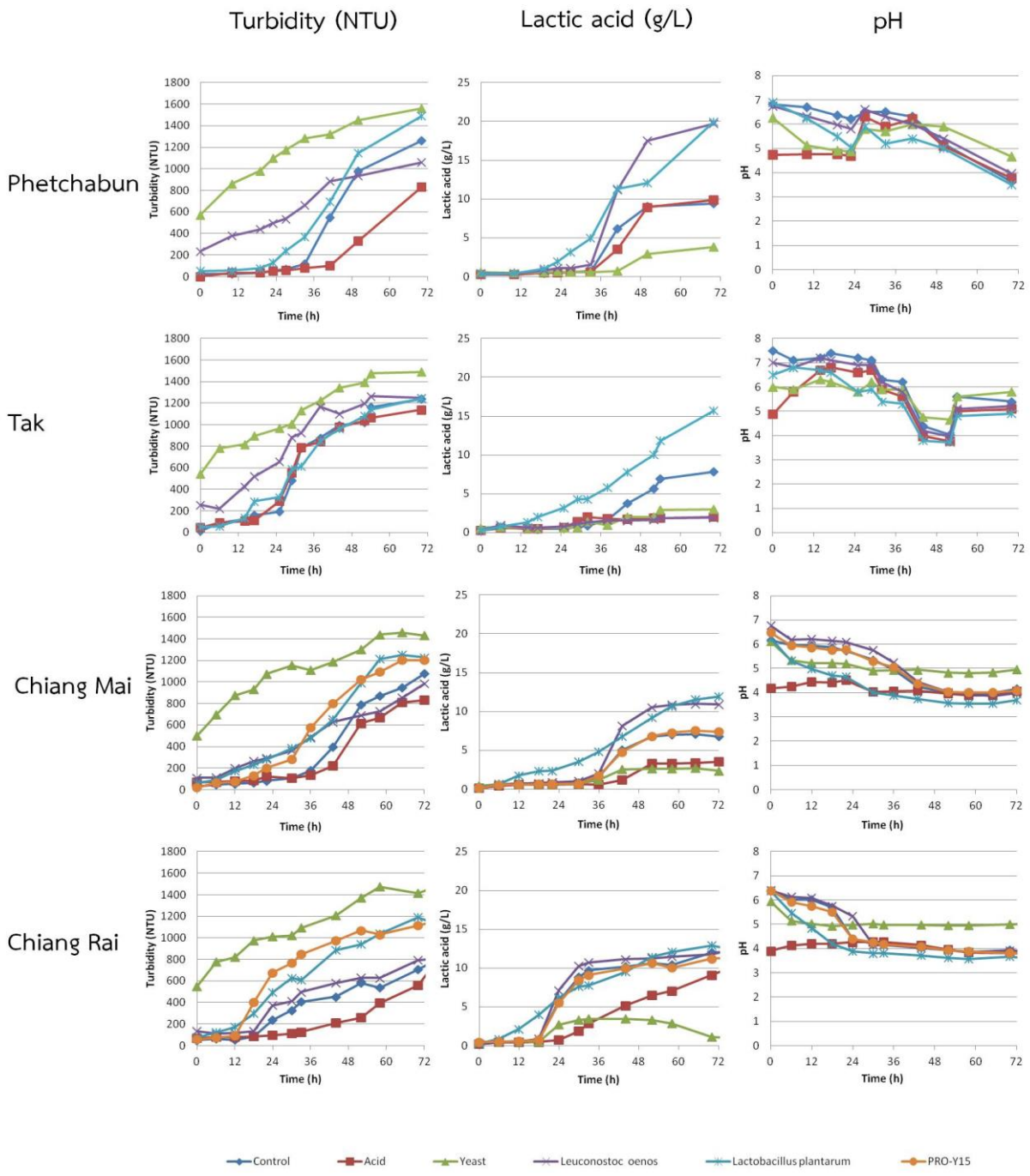


Figure 4 Coffee fermentation profiles under oxygen-limited condition explain in Turbidity ratio (NTU), Latic acid (g/L) and pH of six treatments (Control, Acid, Yeast BAwine, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc oenos* and PRO-Y15) at four regional horticultural offices

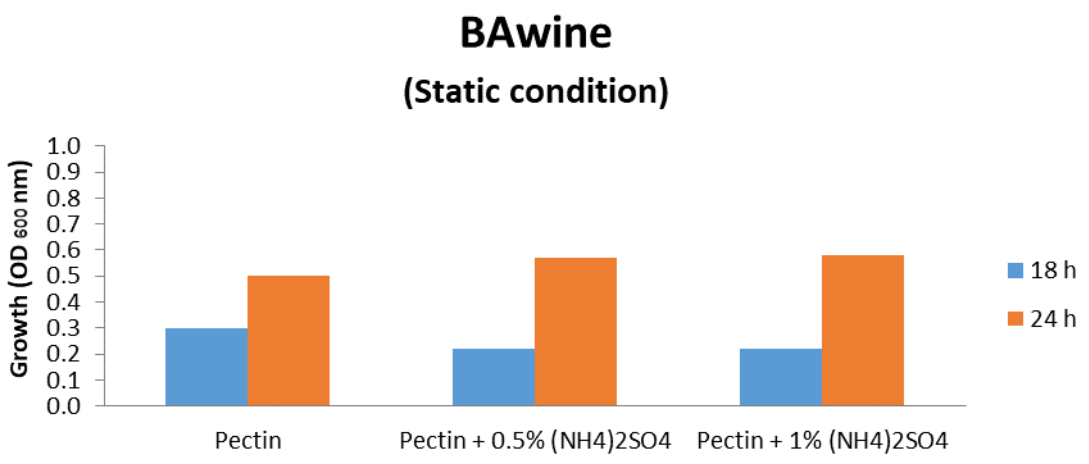


Figure 5 Growth of BAwine in pectin medium supplemented with 0, 0.5 and 1 % Ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$) under static condition

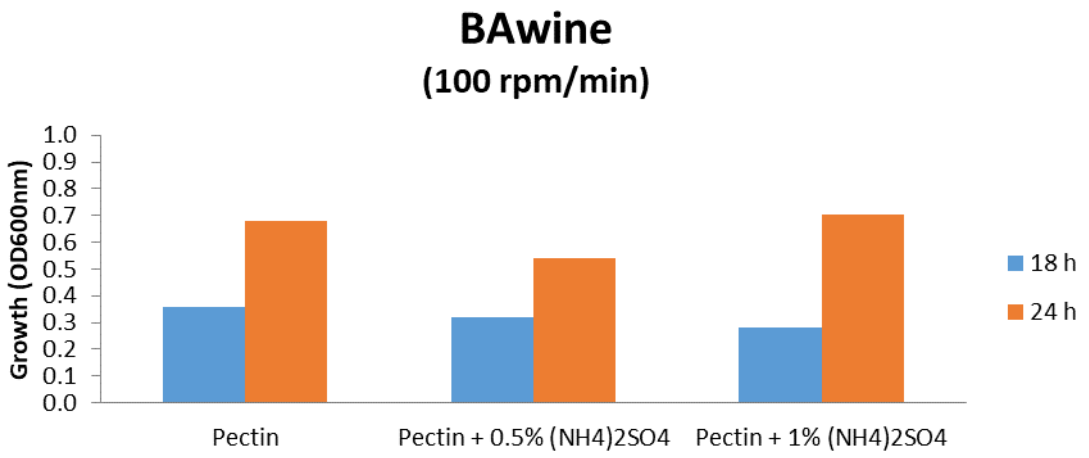


Figure 6 Growth of BAwine in pectin medium supplemented with 0, 0.5 and 1 % Ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$) under shaking condition (100 rpm/min)

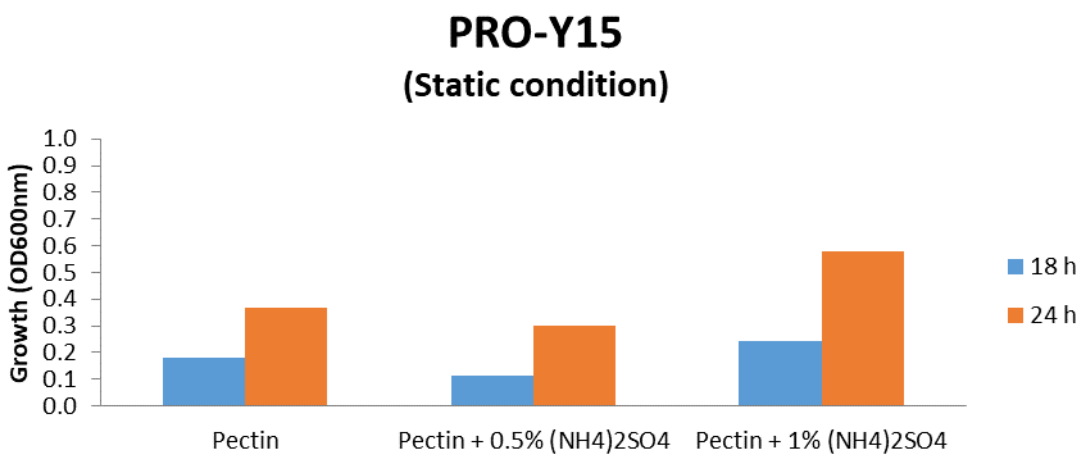


Figure 7 Growth of PRO-Y15 in pectin medium supplemented with 0, 0.5 and 1 % Ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$) under static condition

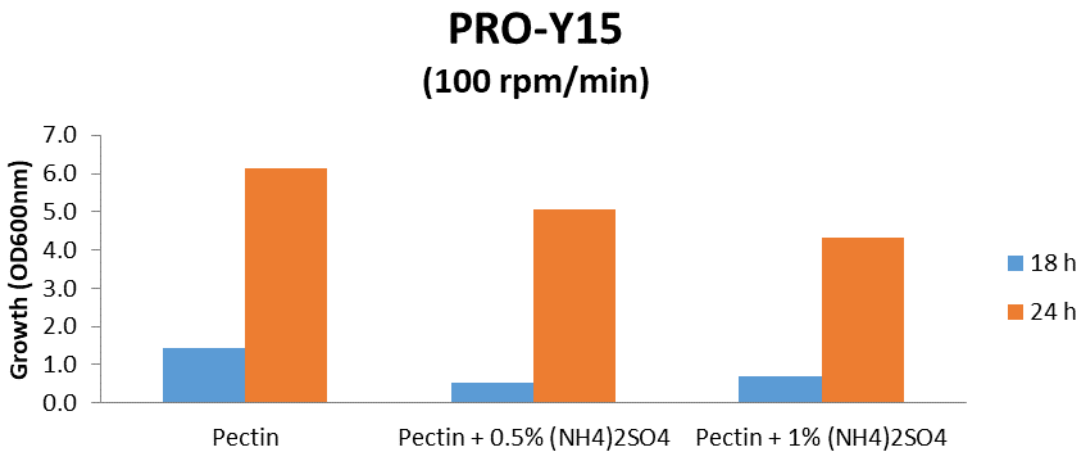


Figure 8 Growth of PRO-Y15 in pectin medium supplemented with 0, 0.5 and 1 % Ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$) under shaking condition (100 rpm/min)