รายงานโครงการวิจัย

โครงการวิจัยและพัฒนากระบวนการหมักกาแฟอาราบิก้าคุณภาพ

Research and Development on Arabica Coffee Fermentation project

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

นายโกเมศ สัตยาวุธ

Komate SATAYAWUT

ปี พ.ศ. 2563

กรมวิชาการเกษตร

รายงานโครงการวิจัย

โครงการวิจัยและพัฒนากระบวนการหมักกาแฟอาราบิก้าคุณภาพ

Research and Development on Arabica Coffee Fermentation project

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

นายโกเมศ สัตยาวุธ

Komate SATAYAWUT

กรมวิชาการเกษตร

ปี พ.ศ. 2563

รูปแบบและองค์ประกอบรายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์
(สำหรับโครงการวิจัย)

หน้าปก

ปกใน/ปกรอง

สารบัญ หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... 1
ผู้วิจัย 2
บทนำ..... 2
บทคัดย่อ..... 5
ระเบียบวิธีการวิจัย..... 9
ผลการทดลอง..... 18
1. การพัฒนากระบวนการหมักกาแฟกาแฟอาราบิก้าด้วยจุลินทรีย์
2. ศึกษาการหมักกาแฟด้วยจุลินทรีย์ในระบบแอนแอโรบิก
3. การพัฒนาต้นแบบเครื่องหมักกาแฟ
4. การใช้ผลิตผลพลอยได้จากเปลือกหุ้มเมล็ดและเมือกกาแฟ
5. ศึกษาการหมักกาแฟโดยจำลองแบบระบบย่อยอาหารของสัตว์
บทสรุปและข้อเสนอแนะ..... 63
บรรณานุกรม..... 64

กรมวิชาการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยและพัฒนาการหมักกาแฟอะราบิก้าคุณภาพ โดยได้รับความร่วมมือจาก สถาบันวิจัยพืชสวน ศูนย์วิจัยและพัฒนาเกษตรหลวงเชียงใหม่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงจังหวัดเชียงราย ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเพชรบูรณ์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรตาก รวมทั้งคำแนะนำจากบุคลากรหลายภาคส่วนของกรมวิชาการเกษตรและภาคเอกชน สมาคมกาแฟและชาแห่งประเทศไทย ที่ให้คำปรึกษาและข้อคิดเห็นต่างๆตลอดการวิจัย รวมทั้งร่วมแก้ไขข้อบกพร่องเพื่อสร้างความสมบูรณ์แก่รายงานฉบับเต็ม คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณเกษตรกรผู้ผลิตกาแฟและผู้ประกอบการแปรรูปกาแฟในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย เพชรบูรณ์และตากที่เอื้อเฟื้อผลิตผลเกษตรและร่วมให้คำแนะนำในการพัฒนางานวิจัย วิเคราะห์ปัญหาและให้ความร่วมมือกับทางกรมวิชาการเกษตร

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากการศึกษาวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ให้ความอนุเคราะห์ทุกภาคส่วนที่ให้คำแนะนำและร่วมมือปฏิบัติงานทดลอง ซึ่งถือเป็นกำลังใจสำคัญในการพัฒนานวัตกรรมใหม่สู่วงการกาแฟประเทศไทยสู่ระดับสากล

นายโกเมศ สัตยาวุธ
นางสาวสุกัญญา นิติยนต์
นางสาวฉัตรนภา ข่มอาวุธ
นางสุภัทรา เลิศวัฒนาเกียรติ

กรมวิชาการเกษตร

ผู้วิจัย

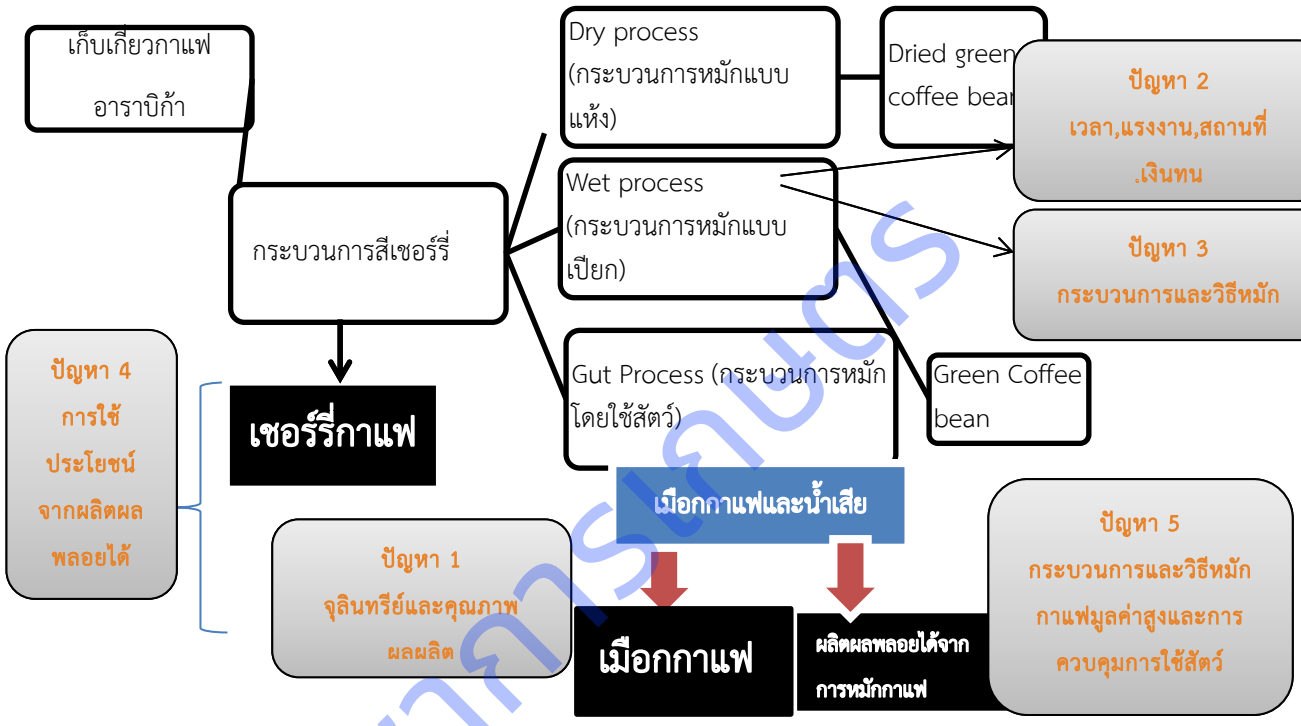
นายโกเมศ สัตยาวุธ	กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
นางสาวสุกัญญา นิติยนต์	กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
นางสาววิมลวรรณ วัฒนวิจิตร	กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
นายประยูร เอ็นมาก	กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
นางสาวฉัตรนภา ข่มอาวุธ	ศูนย์วิจัยและพัฒนาเกษตรหลวงเชียงใหม่
นางสุภัทรา เลิศวัฒนาเกียรติ	สถาบันวิจัยพืชสวน
นายนิทัศน์ ตั้งพินิจกุล	สถาบันเกษตรวิศวกรรม

บทนำ

กาแฟ เป็นเครื่องดื่มที่มีความนิยมอย่างสูงของผู้บริโภคทั่วโลก ได้ถูกจัดเป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมและการส่งออกของประเทศไทย สายพันธุ์ที่มีการนิยมปลูกในประเทศไทยคือพันธุ์อาราบิก้าที่ปลูกในภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ และพันธุ์โรบัสต้าที่ปลูกในภาคใต้ ซึ่งความแตกต่างของทั้งสองสายพันธุ์ในด้านกลิ่นรส จึงทำให้กาแฟพันธุ์อาราบิก้ามีกลิ่นหอมและรสชาติที่ดีกว่าพันธุ์กาแฟโรบัสต้า และได้รับความนิยมนำมาใช้ผลิตเป็นกาแฟคั่วบดมีคุณภาพและราคาสูงในท้องตลาดปัจจุบัน ในกระบวนการผลิตกาแฟจะเป็นส่วนหนึ่งที่ส่งผลต่อคุณภาพของกลิ่นและรสชาติของกาแฟ โดยทั่วไปจะมีสองวิธี คือ กระบวนการแปรรูปแบบเปียก และกระบวนการแปรรูปแบบแห้ง ซึ่งแต่ละวิธีจะให้คุณภาพของเมล็ดกาแฟและกลิ่นรสที่แตกต่างกัน โดยหลังจากการเก็บเกี่ยวกาแฟจะมีการลอกเชอร์รี่ออก จากนั้นในกระบวนการผลิตกาแฟอาราบิก้าคุณภาพจะใช้กระบวนการแปรรูปแบบเปียก (Sivetz, 1963) เป็นการนำเมล็ดกาแฟที่ผ่านการลอกเปลือกนอกออก แล้วนำมาหมักลงในถังหมัก โดยจุลินทรีย์ธรรมชาติที่มากับเมล็ดกาแฟจะทำการหมักเพื่อย่อยเมือกหุ้มเมล็ดกาแฟ ซึ่งเป็นส่วนของเพคติน น้ำตาล เฮมิเซลลูโลส และส่วนที่ไม่ละลายน้ำ จึงต้องอาศัยกิจกรรมจุลินทรีย์และเอนไซม์ในการย่อยสลาย จุลินทรีย์ที่พบส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียและยีสต์ จากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการหมักเมล็ดกาแฟอาราบิก้ายังมีน้อยมากในประเทศไทยและการศึกษาที่ผ่านมาจะเป็นงานวิจัยทางด้านคุณภาพ เช่น ปัจจัยการผลิตที่มีผลต่อสารให้กลิ่นรสของกาแฟผสมแบบไทย การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบระเหย และกรดอินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมักของกาแฟอาราบิก้าที่ปลูกในประเทศไทย (นนทวัชร, 2547) ทั้งนี้ในปัจจุบันเกษตกรได้ละเลยกระบวนการหมักดังกล่าวไปมาก โดยเลือกที่จะใช้กระบวนการแปรรูปแบบแห้ง เนื่องมาจากข้อจำกัดด้านเวลา สถานที่ แรงงานและค่าใช้จ่าย จึงส่งผลให้คุณภาพกาแฟ

กรมวิชาการเกษตร

อาราบิก้าลดลง ทำให้ผู้บริโภคไม่ยอมรับ เกิดสารพิษและสารให้กลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ในกาแฟตามท้องตลาด นอกจากนี้ปัญหาขยะและสิ่งเหลือใช้จากกระบวนการหมักกาแฟยังส่งผลกระทบต่อเกษตรกรและผู้ประกอบการกาแฟที่ส่งปัญหาด้านมลภาวะทางอากาศ น้ำและดินในโรงงานผลิตและแปลงกาแฟเอง โดยสามารถสังเกตได้จากแผนภาพแสดงกระบวนการหมักกาแฟดังนี้



ภาพที่ 1 แสดงที่มาและความสำคัญของการกระบวนการหมักกาแฟอาราบิก้าและปัญหาต่างๆ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเจริญและความสัมพันธ์ระหว่างการหมักเมล็ดกาแฟอาราบิก้าของแบคทีเรียและยีสต์ที่ระยะเวลาต่างๆของการหมักกาแฟอาราบิก้าและทราบถึงระยะเวลาที่เหมาะสมของการหมัก ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักโดยการเติมหัวเชื้อยีสต์เพิ่มลงไปในกระบวนการหมักกาแฟอาราบิก้า และประเมินคุณภาพของกาแฟคั่วบดจากเมล็ดกาแฟอาราบิก้าที่ผ่านกระบวนการหมักโดยการเติมหัวเชื้อยีสต์

2. เพื่อศึกษาปัจจัยในการหมักกาแฟแบบระบบแอนแอโรบิกด้วยจุลินทรีย์ เพื่อพัฒนากาแฟอาราบิก้าคุณภาพ และทดลองผลิตถังหมักกาแฟอย่างง่าย ต้นทุนต่ำ ใช้ในแปลงกาแฟอาราบิก้าคุณภาพ

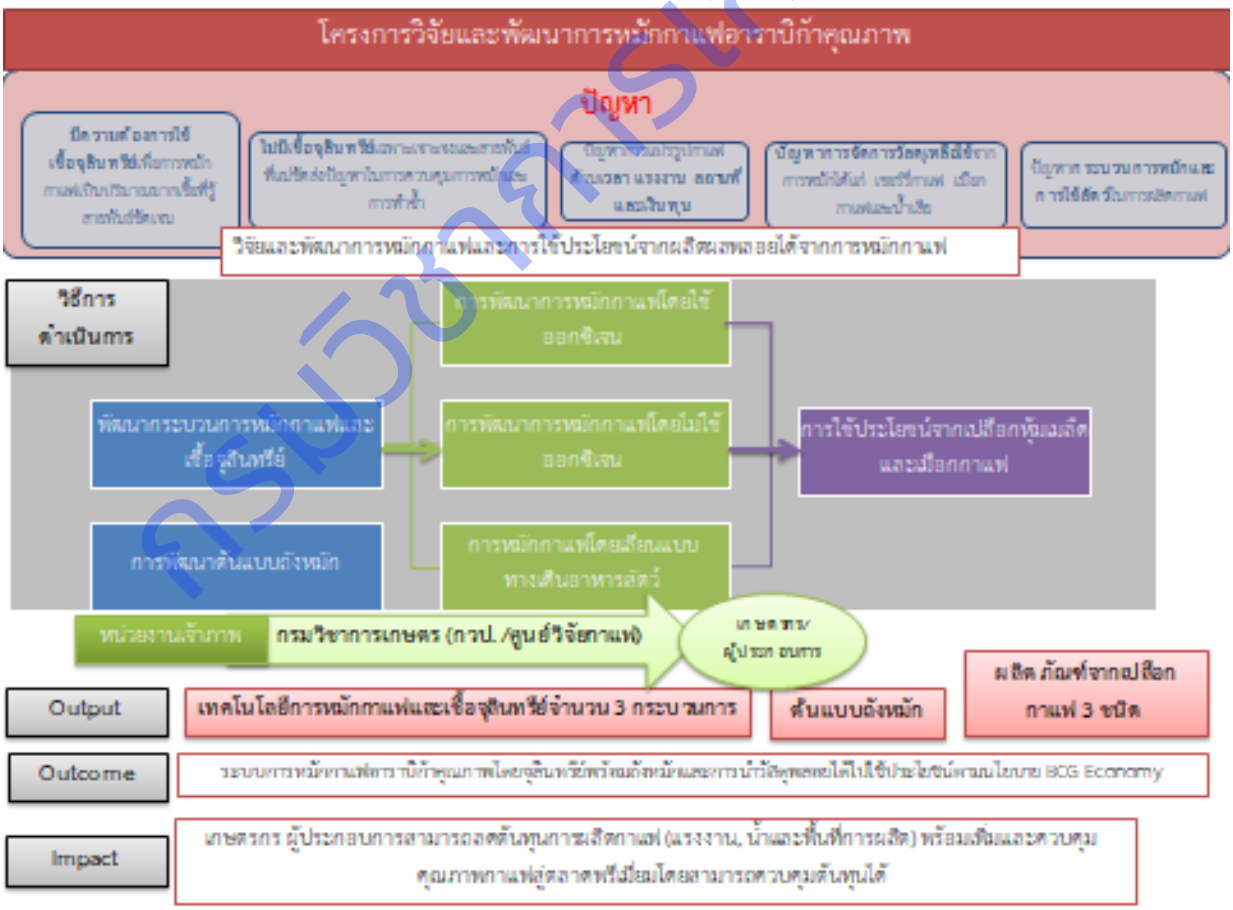
3. เพื่อศึกษาการหมักกาแฟโดยจำลองระบบการย่อยอาหารของสัตว์ เพื่อเก็บข้อมูลจุลินทรีย์ กลิ่น รส และสารสำคัญในระหว่างการหมักกาแฟสำหรับเป็นข้อมูลในการพัฒนาเทคโนโลยีและคุณภาพการแปรรูปกาแฟ ทดแทนการใช้สัตว์ในการหมักกาแฟ

กรมวิชาการเกษตร

4.เพื่อศึกษาสารสำคัญในเมือกกาแฟและเปลือกกาแฟและการนำใช้ประโยชน์จากเมือกกาแฟและเปลือกกาแฟในรูปแบบอาหาร

วิธีการวิจัย

โครงการวิจัยและพัฒนากระบวนการหมักกาแฟอาราบิก้าคุณภาพจึงเป็นงานวิจัยที่จะพัฒนาเทคโนโลยีหมักกาแฟอาราบิก้า เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียและยีสต์ในกระบวนการหมักที่มีการเติมหัวเชื้อยีสต์ เพื่อย่อยเมือกหุ้มของเมล็ดกาแฟ และนำไปเป็นแนวทางในการควบคุมสภาวะและระยะเวลาการหมักที่มีผลต่อคุณภาพกลิ่นรส ซึ่งจะประเมินจากการวัดคุณภาพของเมล็ดกาแฟที่ผ่านการคั่ว และนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเพื่อเพิ่มคุณภาพ ลดต้นทุนและเวลาการผลิต รวมทั้งเป็นการเพิ่มมูลค่าของเมล็ดกาแฟอาราบิก้า นอกจากนี้ยังค้นคว้าเทคโนโลยีใหม่ในการหมักกาแฟอาราบิก้าภายในภาวะแอนแอโรบิก พร้อมทั้งพัฒนาเครื่องต้นแบบช่วยหมักกาแฟอาราบิก้าและนำผลิตผลพลอยได้จากการหมักไปใช้ประโยชน์ เน้นการจัดการการผลิตแบบ Zero-waste process หรือการจัดการการผลิตที่ไม่มีของเสียออกจากระบวนการผลิต โดยมุ่งเน้นการนำไปใช้ประโยชน์จากการสกัดสารสำคัญและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารและการเกษตร



กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

การหมักกาแฟอาราบิก้าโดยจุลินทรีย์ถือเป็นนวัตกรรมการพัฒนากลิ่นรสกาแฟคุณภาพที่ได้รับการยอมรับในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามยังพบปัญหาตั้งแต่ กระบวนการหมักที่ถูกต้องและควบคุมได้ การไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก ปัญหาด้านแรงงาน เวลา การใช้ทรัพยากรน้ำที่สิ้นเปลืองรวมทั้งของเสียจากการหมักที่ถูกทิ้งให้เป็นมลภาวะ ซึ่งหัวใจสำคัญของการหมักกาแฟคือ จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักเมือกกาแฟ ได้แก่ ยีสต์ และ แบคทีเรีย ที่มีศักยภาพในการผลิตกลิ่นรส โครงการพัฒนาการหมักกาแฟอาราบิก้าคุณภาพจึงได้พัฒนากระบวนการหมักกาแฟให้มีประสิทธิภาพรูปแบบใหม่ 3 กระบวนการได้แก่ การหมักกาแฟโดยเทคนิค AAF หรือการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์ *Saccharomyces cerevisiae* strain BAwine แบบเติมอากาศและปรับกรด ที่สามารถควบคุมการหมักให้เสร็จภายในเวลา 18 ชั่วโมงมีการผลิตกลิ่นรสผลไม้ นอกจากนี้มีการใช้จุลินทรีย์ *Pichia Klyuvari* strain Pro-Y17 ในการหมักแบบไม่เติมอากาศที่มีศักยภาพดีในพื้นที่สูงและพัฒนากลิ่นรสกลุ่มชอคโกแลต และกระบวนการหมักแบบจำลองทางเดินอาหารสัตว์โดยเชื้อที่สกัดจากชะมดโดยเบื้องต้น สามารถพัฒนากลิ่นรสนมเนยให้กาแฟได้ ทั้งนี้มีการพัฒนาเครื่องช่วยหมักกาแฟทำให้ควบคุมการหมักง่ายโดยใช้หลักการของอากาศแบบยก มีการควบคุมการเติมอากาศและป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์นอกสภาวะการหมัก ต้นทุนต่ำและกำลังการผลิตไม่น้อยกว่า 50 กิโลกรัมต่อครั้ง ผลพลอยได้จากการหมักกาแฟอันได้แก่ เปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟ เมือกกาแฟและน้ำเสียจากการหมักกาแฟมีการนำไปวิเคราะห์และนำไปใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟที่มีกรดอินทรีย์สูงสามารถพัฒนาเป็นสารปรุงแต่งรสได้เมื่อผ่านการหมักแบบกึ่งแห้งโดยเชื้อ *Streptococus spp.* และหากนำเชื้อ *Aspergillus niger* หมักสารสกัดที่ความเข้มข้น 40% จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคแอนแทรคโนสในกาแฟ ทั้งนี้ผลการวิจัยและพัฒนาการหมักกาแฟอาราบิก้าแบบครบวงจรเพื่อมุ่งแก้ไขปัญหาที่ตั้งไว้ ผ่านผลการทดลองที่มีการทดสอบในพื้นที่จริงและแปลงเกษตรกรเพื่อทดสอบความเป็นไปได้ในการต่อยอดสู่ระดับอุตสาหกรรมให้เกิดความยั่งยืน มีการสร้างเครือข่ายการผลิตกาแฟพรีเมี่ยมของกรมวิชาการเกษตรเพื่อสอดรับเทคโนโลยีและพัฒนา ต่อยอดให้ตอบโจทย์ความต้องการของเกษตรกร ป้องกันปัญหาที่สามารถเกิดได้ตลอดกระบวนการผลิตในอนาคต นวัตกรรมการหมักกาแฟอาราบิก้าทั้งกระบวนการใหม่และต้นแบบผลิตภัณฑ์จากโครงการจะทำให้เกษตรกรสามารถยกระดับคุณภาพกาแฟอาราบิก้าให้มีการเพิ่มมูลค่า สร้างอัตลักษณ์เฉพาะตัว นอกจากนี้ยังมีการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรจากฐานชีวภาพตอบโจทย์ธุรกิจชีวภาพเชิงสร้างสรรค์ตามนโยบายของภาครัฐกับการเพิ่มมูลค่าเศรษฐกิจการฐานชีวภาพแบบครบวงจร

Abstract

Arabica fermentation valids as novel innovation for developing the flavor of coffee quality is known worldwide. However, there are still problems since incontrollable

fermentation process, absence of microorganisms, labor problems, time consuming, wastewater resources, and polluted fermentation waste which related to the core of coffee fermentation 'Microorganisms' included yeast and bacteria. Arabica Coffee Fermentation Project had developed 3 new efficient coffee fermentation processes as follows: AAF techniques or oxidative fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* strain BAwine with aerated and acidified. This technique reduces time consume to 18 hours with the production of fruit flavor. In addition, *Pichia Klyuvari* strain Pro-Y17 was used in anaerobic fermentation with good potency at high altitudes and developed chocolate flavor. Thirdly, the bio-processing fermentation imitated the animal gastrointestinal model extracted from civet enhances milk and butter flavor to coffee. Pilot coffee fermenter has been developed in parallel to facilitate these processes by using the air-lifting principle. This pilot-fermenter model help aeration controlled and evitated microbial with affordable cost and the production capacity is at less 50 kg per process. Futhermore, coffee fermentation by-products, which are Coffee cherry pulp, Coffee mucile and coffee wastewater, were analyzed and utilized. Especially, coffee pulp with high organic acid was able to develop as a flavoring agent after solid-state fermentation by *Streptococus spp*., indeed if using *Aspergillus niger*, the extract could inhibit the growth of anthracnose pathogens in coffee. These technogy have been tested in coffee farm to realize the feasibility of extending to the industrial level for sustainability. Thai Premium Coffee network affected in Department of Agriculture has been established to support this technology, extend to meet the needs of farmers, prevent problems causing throughout the production process in the future. The innovation of Arabica coffee fermentation, both new processes and product prototypes from the project, will enable farmers to raise the quality of arabica coffee to high-value added, creating farmers' identity. Finally, whole process aims to meet the creative bio-business needs in accordance with government policies with an integrated Bio-Circular-Green economy community.

ระเบียบวิธีการวิจัย

การทดลองที่ 1 การพัฒนากระบวนการหมักกาแฟกาแฟอาราบิก้าด้วยจุลินทรีย์

ขั้นตอนที่ 1 การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและยีสต์ต่อผลของการหมักกาแฟอาราบิก้าคุณภาพ

1.1 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับการทดลอง

กรมวิชาการเกษตร

1.2 ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ต่อผลของการหมักกาแฟอาราบิก้าและคุณภาพกาแฟอาราบิก้าที่ได้จากการหมักในห้องปฏิบัติการ

แผนการทดลอง ออกแบบการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 กรรมวิธี 5 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม ไม่เติมหัวเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 ใส่หัวเชื้อ C116 2%

กรรมวิธีที่ 3 ใส่หัวเชื้อ BAwine 2%

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

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาการพัฒนาการหมักกาแฟอาราบิก้าด้วยจุลินทรีย์ในแปลงทดสอบ

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 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 ตรวจสอบสายพันธุ์และคุณภาพกาแฟหลังหมัก

ขั้นตอนที่ 3 การศึกษากระบวนการเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้า

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%

กรมวิชาการเกษตร

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 ทดสอบควบคุมปัจจัยต่อปริมาณเชื้อโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบควบคุมได้เพื่อศึกษาปัจจัยอื่นที่ส่งผลและควบคุมปริมาณแก๊สที่ผลิตและทดลองหมักกาแฟอาราบิก้าในบ่อหมักจริงอย่างน้อย 2 สถานีวิจัยโดยใช้การแปรผันปัจจัยที่ได้จากการพัฒนาการเร่งการหมัก

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

ขั้นตอนที่ 4 การศึกษากระบวนการหมัก AAF techniques ในการย่อยเมือกกาแฟและการประยุกต์ใช้ในแปลงทดลอง

4.1 ศึกษากระบวนการย่อยเมือกโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่งกราด

4.2 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 การใช้เทคนิคใหม่ที่ได้จากขั้นตอนที่ 3

กรมวิชาการเกษตร

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

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

ระยะเวลา ตุลาคม 2559 – กันยายน 2561

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

การทดลองที่ 2 ศึกษาการหมักกาแฟด้วยจุลินทรีย์ในระบบแอนแอโรบิก

1. ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและยีสต์ระหว่างการหมักเมือกกาแฟในสภาวะที่มีอากาศน้อยในห้องปฏิบัติการ

1.1 คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญในระหว่างการหมักเมือกกาแฟในสภาวะที่มีอากาศน้อย

1.2 ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเพคตินของจุลินทรีย์ที่แยกได้

1.2.1 ทดสอบบนอาหารแข็ง Cristal Violet Pectate Medium (CVP)

1.2.2 ทดสอบการหมักเมือกกาแฟในขวดปิดสนิท

1.3 ทดสอบการหมักในสภาวะที่มีอากาศน้อยโดยการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์

1.3.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

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

2 ศึกษาการพัฒนาการหมักกาแฟอาราบิก้าด้วยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกสภาวะที่มีอากาศน้อยในแปลงทดสอบ

ทดสอบการหมักกาแฟอาราบิก้าในแปลงทดสอบ 4 แห่ง ได้แก่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเพชรบูรณ์ (เขาค้อ), ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรตาก (ดอยมูเซอ), ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่

กรมวิชาการเกษตร

(ขุนวาง), ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย (วาวี) โดยบรรจุเมล็ดกาแฟลงในขวดหมักที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 500 กรัม จากนั้นนำขวดหมักที่บรรจุเมล็ดกาแฟมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร ทำการหมัก 6 กรรมวิธี โดยในการทดสอบการหมักจะเติมหัวเชื้อที่เตรียมตามวิธีข้อ 1.3.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในขวดหมัก หลังจากนั้นปิดฝาขวดหมักและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเริ่มทำการหมัก ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง สังเกตการหลุดของเมือกจากเมล็ดกาแฟโดยวิเคราะห์ค่าความขุ่น, ปริมาณกรดทั้งหมด, ความเป็นกรด-ด่าง

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

3 ศึกษากระบวนการเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้าในสภาวะที่มีอากาศน้อยโดยนำผลการทดลองในข้อที่ 2 มาศึกษาต่อ

3.1 ทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้าในขวดปิด

3.1.1 ศึกษาผลของปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในการหมักเพื่อเร่งการหมักเมือกกาแฟในห้องทดลอง ที่อุณหภูมิ 20 และ 30 °C

แผนการทดลอง ออกแบบการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต)

กรรมวิธีที่ 2 เติม 1% แอมโมเนียมซัลเฟต

กรรมวิธีที่ 3 เติม 1.5% แอมโมเนียมซัลเฟต

กรรมวิธีที่ 4 เติม 2% แอมโมเนียมซัลเฟต

3.1.2 ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในการหมักเพื่อเร่งการหมักเมือกกาแฟในห้องทดลอง ที่อุณหภูมิ 20 และ 30 °C

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

กรรมวิธีที่ 4 ปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 8 ด้วยกรดทาทาริก

3.1.3 ทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้าในถังหมักในห้องปฏิบัติการ

3.1.4 ทดสอบผลของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ในอาหารสังเคราะห์

กรมวิชาการเกษตร

3.2 ทดลองหมักกาแฟอาราบิก้าในถังหมักอย่างน้อย 2 ศูนย์วิจัยโดยใช้การแปรผันปัจจัยที่ได้จากการพัฒนาการเร่งการหมัก

3.3 ตรวจสอบคุณภาพของกาแฟอาราบิก้า

3.4 เปรียบเทียบคุณภาพกาแฟที่ได้จากการหมักในระบบปิดกับวิธีปกติและคำนวนต้นทุนการทดลองเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักแบบเดิม แบบใช้เครื่องจักร แบบการใช้สารเคมีและวิธีที่พัฒนามาใหม่

ระยะเวลา ตุลาคม 2560 – กันยายน 2562

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

การทดลองที่ 3 การพัฒนาต้นแบบเครื่องหมักกาแฟ

1. ดัดแปลงเครื่องช่วยหมักขนาด 20 ลิตรโดยใช้หลักการของ single-stage pilot plan ดัดแปลงตามวิธีของ Bartlett and Gerhandt (1989) และทดลองประกอบเครื่องช่วยหมักอย่างง่ายโดยประกอบส่วนประกอบทั้งสิ้น 3 ส่วนได้แก่ ชุดปั้มอากาศ ส่วนของถังหมัก และชุดเก็บตัวอย่างน้ำหมัก

2. นำสภาวะเลี้ยงเชื้อของยีสต์และแบคทีเรียภายใต้สภาวะการหมักจากเทคนิค AAF technique โกเมศ (2560) มาใช้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพทำการทดสอบการหมักแบบ twin-batch competition

3. ทดสอบถังหมักโดยใช้การหมักเมือกโดยใช้เครื่องช่วยหมักอย่างง่ายล้อตามการหมัก Chloramphenicol fermentation ตามวิธีของ Bartlett and Gerhardt (1989) เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมและบันทึกข้อมูล

แผนการทดลอง ออกแบบการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 กรรมวิธี 3 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง (บันทึกการเปลี่ยนแปลง pH)

กรรมวิธีที่ 2 ควบคุมความเป็นกรดด่างโดยใช้กรดทาทาริกปรับเป็น pH 3.0

กรรมวิธีที่ 3 ควบคุมความเป็นกรดด่างโดยใช้กรดทาทาริกปรับเป็น pH 3.5

กรรมวิธีที่ 4 ควบคุมความเป็นกรดด่างโดยใช้กรดทาทาริกปรับเป็น pH 4.0

กรรมวิธีที่ 5 ควบคุมความเป็นกรดด่างโดยใช้กรดทาทาริกปรับเป็น pH 5.0

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

4. ทดสอบถังหมักโดยใช้การหมักเมือกโดยใช้เครื่องช่วยหมักอย่างง่ายล้อตามการหมัก Penicillin fermentation ตามวิธีของ Bartlett and Gerhardt (1989) เพื่อศึกษาการผลิตผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมและเวลาที่เหมาะสมในการใช้เครื่องช่วยหมัก

แผนการทดลอง ออกแบบการทดลองแบบ 3x3 Factorial in RCD จำนวน 3 ซ้ำ

ปัจจัยที่ 1 ควบคุมเวลาในการสกัดจำนวน 12,24,48 ชั่วโมง

ปัจจัยที่ 2 ควบคุมปริมาณน้ำที่ใช้ในการสกัดระดับ 50%, 75% และ 100% ของถังหมัก

กรมวิชาการเกษตร

การบันทึกข้อมูล ลักษณะเมือกหุ้มผิวเมล็ดที่ลดลง ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Acids) ความเป็นกรด-ด่าง (pH)และ การเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์

5. ทดสอบถังหมักโดยใช้การหมักจริงในสภาวะสุญญากาศในสถานีวิจัย เปรียบเทียบคุณภาพกาแฟ เวลาหมักและปริมาณเมือกที่หลุดกับวิธีปกติ

การบันทึกข้อมูล การวิเคราะห์การหมักเมล็ดกาแฟ ได้แก่ ลักษณะเมือกหุ้มผิวเมล็ด ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Acidity : AOAC, 942.15) วิเคราะห์การเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์

การวิเคราะห์เมล็ดกาแฟหลังคั่ว ได้แก่ ความชื้นจากเมล็ดกาแฟโดยใช้วิธีของ The Official Analytical Chemists (AOAC 930.15) ค่าสีของเมล็ดกาแฟโดยใช้เครื่องวัดสี Chroma Meter ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity : AOAC 942.15) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solids) ปริมาณเถ้าของเมล็ดกาแฟ (Ash) น้ำหนักเมล็ดกาแฟ ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีเจลดาห์ล ปริมาณสารคาเฟอีน (Caffeine) และธีโอโบรมีน (Theobromine) ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) วิเคราะห์สารสำคัญที่ให้กลิ่นในกาแฟด้วยเครื่องจมูกอิเล็กทรอนิกส์ (Electronic nose : E-nose)

การทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยให้ผู้ทดสอบชิมที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 5 คน ทดสอบชิมประเมินความชอบในคุณลักษณะของกาแฟในแต่ละด้าน ได้แก่ ลักษณะปรากฏ (Visuel) กลิ่น (Olfactive) รสชาติ (Gustative) และ ความพึงพอใจ (General Impression)

6. สรุปผลการทดลองเปรียบเทียบกับวิธีปกติ คำนวณต้นทุนการทดลองและถ่ายทอดผลงาน

ระยะเวลา ตุลาคม 2561 – กันยายน 2563

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

การทดลองที่ 4 การใช้ผลิตผลพลอยได้จากเปลือกหุ้มเมล็ดและเมือกกาแฟ

ขั้นตอนที่ 1 การประเมินคุณภาพวัสดุเหลือใช้จากกระบวนการหมักกาแฟ

ขั้นตอนที่ 2 การนำเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟไปใช้ประโยชน์

1. ศึกษาคุณภาพและคุณสมบัติของเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟโดยการวิเคราะห์ทางกายภาพและส่วนประกอบทางเคมีและการเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักแบบแห้ง (Solid-state fermentation) โดยมุ่งเน้นคุณค่าทางอาหารเป็นหลัก

2. ศึกษาปริมาณกรดอินทรีย์ที่ได้จากการหมักเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟ โดยเครื่องโครมาโตกราฟีแรงดันสูงในเปลือกหุ้มกาแฟภาวะปกติและภาวะที่เกิดจากการหมักแบบแห้ง

แผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD 3 กรรมวิธี 5 ซ้ำ

กรมวิชาการเกษตร

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์

กรรมวิธีที่ 2 เติมเชื้อจุลินทรีย์ *Aspergillus niger (ที่ไม่ผลิตสารพิษ)*

กรรมวิธีที่ 3 เติมเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus* spp.

การบันทึกข้อมูล ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Glucose, Fructose), ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Acids), ความเป็นกรด-ด่าง(pH), ปริมาณสารแทนนิน, ปริมาณกรดอะมิโน, ปริมาณกรดครอโรเจนิคและปริมาณสารอีเทอร์

3. ศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา (Biofungicide) ในรูปแบบสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟ (อัตราเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟ 100 กิโลกรัมต่อหัวเชื้อ 20 ppm) ทดสอบคุณสมบัติการเกิด Clear-zone ในการยับยั้งเชื้อราจากสารสกัดโดยทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gleosporoides* ด้วยวิธี Broth Dilution Technique

แผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design : CRD) มี 7 ตำรับการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ แสดงใน Table 1

Table 1 Experimental design of using cherry pod extract to test in inhibition of *Collectotrichum gleosporiodes by Broth dilution technique*

กรรมวิธีการทดลอง	รหัสตำรับ	ปริมาณสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟ (%)		น้ำกลั่น (%)
		หมักที่ 30 วัน	หมักที่ 60 วัน	
1	T_1	-	-	100
2	T_2	20	-	80
3	T_3	40	-	60
4	T_4	60	-	40
5	T_5	-	20	80
6	T_6	-	40	60
7	T_7	-	60	40

ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gleosporoides*

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

หมายเหตุ: A; เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่เจริญในตำรับควบคุม

B; เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนผิวหน้าอาหารที่ใช้ในการทดสอบ

การบันทึกข้อมูล คุณสมบัติการยับยั้งเชื้อรา (Clear-zone distance), ปริมาณเซลล์ที่เหลือและลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมีของเชื้อรา

กรมวิชาการเกษตร

4. ศึกษาการผลิตกรดซิตริกจากเปลือกหุ้มเมล็ดโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus* spp. และเพื่อพัฒนาเครื่องปรุงรส Aromat และผลิตภัณฑ์เบเกอร์รี่

แผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 กรรมวิธี 3 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม ไม่เติมหัวเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 ใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus lactis* 2%

กรรมวิธีที่ 3 ใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus thermophilus* 2%

กรรมวิธีที่ 4 ใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus faecium* 2%

จากนั้นนำขวดหมักที่บรรจุเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปิดฝาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเริ่มทำการหมัก ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมงเพื่อนำมาทำการวิเคราะห์ผล

การบันทึกข้อมูล ปริมาณกรดซิตริก, ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Acids), ความเป็นกรด-ด่าง (pH)และ การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

ทดลองผลิตสารสำคัญที่ได้จากเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟและนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในอาหารประเภทเบเกอรี่และเครื่องดื่มเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด

5. สรุปผลการทดลอง คำนวณต้นทุนการทดลองและถ่ายทอดผลงาน

-เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2559 – กันยายน 2561

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

การทดลองที่ 5 ศึกษาการหมักกาแฟโดยจำลองแบบระบบย่อยอาหารของสัตว์

1. คัดแยกจุลินทรีย์จากกาแฟขี้ชะมด

1.1 นำกาแฟขี้ชะมดที่ยังไม่ได้ผ่านการแปรรูป จำนวน 10 กรัม บรรจุลงในขวดหมักที่บรรจุน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Nutrient agar, MRS agar และ YM agar และสุ่มเก็บจุลินทรีย์ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน

1.2 ตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียและยีสต์แยกได้โดยวิธีทางชีวเคมีและโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

2. ทดสอบการหมักกาแฟด้วยจุลินทรีย์ผสมที่แยกได้จากกาแฟขี้ชะมด

2.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

2.2 การหมักกาแฟด้วยจุลินทรีย์

แผนการทดลอง ออกแบบการทดลองแบบ t-test จำนวน 2 กรรมวิธี 10 ซ้ำ

กรมวิชาการเกษตร

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม ไม่เติมหัวเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 ใส่จุลินทรีย์ผสมที่แยกจากกาแฟขี้ชะมด ในข้อ 2.1

จากนั้นนำขวดหมักที่บรรจุเมล็ดกาแฟมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปิดฝา บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส หยุดการหมักกาแฟหลังจากหมักนาน 20 ชั่วโมง

3. ทดสอบการหมักกาแฟด้วยกรดและเอนไซม์เพื่อเลียนแบบสภาวะระบบย่อยอาหารของสัตว์

แผนการทดลอง ออกแบบการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุมที่ไม่เติมกรดและเอนไซม์

กรรมวิธีที่ 2 กรดไฮโดรคลอริก 0.01%

กรรมวิธีที่ 3 เอนไซม์เปปซิน 1.4%

กรรมวิธีที่ 4 เอนไซม์จากตับอ่อน (Pancreatin 1.4%)

4. การตรวจสอบคุณภาพกลิ่นรสของกาแฟที่หมักโดยการทดสอบการชิม (Cupping)

- **เวลาและสถานที่**

ระยะเวลา (เริ่มต้น – สิ้นสุด) : ตุลาคม 2562 ถึง กันยายน 2563

สถานที่ดำเนินการ: กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร, ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย (วาวี)

ผลการวิจัย (Results)

การทดลองที่ 1 การพัฒนากระบวนการหมักกาแฟกาแฟอาราบิก้าด้วยจุลินทรีย์

1. ผลการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ต่อผลของการหมักกาแฟอาราบิก้า

พบว่าเชื้อยีสต์จะมีการเจริญต่อร่วมกับแบคทีเรียอย่างรวดเร็วตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกของการหมักเป็นต้นไป หลังจากชั่วโมงที่มีปริมาณ pH ลดลงระหว่าง 4.0 – 3.5 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 1 และพบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* มีผลต่อการหลุดของเมือกและจากเจริญเติบโตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 โดยแบคทีเรียที่ส่งผลต่อการหลุดของเมือกนั้นเมื่อทำการทดสอบนั้นคือแบคทีเรียชนิด *Erwinia dissolvens* โดยเป็นกลุ่มเดียวกับ Enterobactor ที่ได้ทำการตรวจสอบทำให้ทราบถึงเชื้อจุลินทรีย์เฉพาะที่ช่วยในการหมักกาแฟและสามารถนำไปศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อได้

กรมวิชาการเกษตร

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

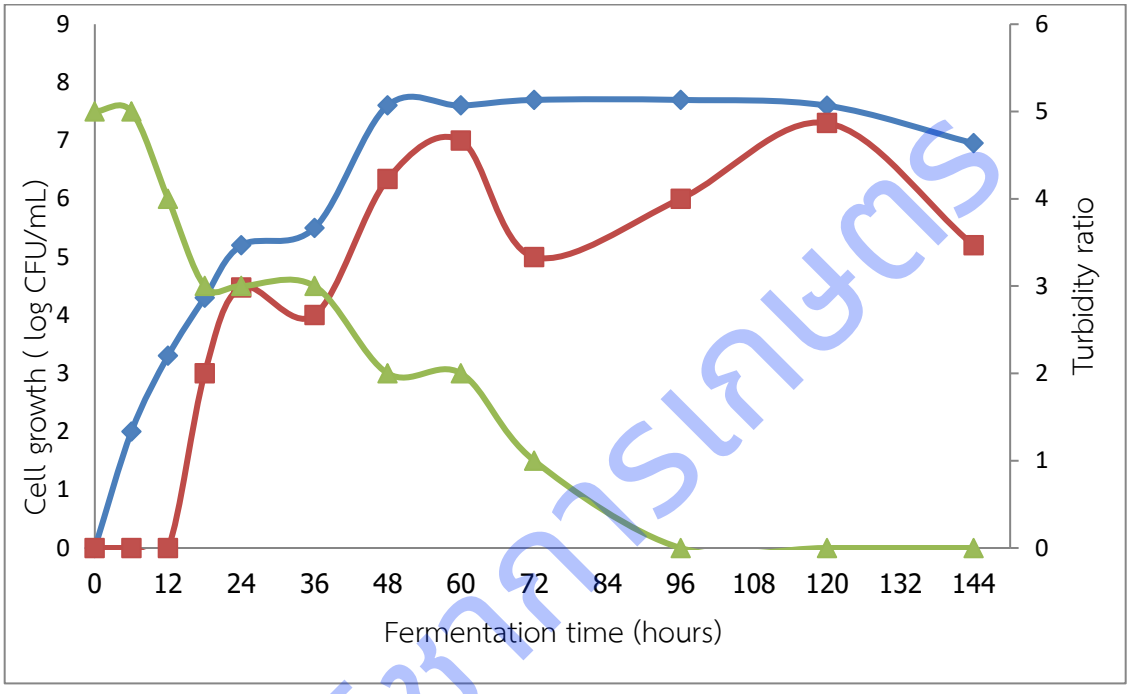


Figure 1 Growth of Yeast and bacteria during arabica fermention inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* BAwine explained by reduction of mucilage and growth of bacteria ( ) yeast ( ) and mucilage reduction in turbidity value ( )

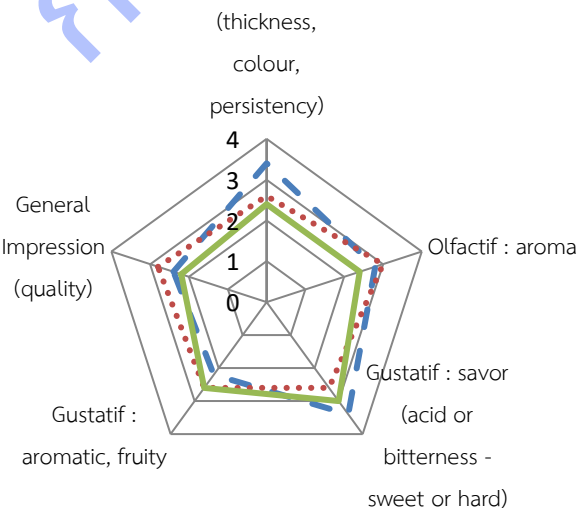


Figure 2 Star graphic of coffee cupping hedonic score using *Saccharomyces cerevisiae* C116 (in blue), BAwine (in green) and control (in red)

กรมวิชาการเกษตร

2. **ผลการศึกษาการพัฒนาการหมักกาแฟอาราบิก้าด้วยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกและคุณภาพกาแฟอาราบิก้าที่ได้จากการหมักในแปลงทดสอบ**

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

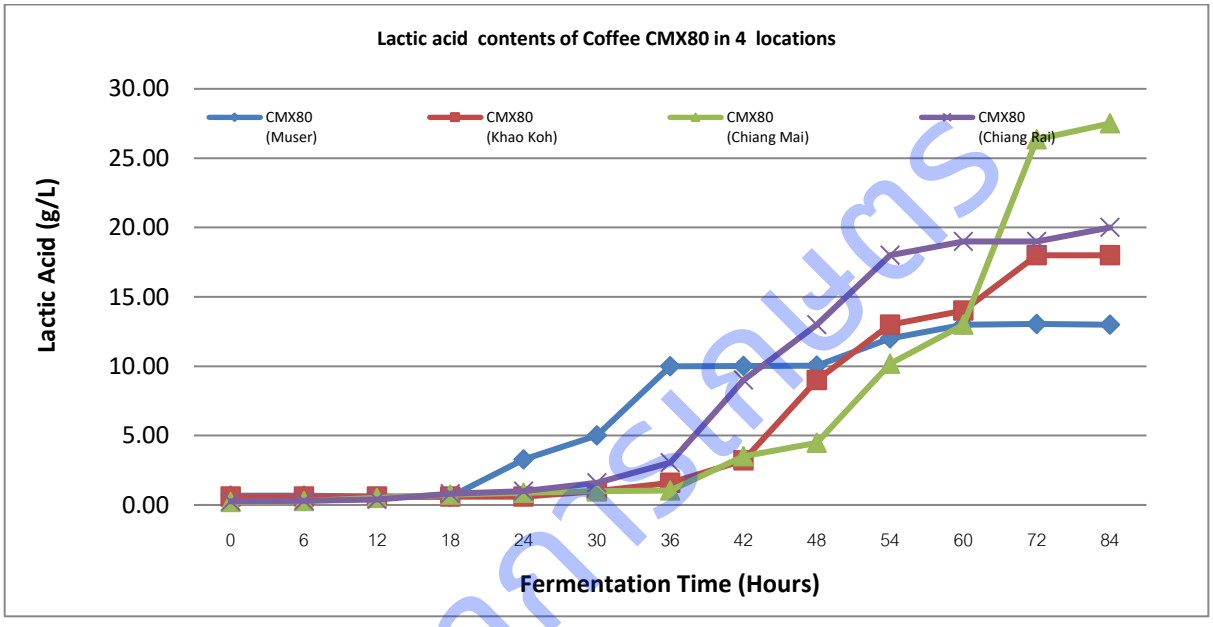


Figure 3 Augmentation of lactic acid explain in g/l of Arabica coffee from fourth regions in Chiang Mai, Chiang Rai, Petchabun and Tak

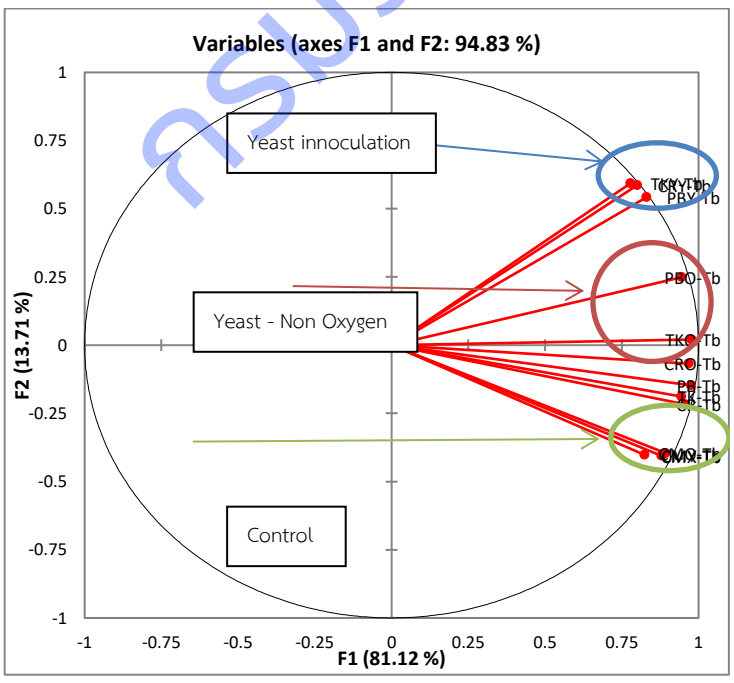


Figure 4 Principal Component Analysis (PCA) of chemical compound issue from coffee fermentation in fourth targeted areas describes in muscilage deformation (Turbidity, IC = 94.83%) and fermentation method and organic acid (Lactic Acid, IC 96.98%)

กรมวิชาการเกษตร

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 แหล่งผลิตกาแฟไม่ส่งผลต่อการหลุดลอกของเมือกดังนั้นผลของการเติมเชื้อยีสต์ส่งผลต่อการหมักเมือกกาแฟให้มีการหลุดลอกของเมือกที่สมบูรณ์อย่างมีนัยสำคัญและส่งผลต่อเวลาที่มีความรวดเร็วขึ้นจาก 72 ชั่วโมงเหลือ 24 ชั่วโมงและคุณภาพของการหมักกาแฟทำให้สารกาแฟมีคุณภาพทางประสาทสัมผัสที่ดี

3. ศึกษากระบวนการเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้า

ผลการทดลองแปรผันปัจจัยในการหมักเพื่อเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้าในห้องทดลองที่อุณหภูมิการหมักตลอดระยะเวลาการหมัก 2 ระดับได้แก่ 30 และ 40 องศาเซลเซียสและแปรผันปริมาณเกลือไดแอมโมเนียมในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 3%, 2.5% และ 2% ต่อการเพิ่มปริมาณออกซิเจนตลอดระยะเวลาการหมักปริมาณ 30, 40, 50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงพบว่าได้ผลวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธี one way ANOVA ต่อการหลุดของเมือกหุ้มผิวเมล็ดที่ลดลงโดยวัดปริมาณค่าความขุ่น (turbidity) 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 2% แต่ใช้ปริมาณออกซิเจนที่ 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงและที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตาราง Correlation matrix พบว่าชุดควบคุมมีค่าแปรผันตรงกับ Treatment ที่ 6 – 9 ผลวิเคราะห์โดยใช้กระบวนการ Tukey Analysis และ Fisher Analysis พบ treatment ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกลับเป็น Treatment ที่ 7 และ 8 ที่ใช้ปริมาณเกลือไม่เกิน 3% แต่ใช้ปริมาณออกซิเจนที่ 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงแสดงให้เห็นว่าปริมาณออกซิเจนที่อัตรา 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงส่งผลต่อการหลุดของเมือกกาแฟแต่ไม่พบความแตกต่างต่อปริมาณเกลือแอมโมเนียม

ผลการทดลองแปรผันปัจจัยในการหมักเพื่อเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้าในห้องทดลองอุณหภูมิการหมักตลอดระยะเวลาการหมัก 2 ระดับได้แก่ 30 และ 40 องศาเซลเซียสและแปรผันปริมาณกรดทาทาริกในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 3%, 5% และ 10% ต่อต่อการเพิ่มปริมาณออกซิเจนตลอดระยะเวลาการหมักปริมาณ 30, 40, 50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงพบว่าได้ผลวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธี one

กรมวิชาการเกษตร

way ANOVA ต่อการหลุดของเมือกหุ้มผิวเมล็ดที่ลดลงโดยวัดปริมาณค่าความขุ่น (turbidity) 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 ที่ใช้ปริมาณกรดทาทาริกที่ 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 ที่ใช้ปริมาณกรดทาทาริกไม่เกิน 5% แต่ใช้ปริมาณออกซิเจนที่ 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงแสดงให้เห็นว่าปริมาณออกซิเจนที่อัตรา 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงส่งผลต่อการหลุดของเมือกกาแฟโดยใช้ปริมาณกรดทาทาริกไม่น้อยกว่า 5%

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 ที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ผู้ทดสอบจะได้รับรสชาติกาแฟที่มีค่า Acidity สูงและกลิ่น off-flavor ทั้งนี้เนื่องมาจากการหมักเป็นเวลานานถึง 72 ชั่วโมงและทำให้เกิดกลิ่น Ferment (หมัก) อย่างชัดเจนเมื่อพิจารณาปริมาณ Volatile acid ที่เป็นกลุ่มกรดอาซีติกจักมีค่าสูงมากกว่า 3.5 กรัมต่อกิโลกรัมถือเป็นกลิ่นน้ำส้มสายชูที่ไม่ก่อให้เกิดผลดีต่อคุณภาพกาแฟ เมื่อพิจารณากลุ่ม Cluster ที่ให้ผลต่อการคั่วที่มีสีเข้มและความขมสูงเช่น ชุดการทดลองที่ 2 (treatment 2) ถือเป็นกลุ่มที่น่าสนใจอีกกลุ่มโดยเฉพาะการผลิตกาแฟเพื่อลด Acidity และ ให้ค่าความขมและสีที่สูง ซึ่งนำไปสู่ต้นแบบการผลิตเพื่อผลิตกาแฟที่ต้องการคุณลักษณะเฉพาะของสีและรสชาติขมได้ ผลการพัฒนากระบวนการหมักโดยพบว่าการหมักกาแฟให้ได้คุณภาพดีต้องใช้เชื้อจุลินทรีย์ Saccharomyces cerevisae ที่อัตรา 20 ไมโครกรัมต่อเฮกโตลิตร(Flore Fermentation) รวมกับปริมาณออกซิเจนที่อัตรา 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง (Oxygenation) และใช้ปริมาณกรดทาทาริกไม่น้อยกว่า 5% (Acidification) ทำให้เกิดกระบวนการใหม่ที่เรียกว่า “AAF technique” (Acelerated Arabica Fermentation “Acid-Air-Flore Fermentation”)

กรมวิชาการเกษตร

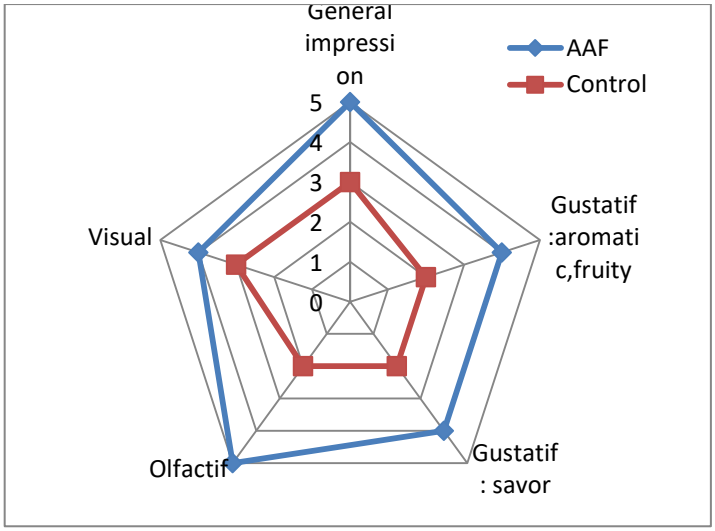


Figure 5 Star graphic described Cup tasting score of Arabica coffee var CMX80 using Acid-Air-Flore Techniques compared to control process (traditional)

4. การหมักกาแฟแบบ AAF techniques

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

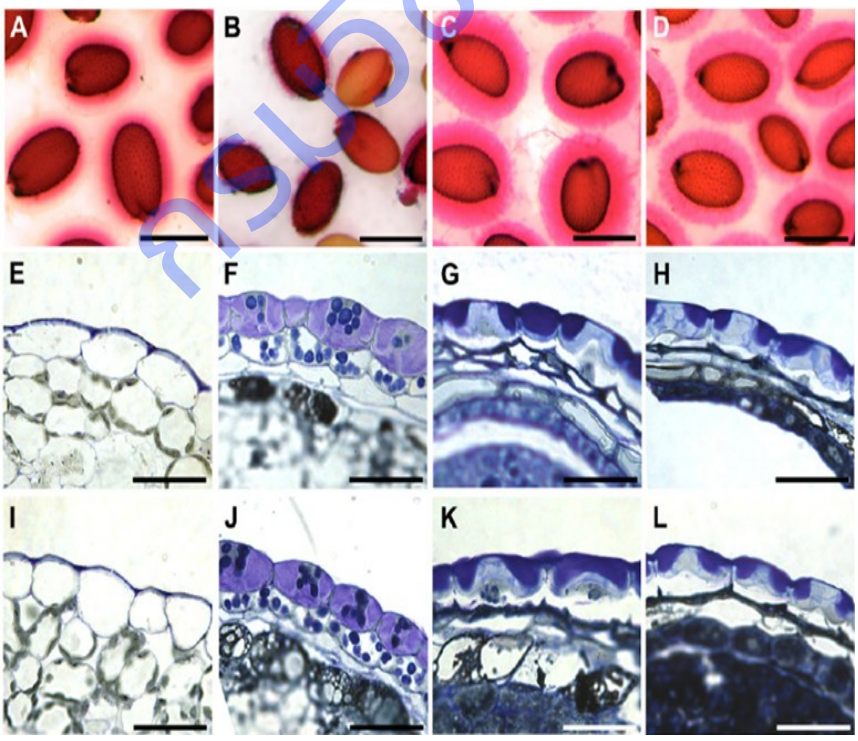


Figure 6 Polysaccharide modification of muscilage deform using High performance microscopy in every 48 hour; A – muscilage bean, B – completed demusculage bean, C & D show the occurrence of AAF techniques, E-L explained more in polysaccharide modification using dehydration of coffee muscile

กองบริการการศึกษา

4.2 ผลการทดลองการหมักเมือกของจุลินทรีย์ *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 จึงถือว่า BAwine เป็นสายพันธ์ที่เหมาะสมในการนำไปทดสอบในพื้นที่ทดสอบนอกจากนี้คุณภาพการหลุดของเมือก ลักษณะเมือกและกลิ่นยังเป็นที่น่าพึงพอใจในการนำไปใช้ในพื้นที่ทดสอบ

Table 2 Pectinolytic Activity of isolated using in mucilage fermentation on cystal violet pectate media

Isolate	*Enzyme Activity*					*Pectin*
	PG[1]		PE	PTE	PATE	*decomposed*
	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)

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” หรือเปรี้ยวแลคติกเกิดขึ้นในชุดทดลองที่มีการย่อยเมือกในเวลานาน

กรมวิชาการเกษตร

เกินไปทำให้กาแฟมีรสเปรี้ยวจัดไม่เป็นที่ยอมรับ 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 นั้นโดยปกติใช้เวลานานมากและในบางการหมักพบว่าค่าความเป็นกรดด่างไม่ลดลงต่ำกว่า 4.5 ทำให้เกิดกระบวนการหมักกรดอาซีติกและการหมักคู่ขนานทำให้เกิดสารและกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ อย่างไรก็ตามปัจจัยสำคัญในการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างคือคุณภาพน้ำที่ใช้ในการหมักพบว่าน้ำในแต่ละสถานีทดสอบมีค่าความเป็นกรดด่างแตกต่างกันและในปี 2561 พบว่าในสถานีวิจัยพืชสวนเพชรบูรณ์น้ำมีค่าความเป็นด่างสูงมากโดยเมื่อนำมาวิเคราะห์ค่า BOD กว่า 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าคุณภาพน้ำไม่เหมาะสำหรับดื่ม น้ำมีคุณภาพกระด้างส่งผลต่อการหมักกาแฟและเมื่อตรวจสอบค่า TDS (Total Dissolved Solid) พบค่าสูงกว่า 300 มิลลิกรัมต่อลิตรและมีค่า PO2 ในปริมาณต่ำ จึงไม่นำผลการทดสอบจากสถานีดังกล่าวมาใช้ในการวิเคราะห์พบค่าความเป็นกรดด่างของการหมักกาแฟโดยจุลินทรีย์ในปี 2560 พบว่ามีค่า pH ต่ำกว่า 4.5 ในชั่วโมงที่ 12 และหากใช้ AAF technique จะได้ผลในชั่วโมงที่ 10 ซึ่งดีกว่าชุดควบคุมถึง 4 เท่าตัว (ปี 2560 ชุดควบคุมมีค่าความเป็นกรดด่างลดลงที่ชั่วโมงที่ 36 และปี 2561 ในชั่วโมงที่ 44)

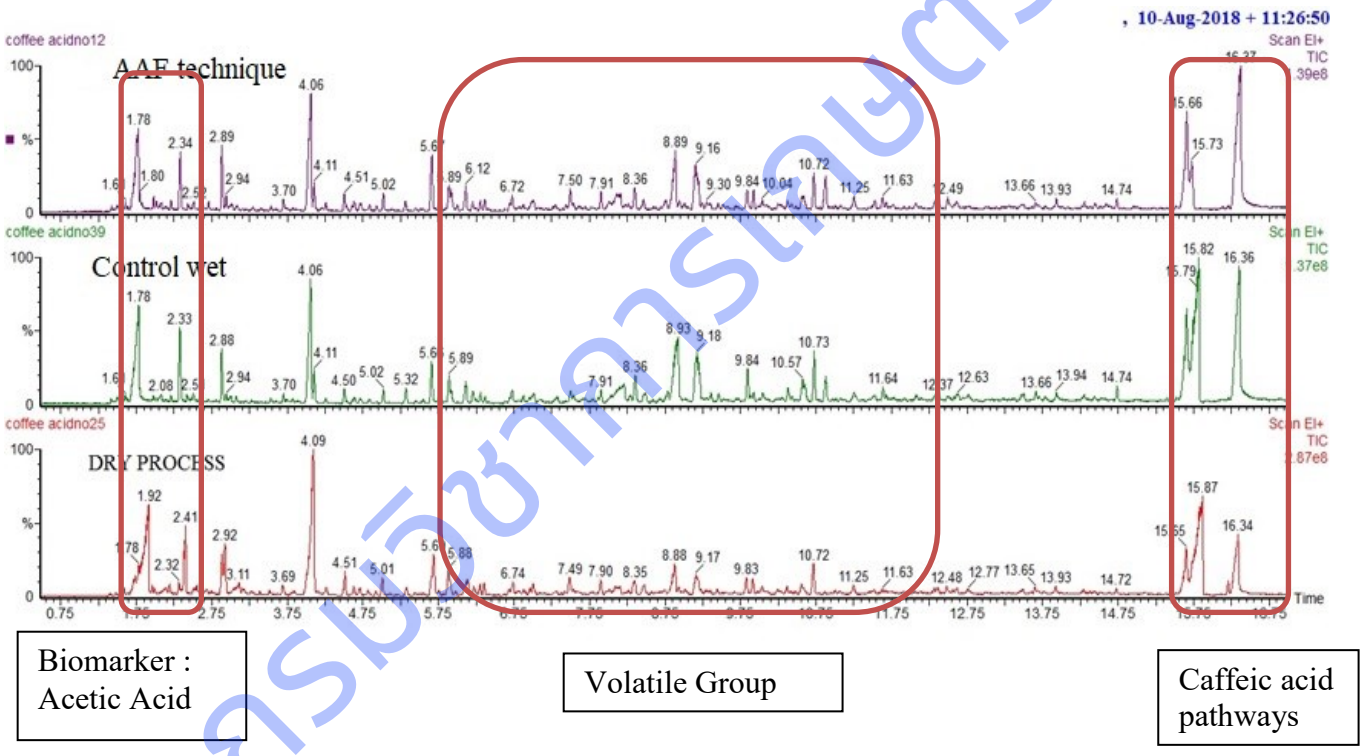
<u>วิจารณ์คุณภาพน้ำที่เหมาะสำหรับการหมักย่อยเมือก :</u> ปัจจัยสำคัญของน้ำตั้งต้นที่ใช้ในการหมักของเชื้อจุลินทรีย์คือ ความกระด้างของน้ำ (Water Hardness), ค่าความเป็นกรดด่าง(pH) และปริมาณเกลือแร่ของน้ำ (Alkalinity) โดยความกระด้างของน้ำและค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นสำคัญในการเจริญเติบโต โดนสามารถใช้ค่า TDS(Total 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

แนวทางการแก้ปัญหาน้ำกระด้างและค่าความเป็นกรดด่างไม่เหมาะสมจะเติมเกลือแคลเซียมหรือแอมโมเนี่ยมซัลเฟสเพื่อให้จุลินทรีย์มีธาตุอาหารมากพอที่ใช้ในการดำเนินกิจกรรมอย่างไรก็ตามกระบวนการดังกล่าวถือเป็นการแก้ปัญหาที่ปลายเหตุที่ไม่สามารถจัดการกับคุณภาพน้ำต้นทางได้ดังนั้นหากจัดการคุณภาพน้ำได้ตั้งแต่แหล่งผลิตจักลดต้นทุนในการเพิ่มสารเคมีที่ใช้ในการหมัก

ผลการทดสอบคุณภาพเมล็ดกาแฟจากวิธี AAF technique เปรียบเทียบกับ ชุดควบคุม

กรมวิชาการเกษตร

พบว่าสารกาแฟที่ทำการทดลองมีค่าความชื้นหลังคั่วเฉลี่ย 9.00% และค่าสีหลังคั่วอยู่ที่ระดับ Agtron 53.33 เท่ากันทุกตัวอย่างทดสอบ โดยผลการทดสอบลักษณะทางกายภาพของกาแฟจากแหล่งเพาะปลูกทั้ง 4 สถานีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกล่าวคือกาแฟมีค่าความเป็นกรดโดยรวม (Total Acidity in tartaric acid) เฉลี่ย 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) นอกจากนี้ผลปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสพบว่า ค่าองศาบริกซ์ในกาแฟที่ใช้เทคนิค AAF technique จะอยู่ที่ 8.77 และส่งผลให้น้ำกาแฟมีค่า Total dissolved solid อยู่ที่ 251.91 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในกาแฟที่ผ่านเทคนิคดังกล่าวมีการผลิตสารให้กลิ่นรสเพิ่มขึ้นมาโดยเมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันในเมล็ดกาแฟกลุ่มนี้พบว่ามีปริมาณน้ำมันสูงถึง 13.76% (STD : 1.78) แต่ต่างกับชุดควบคุมที่ไม่หมักที่8.00% หรือประมาณ 1.2 เท่า



กรมวิชาการเกษตร

Figure 7 Comparative chromatogram of coffee flavor profile using dry process, wet process as control and AAF techniques distinguished the different volatiles which shown the various flavor compared to those two existent techniques. The result of cupping testing confirmed the ranking of 85 – 87 /100 compared to control as 75/100

ตารางที่ 2 Chemical compounds issued from different techniques using for coffee fermentation explained in organic acid, sugar and phenolic acid.

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.

กรมวิทยาศาสตร์

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

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)

Table 3 Production cost of different coffee fermentation techniques explain from 1 kilograms of coffee cherry

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	

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2 ศึกษาการหมักกาแฟด้วยจุลินทรีย์ในระบบแอนแอโรบิก

1. ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและยีสต์ระหว่างการหมักเมือกกาแฟในสภาวะที่มีอากาศน้อยในห้องปฏิบัติการ

จากการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญในระหว่างการหมักเมือกกาแฟในสภาวะที่มีอากาศน้อย เชื้อ พบการเจริญของยีสต์และแบคทีเรียแลคติกแต่ไม่พบการเจริญของรา แสดงให้เห็นว่ายีสต์และแบคทีเรียแลคติกมีความเกี่ยวข้องกับการหลุดของเมือกกาแฟ โดยในระหว่างการหมักสามารถแยกเชื้อยีสต์ได้จำนวน 53 ไอโซเลต และแบคทีเรียจำนวน 48 ไอโซเลต เมื่อนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเพคตินในบนอาหารแข็ง CVP และทดสอบความสามารถในการย่อยเมือกกาแฟในขวดปิดสนิท พบยีสต์และแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการหลุดของเมือกกาแฟภายในเวลา 18 ชั่วโมงจำนวน 16 และ 3 ไอโซเลต ตามลำดับ ซึ่งเร็วกว่าการย่อยเมือกกาแฟโดยวิธีธรรมชาติ เมื่อทดสอบการหมักเมือกกาแฟในสภาวะแอนแอโรบิกหรือในสภาวะที่มีอากาศน้อยเปรียบเทียบกับการเติมกรด, การเติมเชื้อเชื้อยีสต์ BAwine และการเติมเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* และ *Leuconostoc oenos* พบว่าการเติมยีสต์ BAwine และ PRO-Y15 มีผลต่อการหลุดของเมือกได้ดีกว่าการเติมกรดและการเติมแบคทีเรียแลคติกเมื่อหมักกาแฟเป็นเวลา 18 ชั่วโมง และสามารถทำให้เมือกกาแฟหลุดอย่างสมบูรณ์เมื่อหมักกาแฟครบ 24 ชั่วโมง (Figure 1)

จากการจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ PRO-Y15 โดยใช้อนุกรมวิธานระดับโมเลกุล โดยเปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์ในโดเมน 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% จึงจัดจำแนกยีสต์ PRO-Y-15 เป็น *Pichia kluyveri*

2. ศึกษาการพัฒนาการหมักกาแฟอาราบิก้าด้วยแบคทีเรียที่คัดเลือกในสภาวะที่มีอากาศน้อยในแปลงทดสอบ

จากการทดสอบการหมักในแปลงทดสอบ โดยวิธีธรรมชาติ (ไม่เติมจุลินทรีย์) (Figure 2) พบว่าการหลุดของเมือกกาแฟซึ่งแสดงผลเป็นค่าความขุ่น (Turbidity) มีค่าเพิ่มขึ้นในน้ำหมักของทุกกรรมวิธี และเมื่อทำการหยุดการหมักที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเมือกหลุดอย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามความแตกต่างของแปลงทดสอบมีผลต่อการหลุดของเมือกกาแฟ แสดงให้เห็นว่าผลผลิตกาแฟ, อุณหภูมิที่ใช้ในการหมักและเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติส่งผลต่อความเร็วในการหลุดของเมือกกาแฟ การปรับความเป็นกรดเริ่มต้นไม่มีผลต่อการหมักเนื่องจากหลังปรับค่าความเป็นกรด (pH 4) แล้วค่าความเป็นกรดมีการเปลี่ยนแปลงสูงขึ้นจนเท่ากับชุดทดสอบอื่นๆ แล้วจึงลดลงอีกครั้งเมื่อจุลินทรีย์ธรรมชาติในการหมักกาแฟเจริญเติบโต ทั้งนี้การปรับความเป็นกรดอาจยับยั้งจุลินทรีย์ธรรมชาติทำให้การหมักเกิดขึ้นช้าลง เมื่อเติมแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* ส่งผลให้ปริมาณกรดแลคติกสูงขึ้นรวดเร็วกว่าชุดการทดสอบอื่นๆ และทำให้ค่าความขุ่นสูงขึ้นเร็วกว่าการหมักแบบธรรมชาติแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแลคติกส่งเสริมการหลุดของเมือกกาแฟซึ่งสอดคล้องกับผลการแยก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เชื้อที่พบการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในเพาะเลี้ยงเชื้อที่แยกจากตัวอย่างการหมักกาแฟ การเติมแบคทีเรีย *Leuconostoc oenos* และการเติมกรดให้ผลการเปลี่ยนแปลงของกรดแลคติกที่แตกต่างกันระหว่างการหมักกาแฟที่เก็บจากจังหวัดเพชรบูรณ์ และจังหวัดตาก แสดงให้เห็นว่าปัจจัยภายนอก เช่น จุลินทรีย์ในธรรมชาติของแหล่งปลูกกาแฟมีผลต่อปัจจัยที่นำมาทดสอบ และมีแนวโน้มว่าระบบการหมักที่เหมาะสมสำหรับการหมักเมือกกาแฟอาจแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ การเติมยีสต์ BAwine และการเติมยีสต์ PRO-Y15 ทำให้เกิดการหลุดของเมือกได้ดีในสภาวะไร้อากาศ และทำให้เกิดการหลุดของเมือกได้เร็วกว่าเมื่อเติมแบคทีเรียแลคติก (Figure 3)

3. ศึกษากระบวนการเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้าในสภาวะที่มีอากาศน้อย

3.1 ผลของปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในการหมักเพื่อเร่งการหมักเมือกกาแฟ

จากการทดสอบการเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้าในสภาวะที่มีอากาศน้อย โดยแปรผันปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตให้มีความเข้มข้น 1%, 1.5% และ 2% พบว่าที่อุณหภูมิ 20°C การหลุดของเมือกกาแฟของชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้นได้ช้า ใช้เวลามากกว่า 120 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับสภาพภูมิอากาศบนยอดดอยที่มีอุณหภูมิต่ำและต้องใช้ระยะเวลาในการหมักกาแฟนาน การเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตไม่ส่งผลต่อการเร่งการหลุดของเมือกกาแฟในชุดควบคุม แต่ในทางตรงกันข้ามเมื่อเติมหัวเชื้อยีสต์ BAwine และ PRO-Y15 ในระบบหมัก ช่วยเร่งการหมักกาแฟที่อุณภูมิ 20 °C ได้ โดยยีสต์ BAwine ใช้เวลาในการทำให้เมือกหลุดอย่างสมบูรณ์ภายใน 72 ชั่วโมงและเมื่อเติม 1% แอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้ระยะเวลาในการหมักเมือกลดลง โดยเมือกจะหลุดภายใน 54 ชั่วโมง การเติมหัวเชื้อยีสต์ PRO-Y15 ช่วยเร่งการหมักเมือกได้ดีที่สุด โดยยีสต์ PRO-Y15 ใช้เวลาในการทำให้เมือกหลุดอย่างสมบูรณ์ภายใน 36 ชั่วโมงและเมื่อเติม 1% แอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้ระยะเวลาในการหมักเมือกลดลง โดยเมือกจะหลุดภายใน 30 ชั่วโมง ซึ่งถือได้ว่าเชื้อยีสต์ PRO-Y15 มีประสิทธิภาพในการใช้เตรียมเป็นหัวเชื้อในการหมักกาแฟที่อุณหภูมิต่ำ เมื่อทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 30 °C การหลุดของเมือกกาแฟของชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้นภายในเวลา 48 ชั่วโมง การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตไม่ส่งผลต่อการเร่งการหลุดของเมือกกาแฟในชุดควบคุม เมื่อเติมหัวเชื้อยีสต์ BAwine และ PRO-Y15 ในระบบหมัก ช่วยเร่งการหมักกาแฟที่อุณภูมิ 30 °C ได้ โดยยีสต์ BAwine ใช้เวลาในการทำให้เมือกหลุดอย่างสมบูรณ์ภายใน 36 ชั่วโมงและเมื่อเติม 1% แอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้ระยะเวลาในการหมักเมือกลดลง โดยเมือกจะหลุดภายใน 30 ชั่วโมง การเติมหัวเชื้อยีสต์ PRO-Y15 ช่วยเร่งการหมักเมือกได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับชุดควบคุมและชุดที่เติมยีสต์ BAwine โดยยีสต์ PRO-Y15 ใช้เวลาในการทำให้เมือกหลุดอย่างสมบูรณ์ภายใน 24 ชั่วโมงและเมื่อเติม 1% แอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้ระยะเวลาในการหมักเมือกลดลง โดยเมือกจะหลุดภายใน 18 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่สูงขึ้นไม่มีผลต่อการเพิ่มความเร็วในการหมักเมือกกาแฟ

เมื่อทดสอบผลของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการเจริญของยีสต์ BAwine และ PRO-Y15 ในอาหารสังเคราะห์เพคติน พบว่าการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตส่งผลในการเพิ่มการเจริญของยีสต์

กรมวิชาการเกษตร

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 สูงกว่าการเจริญของยีสต์ BAwine 10 เท่า

3.2 ผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในการหมักเพื่อเร่งการหมักเมือกกาแฟ

จากการทดสอบการเร่งการหมักเมือกกาแฟอาราบิก้าในสภาวะที่มีอากาศน้อยโดยแปรผันความเป็นกรด-ด่าง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ที่อุณหภูมิ 20 และ 30 °C เบื้องต้นพบว่าการปรับค่าความเป็นกรดด่างในช่วง pH 5-8 ไม่มีผลต่อการเร่งการหลุดของเมือกกาแฟในทุกกรรมวิธี อาจเนื่องมาจากยีสต์และแบคทีเรียแลคติกตามธรรมชาติรวมถึงหัวเชื้อยีสต์ 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

3.3 ทดลองหมักกาแฟอาราบิก้าในถังหมัก

เมื่อทำการทดสอบการหมักในแปลงทดสอบโดยใช้กรรมวิธีเติมหัวเชื้อยีสต์ PRO-Y15 ในระบบที่ไม่ต้องควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง (pH 5-8) และไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่เติมหัวเชื้อยีสต์ BAwine และที่ไม่เติมหัวเชื้อยีสต์ ผลการทดสอบพบว่าในระหว่างการหมักมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิแวดล้อมในช่วงเวลากลางวันและเวลากลางคืน โดยมีอุณหภูมิอยู่

กรมวิชาการเกษตร

ระหว่าง 14-27 °C ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นมีค่าอยู่ระหว่าง 6.5-7.5 แต่อย่างไรก็ตามกรรมวิธีที่เติมหัวเชื้อยีสต์ PRO-Y15 ในระบบหมักที่ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตทำให้เกิดการหลุดของเมือกกาแฟอย่างสมบูรณ์ได้เร็วที่สุดในทุกแปลงทดสอบ โดยการหลุดของเมือกกาแฟเกิดขึ้นภายใน 20-24 ชั่วโมงหลังเริ่มการหมักกาแฟ (Table 1-2) การทดสอบในแปลงทดสอบพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์เกิดการหลุดของเมือกกาแฟเร็วกว่าอาจเนื่องมาจากอุณหภูมิแวดล้อม (20-27 °C) สูงกว่าแปลงทดสอบในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย (14-23 °C)

จากเก็บข้อมูลค่าความขุ่นของการหมักกาแฟให้ผลเป็นไปในรูปแบบเดียวกันทั้ง 4 แปลงทดสอบ โดยค่าความขุ่นของกรรมวิธีที่เติมหัวเชื้อยีสต์ PRO-Y15 มีค่าสูงกว่ากรรมวิธีอื่นๆ แสดงให้เห็นถึงการเจริญของยีสต์และการหลุดของเมือกกาแฟ ซึ่งทำให้เกิดความขุ่นในน้ำหมัก ผลการทดสอบดังกล่าวสอดคล้องกับการทดสอบโดยการสัมผัสเมล็ดกาแฟ โดยพบว่าเมื่อเวลาของการหมักผ่านไป 12 ชั่วโมง เมือกกาแฟเกิดการอ่อนตัว ไม่เกาะแน่นที่เมล็ดกาแฟ เมื่อกวนระบบหมักหรือใช้มือถูเมล็ดเพียงเล็กน้อยเริ่มเกิดการหลุดร่อนของเมือกกาแฟ 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 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี One-Way ANOVA โดยใช้การเปรียบเทียบแบบ Tukey พบว่ากรรมวิธีที่เติมหัวเชื้อยีสต์ BAwine และ PRO-Y15 มีคะแนนจากการชิม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) 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

กรมวิชาการเกษตร

Table 4 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 5 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 6 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

กรมวิชาการเกษตร

Table 7 Physical properties and cupping score of roasting fermented coffee beans using three treatment with 1% ammonium sulfate

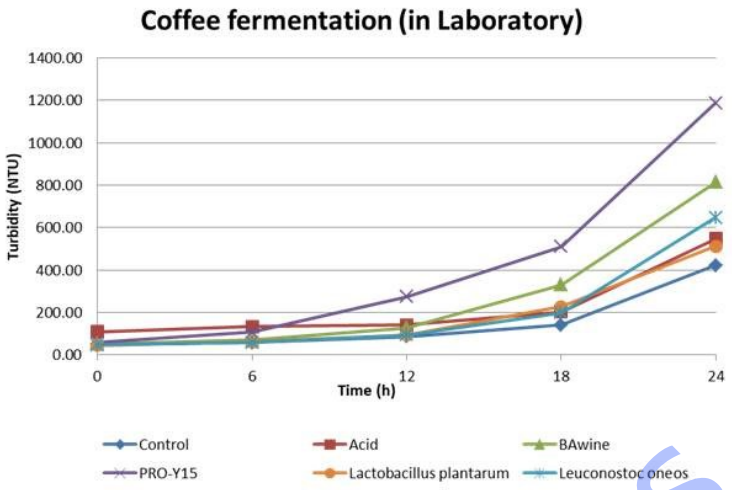
Physical properties and Cupping score	1% Ammonium Sulfate		
	Control	Control	Control
Moisture	1.13±0.1	1.15±0.2	1.10±0.1
Color (Agtron)	55.5±5.8	54.35±2.8	56.05±4.0
Brix	1.59±0.6	1.6±0.7	1.56±0.7
pH	5.34±0.1	5.23±0.1	5.45±0.2
Total dissolved solid	1.26±0.5	1.36±0.4	1.25±0.5
Total Acid Content	0.02±0.0	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 8 Cost investment of different fermentation method (1 kilgrams of green cofffe beans)

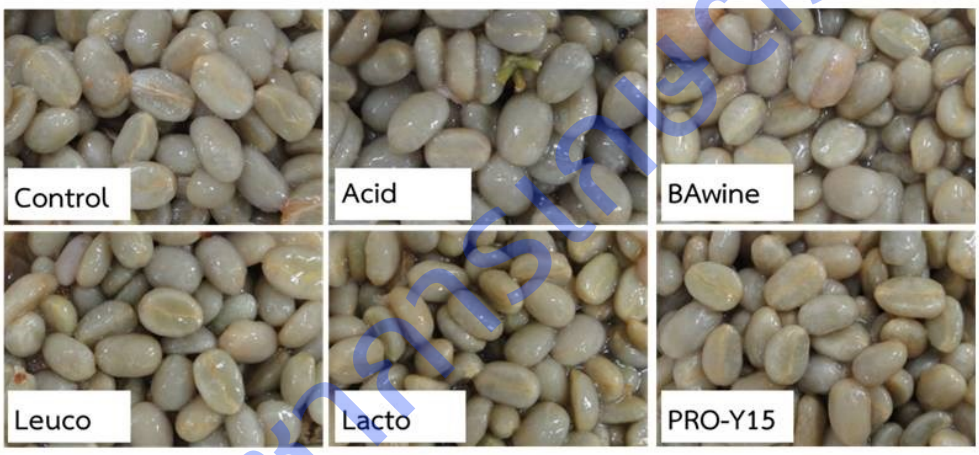
Process	Cost (baht)	Time	Disadvantage
Traditional Wet Process	55	Above 60 hr	- Long fermentation - Enormous water used
Machine	35	1 min/kg	- Incomplete demucilage - Broken beans
Chemical	135	Above 24 hr	- Chemical residue, unpleaseant odor
PRO-Y technique	30	Less than 24 hr	

กรมวิทยาศาสตร์

(A)



(B)



(C)

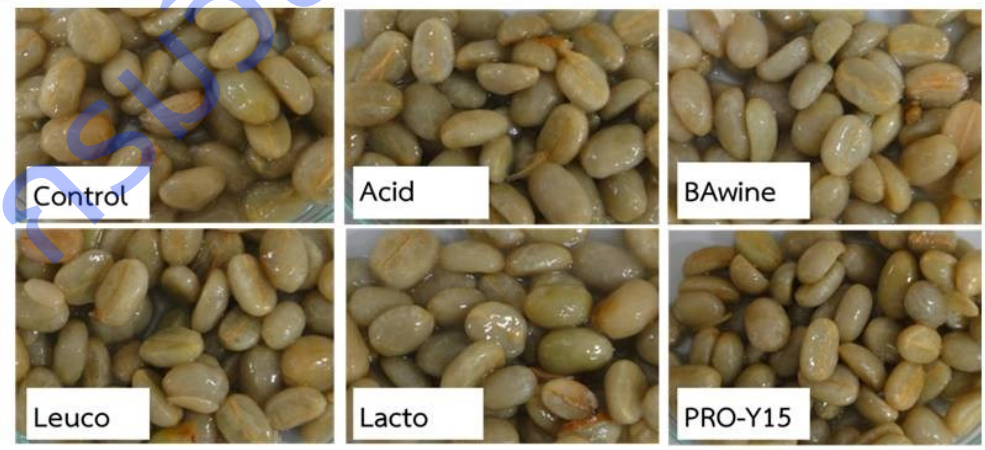


Figure 8 Coffee fermentation of six treatments (Control, Acid, Yeast BAwine, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc oenos* and PRO-Y15) explain in Turbidity (A), mucilage removal of coffee bean at 18 hour (B) and mucilage removal of coffee bean at 24 hour (C)

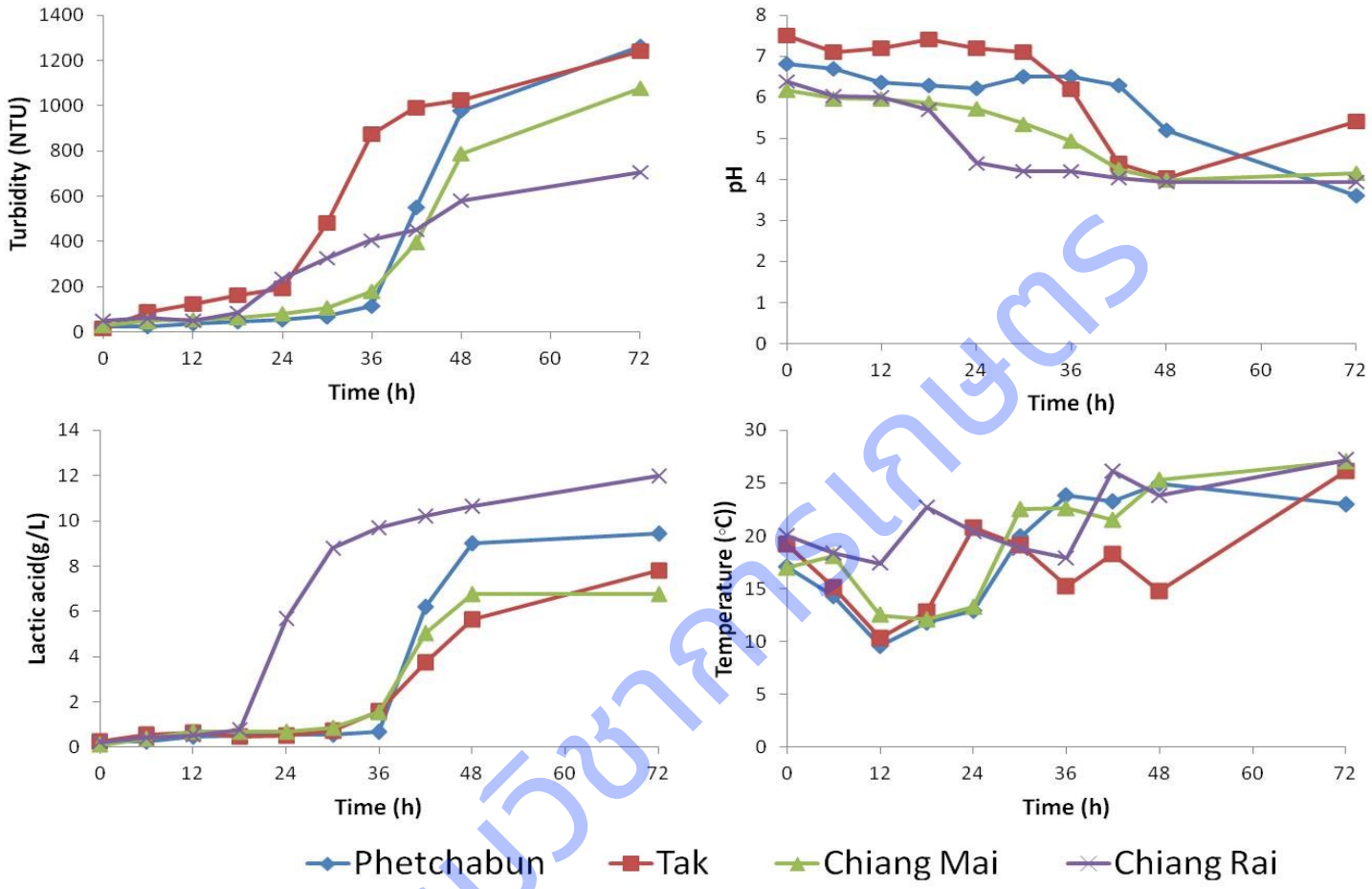


Figure 9 Coffee fermentation profiles of traditional wet process explain in Turbidity (NTU), Latic acid (g/L) and pH of six treatments at four regional horticultural offices

กรมวิชาการเกษตร

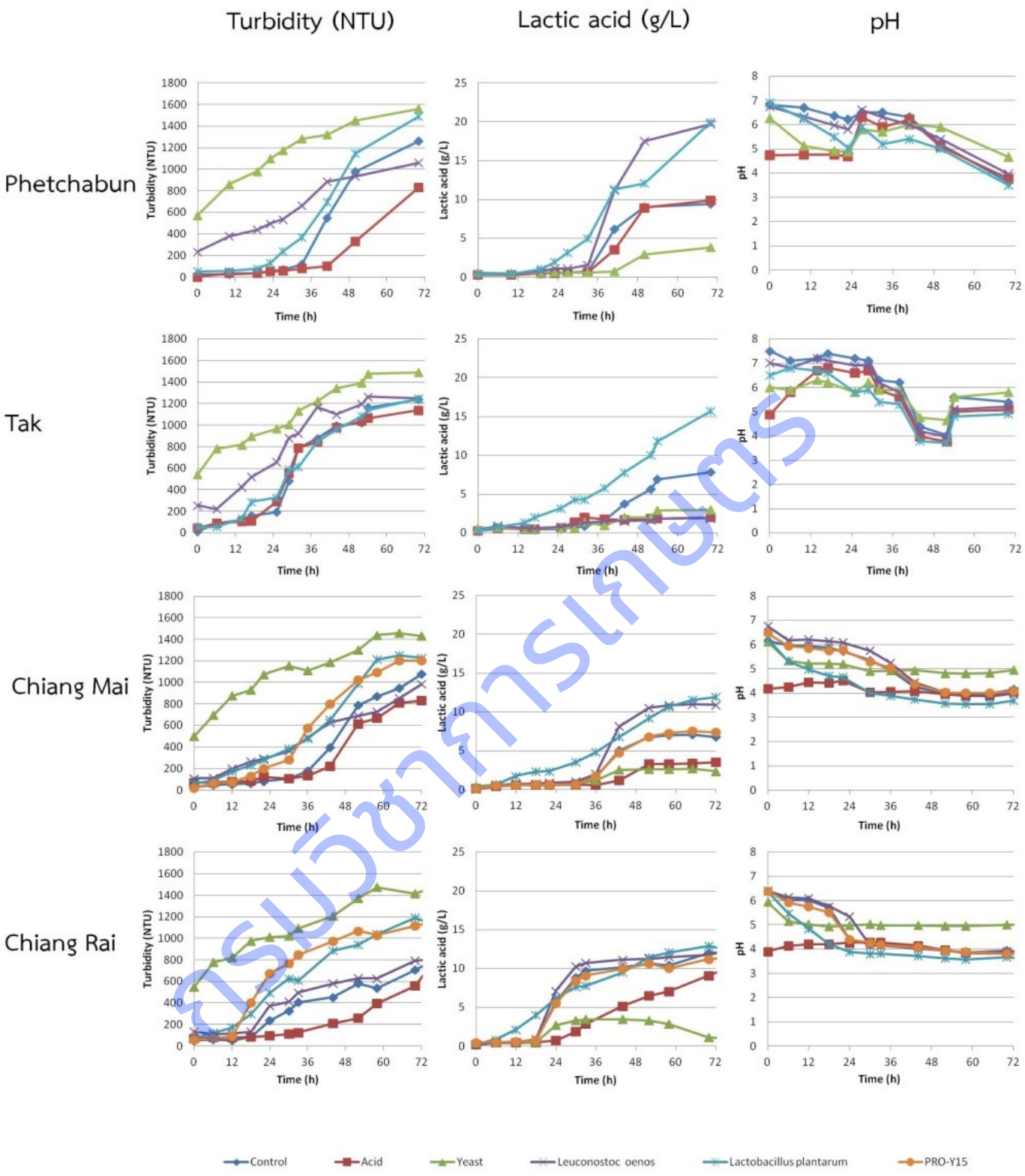


Figure 10 Coffee fermentation profiles under oxygen-limited condition explain in Turbidity ratio (NTU), Latic acid (g/L) and pH of six treatments at four regional horticultural offices

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การหมักกาแฟอาราบิก้าในระบบปิดซึ่งเป็นสภาวะที่มีอากาศน้อย โดยใช้หัวเชื้อยีสต์ *Pichia kluyveri* PRO-Y15 ในการเร่งการหมักและการหลุดลอกของเมือกหุ้มเมล็ดกาแฟ ในสภาวะแวดล้อมธรรมชาติที่มีอุณหภูมิระหว่าง 14-27 °C และระบบหมักมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระหว่าง 5-8 สามารถทำให้เมือกกาแฟหลุดอย่างสมบูรณ์ได้ภายในเวลา 20-24 ชั่วโมง ซึ่งช่วยลดระยะเวลาการหมักกาแฟ การใช้ทรัพยากรน้ำและแรงงานที่ใช้ในการขัดเมือกกาแฟตามการแปรรูปกาแฟแบบดั้งเดิมลงได้ 80% (Table 5) และกาแฟที่ได้จากการหมักโดยใช้หัวเชื้อยีสต์ดังกล่าวยังมีคะแนนการชิม (Cupping score) ดีกว่าการหมักที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ โดยผลจากการทดสอบพบว่าการผลิตกาแฟโดยใช้หัวเชื้อ *Pichia kluyveri* PRO-Y15 ทำให้กาแฟมีแนวโน้มที่จะมีกลิ่นที่ใกล้เคียงกับกลิ่นของช็อกโกแลตเป็นส่วนประกอบ แสดงให้เห็นว่ากระบวนการแปรรูปกาแฟนั้นนอกจากเพิ่มคุณภาพแล้วยังสร้างความแตกต่างและเอกลักษณ์ให้กับกาแฟได้อีกด้วย

การทดลองที่ 3 การพัฒนาต้นแบบเครื่องหมักกาแฟ

1. ผลการดัดแปลงเครื่องช่วยหมักกาแฟโดยใช้หลักการของ Single-stage pilot plan

การพัฒนาต้นแบบถังหมักกาแฟโดยใช้หลักการของ Single-stage pilot plan ประกอบด้วย (1.) การพัฒนาตัวถัง (2.) ระบบจ่ายอากาศ (3.) ระบบเติมสาร (4.) ระบบเก็บผลผลิต ตามภาพพิมพ์เขียวใน **Figure 2** และพบว่าการใช้ระบบการหมักแบบ AAF technique ที่ใช้ปริมาณออกซิเจนไม่น้อยกว่า 6 ลิตรต่อนาที ด้วยการจ่ายอากาศแบบเทอบีน (turbine) สามารถกระจายอากาศได้ทั่วถังดีที่สุดซึ่งระบบเทอบีนจะควบคุมการลดลงของแก๊สออกซิเจนและการเพิ่มขึ้นของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในระดับที่สม่ำเสมอเมื่อใช้ปั๊มจ่ายอากาศขนาด 6 ลิตรต่อนาที โดยพบการไหลออกของอากาศ (fluxed air) ในอัตราที่คงที่ที่ 100 ลิตรต่อวันตาม

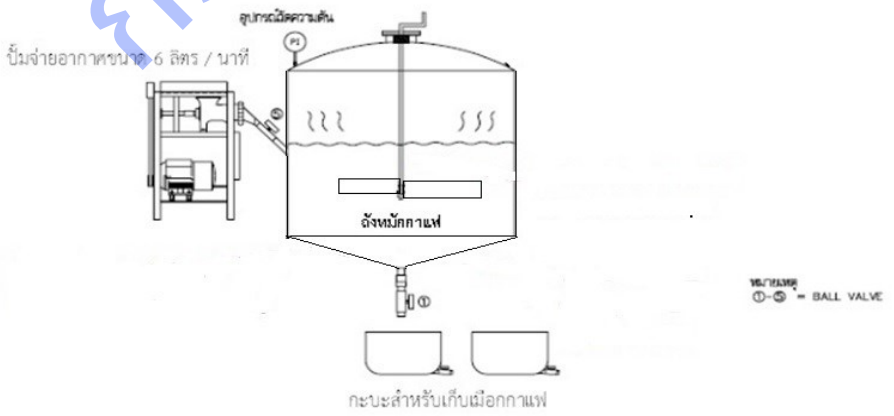


Figure 11 Green print of Demo-Coffee Fermenter

กรมวิชาการเกษตร

Figure 12 Demonstration model of Coffee Fermenter model 1 – CFerm1

ทดสอบประดิษฐ์ต้นแบบถังหมักขนาด 50 ลิตรใน **Figure 12** โดยใช้วัสดุสแตนเลสเกรด 304 หรือ 18/8 ซึ่งเป็นสแตนเลสที่มีสารโครเมี่ยมอยู่ 18% นิกเกิ้ล 8% โดยมีความสามารถทนต่อการเกิดสนิม (Oxidation) และทนการกัดกร่อนต่างๆได้เป็นอย่างดี เนื่องจากมีสารนิกเกิ้ลจึงทำให้แม่เหล็กดูดไม่ติด มีปริมาณคาร์บอนต่ำจึงมีความเหนียวสูง และตรงตามมาตรฐาน มอก. สำหรับถังบรรจุน้ำสำหรับบริโภคมีท่อระบาย 2 จุดได้แก่ (1.) ท่อระบายเมือกมีตะแกรงกันเมล็ดกาแฟหลุดด้านล่าง (2.) ท่อปล่อยเมล็ดกาแฟสำหรับระบายเมล็ดกาแฟที่หมักเสร็จด้านหน้ามีฝาปิดถอดได้และมีปั๊มจ่ายอากาศคงที่ขนาด 6 ลิตรต่อนาที

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในถังหมักพบว่าจากการประยุกต์ใช้ AAF technique โดยใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* strain BAwine ทดสอบการเจริญเติบโตในถังหมักโดยมีการปรับกรด (Acidification) โดยกรดทาทาริกที่ 20 ppm โดย pH เริ่มต้นอยู่ที่ 4.5 และให้อากาศต่อเนื่องที่ 6 ลิตรต่อนาที เชื้อยีสต์จะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกของการหมักเป็นต้นไป โดยมีจำนวนเซลล์ 6.95 log CFU/ml และการเจริญของเชื้อยีสต์จะมีปริมาณลดลงในชั่วโมงที่ 72

ลิขสิทธิ์การเกษตร

2. ผลการทดสอบการหมักจากต้นแบบเครื่องช่วยหมักล้อตามการหมัก

2.1 ผลการทดสอบการหมักแบบ Chloramphenical ที่สามารถกำหนดปริมาณกรดด่างที่เหมาะสม

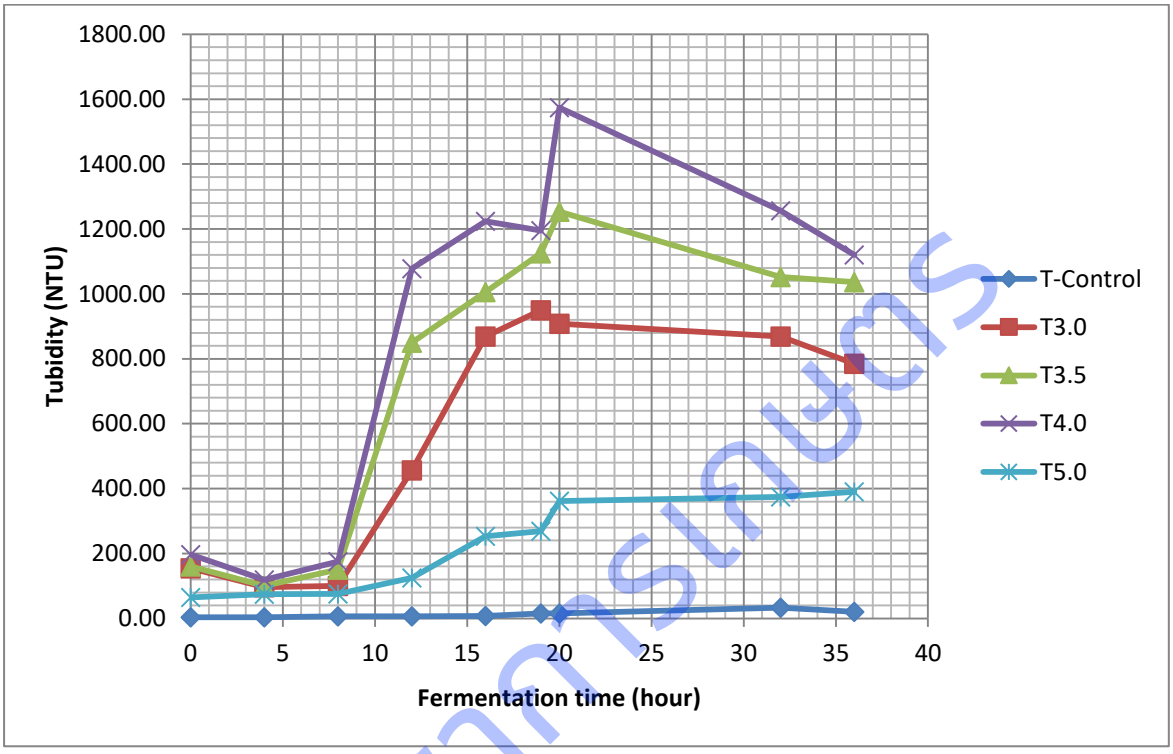


Figure 13 Fermentation results of acidity variation (tartaric acid) following chloramphenicol trial in different condition

ผลจาก **Figure 13** พบว่ากรรมวิธีที่ 4 ที่ได้ทดสอบปรับกรดทาทาริกที่ pH 4.0 ตอบสนองการหลุดลอกของเมือกได้ดีที่สุดโดยพบว่าเมือกหลุดหมดในเวลาไม่เกิน 18 ชั่วโมง (99.89% จาก NTU 1,500) โดยในกรรมวิธีที่ 2 และ 3 ที่ปรับ pH ที่ 3.0 และ 3.5 ตามลำดับพบการหลุดลอกของเมือกเช่นเดียวกันแต่ในปริมาณที่ต่ำกว่าที่อัตรา 80% และ 66.67% ซึ่งในกรรมวิธีที่ 5 พบการหลุดลอกของเมือกที่ชั่วโมงที่ 18 น้อยมากเพียง 26.67% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้ถังหมักสามารถนำกระบวนการ AAF techniques ในการปรับกรดที่ pH 4.0 ประยุกต์ใช้ได้ โดยเมื่อติดตามปริมาณความเป็นกรดด่างพบว่ากรรมวิธีที่ 4 มีความเสถียรสูงซึ่งแตกต่างกับชุดควบคุมที่มีการลดลงของเมือกที่ต่ำและมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดด่างมากโดยเฉพาะหลังจากชั่วโมงที่ 18 จึงได้นำถังหมักไปทดสอบในพื้นที่ทดลองจำนวน 3 สถานีทดลองเมื่อยืนยันผลการทดลอง พบว่าการหมักโดยใช้ถัง CFerm จะมีลักษณะเด่น 3 ประการได้แก่ ลดการผลิตกรดอินทรีย์และสารก่อรสขมไม่พึงประสงค์ (Acetic Acid กว่า 57%, Furfural กว่า 25% และ Pyrazine กว่า 44%) ผลิตกลิ่นรสที่น่าสนใจได้

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

เพิ่มขึ้นได้แก่ Ethanone (กลิ่นผลไม้), ∂-butyrolactone (กลิ่นนมเนย), β-damascenone (กลิ่นดอกไม้) และสารกลุ่ม Phenol (กลิ่นผลไม้) ทั้งนี้การใช้กระบวนการหมักดังกล่าวส่งผลถึงปริมาณคาเฟอีนอย่างมีนัยสำคัญโดยพบการลดลงของปริมาณคาเฟอีนกว่า 38% อีกด้วย (**Table 9**)

Table 9 description of chemical and flavor profile of coffee bean using AAF technique in Demo Coffee Fermenter compared to standard method

Compounds	*LRI*		*FID peak area (10^4)*		*Identification*	*Changing percentage*
	FFAP	Ref	Control	CFerm-AAF		
Acids						
Acetic acid[1]	1452	1468	8,112 ± 146	3,409 ± 520	MS,LRI	- 57.97%
3-Methyl-2-butanoic acid[1]	1804	1819	340 ± 245	317 ± 16	MS,LRI	- 6.76%
Carbonyls						
2,3-butanedione[1]	1025		350 ± 33	446 ± 12	MS	27.43%
2,3-pentadione[1]	1063	1067	510 ± 6	541 ± 70	MS, LRI	6.08%
Hexanal[1]	1084	1079	36 ± 3	42 ± 4	MS, LRI	16.67%
∂-butyrolactone[1]	1653	1637	453 ± 130	1,377 ± 384	MS, LRI	203.97%***
β-damascenone[1]	1833	1828	25 ± 17	77 ± 7	MS,LRI	208%***
Ethanone	1846		615 ± 3	2,722 ± 3	MS	343%***
Furans						
Furfural[1]	1478	1473	39,439 ± 536	24,761 ± 406	MS,LRI	-25.30%
5-methylfurfural[1]	1591	1582	6,274 ± 441	4,660 ± 260	MS,LRI	-25.73%
Phenols						
Guaiacol[1]	1876	1871	360 ± 45	277 ± 20	MS, LRI	-23.05%
Phenol[1]	2019	2030	244 ± 123	357 ± 47	MS, LRI	46.31%***
4-vinylphenol[1]	2413		50 ± 1	82 ± 12	MS	64%
Pyrazines						
Pyrazine[1]	1220	1215	29,999 ± 17	16,777 ± 59	MS, LRI	-44.07%
2-methylpyrazine[1]	1274	1267	4,972 ± 520	7,188 ± 391	MS, LRI	44.57%
Pyrroles						
2-acetylpyrrole[1]	1989	1983	1,140 ± 67	1,204 ± 99	MS, LRI	5.61%
1H-pyrrole-2-carboxyaldehyde[1]	2047	2038	15,674 ± 35	11,098 ± 97	MS, LRI	29.20%
Miscellaneous						
Maltol[1]	1989	2004	6,350 ± 157	6,372 ± 163	MS, LRI	0.35%
Caffeine	3052		4,876 ± 47	2,983 ± 17	MS, LRI	-38.82%

[1]Compounds reported in Flament (2002); Control = unfermented coffee; CFerm-AAF = Full-city 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.

2.2 ผลการทดสอบการหมักแบบ Penicillin เพื่อศึกษาเวลาและปริมาณน้ำที่เหมาะสม

กรมวิชาการเกษตร

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการหมักทั้งระดับน้ำและการหลุดลอกของเวลาการหมักนั้นส่งผลชัดเจนต่อการใช้ต้นแบบถังหมัก (Water fill 50 – 100%) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักตามวิธีดั่งเดิม (เติมน้ำท่วมระดับบ่อหมัก : Submerged with microbial inoculation) จะมีการหลุดลอกของเมือกที่แตกต่างกันและการเจริญเติบโตของเชื้อที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ หากปริมาณน้ำไม่เพียงพอหรือเติมน้อยกว่า 50% แม้จะเกิดการหลุดลอกของเมือกแต่การเจริญเติบโตของเชื้อจะช้ากว่าการใช้น้ำที่ 75% ขึ้นไปและชะลอเมื่อใช้น้ำปริมาณมาก (submerge) ซึ่งนอกจากจะทำให้เกิดการสิ้นเปลืองน้ำในการหมักแล้วการเจริญเติบโตจะช้าลงอีกด้วย ปัจจัยที่ส่งผลต่อการใช้ถังหมักที่สำคัญคือปริมาณน้ำที่เหมาะสมระดับไม่น้อยกว่า 75 – 100% ของปริมาณกาแฟและระยะเวลาในการหมักไม่เกิน 24 ชั่วโมง (18 ชั่วโมงตามเวลาแนะนำของ AAF techniques, โกเมศ (2560) นอกจากนี้พบผลการทดสอบตาม **Table 10** ว่าการใช้ถังหมักนี้สามารถพัฒนาการหมักกาแฟแบบยังยืนยันการผลิตกลิ่นรสเฉพาะของกาแฟได้แก่การเพิ่มขึ้นของ Ethanone (กลิ่นผลไม้), ∂-butyrolactone (กลิ่นนมเนย), β-damascenone (กลิ่นดอกไม้) และสารกลุ่ม Phenol (กลิ่นผลไม้) ซึ่งเวลาการหมักและปริมาณน้ำนี้ยังลดทรัพยากรในการหมัก ต้นทุนและสามารถนำไปทดลองกระบวนการที่เหมาะสมของกาแฟในพื้นที่ต่างๆที่จะนำถังหมักไปทดสอบได้ โดยสามารถกำหนดระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อการหมักให้ได้คุณภาพดีและส่งเสริมการลดต้นทุนการผลิตอีกด้วย โดยผลการเปรียบเทียบผลการใช้ถังหมักและวิธีหมักแบบบ่อหมักเดิม พบการผลิตกลิ่นที่แตกต่างชัดเจน

Table 10 Appearance of mucilage deformation and microbial growth of coffee bean using AAF technique in Coffee Fermenter

	Fermenter with Water fill 50%	*Fermenter with Water fill 75%*	*Fermenter with Water fill 100%*	*Submerge with microbial inoculation (Control)*	*Average F.time (F2 factor)* [1]
12 hours	Fully Mucilage (2.48 log CFU/ml)	Fully Mucilage (3.14 log CFU/ml)	Fully Mucilage (3.04 log CFU/ml)	Fully Mucilage (2.12 log CFU/ml)	2.415
24 hours	Half Mucilage with high dense (3.81 log CFU/ml)	Degraded Mucilage with dense (5.03 log CFU/ml)	Degraded Mucilage with dense (4.93 log CFU/ml)	Half Mucilage with high dense (4.61 log CFU/ml)	4.595
48 hours	Degraded Mucilage (3.91 log CFU/ml)	Degraded Mucilage (5.82 log CFU/ml)	Degraded Mucilage (5.93 log CFU/ml)	Degraded Mucilage (4.92 log CFU/ml)	5.1475
Average Water used (F1 factor) [2]	3.40	3.06	4.63	3.883	CV = 52.12%

2.3 ผลการปรับปรุงต้นแบบเครื่องช่วยหมักที่แก้ไขระบบจ่ายอากาศและการเก็บผลผลิต

กรมวิชาการเกษตร

การปรับปรุงต้นแบบเครื่องช่วยหมักกาแฟจากผลการทดสอบการหมักกาแฟจากรุ่น CFerm1 พบว่าระบบที่มีปัญหาต่อการหมักคือ “ระบบจ่ายอากาศ” ซึ่งระบบเดิมจะใช้ท่อจ่ายอาหารและหัวจ่ายแบบพ่นฝอยเทอบีนที่ระดับต่ำทำให้ระดับการเติมอากาศที่คาดไว้ต่ำกว่า 6 ลิตรต่อนาทีโดยเฉพาะเมื่อเมือกกาแฟเริ่มหลุดเกิดการทับถมของเมือกบริเวณจุดจ่ายอากาศ ซึ่งถังหมักรุ่นที่พัฒนาใหม่จะมีการพัฒนาระบบจ่ายอากาศแบบเทอบีนฝังส่วนฝาโดยมีรูเจาะความยาว 80% ของตัวถังเพื่อให้ระบบจ่ายอากาศสามารถมีการจ่ายอากาศที่สม่ำเสมอลดอัตราการทับถมของเมือกกาแฟระหว่างการหลุดทำให้ได้อัตราการเติมอากาศที่สม่ำเสมอที่ 6 ลิตรต่อนาทีและปริมาณการไหลของอากาศ (flux air) ตลอดกระบวนการหมักตามที่ต้องการที่ 600 ลิตร ตาม **Figure 14**

นอกจากนี้มีการพัฒนาระบบแยกเมือกออกจากกาแฟที่หมักและโดยใช้ตะแกรงฝังแยกเพื่อสามารถเก็บเมือกได้ทันทีที่หมักเสร็จ และปรับปรุงขาตั้งให้สามารถเคลื่อนย้ายได้เพื่อให้สามารถย้ายทำความสะอาดได้สะดวก ตัดระบบเติมกรดออกเนื่องจากไม่จำเป็นต้องมีการเติมกรดตลอดเวลา ถังดังกล่าวได้พัฒนาไปในรูปแบบที่ชื่อว่า CFerm2 ซึ่งมีการนำไปทดสอบการหมักในสภาวะจริง พบว่าการทดลองใช้ถังหมักรุ่นเติมอากาศรุ่น Cferm2 มีประสิทธิภาพการหมักที่ดีกว่าการหมักโดยระบบปกติในทั้ง 4 สถานที่ทดสอบโดยพบว่าเมื่อทำการทดสอบโดยกระบวนการ AAF techniques ประสิทธิภาพการย่อยเมือกจะดีกว่าวิธีควบคุมหรือการหมักโดยวิธีปกติอีกทั้งสามารถควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง (pH) รวมทั้งการเติมอากาศที่ดีกว่ารุ่น CFerm1 นอกจากนี้ยังง่ายต่อการเก็บเมือกเพื่อนำไปใช้ทดสอบต่อหรือเพื่อนำมาใช้ในการหมักซ้ำและการเก็บเมล็ดกาแฟที่หมักเสร็จอีกด้วย

ความแตกต่างของถังหมักที่ออกแบบเพิ่มเติมตาม **Table 11** เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมักและง่ายต่อการเก็บเมือกกาแฟและเก็บสารกาแฟที่หมักเสร็จแล้วโดยการเพิ่มท่อสำหรับป้อนอาหารทางด้านบนป้องกันการรั่วซึมของแก๊สและยกตะแกรงสูงเพื่อสะดวกต่อการเก็บเมือกและแยกสารกาแฟจากเมือกกาแฟได้ เพิ่มโครงเหล็กสี่เส้นเป็นฐานที่สามารถยกออกได้รอบถัง พบว่าชุดปรับปรุงที่ 2 มีประสิทธิภาพการหมักที่ดีขึ้นกว่าชุดที่ 1 และดีกว่าบ่อหมักกาแฟโดยสามารถควบคุม pH และ Turbidity ได้ดีในทุกพื้นที่ทดสอบและลดเวลาการหมักอย่างชัดเจน ส่วนสำหรับต้นทุนการผลิต **Table 11** พร้อมการนำไปใช้ประโยชน์พบว่าการใช้ถังหมักเพิ่มต้นทุนที่ 5 บาทจากวิธีแบบเดิมซึ่งยังถูกกว่าการใช้เครื่องคัดเมือก เอนไซม์และวิธีทางเคมี นอกจากนี้วิธีเดิมจะใช้น้ำและมีสิ่งเหลือใช้เยอะมาก ทำให้ต้นแบบถังหมักถือเป็นทางเลือกที่ดีในการแปรรูปกาแฟชนิดใหม่ที่มีคุณภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

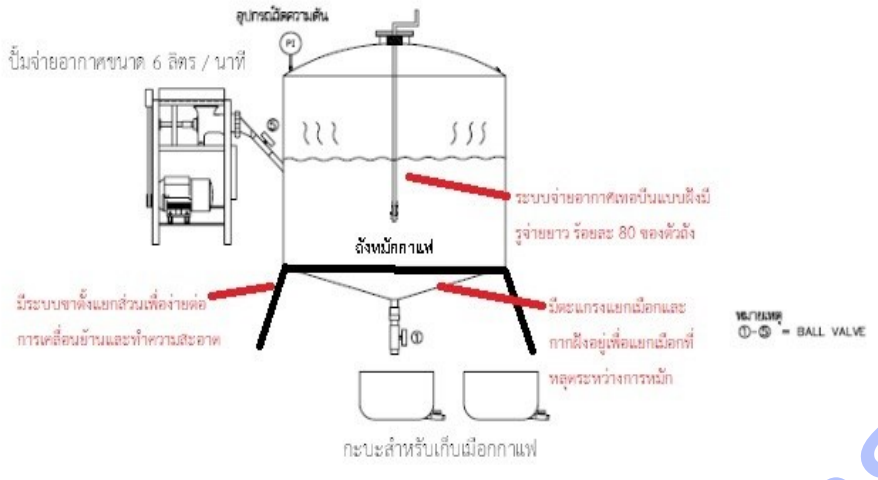


Figure 14 Demonstration of new model of coffee fermenter-CFerm2

Table 11 Summarize of two model of coffee fermenters CFerm2 comparing to CFerm1

องค์ประกอบของระบบ	รุ่น CFerm1	รุ่น CFerm2
ใช้ถังสแตนเลสขนาด 100 ลิตรซึ่งมีปริมาตรการหมัก 80 ลิตร	√	√
ท่อสำหรับป้อนอากาศสำหรับเติมแก๊สจากปั๊มเติมอากาศแบบ Air Turbine ในระหว่างการหมักในอัตราคงที่หรือแปรผันตามแรงดันปั๊ม	-	√
ด้านล่างของถังมีวาล์วสำหรับเก็บเมือกกาแฟและถ่ายน้ำหมักทิ้ง	√	√
มีตะแกรงแยกสารกาแฟที่หมักเรียบร้อยตรงท่อถ่ายสารกาแฟเพื่อง่ายแก่การเก็บสารกาแฟและการนำเมือกกาแฟไปใช้หมักซ้ำ	-	√
ฐานถังหมักสามารถถอดออกได้เพื่อการทำความสะอาดและเคลื่อนย้าย	-	√

3. ผลการทดสอบการหมักในพื้นที่ทดสอบจริง

ผลการทดสอบต้นแบบถังหมัก(ปรับปรุง 2) โดยถังหมักขนาด 100 ลิตรได้ดำเนินการทดสอบในพื้นที่ทดลองทั้งสิ้น 4 ศูนย์วิจัยในการทดสอบการหมักกาแฟอะราบิก้า พบผลการทดสอบทาง

กรมวิชาการเกษตร

ประสาทสัมผัสของการทดสอบหมักโดยถังหมักและการหมักแบบดังเดิมพบผลวิเคราะห์โปรไฟล์กลิ่นโดยเครื่อง GC-SPME-FID-O-MS ตาม **Table 12** โดยพบความแตกต่างในกลุ่มสาร Furfural, Pyrazine และ 2-formylthiophene, Ethanone ที่มีปริมาณมากซึ่งเป็นสารให้กลิ่นผลไม้ เมื่อใช้ถังหมักต้นแบบและพบสาร 5-methyl-2-furancarboxaldehyde และ 2-methylbutanal ที่ให้กลิ่นน้ำตาลไหม้ในชุดควบคุมมากกว่าแสดงให้เห็นว่าถังหมักสามารถควบคุมการผลิตกลิ่นสารสำคัญได้ดี จากการหมักนอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ถังหมักนี้มีการลดลงของเวลาการหมักและความคงตัวของปริมาณกรดด่างตามผลทดลองในพื้นที่ทดสอบทั้ง 4 แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการใช้ถังหมักในการหมักกาแฟที่ควบคุมได้

Table 12 Summarize of field trial of coffee fermenter at Khao koh (600 meter above sea level) and Khun wang station (1,200 meter above sea level) compared to typical method

Compounds	*LRI*		*FID peak area (10^4)*				*Identification*
	FFAP	Ref	Khao Koh		Khun Wang		
			Control	Tank	Control	Tank	
Acetic acid[1]	1452	1468	6,463 ± 373	6,137 ± 300	5,725 ± 0	5,805 ± 0	MS,LRI
2-methyl-butanal	1804	1819	16,493 ± 32	40,361 ± 32	26,535 ± 0	39,164 ± 0	MS.LRI
2,3-butanedione[1]			113 ± 32	592 ± 18	83 ± 32	432 ± 18	MS
Ethanone[1]	1084	1079	237,686 ± 0	240,931 ± 1	199,104 ± 0	258,147 ± 0	MS, LRI
Furfural[1]	1478	1473	29,269 ± 0	80,105 ± 0	23,922 ± 0	43,626 ± 0	MS,LRI
Pyrazine			15,940 ± 0	40,938 ± 0	26,259 ± 0	48,705 ± 0	MS
5-methyl-2-furancarboxaldehyde			48,677 ± 0	14,636 ± 0	26,553 ± 0	40,264 ± 0	MS
Acetoin[1]	1293	1291	319 ± 11	272 ± 23	319 ± 11	272 ± 23	MS, LRI
∂-butyrolactone[1]	1653	1637	2348 ± 175	2524 ± 411	2348 ± 175	2524 ± 411	MS, LRI
4-vinylphenol[1]	2413		-	45 ± 1	-	45 ± 1	MS
2-formylthiophene[1]	1716	1679	24,953 ± 9	30,284 ± 28	26,535 ± 0	26,658 ± 0	MS, LRI
Neophytadiene	1376		35 ± 23	-	35 ± 23	-	MS, LRI
Maltol[1]	1989	2004	3,141 ±136	5,376 ± 366	3,141 ±136	5,376 ± 366	MS, LRI
Indole[1]	2475	2476	166 ± 48	215 ± 31	166 ± 48	215 ± 31	MS, LRI

[1]Compounds reported in Flament (2002); Control = traditional fermented coffee; Tank = AAF techniques used tanked 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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

ถังหมักกาแฟต้นแบบที่พัฒนาโดยหลักการ Single stage pilot ประกอบด้วยการตัวถังที่ผลิตจากสแตนเลส 304 เพื่อลดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริเวณผนังมีตะแกรงแบ่งเก็บตะกอนและหัวเชื้อเพื่อการใช้งานซ้ำ ระบบเติมอากาศที่ไม่น้อยกว่า 6 ลิตรต่อนาทีจากปั้มลมจากภายนอกเพื่อให้เกิด flux air ที่ไม่น้อยกว่า 100 ลิตรต่อวันส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้เพื่อเหมาะในการหมักกาแฟที่ 6.95 log CFU ต่อมิลลิลิตร มีการออกแบบระบบเก็บเมล็ดกาแฟจากท่อเก็บเมล็ดด้านหน้าและง่ายต่อทำความสะอาด ซึ่งเมื่อทดสอบโดยการหมักแบบ Chloramphenical เพื่อศึกษาสภาวะกรดที่เหมาะสมพบว่าสภาวะกรดที่เหมาะสำหรับการหมักโดยถังหมักอยู่ที่ความเป็นกรดโดยกรดทาทาริกที่ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและการทดสอบการหมักแบบ Penicillin จะใช้ปัจจัยควบคู่ที่ปริมาณน้ำ 75 ถึง 100% ของปริมาณเมล็ดกาแฟที่เวลาไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง โดยการใช้ถังหมักยังส่งผลต่อการลดความขมจากการผลิตกรดอินทรีย์ที่มากเกินไปจากบ่อหมักปกติ เพิ่มการผลิตสารให้กลิ่นกลุ่ม Ethanone (กลิ่นผลไม้), ∂-butyrolactone (กลิ่นนมเนย), β-damascenone (กลิ่นดอกไม้) และสารกลุ่ม Phenol (กลิ่นผลไม้) และยังสามารถควบคุมปริมาณหรือลดคาเฟอีนได้ 38% ในบางชุดการทดลองซึ่งให้ผลทดสอบที่ดีในแปลงทดสอบอีกด้วย โดยต้นทุนการใช้ถังหมักอยู่ที่ 25 บาทต่อกาแฟหมัก 50 กิโลกรัมหรือ (0.45 บาทต่อกิโลกรัม) ต่างจากวิธีปกติที่ 1.2 บาทต่อกิโลกรัม

การทดลองที่ 4 การใช้ผลิตผลพลอยได้จากเปลือกหุ้มเมล็ดและเมือกกาแฟ

1. ผลการประเมินคุณภาพผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการหมักกาแฟ ผลพลอยได้จากกระบวนการหมักกาแฟจนถึงกระบวนการตากกาแฟแบ่งออกเป็น 3 ผลผลิตได้แก่

1.1 เปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟ (Cherry)

ผลการศึกษาคุณภาพของเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟตาม Table 2 ที่มีปริมาณ 60% ของผลผลิตกาแฟพบว่ามีปริมาณของสารประกอบไนโตรเจนมากถึง 31.30% ตามด้วยปริมาณ Crude fiber 21.40% ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 12.40% โปรตีน 10.10% แทนนิน 7.80% และสารประกอบอื่นๆ 17% ซึ่งสามารถนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารโดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ปรุงรสเนื่องจากสารกลุ่มไนโตรเจนที่มีอยู่มากตอบสนองดีต่อการหมัก และสารแทนนินและ Reducing Sugar สามารถนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ในแปลงทดสอบได้

Table 13 Average ratio of composition of coffee pulp in Thai Coffee

Contents	*Proportions (%)*
Nitrogen-free extract	31.30
Crude fiber	21.40
Reducing sugars	12.40
Crude protein	10.10
Tannins	7.80

กรมวิชาการเกษตร

Pectin substances	6.50
Chlorogenic acid	2.60
Caffeine	2.30
Nonreducing sugar	2.00
Ash	1.50
Ether extract	0.48
Total caffeic acid	1.60

1.2 เมือกกาแฟ (Mucilage)

- ผลการศึกษาเมือกกาแฟที่ได้จากการหมักโดยมีปริมาณเพียง 10% ของเมล็ดกาแฟพบว่าตาม Table 14 มีปริมาณน้ำที่สูงพบว่ามีน้ำเป็นส่วนประกอบถึง 84.20% และโปรตีน 8.00% และสารประกอบอื่น 7.8% โดยพบว่าสามารถนำเมือกกาแฟไปใช้ประโยชน์ได้หลายรูปแบบโดยเฉพาะปริมาณโปรตีนละน้ำตาลที่เหลือในเมือกกาแฟสามารถพัฒนาเป็นสารเคลือบผลไม้ได้เพราะมีสารเพคตินเป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ยังสามารถนำกากใยไปพัฒนาเป็นสารสกัดมูลค่าสูงได้เพราะมีโปรตีน

Table 14 Average ratio of composition of coffee mucilage in Thai Coffee

Contents	*Proportions (%)*
Water	84.20
Protein	8.00
Glucose (reducing)	2.50
Sucrose (nonreducing)	1.60
Pectin	1.00
Ash	1.60

1.3 น้ำเสียจากการหมักกาแฟ (Waste water)

ผลการวิเคราะห์ Table 15 พบปริมาณน้ำที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปกาแฟจากการสีเปลือกหมักและล้างเมล็ดกาแฟมีปริมาณมากโดยปริมาณกาแฟ 49 กรัมจะใช้น้ำในการแปรรูปที่ 1 ลิตร ซึ่งหากผลิตกาแฟ 1 ตันจะใช้น้ำในการแปรรูปสูงถึง 20,408 ลิตร โดยเมื่อนำน้ำที่ใช้ในการหมักกาแฟมาตรวจคุณภาพพบว่าค่าความเป็นกรดด่างอยู่ที่ 4.27 – 4.40 ค่า COD อยู่ที่ 9,270 – 14,800 ค่า BOD อยู่ที่ 472 – 551 โดยพบว่าในน้ำเสียจากการหมักกาแฟนั้นเมื่อเทียบกับมาตรฐานของ ISI standards พบว่าจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีและน้ำดังกล่าวจะเน่าเสียได้ง่าย แต่อย่างไรก็ตามยังพบสารประกอบสำคัญมากมายได้แก่ Unrefined pectin ที่มีปริมาณ dietary fiber สูง หรือ

กรมวิชาการเกษตร

สารสำคัญจาก antioxidant กลุ่ม flavonoids ที่เกิดจากกระบวนการ deesterified ของเมือกกาแฟ ดังนั้นการเก็บน้ำหมักผสมกับเมือกจึงเป็นกระบวนการที่เหมาะสมในการนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ได้

Table 15 Average ratio of characteristics of coffee fermented wastewater

Parameter	*Value*
pH	4.27 – 4.40
COD, mg/ml	9,270 – 14,800
BOD @ 27 C, mg/L	427 - 551
Ammonia nitrogen, mg/L	42 - 57
Nitrate nitrogen, mg/L	32 - 48
Phosphorus, mg/L	60 - 90

2. การนำเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟไปใช้ประโยชน์

2.1 ผลทดสอบการหมักแบบ Solid state fermentation ของเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟ

ผลการทดสอบการศึกษาการหมักแบบ Solid state fermentation (SSF) ของเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟโดยใช้ความร้อนโดยการทดสอบผลของ Mycelium activity และ Sporulation ของเชื้อราต้นแบบ *Aspergillus niger* strain PRO17 ที่ไม่ผลิตสารพิษภายใต้ปัจจัยที่ส่งผลสูงสุดของเชื้อรา (static condition) พบการเจริญเติบโตของเชื้อที่ 32% ที่ ชั่วโมงที่ 12 และสูงสุดที่ 75% หลังจากชั่วโมงที่ 33 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการเติมเชื้อต่อเนื่องพบว่าค่า bonded particle จะมีค่าไม่เกิน 33% โดยปริมาณต่ำสุดที่เติมอยู่ที่ 2% ต่อวันโดยปริมาณ bonded particle จะไม่เกิน 30% ตลอดกระบวนการหมัก SSF โดยในปริมาณที่มากขึ้นกลับทำให้ค่า bonded particle ลดลงตามลำดับซึ่งมีผลชัดเจนต่อการหมักแบบ SSF นั่นเองโดยผลการทดสอบปริมาณ bonded particle เมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 48 ชั่วโมงอยู่ที่ 28.7±1.2 % ขณะที่ปริมาณสูงสุดของการเติมเชื้อทดสอบที่ 8.0 ต่อวันมีค่าเพียง 8.9±0.2 % โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ซึ่งผลการทดสอบนี้ส่งผลให้ทราบถึงปริมาณเชื้อ *A. niger* strain PRO17 ที่นำไปใช้ทดสอบในการหมักแบบ SSF กับเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด นอกจากนี้พบว่าค่า PME activity มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ 47 mU ต่อกรัมของวัตถุดิบโดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นกว่า 70.7 mU

กรมวิชาการเกษตร

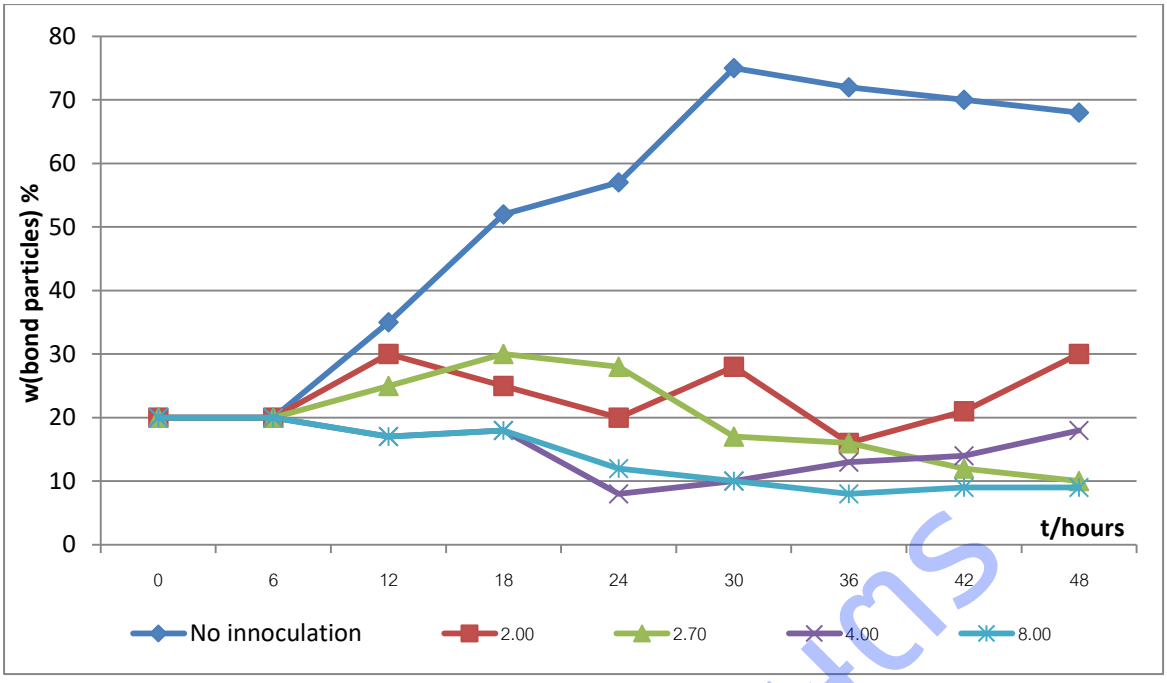


Figure 15 Bonded particle fraction during the solid-state fermentation of coffee pulp by *A. niger* strain PRO17 in bottle reactors. After a static period of 12 hours, four different daily frequencies were applied: 0.00, 2.00, 2.70, 4.00, and 8.00 day^{-1}

2.2 ผลของการทดสอบการหมักปริมาณสารสำคัญในเมล็ดกาแฟโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีแรงดันสูงในเปลือกหุ้มกาแฟภาวะปกติและภาวะที่เกิดจากการหมักแบบแห้งพบว่า Table 5 แสดงปริมาณของกรดอินทรีย์ปริมาณมากที่เกิดจากการทดสอบหมักโดยเชื้อกลุ่ม *Streptococcus spp.* ปริมาณมากกว่า 5.26 mg/l โดยมีปริมาณกรด chlorogenic acid และ cafeic acid ด้วยซึ่งแสดงให้เห็นว่าเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์กรดสูงส่วนการทดสอบโดย *Aspergillus niger* พบว่ามีการสกัดแทนนินสูงและปริมาณกรดอินทรีย์สูง

Table 16 Chemical compounds content of Cherry pod solution after solid state fermentation trial for 60 days using different microbial sources.

Parameter	Control	*Aspergillus niger*	*Streptococcus spp.*
Nitrogen-free extract (%)	25.63	8.25	16.36
Total Acid Content (mg/l)	1.26	4.12	5.26
Crude protein (%)	8.10	7.36	7.21
Tannins (Ethanol index)	12,300	18,940	16,520
Pectin substances (DE%)	62.5	63.6	59.6
Chlorogenic acid (ug/l)	2.90	3.69	3.58
Caffeine (%)	2.12	2.35	4.31

กรมวิชาการเกษตร

2.3 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา (Biofungicide) ในรูปแบบสารสกัดเอทานอลจากเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟ พบผลการทดสอบคุณสมบัติการเกิด Clear-zone ตาม Table 17 ในการยับยั้งเชื้อราจากสารสกัดหมักในรูปแบบ Solid state fermentation และผลการยับยั้งเชื้อราในห้องปฏิบัติการตาม Figure 3 โดยการใช้สารสกัดจากเปลือกกาแฟเพียง 40%

Table 17 Inhibition value of *Colletotrichum gleosporoides* (in percentage) during 4 to 7 days of experiment

Treatment	*Day of Experiment*			
	4	5	6	7
T_1	0.00	0.00	0.00	0.00
T_2	70.94	62.95	57.83	48.75
T_3	100	100	100	100
T_4	100	100	100	100
T_5	100	100	100	100
T_6	100	100	100	100
T_7	100	100	100	100

Control 40% of Coffee Cherry extract

Figure 16 Growth of *Colletotrichum gleosporoides* in control compared to 40% CPE (Cherry Pod Extract) in NA for 30 days of experiment

จากการพ่นสารสกัด CPE (Cherry Pod Extract) ที่ 40% ในต้นกาแฟระยะใบผีเสื้อคุมในระบบโรงเรือนและทำการ inoculation เชื้อรา *Colletotrichum gleosporoides* ไปเป็นเวลา 1 สัปดาห์โดยการพ่นพบการแสดงออกของโรคแอนแทรคโนสในชุดควบคุมที่ 83.33% จากกลุ่มตัวอย่าง 30 ต้น (30:30) โดยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.01 (p-value <0.01) โดย

กรมวิชาการเกษตร

พบว่าสารสกัด CPE สามารถควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสในต้นกาแฟระยะปักผีเสื้อได้โดยมีความจำเป็นต้องนำไปทดสอบในแปลงทดสอบเพื่อการยืนยันผลการนำชีวภัณฑ์ไปใช้ประโยชน์ โดยสารสกัด CPE นี้มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำด้วยใช้วัตถุดิบในแปลงเกษตรกรที่เหลือทิ้งจากการแปรรูปกาแฟทำให้มีค่าใช้จ่ายเพียงการผลิตเชื้อ *Aspergillus niger* ที่มีต้นทุนการผลิตหัวเชื้อที่หลอดละ 5 บาทเพื่อการใช้หมักผลเชอร์รี่ 500 กิโลกรัม เพื่อให้ได้สารสกัด 50 ลิตร

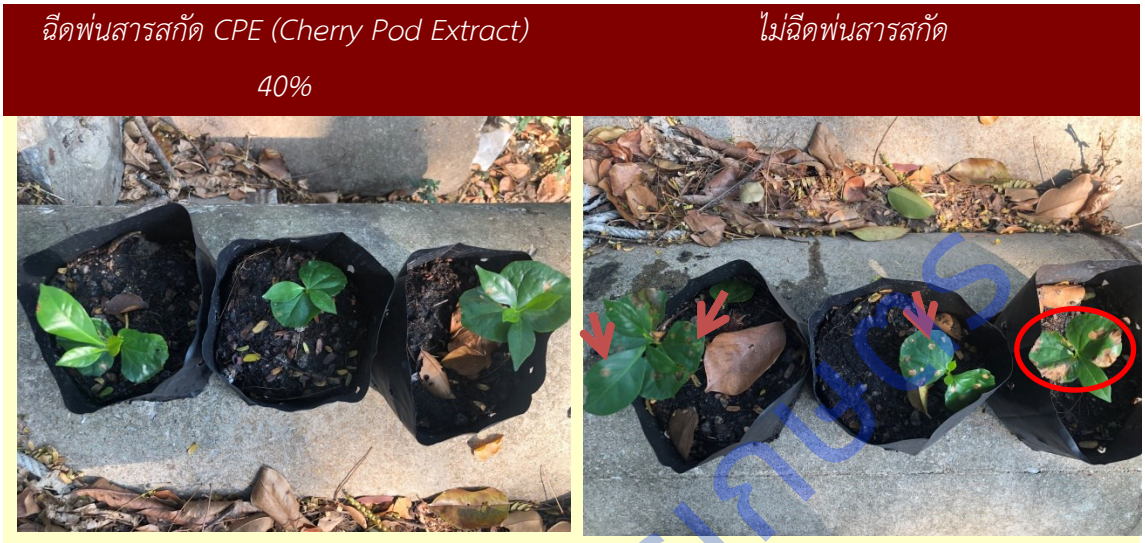


Figure 17 Application on nursery for young coffee plant (butterfly state) using 40% of CPE and control replication with *in prior* infected by *Colletotrichum gleosporoides*

2.4 ศึกษาการผลิตกรดซิตริกจากเปลือกหุ้มเมล็ดโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus spp.* ผลทดสอบการทำแห้งเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟ Cherry โดยการใช้กระบวนการตากแห้ง (sun-dryer method) เป็นเวลา 14 วันจนความชื้นต่ำกว่า 8% และตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีและสามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์ปรุงรส (aromat) จากเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟในการทดสอบผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆโดยสามารถแบ่งชนิดของผง GCP ได้เป็น 3 ชนิดตามการนำไปใช้โดยผงละเอียดที่สุดคือ GCP400 ที่สามารถนำไปทำซอสปรุงรสได้ที่ความหวาน 35 องศาบริกซ์เนื่องจากมีปริมาณ Sucrose สูงโดยเมื่อผสมกับ Glucose Syrup เพื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลสามารถพัฒนาซอสปรุงรสได้ , GCP600 ที่สามารถนำไปเป็นผงโรยปรุงรสอาหารได้โดยเน้นอาหารคาว โดยการปรุงแต่งรสกับสมุนไพรและธัญพืช และขนาดใหญ่สุดที่ GGCP ที่นำไปผสมกับแป้งเค้กใช้ในผลิตภัณฑ์เบเกอร์รี่โดยสามารถนำไปทดแทนแป้งสาลีได้เมื่อทดสอบการเก็บรักษาที่ 30 วันในถุง HDPE เปรียบเทียบกับถุง PE พบว่าถุง HDPE สามารถยืดอายุการเก็บรักษาผง GCP ได้ในเวลา 30 วันโดยสามารถควบคุมสี ความชื้นและกลิ่นของสาร Ethanone (กลิ่นผลไม้) ในการทดสอบผง GCP ทั้ง 3 ชนิด

กรมวิชาการเกษตร

Table 17 Physiology parameter of Cherry pods composition of *Coffea Arabica*

Parameter	*Fresh Cherry pod*	*Dry Cherry pod*
Sugar content (Brix)	15.5	3.3
pH	6.64	4.28
Total acid content	0.08%	0.22%
L* (Lightness)	27.89	16.80
a (Red & Green color)	7.82	10.05
B (Yellow & Blue color)	- 8.09	- 4.12
Moisture content	50%	8%

Fresh Cherry pod Dry Cherry pod Grind Cherry pod (GCP)

Figure 18 Cherry pod transformation for on-purpose utilization on food products using sun-drying method (14 days of exposed sun-dry)

GCP below 400 µm GCP between 400 - 600 µm GCP over 600 µm

Figure 19 Cherry pod classification for on-purpose utilization separated by grind size

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Table 18 Result of GCP storage explained in colors, moisture content and Ethanone (Fruity flavor) in HDPE packaging

GCP	Time	L*	a*	b*	Moisture	Ethanone (%)
Control	0	16.39±0.38a	10.38±1.76c	- 4.41±0.08b	8%	15.45
GCP400	10	13.49±1.96ab	8.67±0.27b	- 2.41±0.08b	14%	5.02
	20	12.17±0.26ab	8.67±0.27b	1.66±0.05b	15%	4.12
	30	12.03±2.69ab	8.67±0.27b	1.99±1.68b	18%	3.25
GCP400	0	16.39±0.38a	10.38±1.76c	- 4.41±0.08b	8%	15.45
in HDPE	10	16.69±1.96ab	9.67±0.27b	- 4.41±0.08b	8%	14.11
	20	16.36±0.26ab	9.67±0.27b	3.96±0.05b	8%	15.08
	30	15.13±2.69ab	9.67±0.27b	3.99±1.68b	8%	15.15
Control	0	16.47±0.18a	10.32±2.16c	- 4.41±0.08b	8%	18.45
GCP600	10	14.40±1.96ab	6.67±0.37b	- 3.11±0.58b	15%	9.12
	20	13.38±0.16ab	6.57±0.25b	3.16±0.15b	17%	4.22
	30	12.03±2.10ab	6.47±0.17b	2.99±1.28b	18%	4.15
GCP600	0	16.47±0.18a	10.32±2.16c	- 4.41±0.08b	8%	18.45
in HDPE	10	15.57±0.16ab	10.61±0.37b	- 4.11±0.58b	8%	16.52
	20	15.38±1.28ab	10.17±0.25b	4.16±0.15b	8.5%	16.22
	30	15.03±1.20ab	9.41±0.17b	3.99±0.28b	8.5%	15.25
Control	0	15.31±0.38a	10.08±1.76c	- 4.41±0.08b	8%	13.15
GGCP	10	13.99±1.96ab	9.67±0.27b	- 2.21±0.08b	13%	6.12
	20	12.07±0.23ab	8.17±0.27b	1.96±0.05b	14%	3.02
	30	11.02±2.69ab	8.07±0.27b	1.99±1.68b	18%	2.15
GGCP in	0	15.31±0.38a	10.08±1.76c	- 4.41±0.08b	8%	13.15
HDPE	10	14.99±1.26ab	9.67±0.27b	- 4.21±0.08b	8%	13.12
	20	14.57±0.43ab	9.97±0.27b	3.96±0.05b	8%	12.02
	30	14.22±2.29ab	9.17±0.27b	3.99±1.68b	8%	12.15

กรมวิทยาศาสตร์

3. การนำเมือกกาแฟไปใช้ประโยชน์

3.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในเมือกกาแฟเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์

ผลการทดสอบการสกัดเพคตินจากเปลือกและเมือกกาแฟพบว่าสารสกัดเมือกกาแฟมีสารสกัดชนิด Low Methoxyl Pectin (LM) ซึ่งจะไม่ถือเป็นสารก่อเจลเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความหวานและความเป็นกรดสูงและประกอบด้วยกรดยูโรนิกสูง เมื่อผสมระหว่าง LM (2%) ผสมกับกลีเซอรอล น้ำมันดอกทานตะวันและแคลเซียมครอไรท์ พบว่าสามารถใช้ทดสอบเคลือบส้มได้และเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

Table 19 Chemical composition of Coffee pectin compared to commercial pectin

Compounds	Coffee Pectin	Commercial
Uronic Acids	34.52	25.30
Neutral noncellulosic polysaccharides	15.25	17.8
Cellulose	8.2	9.0
Rhamnose	5.3	4.3
Arabinose	36.98	28.63
Xylose	9.58	13.69
Glucose	30.3	30.5

Decanted Coffee Mucilage

Coffee Pectin Extract (PCE)

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การใช้ประโยชน์จากผลิตผลพลอยได้จากการหมักกาแฟทั้งสามชนิดในกระบวนการผลิตกาแฟเพื่อเพิ่มมูลค่านั้นเป็นทางเลือกการเพิ่มรายได้จากวัสดุเหลือใช้ ตั้งแต่การใช้เปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟที่มีปริมาณไนโตรเจนและไฟเบอร์สูงในการพัฒนาชีวภัณฑ์ป้องกันโรคแอนแทรคโนสในต้นกาแฟโดยการหมักแบบแห้งด้วย *A. niger* และการหมักกรดซิตริกด้วย *Steptococcus spp.* เพื่อพัฒนาเป็นสารปรุงรสอาหารได้แก่ซอส, ผงปรุงรสและแป้งเปลือกกาแฟ นอกจากนี้เมือกกาแฟและน้ำหมักกาแฟที่มีปริมาณเพคตินสูงสามารถนำไปทดสอบสกัดเพคตินที่ทำการทดสอบเคลือบส้มให้ยืดอายุได้ ซึ่งการนำวัสดุเหลือใช้ทั้งหมดนี้ถือเป็นการสร้างรายได้เพิ่มขึ้นแก่เกษตรกรผู้แปรรูปกาแฟเพื่อใช้ประโยชน์ในชุมชน นอกจากนั้นยังลดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมจากการทิ้งวัสดุเหลือใช้ทั้งหมดที่ปัจจุบันสร้างความขัดแย้งให้ชุมชนอย่างมากก่อให้เกิดข้อพิพาทที่สำคัญของผู้ประกอบการกาแฟและชุมชนรอบข้างทั้งนี้งานวิจัยชิ้นนี้มุ่งสร้างทางเลือกที่สามารถสร้างรายได้ที่ยั้งยืนและลดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อมส่งเสริมการผลิตกาแฟที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมที่ยั่งยืน

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 5 ศึกษาการหมักกาแฟโดยจำลองแบบระบบย่อยอาหารของสัตว์

ผลการวิจัย (Results)

กาแฟขี้ชะมดที่ผลิตในฟาร์มเพาะเลี้ยงชะมดมีวิธีการผลิตโดยเกษตรกรเก็บและคัดเลือกผลเชอร์รี่กาแฟอาราบิก้าที่สุกเต็มที่จากต้นกาแฟเพื่อใช้เป็นอาหารของชะมด หลังจากที่ชะมดบริโภคเชอร์รี่กาแฟแล้วจะขับถ่ายเมล็ดกาแฟออกจากร่างกายในเช้าวันถัดไป เมล็ดกาแฟจะถูกย่อยอยู่ในระบบย่อยอาหารของชะมดเป็นเวลาไม่เกิน 24 ชั่วโมง กาแฟขี้ชะมดสดที่ออกจากตัวชะมดมีลักษณะจับตัวเป็นก้อน เกษตรกรจะนำกาแฟขี้ชะมดที่ได้ไปตากแดดจนแห้ง และนำมาลอกกะลากาแฟออกก่อนคั่วกาแฟเพื่อขาย หากเป็นนอกฤดูของการเก็บเกี่ยวผลผลิตกาแฟ เกษตรกรจะใช้ผลไม้ เช่น กล้วย เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงชะมด ลักษณะของขี้ชะมดที่ได้จะเป็นก้อนเหมือนอุจาระทั่วไป (Figure 1)

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างกาแฟขี้ชะมดสดและขี้ชะมดจากฟาร์มของเกษตรกรผู้ผลิตกาแฟขี้ชะมดในพื้นที่ อ. วาวี จ. เชียงราย ซึ่งผลการคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างขี้ชะมดโดยการนำตัวอย่างกาแฟขี้ชะมด 10 กรัม บรรจุลงในขวดหมักที่บรรจุน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน (Figure 2) และนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Nutrient agar, MRS agar และ YM agar สามารถแยกได้จำนวน 25 ไอโซเลต ประกอบด้วย แบคทีเรีย 19 ไอโซเลต และยีสต์ 12 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็น *Lactobacillus plantarum* , *Shigella flexneri, Kurthia gibsonii, Escherichia coli* และ *Serratia* sp. และ *Pichia kudriavzevii* จากผลการจัดจำแนกจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้พบว่าในตัวอย่างขี้ชะมดประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่ก่อโรคที่สามารถพบได้ทั่วไปในอุจจาระของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ *Shigella flexneri, Kurthia gibsonii, Escherichia coli* ซึ่งไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นจุลินทรีย์ในการผลิตอาหาร แม้ว่ากาแฟที่จะนำมาบริโภคต้องผ่านกระบวนการทำแห้ง และการคั่วด้วยความร้อนสูงที่สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ดังกล่าวถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้กาแฟขี้ชะมดไม่ได้รับความนิยมในกลุ่มของผู้บริโภคที่มีความกังวลในเรื่องของสุขอนามัยในการผลิตอาหาร แต่อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* และยีสต์ *Pichia kudriavzevii* เป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อการหมักกาแฟ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยโปรตีนในกาแฟ เพื่อสร้างสารตั้งต้นของกลิ่นรสในกาแฟได้ (Hadipernata and Nugraha, 2017)

เมื่อทำการทดสอบการหมักกาแฟโดยใช้จุลินทรีย์ผสมที่คัดแยกได้ในขวดหมักที่บรรจุเมล็ดกาแฟและบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง (Figure 3) เพื่อเลียนแบบการกินกาแฟของชะมด เมื่อครบเวลา 20 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของชุดควบคุมและชุดที่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์มีค่าลดลง จาก 5.2-5.4 เป็น 4.3 แสดงให้เห็นว่ามีการสร้างกรดในระหว่างการหมักทั้งสองกรรมวิธี ค่าความหวาน (Brix) มีแนวโน้มสูงขึ้น โดย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ชุดที่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์มีค่า Brix สูงกว่าชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่ามีกิจกรรมของจุลินทรีย์ในการย่อยเปลี่ยนรูปเพคตินในกาแฟเป็นน้ำตาลได้ดีกว่าชุดควบคุม และค่าความขุ่นของชุดที่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์สูงกว่าชุดควบคุมแสดงให้เห็นว่ามีการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีและมีการหลุดของเมือกหุ้มกาแฟได้ดี (Figure 4) ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการชิม (Cupping test) พบว่ากาแฟที่หมักโดยการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์มีการเปลี่ยนแปลงรสชาติจากชุดควบคุม โดยกาแฟที่หมักโดยการเติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่แยกจากชะมดมีความซับซ้อนของกลิ่นกาแฟมากกว่าชุดควบคุม โดยกลิ่นที่ได้มีรสชาติของผลไม้ มีความเปรี้ยว และมีความนุ่มและรสชาติค้างในปาก (Aftertaste) ดีกว่าชุดควบคุม มีคะแนน Cupping ที่ 80±2 ซึ่งสูงกว่ากาแฟชุดควบคุม (73±2) (Table 1) แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกมาได้มีผลต่อการพัฒนาคุณภาพของกาแฟให้แตกต่างจากการหมักกาแฟแบบเปียก (wet process) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับกาแฟขี้ชะมดยังมีความแตกต่างของรสชาติ

เมื่อทำการทดสอบการหมักกาแฟโดยการใช้กรดและเอนไซม์ โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริก 0.01%, เติมเอนไซม์เปปซิน 1.4% และเติมเอนไซม์จากตับอ่อน (Pancreatin) 1.4% ในขวดหมักที่บรรจุเมล็ดกาแฟและบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เพื่อเลียนแบบระบบย่อยอาหารของสัตว์ โดยเมื่อครบเวลา 20 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของชุดควบคุมและชุดทดสอบที่เติมกรดและเอนไซม์แสดงให้เห็นว่ามีการสร้างกรดจากจุลินทรีย์ธรรมชาติในระหว่างการหมักในทุกกรรมวิธี ค่าความหวาน (Brix) มีแนวโน้มสูงขึ้น โดยเมื่อหมักครบ 20 ชั่วโมง กรรมวิธีมีที่ เติมเอนไซม์เปปซินและกรรมวิธีที่เติมเอนไซม์จากตับอ่อน มีค่า Brix สูงกว่าค่าเริ่มต้นประมาณ 0.5 เช่นเดียวกับชุดควบคุม แต่การเติมกรดไฮโดรคลอริกมีค่า Brix เพิ่มขึ้น 0.8 แสดงให้เห็นว่าการเติมกรดไฮโดรคลอริกซึ่งปรับค่า pH ของระบบหมักลงอยู่ที่ 3.98 ส่งผลให้กิจกรรมของจุลินทรีย์ธรรมชาติในการย่อยเปลี่ยนรูปเพคตินในกาแฟเป็นน้ำตาลได้ดีกว่ากรรมวิธีอื่นๆ ซึ่งมีค่า pH ประมาณ 5.0-5.4 ซึ่งกรรมวิธีที่เติมกรดไฮโดรคลอริกยังต้องมีการปรับปรุงการทดสอบโดยเพิ่มความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก เพื่อให้ค่า pH ของการหมักต่ำลงที่ประมาณ pH 1-2 เพื่อที่จะได้ใกล้เคียงกับค่า pH ในกระเพาะอาหารสัตว์ต่อไป เมื่อทดสอบค่าความขุ่น (Turbidity) ของกรรมวิธีมีที่เติมกรดไฮโดรคลอริก,เติมเอนไซม์เปปซิน, และเติมเอนไซม์จากตับอ่อน พบว่ามีค่าความขุ่นสูงกว่าชุดควบคุมแสดงให้เห็นว่ามีการหลุดของเมือกหุ้มกาแฟได้ดีกว่า (Figure 5) ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการชิม (Cupping test) พบว่ากาแฟที่หมักโดยการเติมเอนไซม์เปปซินและกรรมวิธีที่เติมเอนไซม์จากตับอ่อนมีการเปลี่ยนแปลงรสชาติจากชุดควบคุม โดยกาแฟที่หมักโดยการเติมเอนไซม์เปปซินและกรรมวิธีที่เติมเอนไซม์จากตับอ่อนมีความซับซ้อนของกลิ่นกาแฟมากกว่าชุดควบคุม โดยกลิ่นที่ได้มีกลิ่นโทนหวาน เช่น วนิลา และคาราเมล มีคะแนน Cupping ที่ 75-76 ซึ่งสูงกว่ากาแฟชุดควบคุม (73±2) เล็กน้อย (Table 1) แสดงให้เห็นว่าการเติมเอนไซม์ได้มีผลต่อการพัฒนาคุณภาพของกาแฟให้แตกต่าง

กรมวิชาการเกษตร

จากการหมักกาแฟแบบเดิมแต่เมื่อเปรียบเทียบกับกาแฟขี้ชะมดรสชาติที่ได้ยังมีความแตกต่าง

การทดสอบองค์ประกอบทางเคมีของกลิ่นกาแฟคั่วโดยการสกัดสาร*และใช้*วัสดุดูดซับที่สัมผัสสารโดยตรง (*Solid phase microextraction, SPME)* วิเคราะห์ด้วย Gas Chromatography – Olfactory spectrometry (GC-O) พบชนิดของสารเคมีและปริมาณของสารเคมีที่แตกต่างกันในแต่ละกรรมวิธีการหมัก โดยมีสารสำคัญในการเกิดกลิ่นรสของกาแฟ 17 ชนิด ในทุกกรรมวิธีการหมัก รูปแบบของกลิ่นรสที่ระเหยได้ในทุกกรรมวิธีมีรูปแบบของโครมาโตรแกรมที่ใกล้เคียงกัน แต่ความเข้มข้นของสารเคมีแตกต่างกัน การหมักกาแฟโดยใช้จุลินทรีย์สามารถปรับระดับความเข้มข้นของสารเคมีในกาแฟให้เพิ่มขึ้นหรือลดลงเพื่อให้มีปริมาณใกล้เคียงกับกาแฟขี้ชะมด ได้แก่ Furfuryl formate, 2,6-dimethyl-Pyrazine, 5-methyl-2-Furancarboxaldehyde, 3-ethyl-2,5-dimethyl-Pyrazine และ 2-Methoxy-4-vinylphenol ซึ่งให้กลิ่นในกลุ่มของ ผลไม้, ถั่ว, เครื่องเทศ และกลิ่นโทนหวาน การหมักกาแฟโดยกรดและเอนไซม์ สามารถปรับระดับความเข้มข้นของสารเคมี ได้แก่ Furfuryl formate, 2,6-dimethyl-Pyrazine, 5-methyl-2-Furancarboxaldehyde, 4-Pyridinemethanol และ 3-ethyl-2,5-dimethyl-Pyrazine ซึ่งให้กลิ่นในกลุ่มของ ผลไม้ และ ถั่ว เช่นกัน (Table 2, Figure 6-7) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารให้กลิ่นในกาแฟอาจมีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่ใช้ในการทดสอบเข้าไปย่อยผนังเซลล์หรือโครงสร้างของกาแฟที่เป็นคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนให้มีขนาดเล็กลงเปลี่ยนเป็นสารตั้งต้นของสารให้กลิ่นในกาแฟซึ่งเมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับความร้อนโดยการคั่วจึงให้กลิ่นและรสที่แตกต่างกันไป จากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Muzaifa et. al (2018) ซึ่งเปรียบเทียบกลิ่นรสของกาแฟขี้ชะมดที่ได้จากธรรมชาติและชะมดเลี้ยง โดยรายงานว่ากาแฟที่ได้จากชะมดที่อาศัยในป่าธรรมชาติจะมีกลิ่นและรสในโทนของ ถั่ว ครีมนม สมุนไพร กลิ่นมิ้นท์ และกลิ่นหญ้า ในขณะที่กาแฟที่ได้จากชะมดเลี้ยง จะให้กลิ่นในโทนของ ถั่ว มิ้นท์ กลิ่นหญ้า และกลิ่นผลไม้ แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่ใช้ในการทดสอบมีบทบาทและความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารเคมีภายในกาแฟเพื่อเลียนแบบการผลิตจำลองระบบย่อยอาหารของสัตว์

กรมวิทยาศาสตร์

Table 20 Physical properties and cupping score of roasting fermented coffee beans using civet microbes, hydrochloric acid and enzyme (pepsin and pancreatin) for 20 hours.

Physical properties and Cupping score	Control	Civet microbes	HCl	Pepsin	Pancreatin
Color (Agtron)	42.9±0.3	42.7±0.3	40.1±0.3	41.8±0.6	40.6±0.5
Brix	2.09±0.2	1.7±0.2	1.76±0.2	1.75±0.2	1.70±0.2
pH	6.1±0.3	5.9±0.3	6.0±0.2	6.0±0.3	5.9±0.2
Total dissolved solid	1.66±0.2	1.38±0.2	1.39±0.1	1.39±0.1	1.35±0.2
Cupping score	73±2	80±2	73±1	76±2	75±2
Flavor	Herb/Nut	Chocolate/Fruity	Herb/Nut	Caramel	Vanilla

Figure 20 Caged Civet

Figure 21 Appearance of civet feces and isolation of microbial from civet feces.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

Figure 23 Fermentation process of coffee in jar, green bean coffee and roasted coffee

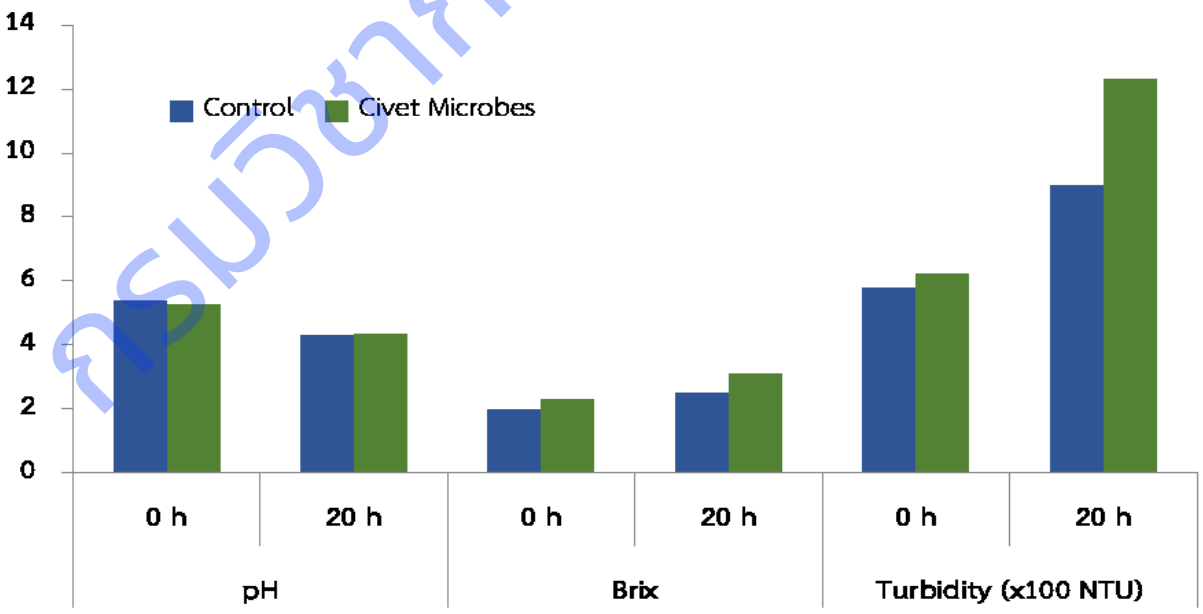


Figure 24 Coffee fermentation profiles of traditional wet process (Control) and fermentation by using civet microbes process explain in pH, Brix and Turbidity (NTU) in fermentation jar

กรมวิชาการเกษตร

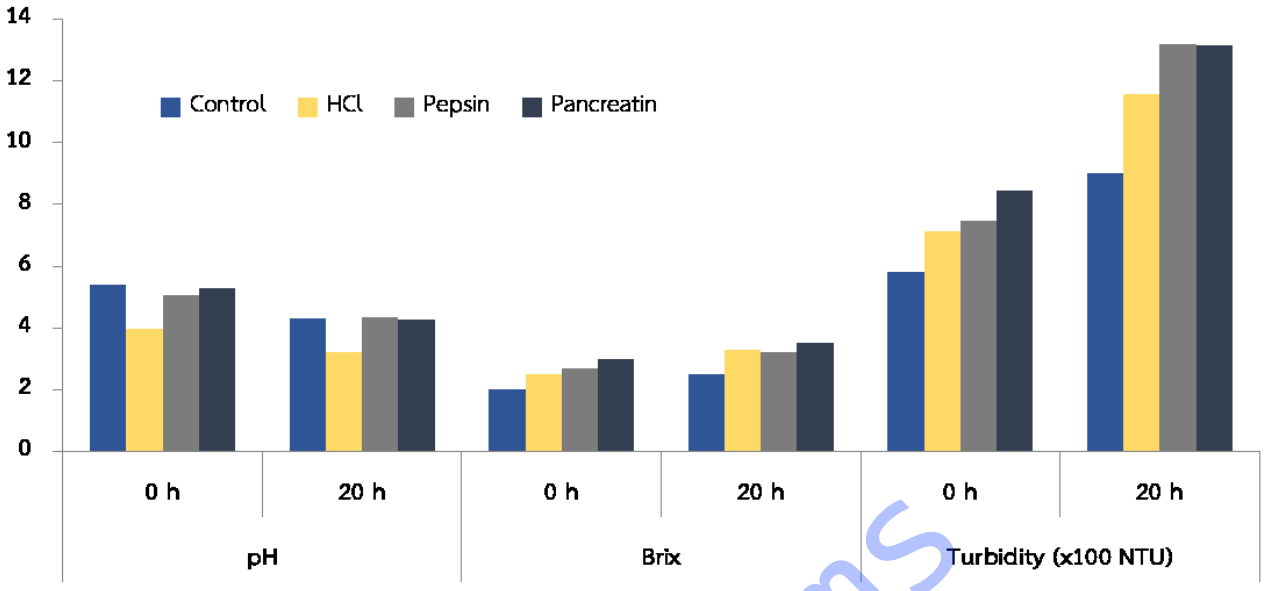


Figure 25 Coffee fermentation profiles of four treatments (Control, HCl, Pepsin and pancreatin) explain in pH, Brix and Turbidity (NTU) in fermentation jar.

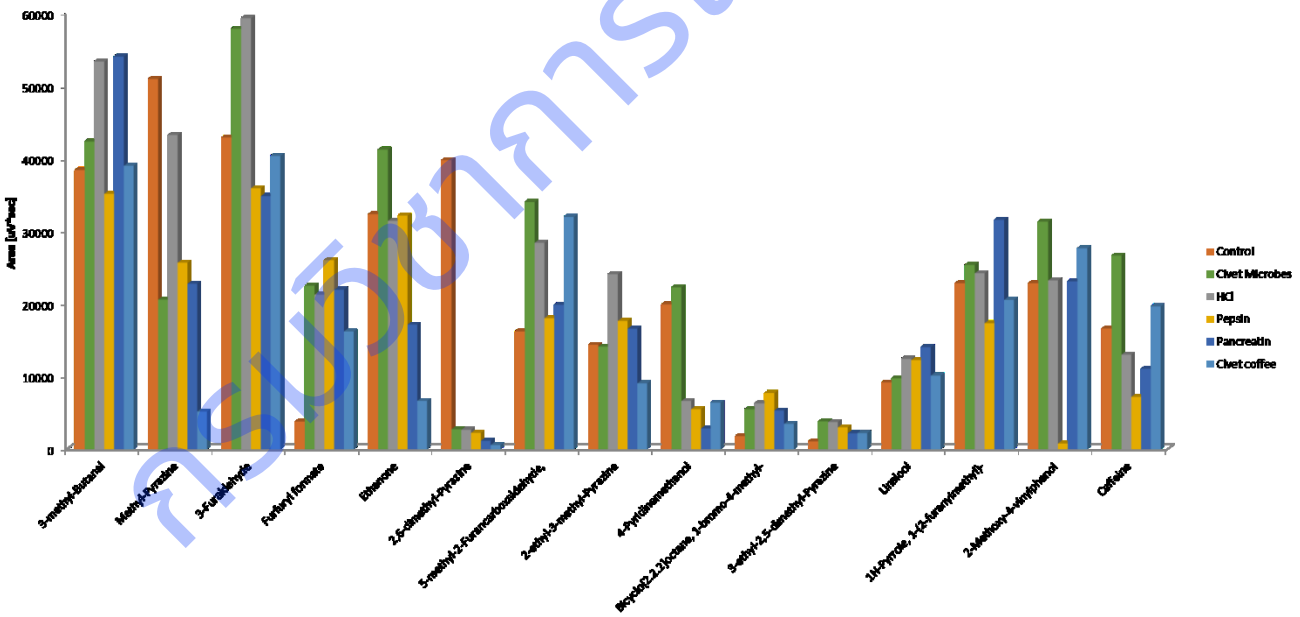


Figure 26 Chemical compounds in roasted fermentation coffee and civet coffee.

ลิขสิทธิ์การใช้งาน

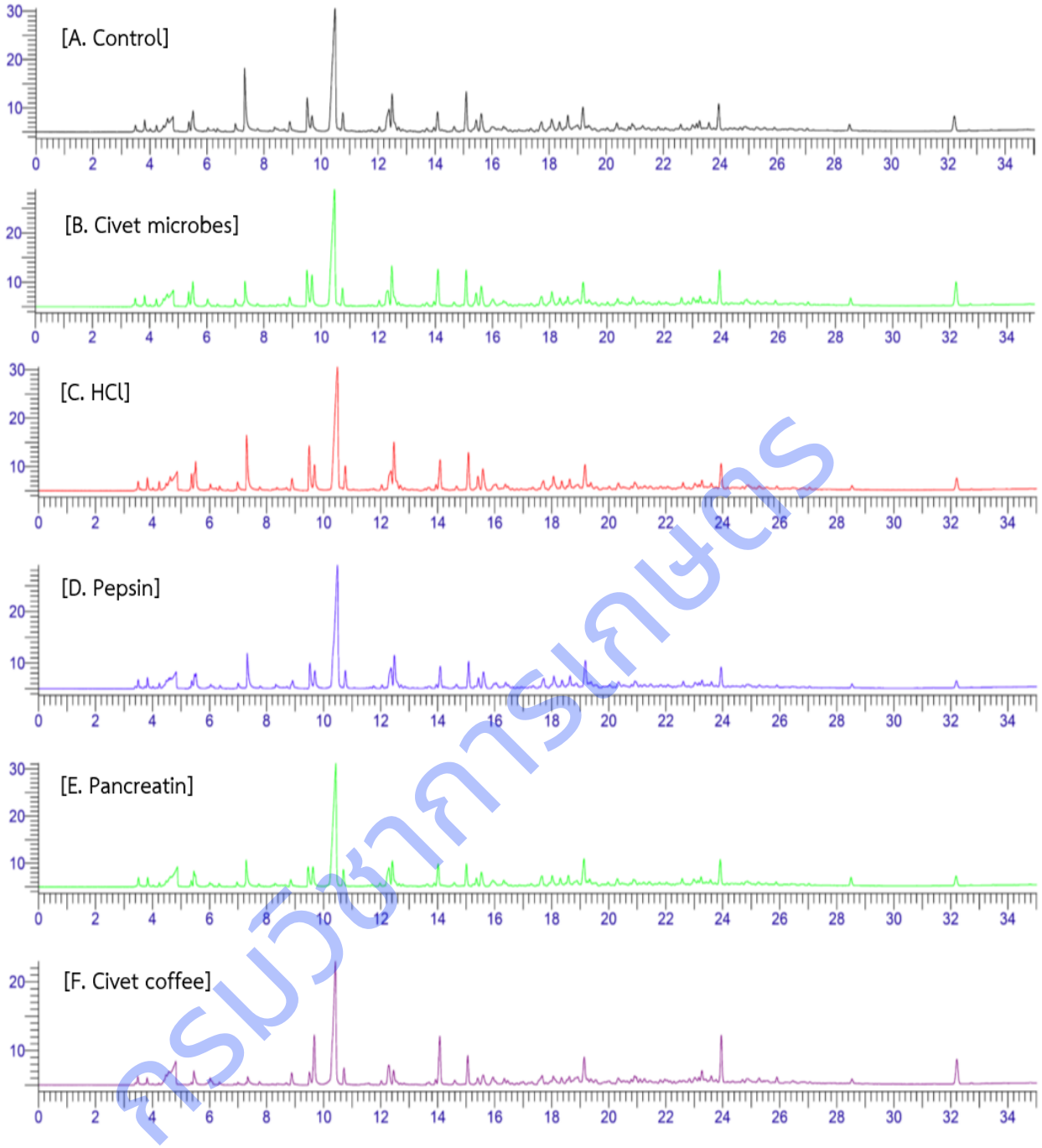


Figure 27 Chromatograms of chemical compounds in roasted fermentation coffee and civet coffee.

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการหมักกาแฟโดยจำลองแบบระบบย่อยอาหารของสัตว์เพื่อพัฒนาคุณภาพของกาแฟให้มีความแตกต่างจากการหมักกาแฟแบบดั้งเดิม ลดการทรมานสัตว์ โดยขอบเขตของผลการวิจัยฉบับนี้ประกอบด้วย การคัดแยกจุลินทรีย์จากขี้ชะมด, การทดสอบการหมักกาแฟโดยใช้จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้และทดสอบการหมักโดยใช้เอนไซม์ จากผลการคัดแยกจุลินทรีย์พบว่าในขี้ชะมดประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ได้แก่ แบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* ,ยีสต์และจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งเมื่อหมักกาแฟด้วยจุลินทรีย์ผสมที่คัดแยกได้ส่งผลให้คุณภาพทางประสาทสัมผัสของกาแฟดีขึ้นและใช้ระยะเวลาในการหมักกาแฟสั้นกว่าจากการหมักกาแฟแบบดั้งเดิม ความเข้มข้นของสารเคมีในกาแฟ ได้แก่ Furfuryl formate , 5-methyl-2-Furancarboxaldehyde, 3-ethyl-2,5-dimethyl-Pyrazine และ 2-Methoxy-4-vinylphenol ซึ่งให้กลิ่น ผลไม้ ถั่ว เครื่องเทศ และกลิ่นโทนหวาน มีการเปลี่ยนแปลงให้มีปริมาณใกล้เคียงกับกาแฟขี้ชะมด เมื่อทดสอบการหมักกาแฟโดยใช้เอนไซม์เปปซินและเอนไซม์จากตับอ่อน สามารถเพิ่มคุณภาพทางประสาทสัมผัสของกาแฟดีเช่นกัน โดยความเข้มข้นของ Furfuryl formate , 5-methyl-2-Furancarboxaldehyde และ 3-ethyl-2,5-dimethyl-Pyrazine ซึ่งให้กลิ่น ผลไม้และถั่ว มีการเปลี่ยนแปลงให้มีปริมาณใกล้เคียงกับกาแฟขี้ชะมด จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์และเอนไซม์ต่างมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีในกาแฟและสามารถนำไปใช้ในการหมักกาแฟโดยการจำลองการหมักกาแฟเลียนแบบระบบย่อยอาหารของสัตว์ได้ ซึ่งคณะผู้วิจัยจะทำการศึกษาโดยการรวมปัจจัยของจุลินทรีย์ (เลือกใช้เฉพาะจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรค) เอนไซม์ การปรับสภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหารของสัตว์ได้แก่ pH และอุณหภูมิ เพื่อจำลองแบบระบบการหมักกาแฟเลียนแบบระบบย่อยอาหารสัตว์ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

ประกอบด้วย

1. ผลการวิจัยของโครงการ เน้นผลผลิต output ตรงเป้าประสงค์ของโครงการ ตามวัตถุประสงค์

ผลงานที่ได้รับประกอบด้วย

1) ต้นแบบกระบวนการใหม่ระดับกึ่งอุตสาหกรรมจำนวน 3 กระบวนการ ได้แก่

1.1 เทคโนโลยีการหมักกาแฟแบบใช้ออกซิเจน (AAF techniques)

1.2 เทคโนโลยีการหมักกาแฟแบบ ไม่ใช้ออกซิเจน (Pro-Y techniques)

1.3 เทคโนโลยีการหมักจำลองกระเพาะอาหารสัตว์ (Bio-processing techniques)

2) ต้นแบบผลิตภัณฑ์ระดับอุตสาหกรรมและกึ่งอุตสาหกรรมจำนวน 3 ต้นแบบ ได้แก่

2.1 ต้นแบบเครื่องช่วยหมักกาแฟ

2.2 เชื้อจุลินทรีย์สำหรับหมักกาแฟคุณภาพจำนวน 3 ชนิด

2.3 ผลิตภัณฑ์จากสารสกัดจากเชอร์รี่กาแฟ

3) องค์ความรู้ใหม่ จำนวน 1 องค์ความรู้ได้แก่

3.1 เทคโนโลยีการสกัดสารสำคัญจากเชอร์รีกาแฟและเมือกกาแฟ

4) การใช้ประโยชน์เชิงสาธารณะและการฝึกอบรม ได้แก่

4.1 เทคโนโลยีการหมักกาแฟคุณภาพ ภายใต้โครงการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกาแฟพรีเมี่ยมปี 2560 – 2564 ในพื้นที่ 13 จังหวัด

5) การนำเสนอผลงานในงานประชุมระดับชาติและนานาชาติ จำนวน 4 เรื่องได้แก่

5.1 ระดับนานาชาติ

- Novel techniques to create coffee flavor profile using AAFtechniques ในงานประชุม Re:co symposium และ Specialty Coffee Expo 2019 ณ เมืองบอสตัน สหรัฐอเมริกา

- Accelerated Arabica Fermentation ในงานประชุม Food Innovation Asia Conference 2019 ณ Bitec บางนา กรุงเทพมหานคร

- AAF techniques : novel method approaching coffee flavor ในงานประชุม Asean Coffee and Industrial Development Conference 2020 ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติ จังหวัดเชียงใหม่

- Anaerobic and microbial fermentation for coffee ในงานประชุม Asean Coffee and Industrial Development Conference 2020 ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติ จังหวัดเชียงใหม่

กรมวิชาการเกษตร

2. ข้อเสนอแนะ (เชิงการนำไปใช้ประโยชน์ บอกผลลัพธ์ (outcome) ที่มีผลกระทบในทางกว้างที่นำผลผลิตไปใช้ หรือนำไปวิจัยต่อ)

แผนการนำไปใช้ประโยชน์

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

กรมวิชาการเกษตร

บรรณานุกรม

โกเมศ สัตยาวุธ, ปิยนุช นาคะ และมาโนช หาญเทวี. 2554. ปริมาณสารไพรีนและผลต่อความขมของกาแฟคั่วบดในประเทศไทย; ประชุมวิชาการกาแฟแห่งชาติครั้งที่ ๑ โรงแรมฮอล์ลิเดย์อินน์ จังหวัดเชียงใหม่, 12 หน้า.

โกเมศ สัตยาวุธ, วิมลวรรณ วัฒนวิจิตร, ปิยนุช นาคะ, มาโนช หาญเทวี และสรัญญา อุปรักขิตานนท์, 2556. การผลิตกาแฟที่มีสารกลุ่ม Polycyclic Aromatic Hydrocarbon ต่ำ. รายงานการประชุมวิชาการสำนักวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร โรงแรมชะอำบีสรีสอร์ท จังหวัดเพชรบุรี, 15 หน้า.

โกเมศ สัตยาวุธ, สุกัญญา นิติยนต์, ฉัตรนภา ข่มอาวุธ, สุภัทรา เลิศวัฒนาเกียรติ. 2561. การวิจัยและพัฒนาการหมักกาแฟอะราบิก้าโดยจุลินทรีย์, รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2561, กอง

วิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 18 หน้า

จิรสวัสดิ์ ภูวิภิรมย์. 2546. ปัจจัยการผลิตที่มีผลต่อสารให้กลิ่นรสของกาแฟผสมแบบไทย. บัณฑิตวิทยาลัย, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร, ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 7 หน้า.

นนทวัชร ชิตวิลัย. 2547. การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบระเหย และกรดอินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมักของกาแฟอาราบิก้าที่ปลูกในประเทศไทย. บัณฑิตวิทยาลัย, สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร, ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร, มหาวิทยาลัยศิลปากร. 8 หน้า

ปิยะมาศ ศรีรัตน์, ปิยะนุช นาคะ และอรพิน ภูมิภมร. 2551. ผลของการสีเปลือกนอกของผลกาแฟและการสลายเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟด้วยเอนไซม์เพคติเนสต่อระยะเวลาการอบแห้งและคุณภาพของเมล็ดกาแฟพันธุ์โรบัสต้า. วารสาร วิทยาศาสตร์เกษตร. 39(3), 401-404.

พัชนี สุวรรณวิศาลกิจ. 2545. กาแฟคั่ว. วารสารอาหาร: 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.

สุกัญญา นิติยนต์, โกเมศ สัตยาวุธ, ฉัตรนภา ข่มอาวุธ, สุภัทรา เลิศวัฒนาเกียรติ. 2562. การศึกษาการหมักกาแฟด้วยจุลินทรีย์ในระบบแอนแอโรบิก (ไม่ใช้ออกซิเจน), รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2562, กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร

Aprotosoaie, A.C., Luca S.V. and A., Miron. 2015. Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products-An Overview. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 15,73-91.

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

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

กองวิชาการเกษตร

Bartlett, M.C. and P. Gerhardt. 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.

Batista, N., Ramos, C., Dias, D., Pinheiro, A. and R. Schwan. 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

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

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.

Fitri, Tawali, A.B. and A. Laga. 2019. Luwak coffee in vitro fermentation: literature review. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 230. 012096. 10.1088/1755-1315/230/1/012096.

Flament, I. 2002. Coffee Flavor Chemistry. UK: John Wiley & Sons, Ltd. 396 pp.

Franca, A.S. Mendonca, JCF. and S.D. Oliveira. 2005. Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. LWT, 38, 709–715.

Gokulakrishnan, S. Chandraraj, K. and S.N. Gummadi. 2005. Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine. Enzyme and Microbial Technology, 37, 225–232.

Gonzalez-Rios, O. Suarez-Quiroz M. Renaud, B. and S. Schorr-Galindo. 2007. Impact of “ecological” post-harvest processing on the volatile fraction of coffee beans: I. Green coffee. J. Food Comp. and Ana. 20(3):289-296.

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.

Hadipernata, M. and S. Nugraha. 2018. Process technology of luwak coffee through bioreactor utilization. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 102. 012092. 10.1088/1755-1315/102/1/012092.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Jagani, H. Hebber, K. Gang, S.S. Vasath Raj P. Chandrashekhar, R. and J. Venkata. 2010. An overview of fermenter and the design considerations to enhance its productivity. Pharmacologyonline 1:261-301.

Jumhawan, U., Putri, P.P., Yusianto, Marwani, E., Bamba, T. and E Fukusaki. 2013. Selection of Discriminant Markers for Authentication of Asian Palm Civet Coffee (Kopi Luwak): A Metabolomics Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (33), 7994-8001.

López-Galilea, I. Fournier, N. Cid, C. and E. Guichard. 2006. Changes in headspace volatile concentrations of coffee brews caused by the roasting process and the brewing procedure. J Agric Food Chem. 1;54(22):8560-6.

Massimo, M.F. 2004. Composition and properties of Indonesian plam civet coffee (Kopi Luwak) and Ethiopian civet coffee, *Food Research Intenational*, 37, 901-912

Mondello, L. Costa, R. Tranchida P.Q. Dugo, P. Presti M.L. Festa, S. Fazio, A. and G. Dugo. 2005. Reliable characterization of coffee bean aroma profiles by automated headspace solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrophotometry with the support of a dual-filter mass spectra library. J. Seperation science. 28(9-10):1101-9.

Moon, J.K. and T. Shibamoto. 2009. Role of roasting conditions in the profile of volatile flavor chemicals formed from coffee beans. J. Agric. Food. Chem. 57(13):5823-31.

Muzaifa, M., Hasni, D., Patria, A. Febriani and A. Abubakar. 2018. Sensory and microbial characteristics of Civet coffee. International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology. 8. 165-171.

Nasanit R., and K. Satayawut. 2014. Microbial communities during wet fermentation process of Coffea Arabica var. chiangmai 80. Kasetsart Journal-Natural Science. 49. 32-41.

Nebesny, E. Budryn, G. Kula, J. and T. Majda. 2007. The effect of roasting method on headspace composition of robusta coffee bean aroma. European Food research and technology. 255(1):9-19.

Paek, K.Y. Chakrabarty D. and E.J. Hahn. 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 81, 287-300.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

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

Padmapriya, R. 2013. Coffee waste management- An overview. *International Journal of Current Science, vol.9,* pp. 83-91.

Silva, C.F., Vilela, D.M., Cordeiro, C.L.D.S., Duarte, W.F., Dias, D.R., and R.F., Schwan. 2013. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. World J Microbiol Biotechnol, 29, 235–247.

Sivetz, M. and H.E. Foote. 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.

Suhandono, S., Setiadi, H., Kristianti, T., Kusuma, A.B., Wedaringtyas, A.W., Djajadi, D.T., and I. Aryantha. 2016. Diversity of Culturable Bacterial in Various Parts of Luwak's (*Paradoxurus hermaprodithus javanica*) Gastrointestinal Tract. Microbiology Indonesia, 10, 4.

Varnam, H.A. and P.J. Sutherland. 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.

Von Enden, J.C. 2002. Review of coffee waste water characteristics and approaches to treatment. Coffee Research Report: Kainantu, Papua New Guinea.

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่