รายงานโครงการวิจัย

โครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตกาแฟคุณภาพ

Research and Development on qualitative coffee production

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

นายโกเมศ สัตยาวุธ

Komate SATAYAWUT

ปี พ.ศ. 2564

กรมวิชาการเกษตร

รายงานโครงการวิจัย

โครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตกาแฟคุณภาพ

Research and Development on qualitative coffee production

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

นายโกเมศ สัตยาวุธ

Komate SATAYAWUT

ปี พ.ศ. 2564

กรมวิชาการเกษตร

คำปรารภ (Foreword หรือ Preface)

การผลิตกาแฟคุณภาพ คือการพัฒนากระบวนการผลิตกาแฟให้ได้คุณภาพระดับสากลโดยมีการนำไปใช้ประโยชน์ในโครงการการผลิตกาแฟพรีเมี่ยมของกรมวิชาการเกษตร โดยการใช้นวัตกรรมการผลิตกาแฟตั้งแต่การหมักเฉพาะตัว ได้แก่การหมักเลียนแบบทางเดินอาหารสัตว์และการตอบโจทย์การใช้วัสดุเหลือใช้จากการหมักแบบครบวงจรตอบโจทย์หลักการของเกษตรหมุนเวียน (Circular Agriculture) นอกจากนี้การส่งเสริมการสร้างอัตลักษณ์ของโครงการมุ่งสู่การตรวจสอบคุณภาพได้ง่ายตามหลักการทางเคมี (Chemometrics) กาแฟคุณภาพถือเป็นสินค้าเกษตรนวัตกรรมโดยแท้จริงเพื่อการตอบโจทย์การนำไปใช้ประโยชน์ในพื้นที่จริงและต่อยอดนวัตกรรมสู่การสร้างมูลค่าสินค้าเกษตรให้ได้รับรอบจากนานาชาติและสร้างอัตลักษณ์แก่กาแฟไทยต่อไป

นายโกเมศ สัตยาวุธ
หัวหน้าโครงการวิจัย

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	1
คณะผู้วิจัย	2
บทนำ.....	2
บทคัดย่อ.....	4
1. การใช้ผลิตผลพลอยได้จากเปลือกหุ้มเมล็ดและเมือกกาแฟ	5
2. ศึกษาการหมักกาแฟโดยจำลองแบบระบบย่อยอาหารของสัตว์	14
3. ศึกษาอัตราส่วนสาร Cafestol และ Kahweol ในกาแฟต่อการพัฒนาคุณภาพและอัตลักษณ์กาแฟเฉพาะถิ่น	25
บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....	33
บรรณานุกรม.....	34

กรมวิชาการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตกาแฟคุณภาพ โดยได้รับความร่วมมือจาก สถาบันวิจัยพืชสวน ศูนย์วิจัยและพัฒนาเกษตรหลวงเชียงใหม่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงจังหวัดเชียงราย ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเพชรบูรณ์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรตาก ศูนย์วิจัยพืชสวนเลย และศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสตูล รวมทั้งคำแนะนำจากบุคลากรหลายภาคส่วนของกรมวิชาการเกษตรและภาคเอกชน สมาคมกาแฟและชาแห่งประเทศไทย ที่ให้คำปรึกษาและข้อคิดเห็นต่างๆตลอดการวิจัย รวมทั้งร่วมแก้ไขข้อบกพร่องเพื่อสร้างความสมบูรณ์แก่รายงานฉบับเต็ม คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณเกษตรกรผู้ผลิตกาแฟและผู้ประกอบการแปรรูปกาแฟในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย เพชรบูรณ์และตากที่เอื้อเฟื้อผลิตผลเกษตรและร่วมให้คำแนะนำในการพัฒนางานวิจัย วิเคราะห์ปัญหาและให้ความร่วมมือกับทางกรมวิชาการเกษตร

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากการศึกษาวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ให้ความอนุเคราะห์ทุกภาคส่วนที่ให้คำแนะนำและร่วมมือปฏิบัติงานทดลอง ซึ่งถือเป็นกำลังใจสำคัญในการพัฒนานวัตกรรมใหม่สู่วงการกาแฟประเทศไทยสู่ระดับสากล

นายโกเมศ สัตยาวุธ
นางสาวสุกัญญา นิติยนต์
นางสาวฉัตรนภา ข่มอาวุธ
นางสุภัทรา เลิศวัฒนาเกียรติ

กรมวิชาการเกษตร

คณะผู้วิจัย

นายโกเมศ สัตยาวุธ กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

นางสาวสุกัญญา นิติยนต์ กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

นางสาวฉัตรนภา ข่มอาวุธ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเกษตรหลวงเชียงใหม่

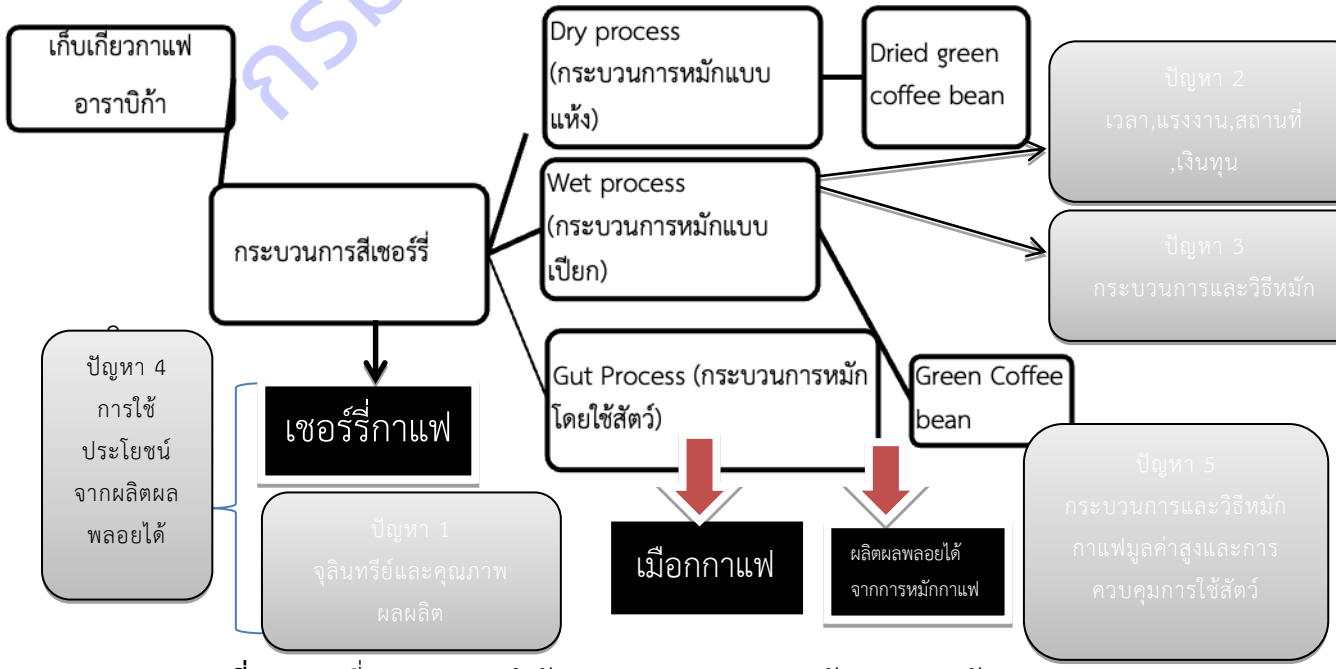
นางสุภัทรา เลิศวัฒนาเกียรติ สถาบันวิจัยพืชสวน

บทนำ

ประกอบด้วย

1 ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

การผลิตกาแฟคุณภาพมักใช้การแปรรูปแบบเปียกโดยใช้จุลินทรีย์ธรรมชาติที่มากับเมล็ดกาแฟจะทำการหมักเพื่อย่อยเมือกหุ้มเมล็ดกาแฟ ซึ่งเป็นส่วนของเพคติน น้ำตาล เฮมิเซลลูโลส และส่วนที่ไม่ละลายน้ำ จากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการหมักเมล็ดกาแฟยังมีน้อยมากในประเทศไทยและการศึกษาที่ผ่านมาจะเป็นงานวิจัยทางด้านคุณภาพ ทำให้เกิดวัสดุเหลือพลอยได้มากมาย โดยก่อให้เกิดข้อจำกัดด้านเวลา สถานที่ แรงงานและค่าใช้จ่าย จึงส่งผลให้คุณภาพกาแฟลดลง ทำให้ผู้บริโภคไม่ยอมรับ เกิดสารพิษและสารให้กลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ในกาแฟตามท้องตลาด นอกจากนี้ปัญหาขยะและสิ่งเหลือใช้จากกระบวนการหมักกาแฟยังส่งผลกระทบต่อเกษตรกรและผู้ประกอบการกาแฟที่ส่งปัญหาด้านมลภาวะทางอากาศ น้ำและดินในโรงงานผลิตและแปลงกาแฟเองโดยสามารถสังเกตได้จากแผนภาพแสดงกระบวนการหมักกาแฟดังนี้



ภาพที่ 1 แสดงที่มาและความสำคัญของการกระบวนการหมักกาแฟและปัญหา

กรมวิชาการเกษตร

2. วัตถุประสงค์

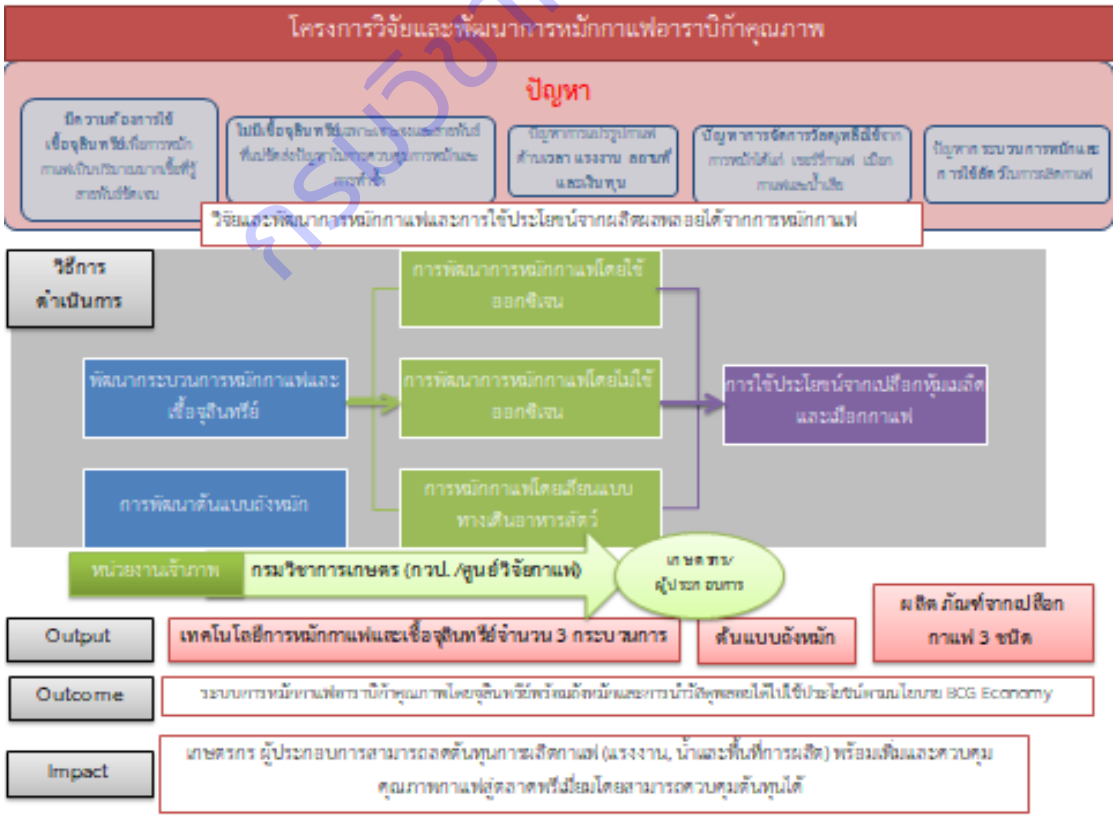
1. เพื่อศึกษาสารสำคัญในเมือกกาแฟและเปลือกกาแฟและการนำใช้ประโยชน์จากเมือกกาแฟและเปลือกกาแฟในรูปแบบอาหาร

2. เพื่อศึกษาการหมักกาแฟโดยจำลองระบบการย่อยอาหารของสัตว์ เพื่อเก็บข้อมูลจุลินทรีย์ กลิ่น รส และสารสำคัญในระหว่างการหมักกาแฟสำหรับเป็นข้อมูลในการพัฒนาเทคโนโลยีและคุณภาพการแปรรูปกาแฟ ทดแทนการใช้สัตว์ในการหมักกาแฟ

3. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารสำคัญกลุ่ม Cafestol และ Kahweol ตั้งแต่ระยะการเก็บเกี่ยวตลอดกระบวนการแปรรูปและระบุอัตราส่วนเฉพาะเพื่อส่งเสริมการผลิตกาแฟคุณภาพเฉพาะถิ่นได้

3.วิธีการวิจัย

โครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตกาแฟคุณภาพ เป็นงานวิจัยที่จะพัฒนานวัตกรรมการผลิตกาแฟ การใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้และควบคุมอัตลักษณ์กาแฟ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเพื่อเพิ่มคุณภาพ ลดต้นทุนและเวลาการผลิต รวมทั้งเป็นการเพิ่มมูลค่าของเมล็ดกาแฟ นอกจากนี้ยังค้นคว้าเทคโนโลยีใหม่ในการหมักกาแฟภายในภาวะเลียนแบบสัตว์และนำผลิตผลพลอยได้จากการหมักไปใช้ประโยชน์ เน้นการจัดการการผลิตแบบ Zero-waste process หรือการจัดการการผลิตที่ไม่มีของเสียออกจากระบวนการผลิต โดยมุ่งเน้นการนำไปใช้ประโยชน์จากการสกัดสารสำคัญและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารและการเกษตร



กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

การผลิตกาแฟคุณภาพจำเป็นต้องใช้นวัตกรรมใหม่เพื่อตอบโจทย์การเปลี่ยนแปลงของโลก ตั้งแต่การสร้างรสชาติใหม่โดยการจำลองการหมักกาแฟเลียนแบบทางเดินอาหารสัตว์โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมชนิด *Lactobacillus plantarum*, *Pichia kudriavzevii* ผสมกับเอนไซม์เปปซินเอนไซม์จากตับอ่อน (pancreatin) และ การปรับ pH ที่ 2.0 เวลาไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง ทำให้เกิดรสชาติใหม่ นอกจากนี้ประเด็นด้านสิ่งแวดล้อมส่งผลให้เห็นความสำคัญของการใช้ผลิตผลพลอยได้จากการหมักกาแฟกาแฟที่มีกว่าร้อยละ 60 ได้แก่ เปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟ เมือกกาแฟและน้ำเสียจากการหมักกาแฟ โดยเพคตินจากเมือกที่เป็นชนิด High Methoxy Pectin สามารถนำมาผลิตสารเคลือบส้มเพื่อยืดอายุกว่า 10 วันในขณะที่น้ำหมักกาแฟสามารถนำกลับไปใช้ซ้ำได้ถึงสามครั้ง ทั้งนี้การบำบัดน้ำหมักเป็นสิ่งสำคัญเพื่อลดมลพิษผ่านกระบวนการตกตะกอน กรอง เติมอากาศและพืชบำบัดให้ได้คุณภาพตามมาตรฐานกรมโรงงานอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตามการป้องกันการละเมิดสิทธิ์ของการสร้างกาแฟอัตลักษณ์โดยใช้หลักการทาง Chemometric ที่ประเมินอย่างรวดเร็วนี้ตามผลการวิเคราะห์อัตราส่วนของ Cafestol และ Kahweol สามารถระบุอัตลักษณ์แหล่งผลิตกาแฟที่ผลการทดลองยืนยันว่าไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงต่ออัตราส่วนระหว่างกระบวนแปรรูปถือเป็นอัตราส่วนทองคำที่สามารถนำไปใช้ในการควบคุมการซื้อขายนำเข้าเมล็ดได้ ทั้งนี้ผลการวิจัยและพัฒนาการผลิตกาแฟคุณภาพเพื่อมุ่งแก้ไขปัญหาที่ตั้งไว้ ผ่านผลการทดลองที่มีการทดสอบในพื้นที่จริงและแปลงเกษตรกรเพื่อทดสอบความเป็นไปได้ในการต่อยอดสู่ระดับอุตสาหกรรมให้เกิดความยั่งยืน มีการสร้างเครือข่ายการผลิตกาแฟพรีเมี่ยมของกรมวิชาการเกษตรเพื่อสอดรับเทคโนโลยีและพัฒนาต่อยอดให้ตอบโจทย์ความต้องการของเกษตรกร ป้องกันปัญหาที่สามารถเกิดได้ตลอดกระบวนการผลิตในอนาคต นวัตกรรมการหมักกาแฟ การตรวจสอบแหล่งผลิตทั้งกระบวนการใหม่และต้นแบบผลิตภัณฑ์จากโครงการจะทำให้เกษตรกรสามารถยกระดับคุณภาพกาแฟให้มีการเพิ่มมูลค่า สร้างอัตลักษณ์เฉพาะตัว นอกจากนี้ยังมีการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรจากฐานชีวภาพตอบโจทย์ธุรกิจชีวภาพเชิงสร้างสรรค์ตามนโยบายของภาครัฐกับการเพิ่มมูลค่าเศรษฐกิจการฐานชีวภาพแบบครบวงจร

Abstract

Qualitative Coffee production requires new innovations to meet this disruptive society. To create new coffee flavors by simulating the fermentation of coffee, mimicking the animal feed pathway using mixed microorganisms such as *Lactobacillus Plantarum* and *Pichia Kudriavzevii* mixture combine with pepsin and pancreatic enzymes at pH 2.0 adjustment for at least 24 hours, which enhance mimic ‘luwak’ flavors. In addition, environmental concerned aborted the important issues, marked the importance of using more than 60% of coffee by-products from coffee fermentation, such as coffee husks, mucilage and wastewater. High methoxy pectin

กรมวิชาการเกษตร

could obtain from coffee mucilage and used to produce ‘orange coating’ to extend its lifespan by more than 10 days, while coffee ferment water can be reused up to three times. However, the treatment of fermented wastewater is prior to reduce pollution through sedimentation, filtration, aeration processes and wetland plants to meet the national standards. However, in the prevention of infringement of coffee authentication, the results shown the important of chemometric principles, this rapid assessment based on the results of ‘Cafestol and Kahweol ratio’ analyzes was able to identify coffee producing identities that the experimental results confirmed had no effect on alteration. The ratio of both diterpenes is constant mend to ‘the golden ratio’ named that can be used to regulate the import coffee bean. The results of research and development on the production of quality coffee to focus on solving the problems that have been set. Through experimental results that are tested in real areas and farmer plots to test the feasibility of extending to industrial level for sustainability. Premium coffee production network of the department of Agriculture has been created to support technology and development, extending to meet the needs of farmers, preventing problems that can occur throughout the manufacturing process in the future. Coffee fermentation innovation Inspection of new production processes and product prototypes from the project will enable farmers to upgrade coffee quality to add value. By creating a unique identity, there is also the utilization of resources from bio-based bases to meet the needs of creative bio-businesses according to the government's policy and to add value to the integrated Bio-Circular-Green based economy.

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 1

การใช้ผลิตผลพลอยได้จากเปลือกหุ้มเมล็ดและเมือกกาแฟ

Development of Arabica coffee fermentation by using microbial fermentation

โกเมศ สัตยาวุธ สุกัญญา นิติยนต์ ฉัตรนภา ข่มอาวุธ สุภัทรา เลิศวัฒนาเกียรติ

บทคัดย่อ

คำสำคัญ: เปลือกกาแฟ, เมือกกาแฟ, น้ำหมักกาแฟ, สารเคลือบส้ม, การบำบัดน้ำเสีย

ผลิตผลพลอยได้จากการหมักกาแฟเป็นวัตถุดิบที่สร้างมูลค่าเพิ่มจากการหมักกาแฟได้ โดยเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟที่มีมากกว่าร้อยละ 60 สามารถผลิตชีวภัณฑ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในต้นกาแฟได้รวมทั้งนำไปผลิตสารปรุงรสอาหาร สำหรับเพคตินสกัดจากเมือกกาแฟ

และเปลือกและน้ำหมักจะเป็นชนิด High Methoxy Pectin ที่มีค่า Degree of Esterification กว่า 65.57% ที่สามารถนำมาผสมกับสารเคลือบส้ม Canauba wax อัตรา 5% ใช้เคลือบส้มเพื่อยืดอายุได้ประมาณ 10 วัน ทั้งนี้น้ำหมักกาแฟที่ใช้ในการหมักโดยเฉลี่ย 200 ลิตร ต่อการหมักกาแฟเพียง 1 กิโลกรัมนั้นจำเป็นต้องมีการลดการใช้น้ำและบำบัดน้ำเสียจากกระบวนการหมักโดยพบว่าน้ำหมักกาแฟล้วนมีคุณภาพไม่ผ่านมาตรฐานกรมโรงงานอุตสาหกรรมและยังก่อให้เกิดปัญหาข้อขัดแย้งการใช้น้ำระหว่างฤดูการผลิตและน้ำเสียในลำน้ำสาธารณะ ซึ่งผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสามารถใช้น้ำหมักกาแฟซ้ำได้ไม่น้อยกว่าสามครั้ง โดยคุณภาพกาแฟและน้ำหมักที่ได้นั้นไม่แตกต่างกับการใช้น้ำหมักกาแฟครั้งแรก อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสและคุณสมบัติทางเคมีพบว่าสารที่ปริมาณสารกลุ่ม Furans, Pyrazines และ Maltol มีปริมาณลดลงและปริมาณคาเฟอีนและ Methylchromone ยังลดลงโดยเฉลี่ย 75% อย่างไรก็ตามการบำบัดน้ำหมักเป็นกระบวนการสำคัญโดยน้ำหมักกาแฟต้องผ่านระบบบำบัดที่มีถังพัก ถังตกตะกอน ถังกรอง ถังเติมอากาศและพืชบำบัดที่สามารถปรับคุณภาพน้ำหมักให้ได้มาตรฐานกรมโรงงานอุตสาหกรรมก่อนปล่อยสู่แหล่งน้ำสาธารณะได้ ทั้งนี้งานวิจัยชิ้นนี้มุ่งสร้างทางเลือกที่สามารถสร้างรายได้ที่ยั่งยืนและลดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อมส่งเสริมการผลิตกาแฟที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เพื่อตอบโจทย์กระบวนการแปรรูปแบบ BCG model

Abstract

Keywords: Coffee Cherry, Coffee Mucilage, Coffee wastewater, Orange Coating, Water treatment

By-products from coffee fermentation are valuable raw materials. With more than 60 percent of the coffee bean husks can produce bioproducts to inhibit the growth of anthracnose fungi in coffee plants, as well as to produce food flavorings. For coffee mucilage from cherry and ferment water, they contain 65.57% of High Methoxy Pectin that can be mixed with 5% Canauba wax orange varnish to extend its life for approximately 10 days. Coffee fermentation used an average of 200 liters water per 1 kilogram of coffee which required to reduce water use. Futhermore ferment water polluted the environment and shown the insufficient quality to emit due to Industrial wastewater standard. This also cause conflicts about the use of water during the production season and wastewater in public waterways. The results indicated that coffee fermentation could be reused at least three times with the favorable quality of fermented coffee. However, their sensory evaluation and chemical properties were tested with lower amount in Furans, Pyrazines, Maltol, Caffeine and Methylchromone. That comes to the important of wastewater treatment at the final step of coffee fermentation, the tentative treatment system includes

กรมวิชาการเกษตร

sump tanks, sedimentation tanks, filter tanks, aeration tanks and wetland treatment that can rectify the quality of fermented water accord to the Industrial standards before releasing in public waterway. This research aims to create alternatives that can generate sustainable income and reduce environmental pollution problems, promoting green coffee production to meet the Bio-Circular Green model transformation process

บทนำ (Introduction)

การหมักกาแฟทำให้เกิดผลผลิตพลอยได้หรือ by-products ซึ่งผลิตผลพลอยได้สำคัญจากการหมักกาแฟนั้นคือเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟที่มีปริมาณมากกว่าร้อยละ 60 ของปริมาณผลผลิตทั้งหมด นอกจากนี้ยังมีเมือกกาแฟและน้ำเสียจากการหมักกาแฟ ซึ่งขั้นตอนการหมักกาแฟนั้นถือเป็นขั้นตอนการใช้น้ำในการผลิตที่สูงมากตั้งแต่ขั้นตอนการการล้างถึงการหมักก่อให้เกิดน้ำเสียจากการผลิตในปริมาณมากโดยมีการสำรวจว่าการผลิตกาแฟเพียง หนึ่งกิโลกรัมจะใช้น้ำในการผลิตถึง 200 ลิตรอย่างต่ำ นอกจากนี้นั้นน้ำจากกระบวนการหมักยังมีปริมาณคาร์บอนทั้งจากผลผลิตกาแฟและขั้นตอนการแปรรูปปริมาณสูงก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอย่างชัดเจน **Figure 1** แสดงให้เห็นถึงผลผลิตผลพลอยได้ทั้งกระบวนการผลิตกาแฟตั้งแต่ เปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟ, เมือกกาแฟ, กะลากาแฟ, silverskin, กากกาแฟ รวมทั้งน้ำเสียจากการผลิตกาแฟ โดยเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟนั้นถือเป็นผลผลิตพลอยได้อันแรกโดยมีการประมาณการว่าในการผลิตสารกาแฟ 2 ตันนั้นจะมีปริมาณเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟกว่า 1 ตัน โดยเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟนี้ประกอบไปด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วนได้แก่ exocarp หรือเปลือกนอกและ mesocarp หรือส่วนเนื้อผลของกาแฟจะอุดมไปด้วยคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 21 – 32 โปรตีนร้อยละ 5 – 15 ไขมันร้อยละ 2 – 7 และเกลือแร่นอกจากนี้ยังมีสารสำคัญต่างๆได้แก่ แทนนิน โพลีเฟนอลและคาเฟอีนอีกร้อยละ 2 – 8 สารประกอบเพคตินร้อยละ 6.5 น้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 12.4 และกรดคลอโรเจนิกร้อยละ 2.6 ซึ่งมีงานวิจัยการนำเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟไปใช้ประโยชน์เป็นวัสดุปลูกเห็ดและการหมักผสมปุ๋ยกลับไปใช้ในแปลงของเกษตรกร รวมทั้งการทดลองการผลิตไบโอแกสไบโอเอทานอลแต่ยังมีการนำไปใช้ประโยชน์ในการอุตสาหกรรมอาหารและการใช้สารสำคัญจากเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟน้อยมากซึ่งได้มีการทดสอบนำเปลือกหุ้มเมล็ดมาหมักเป็นเครื่องดื่มและสามารถพัฒนาเป็นเครื่องดื่มฟองได้ผลเป็นอย่างดีโดยการศึกษาเบื้องต้นพบการเพิ่มขึ้นของปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มฟีนอลลิกและแทนนินที่สามารถพัฒนาต่อยอดสู่การใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์เพิ่มมูลค่าลดต้นทุนในการผลิตกาแฟและสร้างรายได้เสริมแก่เกษตรกรมากกว่าการทิ้งให้เป็นขยะระหว่างการแปรรูปกาแฟ

เมือกกาแฟและน้ำเสียจากการหมักกาแฟถือเป็นประเด็นสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอย่างมากโดยเฉพาะในการผลิตกาแฟอะราบิก้าคุณภาพที่มีการส่งเสริมให้เกษตรกรแปรรูปแบบเปียกหรือกึ่งเปียกที่ใช้น้ำในปริมาณมาก ซึ่งเมื่อตรวจสอบคุณภาพเบื้องต้นของน้ำที่ใช้ในการผลิตกาแฟนั้นพบปริมาณของสารประกอบอินทรีย์ที่สูงมากเกินค่ามาตรฐานที่จะปล่อยสู่สิ่งแวดล้อม โดยในบางพื้นที่

น้ำเสียจากการหมักกาแฟนี้ยังเป็นพิษโดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์เพื่อการหมักกาแฟจากสายพันธุ์ที่ทราบโดยแน่ชัดและสายพันธุ์ท้องถิ่นส่งผลให้น้ำที่ได้จากการหมักกาแฟนั้นมีปริมาณออกซิเจนต่ำมากสู่ภาวะแอนแอโรบิกหรือภาวะไร้ออกซิเจนซึ่งส่งผลอย่างมากต่อสัตว์น้ำตามธรรมชาติ จากการประมาณการใช้น้ำในการหมักกาแฟพบว่าการใช้เครื่องขัดเมือกในการผลิตกาแฟจะใช้น้ำปริมาณ 1 ลูกบาศก์เมตรต่อกาแฟหนึ่งตันในการลอกเมือกกาแฟในขณะที่การหมักกาแฟโดยวิธีดั้งเดิมจะให้น้ำสูงถึง 20 ลูกบาศก์เมตรต่อกาแฟหนึ่งตันซึ่งการใช้น้ำในปริมาณมากดังกล่าวส่งผลกระทบในการแปรรูปกาแฟของเกษตรกรไทยในพื้นที่สูงที่มักเก็บเกี่ยวกาแฟในฤดูหนาวหรือฤดูแล้งที่มีแหล่งน้ำในการผลิตน้อยส่งผลต่อการแย่งน้ำและข้อขัดแย้งระหว่างเกษตรกรและชุมชนในการจัดการปัญหาน้ำระหว่างการผลิตกาแฟ ซึ่งประเด็นน้ำทิ้งจากการแปรรูปกาแฟนั้นก็ถือเป็นสิ่งสำคัญในการจัดการการผลิตโดยค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำให้เหมาะเพื่อปล่อยคืนสู่แหล่งน้ำธรรมชาตินี้มีราคาที่สูงมาก ซึ่งน้ำเสียที่ได้รับการบำบัดนั้นต้องไม่มีสารอินทรีย์อยู่นั้นเองซึ่งสารอินทรีย์ดังกล่าวประกอบด้วยน้ำตาลหมักและโปรตีน ซึ่งระหว่างการหมักนั้น hydrolysed pectin ที่เป็นเมือกกาแฟจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์เป็นเพคตินขนาดเล็กหรือสาร oligosaccharides ที่ละลายในสารละลายอัลคาไลท์ แต่ด้วยน้ำหมักมักมีความเป็นกรดสูงทำให้สารเพคตินที่ได้จากการหมักจะอยู่ในสภาพกรดและเมื่อมีปริมาณแคลเซี่ยมและไอออนชนิดต่างๆปนอยู่มากจะมีการฟอร์มเจลเป็นลักษณะของ Calcium pectate (Von Enden, 2002) ทำให้ค่า BOD (Biological Oxygen Demand) มีปริมาณสูงกว่า 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตรจากการหมักในบ่อปกติและปริมาณสูงกว่า 8,000 มิลลิกรัมต่อลิตรจากการหมักในถังหมักซึ่งมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องบำบัดน้ำให้มีค่า BOD ต่ำกว่า 200 มิลลิกรัมต่อลิตรก่อนจะปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. ประเด็นวิจัย มุ่งวิจัยและพัฒนาการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้จากการหมักกาแฟ ได้แก่เปลือกหุ้มเมล็ด เมือกและน้ำหมักเพื่อเพิ่มมูลค่า ลดมลพิษและลดต้นทุนการผลิต
2. สถานที่ทำการวิจัย : ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่, ศูนย์วิจัยพืชสวนวาวี(เชียงราย), กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
3. ระยะเวลาดำเนินงาน : ตุลาคม 2563 - กันยายน 2564
4. วิธีการดำเนินการ

ประเมินคุณภาพของเสียที่ได้จากกระบวนการหมักกาแฟโดยเฉพาะอย่างยิ่งเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟ เมือกกาแฟ และน้ำเสียที่ใช้ในการหมักกาแฟเกี่ยวกับส่วนประกอบและสารพิษตกค้าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร

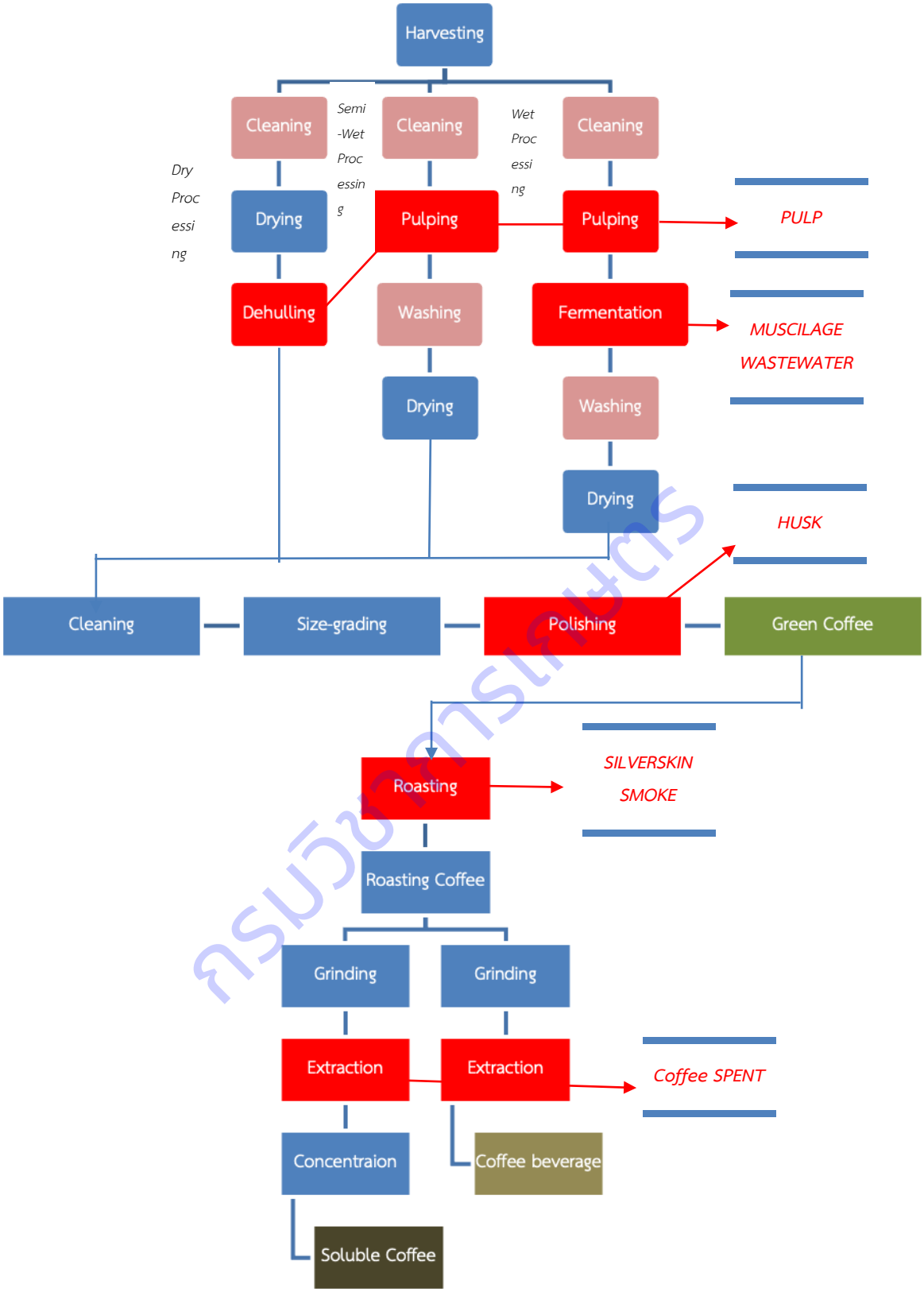


Figure 1 The life cycle of coffee products and residues generation steps (red boxes indicate major steps of coffee by-products)

ขั้นตอนที่ 1 การนำเมือกกาแฟไปใช้ประโยชน์

1. นำเมือกกาแฟและเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟมาสกัดเพคตินเพื่อจำแนกชนิดและการนำไปใช้ประโยชน์โดยการศึกษา Degree of esterification (DE%) เพื่อจำแนกชนิด ปริมาณกรดกาแลคทูโลนิค ความหนืด การคงตัวและภาวะการก่อเจล

2. ทดลองนำเพคตินจากการสกัดจากน้ำหมักกาแฟไปใช้ในการทดสอบการเคลือบผิวส้ม

2.1. การเตรียมผลส้มเพื่อทดสอบการเคลือบ โดยนำส้มมาล้างที่น้ำสะอาดและน้ำผสมโซเดี่ยมไฮโปครอไรท์ร้อยละ 0.02 เพื่อทำความสะอาดและผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

2.2. การเตรียมสารเคลือบตามวิธีของ Moalemiyan,2010 ใช้เพคตินสกัดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เวลา 18 ชั่วโมงผสมซอลบิทอลปริมาณ 6.75 กรัมคนผสมและอุ่นบีแวกซ์ปริมาณ 6 กรัมและโมโนกลีเซอไรท์ 1.8 กรัมใช้เครื่องผสมอัตโนมัติ (homogenizer PowerGen700) ที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เวลา 4 นาทีและลดอุณหภูมิจนเหลือที่ 37±2 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารเคลือบปริมาตร 0.8 มิลลิลิตรมาทาเคลือบส้มและตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเวลาไม่น้อยกว่า 1 ชั่วโมงและแพ็คในถุงพลาสติกเพื่อทดสอบการเคลือบผิวส้มในเวลาเก็บรักษา 30 วัน โดยแปรผันกรรมวิธีโดยเติมเพคตินสกัดปริมาณ 0%, 3% และ 5%

ขั้นตอนที่ 2 การใช้ประโยชน์จากน้ำหมักกาแฟ

1. ทดสอบคุณภาพน้ำหมักกาแฟจากการหมักสารกาแฟปริมาณไม่น้อยกว่า 50 กิโลกรัมเซอร์รี่กาแฟ โดยกระบวนการ AAF Techniques (ผลการทดลองจากการทดลองการหมักกาแฟโดยจุลินทรีย์) โดยใช้การหมักสารกาแฟโดยจุลินทรีย์ *S. cerevisiae* strain BAwine และทดสอบการใช้น้ำหมักซ้ำจำนวน 3 ครั้ง

2.นำตะกอนและน้ำเสียที่เหลือไปทดสอบเพื่อทำการบำบัดน้ำเสียและตรวจสอบคุณภาพน้ำก่อนทิ้งในแหล่งน้ำตามธรรมชาติโดยการตกตะกอนและบำบัดโดยพืช โดยทดสอบระบบบำบัดขนาด 21 ลิตรและติดตามคุณภาพบำบัดน้ำหมักในระดับห้องปฏิบัติการ

2.1 ออกแบบระบบบำบัดน้ำหมักกกาแฟโดยตรวจสอบคุณภาพน้ำหมักกาแฟเปรียบเทียบกับมาตรฐานน้ำปล่อยจากโรงงานผลิตอาหารของกรมโรงงานอุตสาหกรรม

2.2 ดัดแปลงระบบบำบัดน้ำเสียตาม ไพฑูรย์, 2535 จำนวน 5 ขั้นตอนได้แก่ (1.) บ่อรวบรวมน้ำหมักเพื่อบำบัด (Sump tank), บ่อตกตะกอน (Sediment tank), บ่อกรอง (Filtration tank), บ่อเติมอากาศ (Aerated tank) และบ่อพืชบำบัด (Wetland tank)

3 ทดสอบขยายดัดแปลงบ่อพืชบำบัดโดยคัดเลือกพืชบำบัดในพื้นที่ทดสอบจริงโดยขยายกำลังการบำบัดขนาดไม่น้อยกว่า 100 ลิตร

3.1 ดัดแปลงระบบบำบัดจำนวน 5 ขั้นตอนได้แก่ (1.) บ่อรวบรวมน้ำหมักเพื่อบำบัด (Sump tank), บ่อตกตะกอน (Sediment tank), บ่อกรอง (Filtration tank), บ่อเติมอากาศ (Aerated tank) และบ่อพืชบำบัด (Wetland tank) และคัดเลือกพืชท้องถิ่น จำนวน 2 ชนิดได้แก่ ธูปฤาษีและพุทธรักษาเพื่อบำบัดเปรียบเทียบกับระบบการบำบัดโดยการปล่อยลงดิน

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ผลการวิจัย (Results)

1. ผลการประเมินคุณภาพผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการหมักกาแฟ ผลพลอยได้จากกระบวนการหมักกาแฟจนถึงกระบวนการตากกาแฟแบ่งออกเป็น 3 ผลผลิตได้แก่ ***เปลือกหุ้มเมล็ด*** กาแฟ (Cherry) ที่มีปริมาณร้อยละ 60 ของผลผลิตกาแฟพบว่ามีปริมาณของสารประกอบไนโตรเจนมากถึงร้อยละ 31.30 ตามด้วยปริมาณ Crude fiber ร้อยละ 21.40 ซึ่งสามารถนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารโดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ปรุงรสเนื่องจากสารกลุ่มไนโตรเจนที่มีอยู่มากตอบสนองดีต่อการหมัก และสารแทนนินและ Reducing Sugar สามารถนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ในแปลงทดสอบ ในส่วนของ***เมือกกาแฟ (Mucilage)*** ที่มีปริมาณเพียงร้อยละ 10 ของเมล็ดกาแฟมีน้ำเป็นส่วนประกอบถึงร้อยละ 84.20 และโปรตีนร้อยละ 8.00 สามารถพัฒนาเป็นสารเคลือบผลไม้ได้เพราะมีสารเพคตินเป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ยังสามารถนำกากใยไปพัฒนาเป็นสารสกัดมูลค่าสูงได้เพราะมีโปรตีนและ***น้ำเสียจากการหมักกาแฟ (Waste water)*** ระหว่างการผลิตกาแฟ 1 ตันจะใช้น้ำในการแปรรูปสูงถึง 20,408 ลิตร เมื่อตรวจคุณภาพพบว่าค่าความเป็นกรดด่างอยู่ที่ 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 หรือสารสำคัญจาก antioxidant กลุ่ม flavonoids ที่เกิดจากกระบวนการ deesterified ของเมือกกาแฟดังนั้นการเก็บน้ำหมักผสมกับเมือกจึงเป็นกระบวนการที่เหมาะสมในการนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ได้

2. การนำเมือกกาแฟไปใช้ประโยชน์

พบว่าเพคตินสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดและเมือกกาแฟมีสีน้ำตาลอ่อนโปร่งแสงซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์ DE% (65.57%) พบว่าสอดคล้องกับน้ำหนัก (Equivalent Weight) 213.43 mg/mol ซึ่งถือเป็น High Methoxy Pectin (HMP) สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ โดยจากผล FTIR พบว่าอัตราส่วนของกรดกาแลกทูโรนิคสูงถึง 452.84 mg (79.57%) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rakitikul, 2016 อย่างไรก็ตามผลวิเคราะห์ดังกล่าวเมื่อพิจารณาสเปคตรัม 1,250 – 950 cm-1 ที่กำกับ glycosidic bonding และ carboxylic ที่ส่งผลต่อการก่อเจลดังนั้นการนำไปใช้จึงจำเป็นต้องมีการเติมน้ำตาลแอลกอฮอล์เพื่อกระตุ้นการทำลายพันธะดังกล่าวด้วย ทั้งนี้เมื่อทดลองใช้เพคติน (PCE) เพื่อเป็นสารเคลือบผิวส้มโดยใช้สูตรเพคตินโดยดัดแปลงจากวิธีขององอาจ, 2553 พบว่าเมื่อใช้เพคตินสกัดผสม canaubar wax (สารเคลือบทางการค้า) ผลการทดสอบตาม Table 6 พบว่าอัตราส่วน 5% สามารถยืดอายุส้มได้กว่า 10 วันและลดการใช้สารเคลือบลงได้ 10% ทั้งนี้เพคตินสกัดมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดีทำให้สารเคลือบลอกหลุดง่ายเมื่ออากาศร้อนจัดแต่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคด้วยสามารถบริโภคได้จึงเป็นที่น่าสนใจในการทดสอบเคลือบบนผลไม้ที่บริโภคโดยตรงได้

กรมวิชาการเกษตร

Table 1: Properties of Orange Coating by Coffee Pectin after 10 days of storage at ambient temperature in plastic basket

Tm (pectin mixing)	L*	a	b	TSS	TA	SE (odor)	SE (sweet)
Control	16.67±1.63	16.39±5.11	7.12±0.09	11.39	0.51	6.75±0.2	7.43±0.12
2.5%	16.19±1.45	18.58±1.38	8.13±0.14	10.98	0.51	7.23±0.1	7.12±0.02
5%	**13.40±0.73**	**15.64±0.81**	**6.98±0.16**	**10.72**	**0.47**	**8.92±0.1**	**8.75±0.2**
7.5%	15.41±7.30	17.51±7.47	7.00±0.36	10.97	0.55	8.12±0.5	7.12±0.12
10%	14.82±0.09	16.90± 0.21	7.06±0.18	11.06	0.53	7.04 ±0.1	7.02±0.1
12.5%	13.45±2.77	15.53±2.55	7.31±0.51	11.45	0.51	6.34±0.72	6.12±0.2
100%	17.55±7.74	19.17±7.88	7.44±0.26	10.83	0.45	6.71±0.2	7.07±0.2

3.การทดสอบการใช้น้ำเสียจากการหมักกาแฟ

คุณภาพน้ำที่ใช้ในการหมักกาแฟตั้งแต่ขั้นตอนการล้าง การหมักซ้ำครั้งที่ 1 – 3 และการใช้เครื่องขัดเมือกล้วนเกินมาตรฐานคุณสมบัติน้ำเสียเมื่อเปรียบเทียบกับกรมโรงงานอุตสาหกรรม โดยเฉพาะค่าความเป็นกรดด่างที่สูง (pH 3.7 – 4.2) รวมทั้งค่า COD ที่สูงกว่าค่ามาตรฐานกว่า 10 – 50 เท่า และกว่า 100 เท่าเมื่อผ่านเครื่องขัดเมือกและค่า BOD ที่มีปริมาณเพิ่มกว่า 38 – 280 เท่า นอกจากนี้ยังพบปริมาณน้ำมัน (Oil & Grease) และของแข็งแขวนลอยปริมาณมากเกินมาตรฐานอีกด้วย ซึ่งจำเป็นต้องมีการบำบัดก่อนนำปล่อยสู่สิ่งแวดล้อม จาก Table 7 พบว่าการใช้น้ำหมักซ้ำจำนวนไม่เกิน 3 ครั้งนั้นพบว่าคุณภาพของน้ำซ้ำไม่แตกต่างกันและสามารถให้คุณภาพกาแฟที่ดี นอกจากนี้ยังลดการใช้น้ำได้โดยพบว่าปริมาณสารกลุ่ม Furans, Pyrazines และ Maltol ลดลงอย่างมีนัยสำคัญโดยเฉพาะปริมาณ Caffeine ที่ลดกว่า 90% และ MethylChromone กว่า 86.67% ซึ่งสามารถสัณนิษฐานได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่มีปริมาณมากขึ้น (ตามค่า BOD) มีผลต่อการย่อยคาเฟอีนและลดการผลิต methylcrhomone ที่เป็นสารต้านต้านจุลชีพ ทั้งนี้จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับเชื้อที่มีผลต่อการเกิดคุณสมบัติดังกล่าวต่อไปในอนาคต

โดยผลการทดสอบการออกแบบระบบบำบัดน้ำหมักกาแฟตาม Figure 2 พบการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติสำคัญเพื่อพัฒนาน้ำหมักให้ได้คุณภาพตามาตรฐานกรมโรงงานอุตสาหกรรม ได้แก่ ปริมาณความเป็นกรดด่าง(pH) และความขุ่นของน้ำเสีย (Turbidity) เมื่อทดสอบในแปลงทดสอบโดยการขยายกำลังการบำบัดเป็นขนาดไม่น้อยกว่า 100 ลูกบาศก์เมตรนั้นโดยขยายกำลังการทดสอบตามและติดตามผลการบำบัดพบว่าผลการทดลองโดยการใช้พืช 2 ชนิดในส่วนของ Wetland ได้แก่ ธูปฤาษีและต้นพุทธรักษาเพื่อบำบัดเปรียบเทียบกับการปล่อยบำบัดในดินนั้นพบการบำบัดโดยใช้พืชนั้นสามารถปรับปรุงคุณภาพน้ำหมักกาแฟได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้เมื่อนำน้ำมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิเคราะห์เปรียบเทียบกับน้ำตัวอย่างก่อนหมักพบว่าระบบการบำบัดที่ได้พัฒนาขึ้นสามารถบำบัดน้ำจากการหมักได้จริงทั้ง 10 คุณสมบัติโดยเฉลี่ย 95% ยกเว้น Oil & Grease หรือน้ำมันจากเครื่องจักรที่เกิดจากการใช้เครื่องสีกาแฟและเครื่องขัดเมือกที่ใช้ในระหว่างการหมักกาแฟ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับมาตรฐานน้ำเสียจากกรมโรงงานอุตสาหกรรม (ISI standard) พบว่าน้ำที่ผ่านการบำบัดเข้าเกณฑ์ในการนำกลับมาใช้ซ้ำ หรือสามารถปล่อยสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติได้

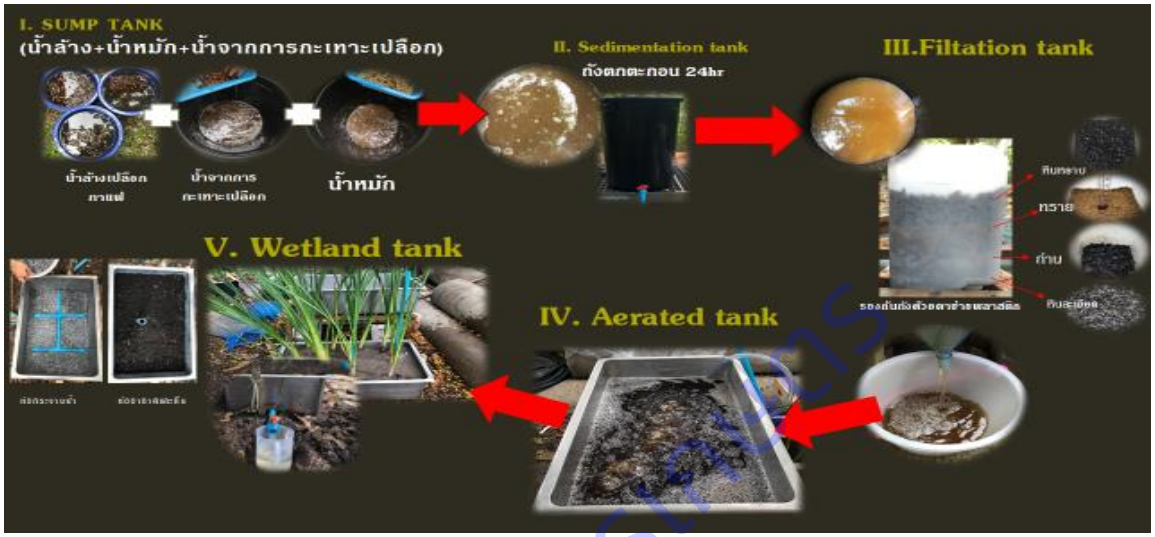


Figure 2 Demonstration protocol of coffee waste treatment method in fifth steps from sump tank to sedimentation tank then the filtration tank combined with aerated tank and stocking the pretreatment water in wetland tank for further used in field or recycling water cycle.

Table 2 Finalization of coffee wastewater parameters after treatment in pilot farm plant. The result shown the amelioration of the entire parameter compared to ISI standard which confirmed the capable of pretreatment water reuse in farm or coffee production plant.

Parameter	Water Before Treatment	Water After Treatment	ISI Standard	%Treatment
BOD	2388 mg/L	5 mg/L	< 20	99 %
COD	3097 mg/L	52 mg/L	< 120	98 %
DO	0.40 mg/L	4.3 mg/L	-	90 %
Oil & Grease	10.4 mg/L	2.5 mg/L	< 5	75 %
pH	3.7	7.5	5.5 – 9.0	90 %
Settleable Solids	11 mL/L	2 mL/L	-	81%
Total Dissolved Solids	1477 mg/L	117 mg/L	< 3,000	92 %
Total Suspended Solids	358 mg/L	8 mg/L	< 50	97 %
TKN	94 mg/L	12 mg/L	-	87 %
Turbidity	166 NUT	10 NUT	-	93 %

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การใช้ประโยชน์จากผลิตผลพลอยได้จากการหมักกาแฟทั้งสามชนิดในกระบวนการผลิตกาแฟเพื่อเพิ่มมูลค่านั้นเป็นทางเลือกการเพิ่มรายได้จากวัสดุเหลือใช้ ตั้งแต่การใช้เปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟที่มีปริมาณไนโตรเจนและไฟเบอร์สูงในการพัฒนาชีวภัณฑ์ป้องกันโรคแอนแทรคโนสในต้นกาแฟ โดยการหมักแบบแห้งด้วย *A. niger* และการหมักกรดซิตริกด้วย *Steptococcus spp.* เพื่อพัฒนาเป็นสารปรุงรสอาหารได้แก่ซอส, ผงปรุงรสและแป้งเปลือกกาแฟ นอกจากนี้เมือกกาแฟและน้ำหมักกาแฟที่มีปริมาณเพคตินสูงสามารถนำไปทดสอบสกัดเพคตินที่เป็นชนิด High Methoxy Pectin ที่ใช้ผสมกับสูตรเคลือบปกติกับ canauba wax ใช้เคลือบส้มให้ยืดอายุได้อย่างน้อย 10 วัน สำหรับน้ำหมักที่มีการทดสอบการใช้ซ้ำนั้นผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสามารถใช้ซ้ำได้อย่างน้อยสามครั้ง ก่อนจะทำการบำบัดซึ่งน้ำหมักกาแฟมีความจำเป็นต้องเข้าสู่ระบบบำบัดที่ได้พัฒนามาทั้งสิ้น 5 ขั้นตอนตั้งแต่ถังพัก ถังตกตะกอน ถังกรอง ถังเติมอากาศและบ่อบำบัดพืชซึ่งผลการทดสอบบำบัดทั้งในห้องปฏิบัติการและแปลงทดสอบพบว่าสามารถทำให้น้ำหมักกาแฟสามารถผ่านมาตรฐานกรมโรงงานอุตสาหกรรมและปล่อยสู่ธรรมชาติได้ ซึ่งการนำวัสดุเหลือใช้ทั้งหมดนี้ถือเป็นการสร้างรายได้เพิ่มขึ้นแก่เกษตรกรผู้แปรรูปกาแฟเพื่อใช้ประโยชน์ในชุมชน นอกจากนั้นยังลดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมจากการทิ้งวัสดุเหลือใช้ทั้งหมดที่ปัจจุบันสร้างความขัดแย้งให้ชุมชนอย่างมากก่อให้เกิดข้อพิพาทที่สำคัญของผู้ประกอบการกาแฟและชุมชนรอบข้างทั้งนี้งานวิจัยชิ้นนี้มุ่งสร้างทางเลือกที่สามารถสร้างรายได้ที่ยั่งยืนและลดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อมส่งเสริมการผลิตกาแฟที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมที่ยั่งยืน

กิจกรรมที่ 2

การศึกษาการหมักกาแฟโดยจำลองแบบระบบย่อยอาหารของสัตว์

Study of coffee fermentation process by simulation of animal digestive system

สุกัญญา นิติยนต์* โกเมศ สัตยาวุธ ฉัตรนภา ข่มอาวุธ และ สุภัทรา เลิศวัฒนาเกียรติ

บทคัดย่อ

คำสำคัญ (Key words) : กาแฟอาราบิก้า, กาแฟขี้ชะมด, ยีสต์, การหมักกาแฟ

กาแฟขี้ชะมดเป็นกาแฟที่มีราคาสูงเนื่องจากความยากและความแปลกในการผลิต ปัจจุบันกาแฟขี้ชะมดที่จำหน่ายในท้องตลาดส่วนใหญ่เกิดจากการผลิตในฟาร์มของเกษตรกร โดยการจับชะมดจากป่ามาเลี้ยงไว้ในกรงและให้กินผลกาแฟสุกเป็นอาหาร เป็นเหตุให้ชะมดถูกจำกัดพื้นที่ ขาดอิสระภาพซึ่งอาจทำให้เกิดโรคระบาดและความเครียด การผลิตกาแฟขี้ชะมดดังกล่าวมีข้อจำกัดมากและได้ผลผลิตน้อย ผู้บริโภคบางกลุ่มไม่นิยมบริโภคเนื่องจากคำนึงถึงความสะอาดถูกสุขลักษณะอนามัย งานวิจัยนี้ได้การจำลองการหมักกาแฟเลียนแบบระบบย่อยอาหารสัตว์ให้มีคุณภาพใกล้เคียงกับกาแฟขี้ชะมดโดยไม่ใช้สัตว์ในการผลิต เพื่อพัฒนาการผลิตกาแฟคุณภาพให้มีความแตกต่างจากการหมักกาแฟแบบดั้งเดิม ลดปัญหาการทรมานสัตว์โดยใช้จุลินทรีย์ผสมที่คัดแยกได้จากขี้ชะมด โดย

* Email: sukanyaniti@gmail.com

กรมวิชาการเกษตร

คัดเลือกเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อการหมักกาแฟและไม่เป็นกลุ่มเชื้อก่อโรค ได้แก่ *Lactobacillus plantarum*, *Pichia kudriavzevii* จากผลสอบการหมักแสดงให้เห็นว่าการเติมจุลินทรีย์ผสมกับเอนไซม์เปปซิน เอนไซม์จากตับอ่อน (pancreatin) และ การปรับ pH ในระบบการหมัก มีผลต่อการพัฒนาคุณภาพของกาแฟให้แตกต่างจากการหมักกาแฟแบบเดิม และเพิ่มความซับซ้อนของกลิ่นรสกาแฟเพิ่มมาก แต่อย่างไรก็ตามกาแฟที่ได้มีความเปรี้ยวและรสชาติค้างในปาก (Aftertaste) ต่ำกว่ากาแฟขี้ชะมด จากการทดสอบพบว่าการปรับ pH เริ่มต้นให้อยู่ในช่วง pH 2-3 โดยกรดไฮโดรคลอริกช่วยให้เกิดการย่อยโครงสร้างของกาแฟและสร้างสารตั้งต้นกลิ่นรสในกาแฟได้เพิ่มความซับซ้อนของกลิ่นรสได้ดี เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการหมักพบว่าการเพิ่มเวลาในการหมักจะส่งผลต่อการเพิ่มความซับซ้อนของกลิ่นรสกาแฟยิ่งขึ้น ระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสมคือ 24 ชั่วโมง ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการชิม (Cupping test) มีคะแนน เฉลี่ยที่ 82 คะแนน ซึ่งสูงกว่ากาแฟชุดควบคุม (คะแนนเฉลี่ย 71.8 คะแนน) และกาแฟหมัก 18 ชั่วโมง (คะแนนเฉลี่ย 78.5 คะแนน) การหมักกาแฟโดยจำลองระบบการย่อยอาหารสัตว์สามารถปรับระดับความเข้มข้นของสารเคมีในกาแฟ ได้แก่ Pyrazine, 2,6-dimethyl และ 2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl ซึ่งให้กลิ่นในกลุ่มของถั่ว และ 2-Furanmethanol, acetate และ 2-Methoxy-4-vinylphenol ซึ่งให้กลิ่นในกลุ่มผลไม้ และกลิ่นโทนหวาน ให้เพิ่มขึ้นให้มีปริมาณใกล้เคียงกับกาแฟขี้ชะมดได้

Abstract

Keywords: Arabica coffee, Civet coffee, Yeast, Coffee fermentation

Civet coffee is an expensive coffee because of its unique fermentation process in civet digestion system. Most of the civet coffee available in the market is produced on farms by coffee farmers. Asian palm civets are currently caught in the wild, kept in small cages and fed the coffee beans. Animals are thus deprived of their freedom and natural spaces, leading to diseases and depression. Civet coffee production using Asian palm civet animal has many weakness such as inefficient production processes and final product quality that always makes consumers hesitate in terms of its hygiene. The aim of this research is to improve the quality of coffee from the traditional coffee fermentation (wet process) by simulation of animal digestive system and to produce coffee with the quality of civet coffee or unique coffee without using animal. The beneficial microorganisms was screened and selected from civet feces, including lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* and yeast *Pichia kudriavzevii*. Coffee fermentation by using isolated microorganisms supplemented with mix enzyme (pepsin and pancreatin) at pH 2-3 (adjusted by

กรมวิทยาศาสตร์

hydrochloric acid) showed the higher coffee cupping score than that of traditional wet process. The results suggested that microorganisms and enzymes affected the chemical composition in coffee. However, aftertaste and acidity of fementation coffee lower than that of civet coffee. The 24 hours fermentation increase complexity of aroma in coffee than that of 18 hours fermentation and control (20 hours). The sensory evaluations of these coffees stand out from the traditional coffee fermentation. Cupping score of coffee fermentation by simulation of animal digestive system for 24 hours is 82, which is higher than that of control (71.8) and 18 hours fermentation (78.5). Concentrations of volatile chemicals that their aroma were described as nutty (Pyrazine, 2,6-dimethyl and 2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl) and fruity / sweet (2-Furanmethanol, acetate and 2-Methoxy-4-vinylphenol) were changed nearly to that of civet coffee.

บทนำ (Introduction)

การหมักกาแฟโดยใช้สัตว์เช่น กาแฟขี้ชะมด กาแฟขี้ช้าง กาแฟขี้วัว เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่เพิ่มมูลค่าของให้กับกาแฟในท้องตลาด ซึ่งปัจจุบันราคาของกาแฟขี้ชะมดที่ปรุงสำเร็จในประเทศไทยมีราคาสูงถึงถ้วยละ 500-1500 บาท โดยมูลค่าที่สูงของกาแฟขี้ชะมดนั้นอาจเป็นผลมาจากความยากของกรรมวิธีการผลิตและความชอบส่วนบุคคลของผู้บริโภค แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ถือเป็นกรรมวิธีที่ทำให้กาแฟมีคุณสมบัติทางกายภาพ กลิ่น และรสชาติแตกต่างจากการผลิตกาแฟแบบดั้งเดิม เป็นการเพิ่มความหลากหลายของกาแฟให้กับผู้บริโภค กาแฟขี้ชะมดเป็นกาแฟพื้นเมืองของอินโดนีเซียซึ่งเป็นที่รู้จักทั่วโลกเนื่องจากมีกลิ่นและรสที่เฉพาะตัว โดยกลิ่นรสของกาแฟขี้ชะมดได้เคยมีการอธิบายว่าจะอยู่ในกลุ่มของกลิ่น earthy, musty, syrupy, smooth, และ chocolate (Massimo, 2004) การผลิตกาแฟขี้ชะมดแบบดั้งเดิมเกิดขึ้นโดยอาศัยจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่มีอยู่ภายในระบบย่อยอาหารของชะมด การผลิตกาแฟขี้ชะมดโดยใช้สัตว์ในการผลิตมีข้อด้อยหลายประการ ได้แก่ ผลิตได้ในปริมาณน้อย ยากต่อการควบคุมคุณภาพ ผู้บริโภคบางกลุ่มไม่ต้องการบริโภคเนื่องจากคำนึงถึงความสะอาดถูกสุขลักษณะอนามัย และเป็นการทรมานสัตว์ ดังนั้นจึงมีงานวิจัยเพื่อที่จะผลิตกาแฟที่มีความคล้ายคลึงกับกาแฟขี้ชะมดทดแทนการใช้สัตว์ในการผลิต โดยพัฒนาหมักกาแฟในถังหมักร่วมกับการใช้เอนไซม์และจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากขี้ชะมด (Fitri and Laga, 2019)

การหมักกาแฟโดยจำลองระบบย่อยอาหารของชะมด สามารถทำได้โดยการคัดแยกและจัดจำแนกจุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบย่อยอาหารของชะมด ได้แก่ กระเพาะอาหาร, ลำไส้เล็ก, ลำไส้ใหญ่ โดยจุลินทรีย์ที่พบในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่มีจำนวนมากกว่าที่พบในกระเพาะอาหาร เนื่องจากในกระเพาะอาหารมีสภาวะที่เป็นกรดมากจึงทำให้มีจุลินทรีย์ปริมาณน้อยสามารถอาศัยอยู่ได้ จุลินทรีย์ที่พบมากในลำใส้ใหญ่ ได้แก่ *Enterobacter cloacae* และ *Lactobacillus brevis* (Suhandono et al, 2016) นอกจากจุลินทรีย์ที่คัดแยกระบบย่อยอาหารแล้ว ยังสามารถคัดแยกจุลินทรีย์กรดแลคติก

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการหมักกาแฟได้จากขี้ของชะมดได้อีกด้วย โดยแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จากขี้ชะมดได้แก่ *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis, Leuconostoc paramesenteroides, Leuconostoc mesenteroides, Leuconostoc dextranicum* และ *Streptococcus faecium* (Fitri et al, 2019)

การทดสอบคุณภาพของกาแฟที่ได้จากการหมักสามารถทำได้โดยการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยการชิม (Cupping test) นอกจากนั้นยังสามารถทดสอบโดยการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีได้อีกด้วย โดย Massimo (2004) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติของกาแฟขี้ชะมด โดยเปรียบเทียบระหว่างกาแฟขี้ชะมดที่ได้จากอินโดนีเซีย (Indonesian plam civet coffe) และ กาแฟขี้ชะมดที่ได้จากเอธิโอเปีย (Ethiopian civet coffee) พบว่าเมื่อทำการทดสอบกลิ่นด้วยเครื่องจมูกอิเล็กทรอนิกส์ (Electronic nose) กลิ่นของกาแฟขี้ชะมดที่ผลิตจากต่างที่กันให้ผลที่ต่างกัน และเมื่อศึกษาโครงสร้างของกาแฟโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าน้ำย่อยในระบบย่อยอาหารของสัตว์มีผลต่อการตัดสายโปรตีนของเมล็ดกาแฟ ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้กลิ่นและรสของกาแฟขี้ชะมดแตกต่างจากกาแฟที่ผลิตตามวิธีดั้งเดิม ในปี 2013, Jumhawan และคณะได้ศึกษาสารสำคัญที่เป็นเครื่องหมายในการตรวจวิเคราะห์กาแฟขี้ชะมดแท้ของอินโดนีเซียเปรียบเทียบกับกาแฟที่ผลิตโดยวิธีปกติ โดยศึกษาจากตัวอย่างกาแฟขี้ชะมด 21 ตัวอย่าง พบว่า Citric acid, malic acid และอัตราส่วนของ inositol/pyroglutamic acid สามารถนำมาใช้เป็นสารเครื่องหมายในการตรวจวิเคราะห์กาแฟขี้ชะมดแท้ได้

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. ประเด็นวิจัย : งานวิจัยนี้ได้การจำลองการหมักกาแฟเลียนแบบระบบย่อยอาหารสัตว์ให้มีคุณภาพใกล้เคียงกับกาแฟขี้ชะมดโดยไม่ใช้สัตว์ในการผลิต เพื่อพัฒนาการผลิตกาแฟคุณภาพให้มีความแตกต่างจากการหมักกาแฟแบบดั้งเดิม ลดปัญหาการทรมานสัตว์โดยใช้จุลินทรีย์ผสมที่คัดแยกได้จากขี้ชะมด โดยคัดเลือกเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อการหมักกาแฟและไม่เป็นกลุ่มเชื้อก่อโรคร่วมกับการใช้เอนไซม์ในระบบย่อยอาหาร และการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ในการผลิตกาแฟ
2. สถานที่ทำการวิจัย : ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่, ศูนย์วิจัยพืชสวนวาวี(เชียงราย), กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
3. ระยะเวลาดำเนินงาน : ตุลาคม 2563 - กันยายน 2564
4. วิธีการดำเนินการ

1. ทดสอบการหมักกาแฟด้วยการผสมเอนไซม์และจุลินทรีย์จากลำไส้สัตว์ในขวดหมัก

1.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร

1.2 ทดสอบการหมักกาแฟในขวดหมัก

นำผลมากาแฟสุกมาแช่น้ำ ทำการลอกส่วนเปลือกนอกออก คัดเลือกเมล็ดเสียและ เมล็ดที่ลอยน้ำออก ล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด บรรจุเมล็ดกาแฟลงในขวดหมักที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จำนวน 500 กรัม ทำการหมัก 2 วิธีคือ ไม่เติมจุลินทรีย์ (หมักแบบธรรมชาติ), เติมจุลินทรีย์ผสมที่แยกจากกาแฟขี้ชะมดและเอนไซม์จากตับอ่อน (Pancreatin)จากนั้นนำขวดหมักที่บรรจุเมล็ดกาแฟมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปิดฝา บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง

1.3 ตรวจสอบคุณภาพกาแฟโดยใช้การคั่วเมล็ดกาแฟแบบคั่วกลาง หลังจากหมักเสร็จแล้วล้างเมล็กาแฟด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไปตากแดด ประมาณ 3-4 วัน คอยพลิกกลับเมล็ดจนเมล็ดแห้ง สุ่มตัวอย่างไปวัดความชื้นให้มีเหลือประมาณไม่เกิน 12 % นำไปสีเปลือกกาแฟออกทำการบรรจุเก็บ ในถุงพลาสติกสุญญากาศนำเมล็ดกาแฟที่ผ่านการสีเปลือกออกแล้ว มาคั่วด้วยเครื่องคั่วเมล็ดกาแฟ โดยทำการคั่วในระดับปานกลาง (medium roast) ใช้เวลาการคั่วประมาณ 8-9 นาที เมื่อคั่วเสร็จแล้วจะได้เมล็ดกาแฟคั่วที่มีสีน้ำตาลดำ เมล็ดกาแฟที่ผ่านการคั่วใส่ถุงพลาสติกสุญญากาศนำตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่วไปตรวจสอบคุณภาพกลิ่นรสของกาแฟที่หมักโดยการทดสอบการชิม (Cupping) ทำการวิเคราะห์ด้าน กายภาพ วิเคราะห์ด้านเคมี และการวิเคราะห์ปริมาณสาระสำคัญที่ให้กลิ่นในกาแฟ

2. ทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการหมักกาแฟจำลองระบบย่อยอาหารของสัตว์

2.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

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

2.2 ทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการหมักกาแฟจำลองระบบย่อยอาหารของสัตว์ในขวดหมัก

2.2.1 ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในการหมักกาแฟจำลองระบบย่อยอาหารของสัตว์โดยปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 2.0 และ 4.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก นำผลมากาแฟสุกมาแช่น้ำ ทำการลอกส่วนเปลือกนอกออก คัดเลือกเมล็ดเสียและเมล็ดที่ลอยน้ำออก ล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด บรรจุเมล็ดกาแฟลงในขวดหมักที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 500 กรัม จากนั้นนำขวดหมักที่บรรจุเมล็ดกาแฟมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร เติมจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 1 ทำการหมัก 3 วิธีคือ ชุดควบคุม (ไม่ปรับความเป็นกรด-ด่าง), ปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 2 และปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก หลังจากนั้นปิดฝาขวดหมัก บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง ตรวจสอบคุณภาพกลิ่นรสของกาแฟที่หมักโดยการทดสอบการชิม (Cupping)

กรมวิชาการเกษตร

2.2.3 ศึกษาผลของเวลาในการหมักกาแฟจำลองระบบย่อยอาหารของสัตว์โดยหมักกาแฟนาน 18, 20 และ 24 ชั่วโมง แล้วนำผลมากาแฟสุกมาแช่น้ำ ทำการลอกส่วนเปลือกนอกออก คัดเลือกเมล็ดเสียและเมล็ดที่ลอยน้ำออก ล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด บรรจุเมล็ดกาแฟลงในขวดหมักที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 500 กรัม จากนั้นนำขวดหมักที่บรรจุเมล็ดกาแฟมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร เติมจุลินทรีย์และเอนไซม์เปปซิน และ หลังจากนั้นปิดฝาขวด บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 20, 18 และ 24 ชั่วโมง ตรวจสอบคุณภาพกลิ่นรสของกาแฟที่หมักโดยการทดสอบการชิม (Cupping)

2.3 ทดสอบการหมักกาแฟจำลองระบบย่อยอาหารสัตว์ตามกรรมวิธีที่คัดเลือก

นำผลมากาแฟสุกมาแช่น้ำ ทำการลอกส่วนเปลือกนอกออก คัดเลือกเมล็ดเสียและเมล็ดที่ลอยน้ำออก ล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด บรรจุเมล็ดกาแฟจำนวน 2000 กรัม ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ทำการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ เอนไซม์ ความเป็นกรด-ด่างและเวลา ตามกรรมวิธีที่คัดเลือก หลังจากหยุดการหมักแล้วนำไปตรวจสอบคุณภาพกลิ่นรสของกาแฟที่หมักโดยการทดสอบการชิม (Cupping)

2.4 ตรวจสอบคุณภาพกลิ่นรสของกาแฟที่หมักเปรียบเทียบกับกาแฟขี้ชะมด

ตรวจสอบคุณภาพกาแฟโดยใช้การคั่วเมล็ดกาแฟแบบคั่วกลาง หลังจากหมักเสร็จแล้วล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไปตากแดด ประมาณ 3-4 วัน คอยพลิกกลับเมล็ดจนเมล็ดแห้ง สุ่มตัวอย่างไปวัดความชื้นให้มีเหลือประมาณไม่เกิน 12 % นำไปสีเปลือกกาแฟออกทำการบรรจุเก็บ ในถุงพลาสติกสุญญากาศนำเมล็ดกาแฟที่ผ่านการสีเปลือกออกแล้ว มาคั่วด้วยเครื่องคั่วเมล็ดกาแฟ โดยทำการคั่วในระดับปานกลาง (medium roast) ใช้เวลาการคั่วประมาณ 8-9 นาที เมื่อคั่วเสร็จแล้วจะได้เมล็ดกาแฟคั่วที่มีสีน้ำตาลดำ เมล็ดกาแฟที่ผ่านการคั่วใส่ถุงพลาสติกสุญญากาศ นำตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่วไปตรวจสอบคุณภาพกลิ่นรสของกาแฟที่หมักโดยการทดสอบการชิม (Cupping) ทำการวิเคราะห์ด้าน กายภาพ วิเคราะห์ด้านเคมี และการวิเคราะห์ปริมาณสาระสำคัญที่ให้กลิ่นในกาแฟ

3. เปรียบเทียบคุณภาพกาแฟที่ได้จากการหมักโดยจำลองระบบย่อยอาหารของสัตว์และคำนวนต้นทุนการทดลองเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักแบบเดิม แบบใช้เครื่องจักร แบบการใช้สารเคมี และวิธีที่พัฒนามาใหม่

ผลการวิจัย (Results)

ในงานวิจัยก่อนหน้านี้คณะผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างกาแฟขี้ชะมดสดและขี้ชะมดจากฟาร์มของเกษตรกรผู้ผลิตกาแฟขี้ชะมดในพื้นที่ อ. วาวี จ. เชียงราย ซึ่งผลการคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างขี้ชะมด 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* ซึ่งไม่เหมาะสมที่จะ

นำมาใช้เป็นจุลินทรีย์ในการผลิตอาหาร แม้ว่ากาแฟที่จะนำมาบริโภคต้องผ่านกระบวนการทำแห้งและการคั่วด้วยความร้อนสูงที่สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ดังกล่าวถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้กาแฟขี้ชะมดไม่ได้รับความนิยมในกลุ่มของผู้บริโภคที่มีความกังวลในเรื่องของสุขอนามัยในการผลิตอาหาร แต่อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* และยีสต์ *Pichia kudriavzevii* เป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อการหมักกาแฟ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยโปรตีนในกาแฟ เพื่อสร้างสารตั้งต้นของกลิ่นรสในกาแฟได้ (Hadipernata and Nugraha, 2017) และเมื่อทดสอบการหมักกาแฟโดยการเติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่แยกจากชะมด พบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกและนำมาทดสอบสามารถทำให้กาแฟมีความซับซ้อนของกลิ่นกาแฟมากกว่าชุดควบคุม โดยกลิ่นที่ได้มีรสชาติของผลไม้ มีความเปรี้ยว และมีความนุ่มและรสชาติค้างในปาก (Aftertaste) ดีกว่าชุดควบคุม มีคะแนน Cupping เฉลี่ยที่ 80 คะแนน ซึ่งสูงกว่ากาแฟชุดควบคุม (คะแนนเฉลี่ย 73) แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกมาได้มีผลต่อการพัฒนาคุณภาพของกาแฟให้แตกต่างจากการหมักกาแฟแบบเปียก (wet process) เมื่อทำการทดสอบการหมักกาแฟโดยการใช้กรดและเอนไซม์ โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริก 0.01%, เติมเอนไซม์เปปซิน 1.4% และเติมเอนไซม์จากตับอ่อน (Pancreatin) 1.4% ในขวดหมักที่บรรจุเมล็ดกาแฟและบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เพื่อเลียนแบบระบบย่อยอาหารของสัตว์ พบว่ากาแฟที่หมักโดยการเติมเอนไซม์เปปซินและกรรมวิธีที่เติมเอนไซม์จากตับอ่อนมีการเปลี่ยนแปลงรสชาติจากชุดควบคุม โดยกาแฟที่หมักโดยการเติมเอนไซม์เปปซินและกรรมวิธีที่เติมเอนไซม์จากตับอ่อนมีความซับซ้อนของกลิ่นกาแฟมากกว่าชุดควบคุม โดยกลิ่นที่ได้มีกลิ่นโทนหวาน เช่น วนิลาและคาราเมล มีคะแนน Cupping ที่ 75-76 คะแนน ซึ่งสูงกว่ากาแฟชุดควบคุม (คะแนนเฉลี่ย 73 คะแนน) เล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าการเติมเอนไซม์ได้มีผลต่อการพัฒนาคุณภาพของกาแฟให้แตกต่างจากการหมักกาแฟแบบเดิม แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกาแฟขี้ชะมดรสชาติที่ได้จากการหมักโดยการแยกปัจจัยของจุลินทรีย์และเอนไซม์ยังมีความแตกต่างจากกาแฟขี้ชะมด

รายงานฉบับนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการหมักกาแฟโดยการรวมปัจจัยของจุลินทรีย์เอนไซม์ การปรับสภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหารของสัตว์ได้แก่ pH และระยะเวลาในการหมักเพื่อจำลองแบบระบบการหมักกาแฟเลียนแบบระบบย่อยอาหารสัตว์เพื่อการผลิตกาแฟที่มีคุณภาพดี

1. ผลการทดสอบการหมักกาแฟด้วยการผสมเอนไซม์และจุลินทรีย์จากลำไส้สัตว์ในขวดหมัก

เมื่อทำการทดสอบการหมักกาแฟโดยการใช้จุลินทรีย์ร่วมกับการเติมเอนไซม์เปปซิน และเอนไซม์จากตับอ่อน (Pancreatin) ในขวดหมักที่บรรจุเมล็ดกาแฟและบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เพื่อเลียนแบบระบบย่อยอาหารของสัตว์ โดยเมื่อครบเวลา 20 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของชุดควบคุมและชุดที่เติมจุลินทรีย์ผสมเอนไซม์มีค่าลดลงจาก 5.5-6.4 เป็น 4.02-4.15 แสดงให้เห็นว่ามีการสร้างกรดในระหว่างการหมักทั้งสองกรรมวิธี ค่าความหวาน (Brix) มีแนวโน้มสูงขึ้น โดยชุดที่เติมจุลินทรีย์ผสมเอนไซม์มีค่า Brix สูงกว่าชุดควบคุมเพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่ามี

กรมวิชาการเกษตร

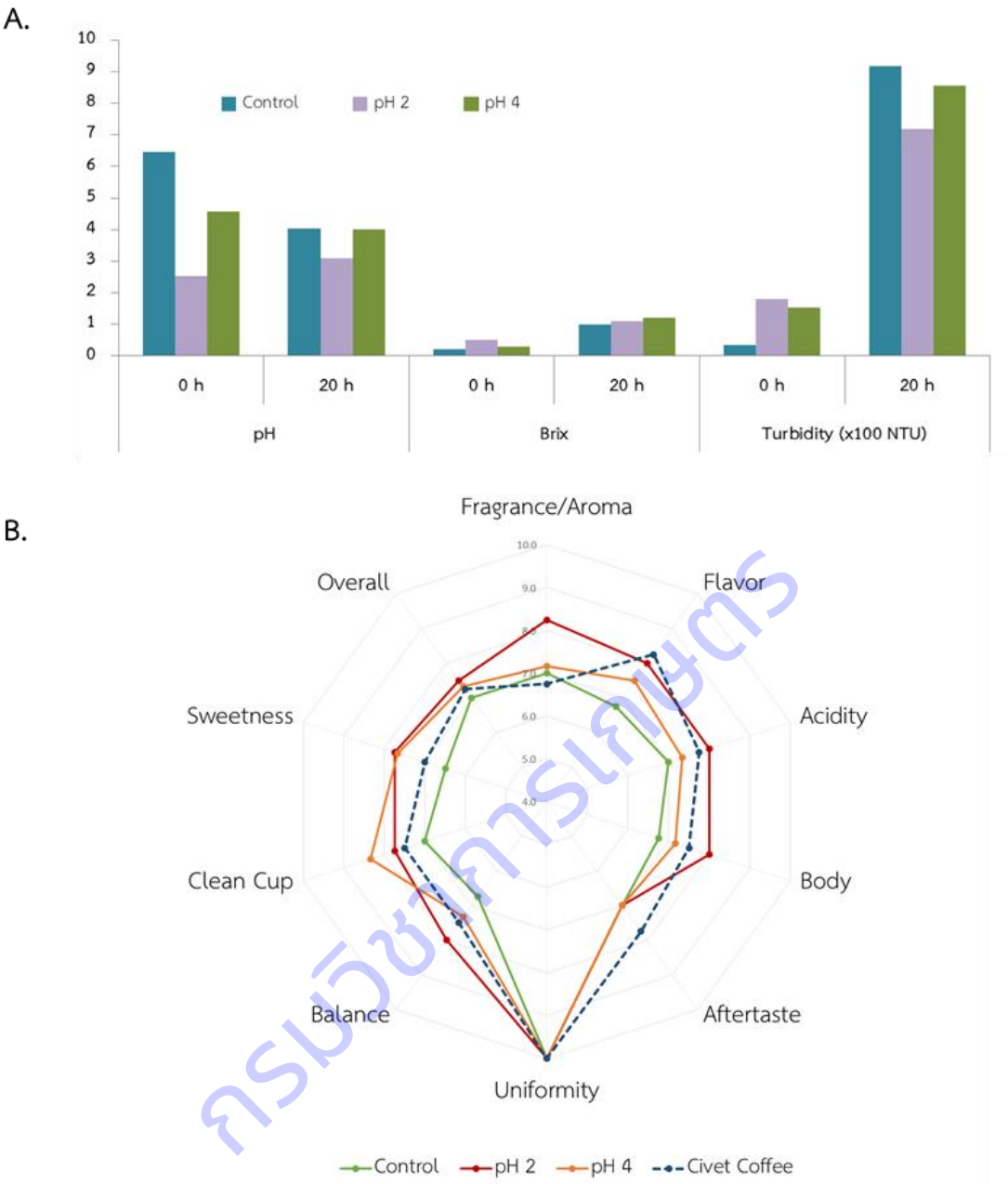
กิจกรรมของจุลินทรีย์ในการย่อยเปลี่ยนรูปเพคตินในกาแฟเป็นน้ำตาลได้ดีกว่าชุดควบคุม ค่าความขุ่นของชุดที่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์สูงกว่าชุดควบคุมแสดงให้เห็นว่ามีการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี (Figure 1) ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการชิม (Cupping test) พบว่ากาแฟที่หมักโดยการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมเอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลงรสชาติจากชุดควบคุม โดยกาแฟที่หมักโดยการเติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่แยกจากชะมดมีความซับซ้อนของกลิ่นกาแฟ (Flavor) มากกว่าชุดควบคุม มีความเปรี้ยว (acidity) ความหวาน (sweetness) และความกลมกล่อมเพิ่มขึ้น (Balance) ดีกว่าชุดควบคุม มีคะแนน Cupping score เฉลี่ย 76.5 ซึ่งสูงกว่ากาแฟชุดควบคุม (คะแนนเฉลี่ย 71.8) เมื่อเปรียบเทียบกับกาแฟขี้ชะมดที่จำหน่ายในท้องตลาดกาแฟที่ได้จากการหมักแม้มีการพัฒนาความซับซ้อนของกลิ่นรสมากขึ้นแต่ยังมีความเปรี้ยว, ความเข้มข้น (body) และรสชาติค้างในปาก (Aftertaste) ต่ำกว่า

2. ผลการทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการหมักกาแฟจำลองระบบย่อยอาหารของสัตว์ในขวดหมัก

2.1 ผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในการหมักกาแฟจำลองระบบย่อยอาหารของสัตว์

เมื่อทดสอบความเป็นกรด-ด่างในการหมักกาแฟโดยหมักกาแฟ 3 กรรมวิธี ได้แก่ ชุดควบคุมที่ไม่เติมจุลินทรีย์ผสมเอนไซม์และไม่ปรับ pH, ปรับ pH เท่ากับ 2 และ ปรับ pH เท่ากับ 4 ในขวดหมักที่บรรจุเมล็ดกาแฟและบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของชุดควบคุมลดลง จาก pH 6 มาอยู่ในระดับ pH 4 แสดงให้เห็นว่ามีการสร้างกรดจากจุลินทรีย์ธรรมชาติในระหว่างการหมัก ชุดทดสอบที่ปรับ pH 4 รักษาระดับ pH คงที่ ในขณะที่ชุดทดสอบที่ปรับ pH 2 มีการเปลี่ยนแปลง pH เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของ pH ดังกล่าวอาจเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ค่าความหวาน (Brix) มีแนวโน้มสูงขึ้น โดยเมื่อหมักครบ 20 ชั่วโมง ทั้ง 3 กรรมวิธี มีค่า Brix สูงกว่าค่าเริ่มต้นประมาณ 0.5 เกิดกิจกรรมของจุลินทรีย์ในการย่อยเปลี่ยนรูปเพคตินในกาแฟเป็นน้ำตาล เมื่อทดสอบค่าความขุ่น (Turbidity) ของกรรมวิธีมีที่ปรับ pH 2 พบว่ามีค่าความขุ่นต่ำกว่าชุดควบคุมแสดงให้เห็นว่ามีการเจริญของจุลินทรีย์ต่ำกว่าและมีการหลุดของเมือกกาแฟน้อยกว่า (Figure 3)

ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการชิม (Cupping test) พบว่ากาแฟที่หมักโดยการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมเอนไซม์และการปรับ pH มีการเปลี่ยนแปลงรสชาติจากชุดควบคุม โดยการปรับ pH ในการหมักทำให้กาแฟ มีความซับซ้อนของกลิ่นกาแฟ (Flavor) เพิ่มขึ้น มีความเปรี้ยว (acidity) ความหวาน (sweetness) ความกลมกล่อมเพิ่มขึ้น (Balance) และความเข้มข้น (body) ดีกว่าชุดควบคุม การปรับ pH 2 มีคะแนน Cupping score เฉลี่ยที่ 80.3 ซึ่งสูงกว่ากาแฟชุดควบคุม (คะแนนเฉลี่ย 71.8) และกาแฟหมักที่ปรับ pH 4 (คะแนนเฉลี่ย 76.8) (Figure 3)



กรมวิชาการเกษตร

Figure 3 **A.)** Coffee fermentation profiles explain in pH, Brix and Turbidity (NTU) and **B.)** Coffee cupping spider of three treatments (Control, pH2, pH4) and civet coffee.

2.2 ผลของเวลาในการหมักกาแฟจำลองระบบย่อยอาหารของสัตว์

การหมักกาแฟโดยเติมจุลินทรีย์ผสมกับเอนไซม์เปปซิน เอนไซม์จากตับอ่อน (pancreatin) และ การปรับ pH ในระบบการหมัก ให้เท่ากับ pH 2 หมักนาน 18 และ 24 ชั่วโมง เมื่อนำกาแฟคั่วที่ได้จากการหมักมาทดสอบโดยการชิมพบว่าการหมักกาแฟนาน 24 ชั่วโมงส่งผลต่อการเพิ่มความซับซ้อนของกลิ่นรสกาแฟยิ่งขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในสภาวะเดียวกันแต่ใช้ระยะเวลาสั้น (18 ชั่วโมง) โดยคะแนนของกลิ่น (Fragrance/Aroma) และ รส (Flavor) มีคะแนนสูงขึ้น โดยมีคะแนน

สูงถึง 8.5 คะแนน และคะแนน Cupping score รวมของการหมัก 24 ชั่วโมงเฉลี่ยที่ 82 ซึ่งสูงกว่ากาแฟชุดควบคุม (คะแนนเฉลี่ย 71.8) และกาแฟหมัก 18 ชั่วโมง (คะแนนเฉลี่ย 78.5)

2.3 การหมักกาแฟจำลองระบบย่อยอาหารสัตว์ตามกรรมวิธีที่คัดเลือก

เมื่อจำลองระบบการย่อยอาหารสัตว์ในการหมักกาแฟโดยใช้จุลินทรีย์ร่วมกับเอนไซม์ผสมเปปซินและแพนครีเอติน ตาม Figure 4 ที่ความเป็นกรด-ด่าง (pH) 2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทดสอบองค์ประกอบทางเคมีของกลิ่นกาแฟคั่วโดยการสกัดสารและใช้วัสดุดูดซับที่สัมผัสสารโดยตรง (Solid phase microextraction, SPME) วิเคราะห์ด้วย Gas Chromatography – Mass Spectrometer (GC-MS) พบว่าการจำลองระบบการย่อยอาหารสัตว์ในการหมักกาแฟโดยใช้จุลินทรีย์ร่วมกับเอนไซม์ผสมเปปซินและแพนครีเอติน ที่ความเป็นกรด-ด่าง (pH) 2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถปรับระดับความเข้มข้นของสารเคมีในกาแฟให้เพิ่มขึ้นให้มีปริมาณใกล้เคียงกับกาแฟขี้ชะมด ได้แก่ Pyrazine, 2,6-dimethyl และ 2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl ซึ่งให้กลิ่นในกลุ่มของถั่ว และ 2-Furanmethanol, acetate และ 2-Methoxy-4-vinylphenol ซึ่งให้กลิ่นในกลุ่มผลไม้ และกลิ่นโทนหวาน (Table 1, Figure 4-6) การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารให้กลิ่นในกาแฟมีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่ใช้ในการทดสอบเข้าไปย่อยผนังเซลล์หรือโครงสร้างของกาแฟที่เป็นคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนให้มีขนาดเล็กลงเปลี่ยนเป็นสารตั้งต้นของสารให้กลิ่นในกาแฟซึ่งเมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับความร้อนโดยการคั่วจึงให้กลิ่นและรสที่แตกต่างกันไป จากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Muzaifa et. al (2018) ซึ่งเปรียบเทียบกลิ่นรสของกาแฟขี้ชะมดที่ได้จากธรรมชาติและชะมดเลี้ยง โดยรายงานว่ากาแฟที่ได้จากชะมดที่อาศัยในป่าธรรมชาติจะมีกลิ่นและรสในโทนของ ถั่ว ครีมนม สมุนไพร กลิ่นมิ้นท์ และกลิ่นหญ้า ในขณะที่กาแฟที่ได้จากชะมดเลี้ยง จะให้กลิ่นในโทนของ ถั่ว มิ้นท์ กลิ่นหญ้า และกลิ่นผลไม้ แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่ใช้ในการทดสอบมีบทบาทและความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารเคมีภายในกาแฟเพื่อเลียนแบบการผลิตจำลองระบบย่อยอาหารของสัตว์

เมื่อทำการเปรียบเทียบคุณภาพกาแฟที่ได้จากการหมักโดยจำลองระบบย่อยอาหารของสัตว์และคำนวนต้นทุนการทดลองเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักแบบเดิม แบบใช้เครื่องจักร และแบบการใช้สารเคมี พบว่าการหมักกาแฟแบบดั้งเดิมนั้นใช้เวลามากกว่า 60 ชั่วโมง เมือกจึงหลุดอย่างสมบูรณ์ โดยในบางพื้นที่มีการเปลี่ยนน้ำในบ่อหมักทุกวันเพื่อลดการเกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ในกาแฟ เช่น กลิ่นเปรี้ยว หรือลดเวลาหมักโดยการแช่เม็ดกาแฟในบ่อหมัก 1 วันและทำการขัดเมือกโดยใช้เครื่องจักร ซึ่งใช้พลังงานไฟฟ้าและน้ำมากอีกทั้งยังมีเกิดการปนเปื้อนกลิ่นเครื่องจักรในกาแฟได้ ซึ่งมีต้นทุนประมาณ 35- 135 บาทต่อกิโลกรัมสารกาแฟ (green bean) แต่อย่างไรก็ตามแม้ว่าการหมักโดยการหมักโดยจำลองระบบย่อยอาหารของสัตว์จะสามารถสิ้นสุดการหมักได้ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ช่วยลดทรัพยากรในการหมักได้แก่ เวลาและปริมาณน้ำ ซึ่งเป็นต้นทุนสำคัญในการผลิตกาแฟอาราบิก้าได้ถึง 80% และให้กาแฟที่มีคุณภาพดีกลิ่นรสแตกต่างจากกรรมวิธีแบบดั้งเดิม แต่เนื่องจากการหมักดังกล่าวจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ 2 ได้แก่ เอนไซม์เปปซิน และเอนไซม์จากตับอ่อน

(Pancreatin) ในการช่วยย่อย ทำให้ต้นทุนในการหมักกาแฟสูงถึงประมาณ 180 บาทต่อกิโลกรัมสารกาแฟ หรืออาจจะสูงกว่านั้นขึ้นกับคุณภาพของเอนไซม์ที่ใช้ในการหมัก จึงทำให้การหมักกาแฟโดยการจำลองระบบย่อยอาหารสัตว์ไม่เหมาะต่อการใช้ในการผลิตกาแฟปริมาณมาก เหมาะสมต่อการผลิตกาแฟในระดับพรีเมียมสำหรับกลุ่มลูกค้าที่มีความต้องการเฉพาะเท่านั้น

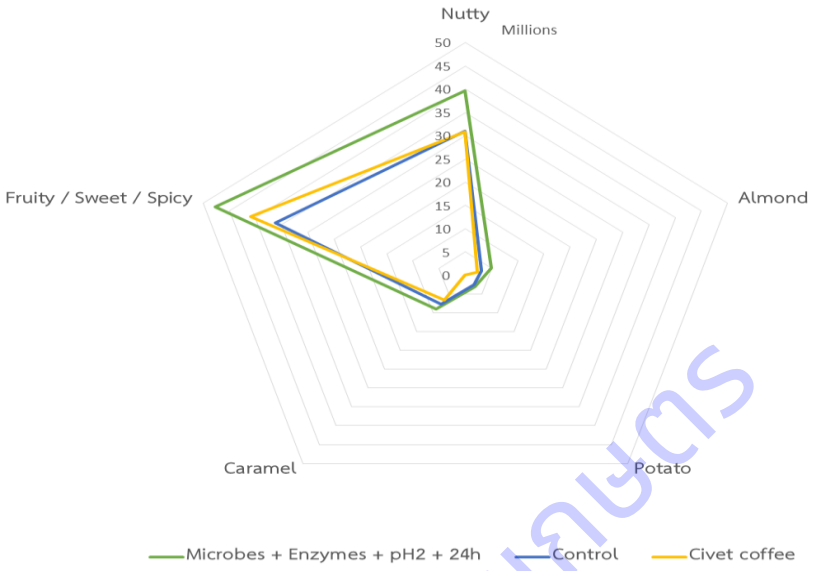


Figure 4 Coffee cupping spider of simulation of animal digestive system (Microbe + Enzyme + pH2 + 24h), control and Civet coffee.

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการหมักกาแฟโดยจำลองแบบระบบย่อยอาหารของสัตว์ เพื่อพัฒนาคุณภาพของกาแฟให้มีความแตกต่างจากการหมักกาแฟแบบดั้งเดิม ลดการทรมานสัตว์ โดยขอบเขตของผลการวิจัยประกอบด้วย จากผลการคัดแยกจุลินทรีย์พบว่าในขี้ชะมดประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ ได้แก่แบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* และยีสต์ *Pichia kudriavzevii* เป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อการหมักกาแฟ และจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด จากผลสอบการหมักแสดงให้เห็นว่าการเติมจุลินทรีย์ผสมกับเอนไซม์เปปซิน เอนไซม์จากตับอ่อน (pancreatin) และ การปรับ pH ในระบบการหมัก มีผลต่อการพัฒนาคุณภาพของกาแฟให้แตกต่างจากการหมักกาแฟแบบเดิม และเพิ่มความซับซ้อนของกลิ่นรสกาแฟเพิ่มมาก แต่ยังมีความเปรี้ยวในกาแฟคั่วและรสชาติค้างในปาก (Aftertaste) ต่ำกว่ากาแฟขี้ชะมด โดยการปรับ pH เริ่มต้นให้อยู่ในช่วง pH 2-3 โดยกรดไฮโดรคลอริก เพิ่มความซับซ้อนของกลิ่นรสได้ดี แสดงให้เห็นว่าการย่อยโครงสร้างของกาแฟด้วยกรดช่วยสารตั้งต้นกลิ่นรสในกาแฟได้ และเมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการหมักพบว่าการเพิ่มเวลาในการหมักจะส่งผลต่อการเพิ่มความซับซ้อนของกลิ่นรสกาแฟยิ่งขึ้น โดยเวลาที่เหมาะสม คือ หมักกาแฟนาน 24 ชั่วโมง การหมักกาแฟโดยจำลองระบบการย่อยอาหารสัตว์สามารถปรับระดับ

ความเข้มข้นของสารเคมีในกาแฟ ได้แก่ Pyrazine, 2,6-dimethyl และ 2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl ซึ่งให้กลิ่นในกลุ่มของถั่ว และ 2-Furanmethanol, acetate และ 2-Methoxy-4-vinylphenol ซึ่งให้กลิ่นในกลุ่มผลไม้ และกลิ่นโทนหวาน ให้เพิ่มขึ้นให้มีปริมาณใกล้เคียงกับกาแฟขี้ชะมดได้

กิจกรรมที่ 3

ศึกษาอัตราส่วนสาร Cafestol และ Kahweol ในกาแฟต่อการพัฒนาคุณภาพและอัตลักษณ์กาแฟเฉพาะถิ่น

Research on ratio content of cafestol and kahweol in coffee responsible to quality and authentication

โกเมศ สัตยาวุธ สุกัญญา นิติยนต์ ฉัตรนภา ข่มอาวุธ และ สุภัทรา เลิศวัฒนาเกียรติ

บทคัดย่อ

คำหลัก : สารคาเฟสโทล, สารคาเวโอล, อัตลักษณ์กาแฟ, แหล่งผลิตกาแฟ, คุณภาพกาแฟ

แหล่งผลิตกาแฟ เป็นจุดขายที่สำคัญเพื่อการสร้างความเชื่อมั่นสู่การซื้อขายกาแฟและผู้บริโภค สาร diterpenes ทีอยู่ในไขมันในกาแฟที่มีปริมาณร้อยละ 18.9 ของกาแฟไทยที่มีกรดลิโนเลอิกและกรดปาล์มิติกเป็นส่วนใหญ่ โดยสารประกอบ diterpenes ที่สำคัญสองชนิดได้แก่ Cafestol และ Kahweol พบว่าในกาแฟ *Coffea Arabica* และ *Coffea Canephora* จะมีสะสมของปริมาณสารกลุ่มดังกล่าวตั้งแต่เวลา 90 วันหลังดอกบานโดยปัจจัยที่ส่งผลต่อการสะสมสารจะขึ้นอยู่กับแหล่งผลิตกาแฟได้แก่ระดับความสูงของพื้นที่ปลูกกาแฟ อุณหภูมิเฉลี่ย ปริมาณน้ำฝนรวมทั้งสายพันธุ์กาแฟ อย่างไรก็ตามเมื่อกาแฟเข้าสู่กระบวนการแปรรูป จะพบเพียงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสาร diterpenes ในกระบวนการที่ผ่านความร้อน โดยเฉพาะกระบวนการตาก การเก็บรักษากาแฟ การคั่วกาแฟและการชงกาแฟ แต่อัตราส่วนของสารทั้งสองชนิดมีปริมาณคงที่ซึ่งเรียกว่า “อัตราส่วนทองคำ” ที่พบในสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติทั่วไป ซึ่งเมื่อตรวจสอบในกรณีศึกษาในพื้นที่ทดสอบเจ็ดจังหวัดพบจุดวิกฤตของการเปลี่ยนแปลงปริมาณสาร diterpenes สองจุดได้แก่การเก็บรักษาและการคั่วกาแฟ ทั้งนี้เพื่อควบคุณภาพของกาแฟให้สม่ำเสมอจึงจำเป็นต้องรักษาระดับของปริมาณสารดังกล่าวโดยการไม่ทำแห้งสารกาแฟเกินอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส การเก็บรักษาสารกาแฟในถุงชนิด HDPE การคั่วกาแฟที่ใช้เวลาไม่น้อยกว่า 8 นาทีและการชงกาแฟที่ 25 – 30 วินาที ดังนั้นปริมาณของสาร Cafestol และ Kahweol จึงบ่งบอกถึงทั้งคุณภาพการผลิตกาแฟและอัตลักษณ์กาแฟตั้งแต่การปลูกตลอดจนการแปรรูป ผลการใช้องค์ความรู้การเปลี่ยนแปลงปริมาณสาร diterpenes กำหนดอัตลักษณ์นี้จึงสามารถนำไปควบคุมการผลิตกาแฟ พื้นที่เพาะปลูกกาแฟ สู่การตรวจสอบย้อนกลับสินค้าพืชกาแฟสู่การค้าขายที่เที่ยงธรรม ส่งเสริมการผลิตกาแฟคุณภาพสู่ระบบการค้าที่เป็นธรรมในอนาคต

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Keywords: Cafestol, Kahweol, Coffee authentication, Coffee Single Origin, Coffee Quality

Coffee Origin builds up the most margin value for building confidence in coffee trading and consumers. Diterpenes are found in coffee fat that accounts for 18.9% in 'Thai Single Origin Coffee' that contains mostly linoleic acid and palmitic acid. The two major diterpenes, Cafestol and Kahweol, were found in *Coffea Arabica* and *Coffea Canephora*. They both accumulate since 90 days after flowering which differ upon to coffee production area complete: the altitude of coffee growing area, the average temperature rainfall, also the coffee varieties. However, the amount of diterpenes could change once again during coffee processing especially during heat treatment process, such as the drying, the storage, the roasting and the brewing. In parallel, the results shown the constant ratio of the two diterpenes, which is called the "golden ratio", found in all living things in nature. When practicing in seven provincial test sites, two critical points of change in diterpenes content were observed: storage and roasting. In order to control the quality of the coffee consistently, it is necessary to maintain the level of the aforementioned substances by not drying the coffee substance above 60°C, stored of the green coffee in HDPE bags, roasted the bean not less than 8 minutes and brew the cup at least 25 – 30 seconds. In conclusion, the amount of Cafestol and Kahweol indicates both the quality of coffee production and coffee identity from planting as well as processing. The effect of using the knowledge of the change in the amount of diterpenes determines this identity and thus can be used to regulate coffee authentication to trace of coffee origin accord to world regulation and promoting the production of quality coffee for further fairtrade system.

บทนำ (Introduction)

สารประกอบที่ส่งผลต่ออัตลักษณ์ของกาแฟที่สำคัญเพื่อจำแนกประเภทนอกจากการตรวจสอบ DNA ของชนิดกาแฟซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูงและใช้เวลานานในการทดสอบ และด้วยมีการกระจายพันธ์ผลิตกาแฟไปทั่วโลกไม่มีกฎหมายแน่นอนในการควบคุมสายพันธ์กาแฟทำให้ไม่สามารถจำแนกแหล่งที่มาของกาแฟได้แน่ชัด การใช้เทคโนโลยีด้านโอมิกซ์จึงเป็นคำตอบของปัญหาการจำแนกอัตลักษณ์ของกาแฟโดยสารประกอบที่สำคัญของกาแฟที่สามารถระบุถึงคุณภาพของกาแฟได้นั้นจะอยู่ในน้ำมันของเมล็ดกาแฟ โดยหลังจากการแปรรูปกาแฟสารประกอบที่ละลายน้ำได้ ได้แก่ สารอินทรีย์ คาร์โบไฮเดรตจะสลายไปในน้ำทิ้งจากการผลิตกาแฟดังนั้นคุณภาพของกาแฟโดยเฉพาะ

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

กลิ่น รสของกาแฟจะคงเหลืออยู่ในส่วนของน้ำมันในเมล็ดกาแฟ (Coffee oil) ซึ่งจากการวิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำมันในเมล็ดกาแฟนั้นจะประกอบไปด้วยสารประกอบ Triacylglycerols กว่าร้อยละ 75 และสาร Diterpene กว่าร้อยละ 20 โดยปริมาณของไขมันจะอยู่ในส่วยของ triacylglycerols และพบว่าปริมาณกรดไขมันในเมล็ดกาแฟจะประกอบด้วยกรดไขมันชนิด C16:0 (Palmitic Acid) และ C18:2 (Linoleic Acid) ทั้งกาแฟอะราบิก้าและโรบัสต้า

สาร Diterpenes ในกาแฟเป็นสารชนิด pentacyclic diterpene alcohols ที่มี kauran skelenton ประกอบด้วยสาร Kahweol และ Cafestol เป็นหลักซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้จะแปรผันไวต่อปริมาณกรด ความร้อนและแสงทำให้การศึกษาเพื่อกำหนดคุณภาพกาแฟระหว่างการแปรรูปเชิงลึกมีการใช้ปริมาณของสารชนิดนี้ได้แก่ ในระหว่างการคั่วกาแฟมีการใช้สาร Cafestol เป็นสารกำหนดคุณภาพการคั่วกาแฟซึ่งผลการศึกษาสามารถกำหนดถึงปริมาณการเบลนกาแฟที่เหมาะสมระหว่างกาแฟอะราบิก้าและโรบัสต้าได้อีกด้วย (Speer, 1993) โดยในประเทศเยอรมันมีการใช้สาร Cafestol ในการกำหนดระดับการคั่วกาแฟที่มีการพัฒนาวิธีการคั่วโดยกระบวนการที่เรียกว่า DIN Method No.10779 (German institute for standardization, 1999) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของประมาณสารทั้งสองชนิดในกระบวนการชงกาแฟ (Silva, 2015) ได้อธิบายถึงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารดังกล่าวระหว่างการทดสอบชงกาแฟเอสเพลสโซว่าปริมาณสารทั้งสองชนิดจะลดลงจาก 58 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม เป็น 30 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม จากอุณหภูมิน้ำที่เปลี่ยนแปลงจาก 70 องศาเซลเซียสเป็น 90 องศาเซลเซียส

การศึกษาปริมาณของสาร Cafestol และ Kahweol ยังให้ความสำคัญถึงผลกระทบทางสุขภาพอีกด้วยโดยมีรายงานว่าสารกลุ่ม diterpene ทั้งสองชนิดนี้ส่งผลต่อการสลายตัวของสารพิษชนิด Aflatoxin B1 โดยผลการทดสอบในเซลล์ตับในหนูทดลองและเซลล์มนุษย์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารทั้งสองชนิดมีปฏิกิริยาต่อต้านสาร Aflatoxin B1 ทำให้เกิดปฏิกิริยา AFBO detoxification หรือการขับสารพิษออกจากเซลล์ตับทั้งในหนูและมนุษย์ (Cavin, 2001) โดยมีการศึกษาเพิ่มเติมตั้งแต่ในแปลงผลิตกาแฟว่ามีการกระจายตัวของสารทั้งสอบชนิดในส่วนต่างๆของกาแฟทั้งผลกาแฟสด ใบกาแฟและต้นกาแฟ ซึ่ง Eloy Dias, 2010 พบว่ามีการกระจายตัวของสาร diterpene ใน endosperm และ perisperm ของกาแฟอะราบิก้าและในเนื้อผล (pericarp) และใบของกาแฟโรบัสต้า แสดงให้เห็นถึงการสะสมของปริมาณสารกลุ่มดังกล่าวตั้งแต่ในแปลงเพาะปลูกตลอดกระบวนการผลิต โดยผลิตภัณฑ์กาแฟที่มีขายตามท้องตลาดพบการกล่าวอ้างถึงส่วนผสมที่สามารถเพิ่มราคาได้และมูลค่าการผลิตได้เช่น 100% อะราบิก้า หรือกาแฟจากพื้นที่สูง (highland coffee) ซึ่งมีการยืนยันถึงผลการใช้สาร diterpenes ทั้งสองชนิดในการควบคุมผลิตภัณฑ์กาแฟในท้องตลาดเช่นการศึกษาของ Schievano,2014 ที่มีการพัฒนาหลักการของ DIN 10779 โดยใช้เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance มาเพิ่มศักยภาพในการตรวจวิเคราะห์และความรวดเร็วของการตรวจสอบปริมาณของตัวอย่างกาแฟ และ Burton,2020 ในการใช้ปริมาณสารทั้งสองชนิดการทำนายแหล่งที่มาของกาแฟคั่วและการพยากรณ์การเบลนกาแฟ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. ประเด็นวิจัย : งานวิจัยชิ้นนี้มุ้งเน้นการวิเคราะห์สารกลุ่ม diterpenes ชนิด Cafestol และ Kahweol ในเมล็ดกาแฟตลอดกระบวนการผลิตตั้งแต่แปลงทดสอบจนถึงผู้บริโภคเพื่อหาอัตราส่วนที่บ่งชี้ถึงอัตลักษณ์ ปัจจัยกำหนดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารและอัตราส่วนที่สามารถใช้จำแนกกาแฟในพื้นที่ปลูกต่างกันได้โดยหลักทางเคมี

2. สถานที่ทำการวิจัย : ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่, ศูนย์วิจัยพืชสวนวาวี(เชียงราย), กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

3. ระยะเวลาดำเนินงาน : ตุลาคม 2563 - กันยายน 2564

4. วิธีการดำเนินการ

1. พัฒนากระบวนการวิเคราะห์สารประกอบ Diterpene ในเมล็ดกาแฟสายพันธุ์ *Coffea Arabica* และ *Coffea Canephora* โดยการใช้การสกัดน้ำมันโดยดัดแปลงจากวิธี AOAC,1990 แล้วพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารสำคัญโดยใช้เครื่อง Gas-Chromatography

2. วิเคราะห์ปริมาณสาร Cafestol และสาร Kahweol ตลอดกระบวนการผลิตกาแฟจำนวน 5 ขั้นตอนตั้งแต่การเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว การหมักกาแฟ การตากกาแฟ การเก็บรักษากาแฟ การคั่วกาแฟและกระบวนการชงประเมินคุณภาพกาแฟ

ขั้นตอนที่ 1 การตากและการเก็บรักษากาแฟ

1. แบ่งสารกาแฟในการตากโดยการสุ่มเมล็ดกาแฟมาอย่างน้อยแปลงทดลองละ 300 กรัม และระหว่างการเก็บรักษาทุกสัปดาห์ตลอดเวลาการเก็บรักษาความชื้นไม่เกินร้อยละ 50 โดยเก็บตัวอย่างกาแฟเพื่อวิเคราะห์ตัวอย่างทุกเดือนเป็นเวลา 10 เดือนเก็บในกระสอบป่าน, ถุงซุปเปอร์ Grain Pro (HDPE), ถุง PP, ถุง PE, ถุง HDPE และกล่องกระดาษหุ้มฟลอย

2. ศึกษาปริมาณสารสำคัญในเมล็ดกาแฟโดยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟฟีแรงดันสูงในเปลือกหุ้มกาแฟภาวะปกติและภาวะที่เกิดจากการหมักโดยศึกษาการผลิตกรดปริมาณสาร Cafestol และ Kahweol

ขั้นตอนที่ 2 การคั่วกาแฟ (Roasting coffee test)

1. ศึกษาคุณภาพเมล็ดกาแฟบ่มเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 10 เดือนในภาชนะที่บรรจุตามกรรมวิธีที่ได้ผลดีที่สุดในขั้นตอนที่ 3 gเพื่อนำมาศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารสำคัญโดยการเลือกการคั่วกลางแบบ Full-city Roast (อุณหภูมิไม่เกิน 240 องศาเซลเซียสเวลา 16 นาที) เพื่อลดการเกิดสารกลุ่ม Polycyclic Aromatic Hydrocarbon ที่เป็นสารพิษในการผลิตกาแฟคั่ว

2. ศึกษาปริมาณสารสำคัญในเมล็ดกาแฟโดยเครื่องโครมาโตกราฟีแรงดันสูงในเปลือกหุ้มกาแฟภาวะปกติและภาวะที่เกิดจากการหมักโดยศึกษาการผลิตกรดปริมาณสาร Cafestol และ Kahweol แบ่งเป็นสารกาแฟไม่คั่ว และคั่วโดยวิธีปกติที่อุณหภูมิ 240 องศาเซลเซียส เวลา 5, 10, 12, 15 และ 20 นาที

ขั้นตอนที่ 3 การชงกาแฟ (Espresso cupping test)

กรมวิชาการเกษตร

1. ศึกษาคุณภาพกาแฟบ่มที่ระยะเวลาไม่น้อยกว่า 10 เดือนโดยใช้บรรจุภัณฑ์ที่ให้ผลดีในขั้นตอนที่ 3 และคั่วที่ให้ผลที่ดีที่สุดในขั้นตอนที่ 4 เพื่อนำมาศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารสำคัญ (อุณหภูมิไม่เกิน 240 องศาเซลเซียสเวลา 16 นาที) เพื่อลดการเกิดสารกลุ่ม Polycyclic Aromatic Hydrocarbon ที่เป็นสารพิษในการผลิตกาแฟคั่วและการพัฒนา Perfect Cupping โดยการทดสอบ Espresso Cupping

2. ศึกษาปริมาณสารสำคัญในเมล็ดกาแฟโดยเครื่องโครมาโตกราฟีแรงดันสูงในเปลือกหุ้มกาแฟภาวะปกติและภาวะที่เกิดจากการหมักโดยศึกษาการผลิตกรดปริมาณสาร Cafestol และ Kahweol โดยใช้กาแฟชงแบบ Espresso ปริมาณ 9 กรัมปล่อยเวลา 5, 10, 15, 20, 25, 30 วินาที ทดสอบการใช้องค์ความรู้ของอัตราส่วนของสาร diterpenes ในพื้นที่แปลงกาแฟพรีเมี่ยมเป็นกรณีศึกษาจำนวน 7 จังหวัดในสถานที่ทดลองและแปลงกาแฟเกษตรกรพรีเมี่ยมเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารสำคัญในพื้นที่จริง ตรวจสอบกระบวนการผลิต จุดวิกฤตและประเมินคุณภาพกาแฟ

ผลการวิจัย (Results)

1. ผลการศึกษากระบวนการวิเคราะห์สารกลุ่ม Diterpene (Cafestol และ Kahweol) และปัจจัยการการเพาะปลูกถึงการตากกาแฟต่อปริมาณสารสำคัญ

สามารถสกัดสาร diterpene จากเมล็ดกาแฟด้วยวิธี Soxhlet วิเคราะห์ด้วย PS-GC-FID ตามวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธี GSLS และ AOAC ใช้เวลาในการสกัดเพียง 4 ชั่วโมงแล้วฉีดสารโดยการใช้กระบวนการ Pulsed split inlet (PS) ที่อุณหภูมิ 330 องศาเซลเซียสใช้ความดันที่ 25 psi วิเคราะห์โดยเครื่อง Gas Chromatography - FID คอลัมภ์ชนิด Elite-5MS column (10m, 0.25mm, 0.15 mm) ที่อุณหภูมเริ่มต้นที่ 50 องศาเซลเซียส (0.25 min) โดยอัตรา 15 C/min ถึง 380 องศาเซลเซียส (10 min) พบปริมาณน้ำมันสกัดจากเมล็ดกาแฟพบว่ามีปริมาณไขมันในประเทศไทยเฉลี่ยอยู่ที่ 10.45 กรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดกาแฟทั้งในกาแฟ *C. arabica* และ *C. canephora* โดยปริมาณสาร Diterpene ester ที่เป็นกลุ่มของ Cafestol และ Kahweol พบว่ามีอยู่เพียงร้อยละ 18.9 เท่านั้นซึ่งส่วนประกอบของกรดไขมันพบว่าเป็นกรดไขมันจำนวน 2 ชนิดหลักได้แก่ กรดไลโนเลอิกและกรดปาล์มิติก นอกจากนี้จะไม่พบสารกลุ่ม Kahweol ในกาแฟสายพันธ์ *C. canephora* ในขณะที่พบสาร Kahweol ปริมาณมากใน *C. Arabica* ประมาณ 516 – 590 mg/100g ส่วนสาร Cafestol นั้นจะพบในกาแฟทั้งสองชนิดมากที่สุดคือ DAF90 – DAF150 ซึ่งเป็นช่วงเก็บเกี่ยวของเมล็ดกาแฟโดยพบข้อสังเกตว่าปริมาณ ratio ของสาร cafestol/kahweol นั้นมีปริมาณคงที่ในช่วงเวลาดังกล่าวทั้งนี้สามารถแบ่ง *C. Arabica* ได้เป็นสองกลุ่มได้แก่พื้นที่สูงกว่าระดับน้ำทะเล 600 เมตรที่มีอัตราส่วนระหว่าง 0.80 – 1.50 และ1,200 เมตรขึ้นไปที่มีอัตราส่วนระหว่าง 0.10 – 0.50 ส่วน *C. canephora* พบอัตราส่วนคงที่ที่ 180 – 200 นอกจากนี้อุณหภูมิและปริมาณน้ำฝนในพื้นที่ปลูกยังส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนอีกด้วย นอกจากนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนของสารกลุ่ม diterpene ทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญในระหว่างการหมักและการตากกาแฟ แต่พบการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

เปลี่ยนแปลงของปริมาณสาร Cafestol และ Kahweol เมื่อเลือกใช้กระบวนการทำแห้งที่มีความร้อนสูงโดยปริมาณสารทั้งสองจะลดลงในปริมาณมากเมื่อเทียบกับชุดควบคุมจากร้อยละ 50 – 75 ซึ่งส่งผลต่อการทดสอบชิมเรื่อง underoast (กาแฟไม่สุก) หรือกลุ่มรสชาติถั่วดิบและถั่วงอก จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการทำความเข้าใจถึงปัจจัยของอุณหภูมิต่อคุณภาพกาแฟต่อไป

2. ปริมาณสาร Cafestol และ Kahweol พร้อมปัจจัยการเก็บรักษาเมล็ดกาแฟภาวะต่างๆที่ส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญ

ผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารสำคัญของกาแฟในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 6 กรรมวิธี พบว่าหลังจากทดสอบเก็บสารกาแฟที่อุณหภูมิและความชื้นควบคุม พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณลดลงของปริมาณน้ำมันโดยรวมและสารสำคัญ โดยพบว่าตั้งแต่เวลาการเก็บรักษา 210 วันถึง 300 วันพบว่าสารกาแฟที่เก็บในชุดควบคุม, ถุงฟลอยและถุง PP seal ปิดสนิทมีปริมาณน้ำมันลดลงอย่างมากโดยเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร Cafestol และ Kahweol ยังพบการลดลงของสารดังกล่าวด้วยแม้อัตรา C/K จะลดลงเพียงเล็กน้อยเกือบคงที่จากค่าเริ่มต้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีเพียง HDPE ที่สามารถควบคุมปริมาณน้ำมันและสารสำคัญ ได้ดี โดยมีถุง PP และ PE ที่สามารถควบคุมได้ใกล้เคียงกันที่ไม่น้อยกว่าร้อยละ 10 ของปริมาณเริ่มต้น โดยสันนิษฐานว่าปริมาณออกซิเจนส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารสำคัญทั้ง 2 ชนิด

3.ปริมาณสาร Cafestol และ Kahweol พร้อมปัจจัยการคั่วเมล็ดกาแฟภาวะต่างๆที่ส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญ

ผลวิเคราะห์ปริมาณสาร Cafestol และ Kahweol ในกาแฟคั่วจาก 7 สถานที่ปลูกกาแฟที่ได้ทดสอบปริมาณการเปลี่ยนแปลงของสารสำคัญใน 4 ขั้นตอนข้างต้นบ่มเป็นเวลา 10 เดือน ทำการทดสอบการคั่วอ่อนแบบ Light Roast (อุณหภูมิไม่เกิน 180 องศาเซลเซียสเวลา 12 นาที), คั่วกลางแบบ Medium Roast (อุณหภูมิไม่เกิน 220 องศาเซลเซียสเวลา 15 นาที) และคั่วเข้มแบบ Dark Roast (อุณหภูมิไม่เกิน 240 องศาเซลเซียสเวลา 20 นาที) เพื่อลดการเกิดสารกลุ่ม Polycyclic Aromatic Hydrocarbon ที่เป็นสารพิษในการผลิตกาแฟคั่วพบว่าปริมาณสารทั้ง Cafestol และ Kahweol มีปริมาณลดลงเมื่อคั่วกลางแบบ Medium Roast และปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อคั่วเข้มแบบ Dark Roast ทุกตัวอย่างโดยยังพบว่าในกาแฟโรบัสต้า (*C. canephora*) จะพบสาร Kahweol น้อยมากเช่นเดียวกับขั้นตอนอื่นและปริมาณอัตราส่วนของ Cafestol/Kahweol ยังเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในระหว่างสถานที่ปลูกกาแฟโดยสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสาร diterpenes ทั้งสองชนิดนี้ไม่ได้ขึ้นอยู่กับเวลาที่ให้ความร้อน สอดคล้องกับ Eloy Dias,2014 ที่อธิบายว่าสาร diterpenes ทั้งคู่จะสลายตัวเป็น dehydrocafestol และ dehydrokahweol หลังจาก 8 นาทีที่เริ่มคั่วกาแฟที่ร้อยละ 60 – 75 และจะมีปริมาณคงที่ต่อจนจบกระบวนการคั่ว

กรมวิชาการเกษตร

4.ปริมาณสาร Cafestol และ Kahweol พร้อมปัจจัยการชงกาแฟภาวะต่างๆที่ส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญ

พบว่าผลของขนาดกาแฟบดว่ากาแฟขนาดเล็ก (FINE 200 – 400 um) มีปริมาณสาร diterpenes มากกว่าขนาดที่บดหยาบทั้งนี้สามารถอธิบายได้จากพื้นที่สัมผัสกับการสกัดที่มากกว่า เมื่อบดละเอียดขึ้นอย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบเวลาสกัด (percolation time) พบว่าระยะเวลาของการกาแฟบดละเอียด (FINE) จากใช้เวลา 35 ± 3 วินาที ขณะที่ COARSE ใช้เวลาเพียง 10 ± 3 วินาที ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารประกอบ diterpenes จะมีปริมาณมากเมื่อมีการสกัดที่นานกว่า โดยเมื่อทำการทดสอบเวลาในการสกัดเปรียบเทียบกับการบดระดับเดียวที่ MEDIUM FINE พบปริมาณสารมากที่สุดที่เวลา 25 – 30 วินาที ทั้งนี้สอดคล้องกับผลการทดสอบชิมที่พบว่าหากใช้เวลาสกัดน้อยกว่า 15 วินาทีกาแฟจะมีรสชาติอ่อนและหากเกิน 30 วินาทีรสชาติจะเข้มไป อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณไขมันทั้งหมด (total lipids) โดยไม่พบปริมาณเปลี่ยนแปลงหลังจากเวลาสกัดที่ 10 วินาที ทั้งนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Caprioli, 2012 ที่ระบุว่าการชงโดยเครื่องเอสเพลสโซนั้นจะมีการสกัดไขมันที่ 10 วินาทีแรกและออกมาเพียงเล็กน้อยหลังจากนั้นโดยหลังจาก 30 วินาทีจะไม่มีไขมันอีกและปริมาณจะลดลงเนื่องจากจะมีน้ำผสมในเครื่องดื่ม ซึ่งกลิ่นรสของกาแฟนั้นจะอยู่ในส่วนของไขมันนี้ดังนั้นผลการทดลองจึงสนับสนุนการพัฒนาการสกัดกาแฟให้ได้ diterpenes สูงและไขมันพอเหมาะที่เวลาระหว่าง 25 – 30 วินาที

5.กรณีศึกษาต่อการเปลี่ยนแปลงสาร Cafestol และ Kahweol ตลอดกระบวนการแปรรูปในพื้นที่ศูนย์การเรียนรู้กาแฟของกรมวิชาการเกษตร

ผลการเปลี่ยนแปลงของสาร diterpenes ตลอดกระบวนการผลิตกาแฟ ได้นำไปทดสอบเป็นกรณีศึกษา เปรียบเทียบกรณีในพื้นที่ทดสอบจำนวน 7 จังหวัดแบ่งเป็น 6 สถานีทดลองและแปลงเกษตรกรทั้งสิ้น 7 แปลงทดสอบและเครือข่ายพื้นที่ละ 40 แปลง รวม 280 แปลงที่ปลูกกาแฟอะราบิก้า และโรบัสต้าในระดับความสูงตั้งแต่ 0 – 1,200 เมตรจากระดับน้ำทะเล การแปรรูปกาแฟที่แตกต่างกันและกระบวนการที่ได้ปรับเปลี่ยนตามระบบการทำกาแฟพรีเมี่ยมของกรมวิชาการเกษตร โดยรายละเอียดตามพบว่าในพื้นที่จริงมีความหลากหลายในกระบวนการแปรรูปกาแฟตั้งแต่การหมักกาแฟทำแห้ง การเก็บรักษา การคั่วกาแฟรวมทั้งการชงกาแฟทั้งนี้ส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสาร diterpenes ภาพรวมที่ สองจุดวิกฤตสำคัญคือการทำแห้งกาแฟ และการคั่วกาแฟทั้งนี้ล้วนเป็นขั้นตอนที่มีความร้อนมาเกี่ยวข้อง สำหรับการเก็บรักษากาแฟนั้นเกษตรกรส่วนใหญ่เก็บรักษากาแฟไม่เกิน 6 เดือนทำให้ปริมาณไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากเหมือนในการทดลอง อย่างไรก็ตามอัตราส่วนของสารทั้งสองชนิดกลับมีปริมาณคงที่ ทั้งนี้เมื่อคำนวณอัตราส่วนดังกล่าวพบว่ามีปริมาณคงที่ตั้งแต่การเก็บเกี่ยวซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัตลักษณ์กาแฟทั้งกาแฟ *C.arabica* และ *C.canephora* จะแปรผันตรงกับแหล่งผลิตเป็นสำคัญ โดยเฉพาะใน *C.canephora* ที่มีปริมาณ Kahweol ต่ำก็ไม่พบการเพิ่มขึ้นของสารดังกล่าวระหว่างกระบวนการแปรรูปแต่อย่างใด ทั้งนี้อัตราส่วนดังกล่าวที่คงที่ตลอดกระบวนการผลิตนี้ถือเป็นอัตราส่วนสำคัญที่ทางผู้ทดลองเรียกว่า อัตราส่วนทองคำ (golden

กรมวิชาการเกษตร

ratio, Table 3) ซึ่งมักพบในธรรมชาติเพื่อใช้อธิบายอัตลักษณ์ที่สามารถบ่งบอกแหล่งผลิตกาแฟได้นั่นเอง

Table 3 Authentication and Identification compounds (Cafestol and Kahweol) ratio in perisperm tissue during *C. Arabica and C. canephora* fruit development (DAF 120) in different regions

Varieties	*Region*	*Cafestol (mg/100g)* [a]	*Kahweol (mg/100g)* [a]	*Cafestol/ Kahweol Ratio*	*Cupping Score*	*Cupping Characteristics*
C. Arabica	Khun Wang (Chiang Mai)	272.55 ± 29.9	1009.48 ± 71.3	0.27	85 – 87/100	Floral with touch of violet (Geranium)
	Wawi (Chiang Rai)	413.88 ± 30.9	985.43 ± 20.3	0.42	88 – 90/100	Spice with hint of chocolate
	Loei (Loei)	97.90 ± 12.36	890.01 ± 25	0.11	78 – 80/100	Acacia (citrus floral)
	Khao koh (Petchabun)	674.78 ± 25.6	758.18 ± 30.5	0.89	78 – 80/100	Corn and Bittersweet
	Muser (Tak)	943.75 ± 12.8	699.08 ± 12.5	1.35	82 – 85/100	Grain and Citrus-Berry
C. canephora	Sawi (Chumporn)	227.52 ± 37	1.255 ± 0.512	181.29	87 – 91/100	Bergamot and Pepper
	Than to (Satun)	406.27 ± 15.2	2.081 ± 0.122	195.23	78 – 80/100	Cashew nut and Walnut
	Mae Ramad (Tak)	387.09 ± 2.5	4.345 ± 0.13	89.088	78 – 81/100	Peanut and Green pea

Data are means ± standard deviations. DAF, days after flowering

[a] Measurement conducted using gas chromatography analysis.

Figure 5 Summarize of Diterpenes variation during coffee processing life cycle with the critical point of diterpenes amounts which refered to different processing techniques

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

กรมวิชาการเกษตร

สารประกอบกลุ่ม diterpenes สามารถใช้ในการจำแนกอัตลักษณ์กาแฟตามหลักการของ chemometric กล่าวคือกลุ่มสารให้กลิ่นในกาแฟที่อยู่ในส่วนของกรดไขมันในกาแฟ อีกทั้งสารกลุ่มนี้ยังส่งผลต่อคุณภาพกาแฟทั้ง *C. arabica* และ *C. canephora* ทั้งนี้ผลการทดลองชี้ให้เห็นถึงปริมาณของ diterpenes ที่แปรผันตามแหล่งเพาะปลูกกาแฟระหว่างร้อยละ 18.9 สำหรับกาแฟในประเทศไทยรวมทั้งกระบวนการแปรรูปกาแฟยังส่งผลต่อปริมาณของสารที่แตกต่างกันโดยเฉพาะขั้นตอนที่มีความร้อนเกี่ยวข้องได้แก่ การตาก การเก็บรักษา การคั่วและการชงกาแฟ ทั้งนี้เพื่อควบคุณภาพของกาแฟให้สม่ำเสมอจึงจำเป็นต้องรักษาระดับของปริมาณสารดังกล่าวโดยการไม่ทำแห้งสารกาแฟเกินอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส การเก็บรักษาสารกาแฟในถุงชนิด HDPE การคั่วกาแฟที่ใช้เวลาไม่น้อยกว่า 8 นาทีและการชงกาแฟที่ 25 – 30 วินาที โดยเมื่อพิจารณาลงลึกถึงอัตราส่วนระหว่างสาร Cafestol และ Kahweol ที่เป็นสารประกอบหลักกลับพบว่าอัตราส่วนดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากหลังจากเก็บเกี่ยวหรือแทบจะคงที่ อัตราส่วนดังกล่าวนี้จึงสามารถใช้จำแนกอัตลักษณ์กาแฟเพื่อการตรวจสอบย้อนกลับสินค้ากาแฟในการค้นหาแหล่งผลิตโดยเฉพาะการจำแนกอัตราการผสมระหว่างกาแฟสายพันธุ์เศรษฐกิจหลักทั้ง *C. arabica* และ *C. canephora* โดยสาร Kahweol ที่จะพบปริมาณมากในกาแฟอะราบิก้าและน้อยมากหรือแทบไม่มีในกาแฟโรบัสต้า ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ากระบวนการผลิตกาแฟตั้งแต่การเพาะปลูกที่เริ่มมีการสะสมปริมาณสารทั้งสองชนิดตั้งแต่วันที่ 90 หลังดอกบาน (DAF90) ในพื้นที่เพาะปลูกกาแฟที่ระดับความสูงแตกต่างกัน ส่งผลถึงอุณหภูมิพื้นที่เพาะปลูก และปริมาณน้ำฝนที่ทำให้อัตราส่วนของสารทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันตามแหล่งผลิตกาแฟ แต่เมื่อเข้าสู่กระบวนการแปรรูปแม้จะมีการเปลี่ยนแปลงในด้านปริมาณของสารทั้งสองชนิดจากปัจจัยสำคัญคือความร้อน ในกระบวนการทำแห้ง กระบวนการเก็บรักษากาแฟในบรรจุภัณฑ์ต่างชนิด การคั่วกาแฟรวมถึงการชงกาแฟ โดยเมื่อกาแฟผ่านความร้อนสูงพบการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารทั้งสองชนิดสูงขึ้นซึ่งเป็นไปในลักษณะคู่ขนาน ทำให้ตอบโจทย์สมมติฐานของหลักการใช้ chemometric ของ diterpenes ในกาแฟเพื่อใช้ในการตรวจสอบย้อนกลับของสินค้ากาแฟในการทดสอบระดับแปลงทดสอบเพื่อเป็นกรณีศึกษาในพื้นที่ 7 จังหวัดในประเทศไทยก็ยังพบว่าปริมาณสาร diterpenes ยังสามารถตอบโจทย์เพื่อใช้ระบุแหล่งกำเนิดหรืออัตลักษณ์กาแฟ โดยจุดวิกฤตที่สำคัญนั้นยังเป็นกระบวนการที่ทางเกษตรกรให้ความร้อนในเมล็ดกาแฟและก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารและคุณภาพของเมล็ดทำให้เกิดลักษณะเฉพาะตัว แต่อัตราส่วนของ Cafestol และ Kahweol นั้นยังคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง อาจกล่าวได้ว่าอัตราส่วนดังกล่าวถือเป็นอัตราส่วนทองคำ (golden ratio) ที่เป็นสิ่งที่พบในธรรมชาติทั่วไปเพื่อใช้ระบุถึงอัตลักษณ์แหล่งกำเนิด กำกับอัตลักษณ์ของกาแฟและบ่งบอกคุณภาพ จึงถือเป็นต้นแบบการควบคุมแหล่งผลิตและกระบวนการผลิตกาแฟสู่การควบคุมคุณภาพอีกทั้งกำหนดอัตลักษณ์ของกาแฟเฉพาะถิ่นที่พัฒนาต่อยอดได้เพื่อความมั่นใจในการซื้อขายและการบริโภคกาแฟสำหรับตลาดกาแฟในปัจจุบันที่มีการแข่งขันการผลิตกาแฟและกลยุทธ์การตลาดที่เปลี่ยนแปลงตลอดเวลา

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

ผลการวิจัยของโครงการ เน้นผลผลิต output ตรงเป้าประสงค์ของโครงการ ตามวัตถุประสงค์ประกอบด้วยต้นแบบกระบวนการใหม่ระดับกึ่งอุตสาหกรรมจำนวน 2 กระบวนการ ได้แก่เทคโนโลยีการหมักจำลองกระเพาะอาหารสัตว์ (Bio-processing techniques) และเทคโนโลยีการบำบัดน้ำเสียจากการหมักกาแฟ, ต้นแบบผลิตภัณฑ์ระดับอุตสาหกรรมและกึ่งอุตสาหกรรมจำนวน 2 ต้นแบบ ได้แก่ เชื้อจุลินทรีย์สำหรับหมักกาแฟคุณภาพจำนวน 1 ชนิดและสารเคลือบส้มจากเพคตินสกัดจากเชอร์รี่กาแฟและเมือกกาแฟ, องค์ความรู้ใหม่ จำนวน 1 องค์ความรู้ได้แก่ เทคโนโลยีการใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบอัตลักษณ์กาแฟโดยหลักการ Chemometric โดยการวิเคราะห์สาร Diterpenes นอกจากนี้ยังมีการใช้ประโยชน์เชิงสาธารณะและการฝึกอบรม ได้แก่ เทคโนโลยีการหมักกาแฟคุณภาพ ภายใต้โครงการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกาแฟพรีเมี่ยมปี 2564

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, กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร 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.

กรมวิชาการเกษตร

พิทักษ์ อาภาศิริผล. 2529). *คำแนะนำการปลูกกาแฟ*. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

พัชนี สุวรรณวิศาลกิจ. 2545. กาแฟคั่ว. วารสารอาหาร: เรื่องของกาแฟที่คุณไม่อาจรู้. วันที่ค้นข้อมูล 10 กุมภาพันธ์ 2556, เข้าถึงจาก http://www.nescafe.co.th/coffee_abc_th_th.axcms

ไพฑูรย์ หมายมั่นสมสุข. 2535. คู่มือวิเคราะห์น้ำเสีย. สมาคมวิศวกรสิ่งแวดล้อมไทยและ World Environment Center, พิมพ์ครั้งที่ 2.

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.

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

Caprioli, G., Cortese M., Cristalli G., Maggi F., Odello L., Ricciutelli M., Sagratini G., Sirocchi V., Tomassoni G. & S. Vittori. 2012. Optimization of espresso machine parameters through the analysis of coffee odorants by HS-SPME-GC/MS. J. Food Chemistry 135(3):1127-1133.

กรมวิชาการเกษตร

Cavin, C., Mace, K., Offord, E.A. & B. Schilter. 2001. Protective effects of coffee diterpenes against aflatoxin B1-induced genotoxicity : mechanisms in rat and human cells. Food Chem Toxicol. 39(6):549-56.

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.

Eloy Dias R.C, A. Ferreira de Faria-Machado, A. Zerlotti Mercadante, N. Bragagnolo and M. de Toledo Benassi. (2014). Roasting Process affects the profile of diterpenes in coffee. Eur. Food Res. Technol. DOI 10.1007/s00217-014-2293.

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.

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.

ลิขสิทธิ์กรมการ

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.

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 Publisher Ltd.

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

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

กรมวิชาการเกษตร