รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : วิจัยและพัฒนากาแฟ

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนากระบวนการหมักกาแฟอาราบิก้าคุณภาพ

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การพัฒนาต้นแบบเครื่องหมักกาแฟ

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Development of coffee fermenter prototype

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นายโกเมศ สัตยาวุธ	กวป.
ผู้ร่วมงาน	นางสาวสุกัญญา นิติยนต์	กวป.
	นางสาวฉัตรนภา ข่มอาวุธ	ศกล.เชียงใหม่
	นางสุภัทรา เลิศวัฒนาเกียรติ	สวส.

5. บทคัดย่อ

ถังหมักกาแฟ ถือเป็นนวัตกรรมการแปรรูปกาแฟเพื่อพัฒนาคุณภาพที่ลดต้นทุนการผลิต ช่วยควบคุมคุณภาพกาแฟพัฒนาโดยหลักการ Single stage pilot ประกอบด้วยการตัวถังและตะแกรงกรองหัวเชื้อเพื่อลดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บริเวณผนัง ใช้ระบบระบบเติมอากาศแบบอากาศยก (air-life fermenter) ที่เกิดจากวงจรการหมุนเวียนภายในและภายนอกทำให้เฟสของเหลวผสมกันได้อย่างมีประสิทธิภาพลดแรงเฉือนเพื่อให้เกิด flux air ที่ไม่น้อยกว่า 100 ลิตรต่อวันโดยใช้ท่อจ่ายอากาศที่ทำจากวัสดุเดียวกับถัง นอกจากนี้มีการออกแบบระบบเก็บเมล็ดกาแฟจากท่อเก็บเมล็ดด้านหน้าและง่ายต่อทำความสะอาด และเก็บหัวเชื้อเพื่อการใช้ประโยชน์ในการสกัดสารสำคัญหรือการใช้ซ้ำ โดยผลการทดสอบ Chloramphenical พบสภาวะกรดที่เหมาะในการใช้ถังหมักอยู่ที่ความเป็นกรดโดยกรดทาทาริกที่ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและผลจากการหมักแบบ Penicillin จะใช้ปัจจัยของปริมาณน้ำร้อยละ 75 ถึง 100 ของปริมาณเมล็ดกาแฟที่เวลาไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง การประยุกต์ใช้ซึ่งถังหมักกาแฟในพื้นที่ต้นแบบให้ผลตอบรับที่ดี และผลผลิตจากถังหมักยังส่งผลต่อการลดความขมจากการผลิตกรดอินทรีย์ที่มากเกินไปจากบ่อหมักปกติ เพิ่มการผลิตสารให้กลิ่นกลุ่ม Ethanone (กลิ่นผลไม้), ∂-butyrolactone (กลิ่นนมเนย), β-damascenone (กลิ่นดอกไม้) และสารกลุ่ม Phenol (กลิ่นผลไม้) และยังสามารถควบคุมปริมาณหรือลดคาเฟอีนได้ร้อยละ 38 ในบางชุดการทดลองซึ่งให้ผลทดสอบที่ดีในแปลงทดสอบอีกด้วย โดยต้นทุนการใช้ถังหมักอยู่ที่ 0.45 บาทต่อกิโลกรัมต่างจากวิธีปกติที่ 1.2 บาทต่อกิโลกรัมส่งผลต่อการลดต้นทุน เวลาและแรงงานในการผลิตกาแฟอย่างมีประสิทธิภาพ

คำหลัก : ถังหมักกาแฟ, ระบบเติมอากาศแบบยก, กาแฟอะราบิก้า, เทคนิคเอเอเอฟ, การหมักเมือกกาแฟ

Abstract

Coffee fermenter are coffee processing innovations to improve quality that reduces production costs, helps control the quality of coffee, developed by the ‘Single stage pilot’

กรมวิชาการเกษตร

principle. It consists of a body and sieves to reduce the growth of microorganisms on the walls, using the air-life system formed by the internal and external circulation circuit, the liquid phase mixes efficiently and reduce the shear force to produce flux air of at least 100 liters per day. In addition, the system is designed to collect coffee beans from the front grain tube and easy to clean and suitable for using inoculum. Optimizing results from Chloramphenical trial founds the optimum acidity of the fermentation tank was at 4.0 mg/l (tartaric acid) and 'Penicillin trial' show the condition of two important factors of 75 to 100% water-filled and fermentation time should be at least 24 hours. The filed application of coffee fermenter gave good feedback. Furthermore, there are more convenience data support the use of fermenter which reduce the bitterness from coffee fermentants of excessive organic acids and increase production of ethanone (fruit flavor), ∂-butyrolactone (Milk butter flavor) and β-damascenone. Coffee fermenter was also able to control or reduce caffeine by 38% in some trials. The cost of using coffee fermenter rest to 0.45 baht per kilogram, different from the normal method at 1.2 baht per kilogram. It exposed that this coffee innovation could reduce working time, labor and optimize coffee production more efficiently and sustainably.

Keywords: Fermenter, Air-lift system, Arabica coffee, AAF techniques, demucilage fermentation

กรมวิชาการเกษตร

6. คำนำ

อุตสาหกรรมการผลิตกาแฟระดับใหญ่มีการขยายตัวมากทำให้ความต้องการเมล็ดกาแฟเพิ่มสูงขึ้นจึงจำเป็นต้องแปรรูปทันทีหลังจากเก็บเกี่ยว ส่งผลให้มีการนำเครื่องจักรและเทคโนโลยีมาใช้ในการผลิตตั้งแต่การเก็บเกี่ยวจนถึงการบริโภค ขั้นตอนสำคัญของการเพิ่มมูลค่ากาแฟคือการหมักกาแฟที่มีความหลากหลายมากในปัจจุบันก่อให้เกิดรสชาติเฉพาะ และเพิ่มมูลค่าในการซื้อขายเพื่อกำหนดอัตลักษณ์กาแฟเฉพาะถิ่นหรือพื้นที่ผลิตได้ โดยปัจจุบันมีการหมักกาแฟหลายรูปแบบได้แก่การหมักแบบเปียกหรือการใช้น้ำตลอดกระบวนการหมัก (Wet Fermentation) การหมักแบบกึ่งเปียกหรือการใช้น้ำบางส่วนระหว่างการหมัก (Semi-Wet Fermentation) และการหมักแบบแห้งหรือไม่ใช้น้ำระหว่างการหมัก (Dry Fermentation) ซึ่งเกษตรมักใช้การหมักกับบ่อปูนหรือถังพลาสติกซึ่งสร้างปัญหาในการควบคุมการผลิต การควบคุมคุณภาพ รวมทั้งการจัดการปริมาณหัวเชื้อที่อาจเกิดการปนเปื้อนระหว่างการหมัก นอกจากนี้ความนิยมการพัฒนากาแฟชนิดไมโครลอท (microlot) หรือปริมาณน้อยที่มีคุณภาพ ยังมีเพิ่มมากขึ้น ดังจะเห็นได้จากมีการเพิ่มความหลากหลายของผลิตภัณฑ์กาแฟเป็นสินค้าไมโครลอทแบบต่างๆทำให้สามารถเพิ่มราคาได้ อย่างไรก็ตามการจัดการไมโครลอทนี้จำเป็นต้องใช้ถังหมักที่สามารถควบคุมได้เพื่อการผลิตที่แม่นยำให้ตรงกับความต้องการ หรือเพื่อเป็นการทดลองก่อนนำไปขยายระดับสเกลใหญ่ได้ ถังหมักจึงเป็นอุปกรณ์พื้นฐานในการพัฒนาคุณภาพกาแฟสู่กาแฟพรีเมี่ยมหรือกาแฟพิเศษของเกษตรกรที่สำคัญ

ถังหมักหรือถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Fermenter/ Bioreactor) ถูกนำมาใช้ในการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ในระดับขยายขนาดจากระดับห้องปฏิบัติการ โดยอาศัยแหล่งความรู้จากถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการ

เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางคือถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใบกวน (stirred tank reactor) ที่มีใบกวนกังหันแบบแบน (flat turbine blade) ทุกวันนี้มีการพัฒนาถังหลากหลายรูปแบบเพื่อวัตถุประสงค์จำเพาะ แต่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยส่วนใหญ่ที่ได้มาตรฐานยังถูกออกแบบขึ้นมาเพื่อเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการแปรรูปหรืออุตสาหกรรมอาหารด้วยมีมูลค่าสูงและการนำไปใช้ในพื้นที่นอกเขตห้องปฏิบัติการ จากข้อมูลงานวิจัยการพัฒนาถังหมักเพื่อการแปรรูปนั้นจะแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลักคือ ถังหมักที่มีการกวนโดยอาศัยแรงเชิงกล (mechanically agitated bioreactor) และถังหมักที่มีการกวนโดยอาศัยแรงดันจากการอัดอากาศและไม่มีการกวน (pneumatically agitated and non-agitated bioreactors) ซึ่งจะประกอบด้วยสองส่วนหลักได้แก่วิธีการกวน (agitation method) และลักษณะของภาชนะ (vessel) ตามการแบ่งการหมักเพื่อใช้ในหลักการผลิตสารสำคัญใน **Table 1**

Table 1 Type of Processing Fermenter Model for Fruit processing approach

Type of Fermenter	*Application Sample*
Mechanically Agitated Fermenter	Stirred tank fermenter Rotating drum fermenter Spin filter fermenter
Pneumatically agitated fermenter and non-agitated fermenter	Simple aeration fermenter Bubble column fermenter Airlift fermenter Packed bed fermenter Fluidized bed fermenter Membrane fermenter

Source: An overview of fermenter and the design considerations enhance its productivity (pharmagologyonline 1:261-301, 2010)

กรมวิชาการเกษตร

การพัฒนาต้นแบบถังหมักกาแฟต้นทุนต่ำนี้จะยึดการใช้การกวนแบบแรงดันอากาศที่ทำให้เกิดแรงเฉือนน้อยเพื่อการลอกเมือก (demucilage) โดยใช้การหมักจากเชื้อจุลินทรีย์เป็นหลัก ดังนั้นใบพัดจึงไม่จำเป็นในต้นแบบดังกล่าว นอกจากนี้ฟองอากาศที่มีทำให้เกิดแรงเฉือนน้อยสามารถถนอมเมล็ดกาแฟ หรือแม้แต่หากนำไปใช้กับพืชชนิดอื่นก็สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้เป็นอย่างดี ข้อด้อยของถังหมักแบบนี้คือการเกิดฟอง (foam) จากการเติมอากาศเข้าไปในปริมาณมากและการเจริญของเซลล์ที่ผนังของภาชนะเพาะเลี้ยง Paek et al. (2001) ได้อธิบายปรากฏการณ์นี้ว่าเกิดจากเส้นผ่านศูนย์กลางของภาชนะเพาะเลี้ยงส่วนบนเท่ากับบริเวณเพาะเลี้ยงและแนะนำในการแก้ไขปัญหาในการออกแบบให้ส่วนบนของภาชนะเพาะเลี้ยงมีเส้นผ่านศูนย์กลางที่ใหญ่ขึ้นและ/หรือออกแบบเป็นรูปลูกโป่งเพื่อลดการกองตัวของหัวเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

การหมักเมือกกาแฟที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์เป็นหัวใจในการพัฒนาคุณภาพจำเป็นต้องมีการเติมอากาศโดยเฉพาะเทคนิคการหมักแบบ AAF techniques โกเมศ (2560) ซึ่งการพัฒนาระบบการจ่ายฟองอากาศให้มี

ประสิทธิภาพจึงเป็นสิ่งสำคัญโดยการพัฒนาระบบจากถังหมักแบบอากาศยก (air-life fermenter) ที่เกิดจากวงจรการหมุนเวียนภายในและภายนอกทำให้เฟสของเหลวผสมกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยข้อดีของระบบนี้คือแรงเฉือนที่สม่ำเสมอและการใช้พลังงานต่ำ นอกจากนี้ยังออกแบบง่ายแต่มีการเกิดฟองระหว่างการเติมอากาศเข้าไปในปริมาณมากจึงมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในรอบภาชนะ อย่างไรก็ตามถังหมักแบบยกอากาศและแบบคอลัมภ์ฟองอากาศสามารถใช้หมักและแปรรูปได้เป็นระยะเวลานานมีการปนเปื้อนต่ำ สามารถกำจัดความเสี่ยงอันเนื่องมาจาก Stirred Sharts และ Seal ที่พบในถังหมักแบบใบกวนซึ่งข้อแตกต่างสำคัญของระบบอากาศยกและแบบคอลัมน์ฟองอากาศคือระบบการหมุนเวียนและลักษณะการเคลื่อนที่แบบไดนามิกของน้ำ **Figure 1** โดยในถังหมักแบบอากาศยกนั้นการหมุนเวียนของของเหลวและการผสมถูกกำหนดโดยอัตราการไหลของอากาศ (gas flow rate) ดังนั้นความเร็วของการหมุนเวียนของน้ำหมักกาแฟจะเกิดเพียงจาก Air flow meter เพียงอย่างเดียวและไม่ต้องใช้กลไกการหมุนเวียนจากระบบการกวนเพิ่มเติม เมื่อเปรียบเทียบกับระบบคอลัมภ์เติมอากาศแม้กลไกการยกอากาศจะเหมือนกันมากในทั้งสองระบบ แต่ถังหมักระบบนี้จะสามารถใช้กับผลผลิตที่มากได้และมีการกระจายตัวของอากาศที่สม่ำเสมอ ซึ่งหากถังหมักมีขนาดใหญ่และสูงถังหมักแบบเติมอากาศจะมีการกระจายตัวอากาศที่ต่ำ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ก้นถังมีการเจริญเติบโตช้ากว่าบริเวณด้านบน

กรมวิชาการเกษตร

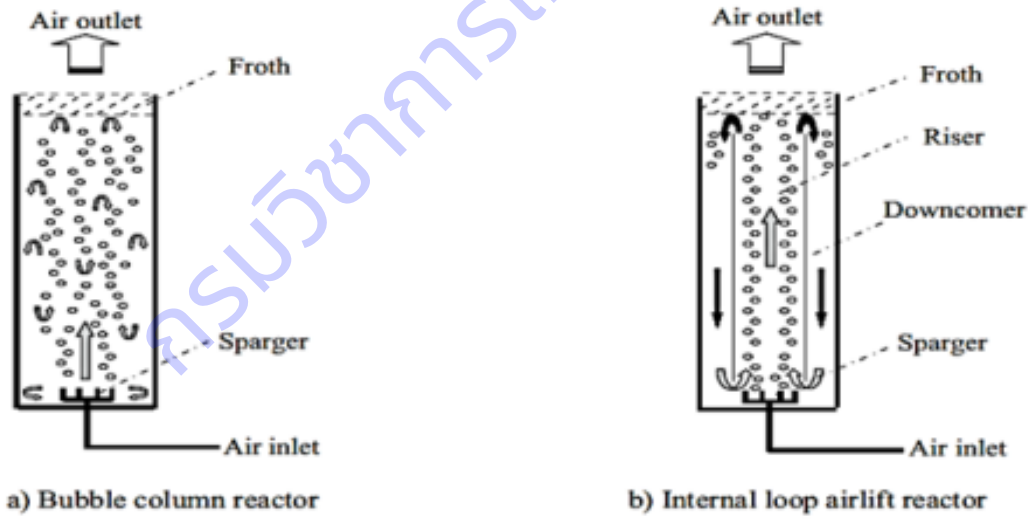


Figure 1 Comparison of Bubble column reactor and internal loop airlift reactor due to water dynamic bubble

Source: 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

การประยุกต์ใช้ถังหมักเพื่อการแปรรูปผลิตผลทางการเกษตรมีความสนใจเพิ่มมากขึ้น โดยมีการใช้ถังพลาสติกราคาถูกในการพัฒนากระบวนการหมักกาแฟพบว่าสามารถควบคุมการผลิตกาแฟระดับไมโครลอทได้ง่าย

และหลากหลายในการทดลองการพัฒนากระบวนการหมักแบบใหม่ นอกจากนี้ยังง่ายต่อการถ่ายหัวเชื้อของการหมักจากจุลินทรีย์ต้นแบบ (innoculated) ง่ายในการเก็บเกี่ยวผลผลิตและลดการสูญเสียผลผลิต ในการทดลองการหมักระดับใหญ่ที่ต้องใช้ปริมาณมากรวมทั้งปัจจัยการหมักได้แก่ น้ำและของเสียจากการหมักที่หากเกิดการเสียหายทำให้เกิดมลภาวะต่อแหล่งน้ำทางธรรมชาติของชุมชน การใช้ถังหมักนั้นยังสามาถเพิ่มพื้นที่ผิวของการขยายหัวเชื้อเพื่อการผลิตที่สม่ำเสมอป้องกันการปนเปื้อน โดยเมื่อเปรียบเทียบกับระบบเดิมนั้นมีการจัดการที่ง่าย ซึ่งเมื่อมีการประยุกต์ใช้ระบบอื่นเพื่อพัฒนาการหมักจะสามารถจัดการได้ง่ายกว่าและควบคุมต้นทุนการผลิตได้เป็นอย่างดี

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1.วัสดุทดลอง

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

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

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

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีเพื่อใช้ในการทดสอบการหมัก ได้แก่

(1) Tartaric Acid

(2) Diammonium sulfate

2.1 สารเคมีเพื่อใช้เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยใช้น้ำ Demineralize ในการทำละลาย เตรียมที่ความเข้มข้น 10 $mg.L^{-1}$ เก็บในขวดทึบเพื่อป้องกันแสงและเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 สัปดาห์ คือ

(3) Lactic acid

3. เครื่องมือ

3.1 High Performance Liquid Chromatography – Ultraviolet ที่มีปั๊มแปรผันแรงดันต่ำ(ยี่ห้อ Shimadzu LC-6A), หัวฉีดชนิด Manual injection ที่แบ่งปริมาณฉีดที่ 20 ไมโครลิตร, การ์ดคอลัมน์ชนิด C18 Silica, คอลัมน์ชนิด C18 Silica (EnviroSep-PP-PAH (EPA Method 610) 125 x 4.6 mm), ตัวตรวจจับสัญญาณชนิด DAD (Shimadzu SPD-SAV),เครื่องแปรผล (รุ่น SPD-SAV) และโปรแกรมแปรผล (LCanalysis), ความเร็วของ Mobile Phase ที่ 0.8 $mL.min^{-1}$ และใช้เวลาในการวิเคราะห์ 30 นาที

กรมวิชาการเกษตร

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

3.3 Spectroscopy Ultraviolet

3.4 Bioreacter ยี่ห้อ Infors HT ที่มีโปรแกรมควบคุม Eve

3.5 เครื่องวิเคราะห์จมูกอิเล็กทรอนิกส์ รุ่น E251 พัฒนาโดยบริษัทเดโก้ประเทศไทย ปี 2554

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

- วิธีการ

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

กรมวิชาการเกษตร

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

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

-เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2561 – กันยายน 2563

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

กองวิชาการและแผน

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

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) สามารถกระจายอากาศได้ทั่วถังดีที่สุดซึ่งระบบเทอบีนจะควบคุมการลดลงของแก๊สออกซิเจนและการเพิ่มขึ้นของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในระดับที่สม่ำเสมอเมื่อใช้ปั้มจ่ายอากาศขนาด 6 ลิตรต่อนาที โดยพบการไหลออกของอากาศ (fluxed air) ในอัตราที่คงที่ที่ 100 ลิตรต่อวันตามผลใน **Figure 3**

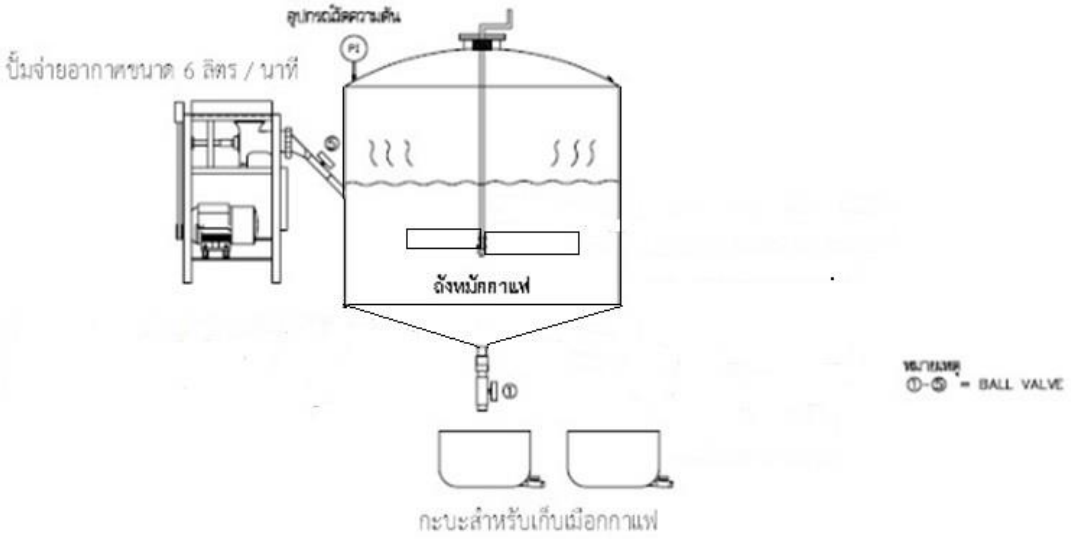


Figure 2 Green print of Demo-Coffee Fermenter

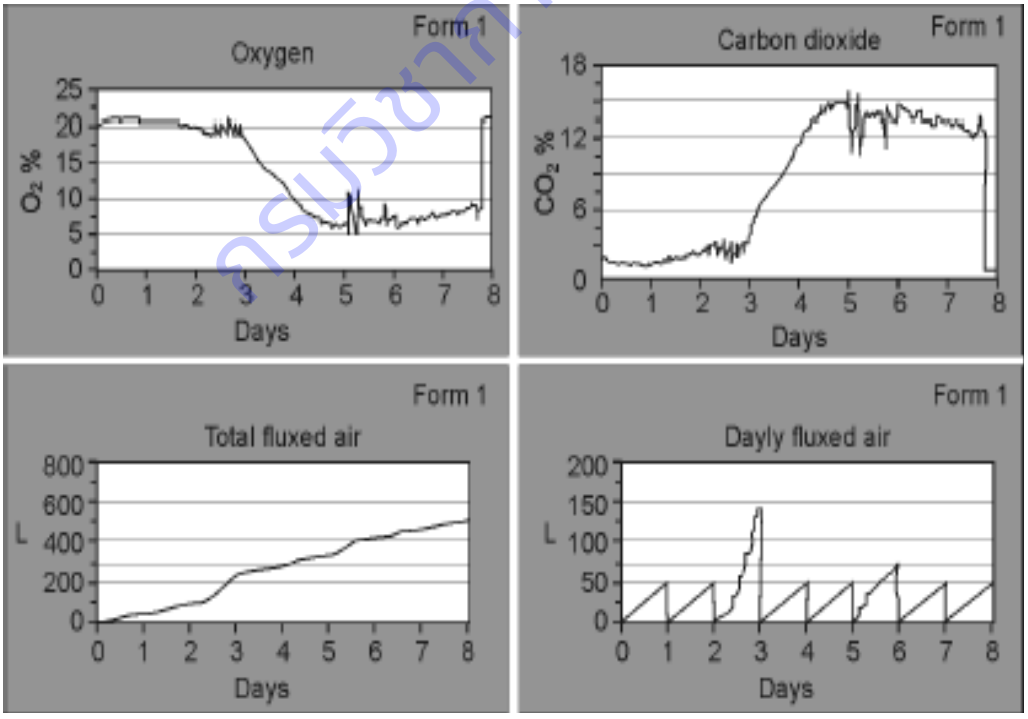


Figure 3 Control of Oxygen and Carbon dioxide levels in the pre-pilot rotating drum bioreactor by using fresh sterile air fluxes.

กรมวิชาการเกษตร

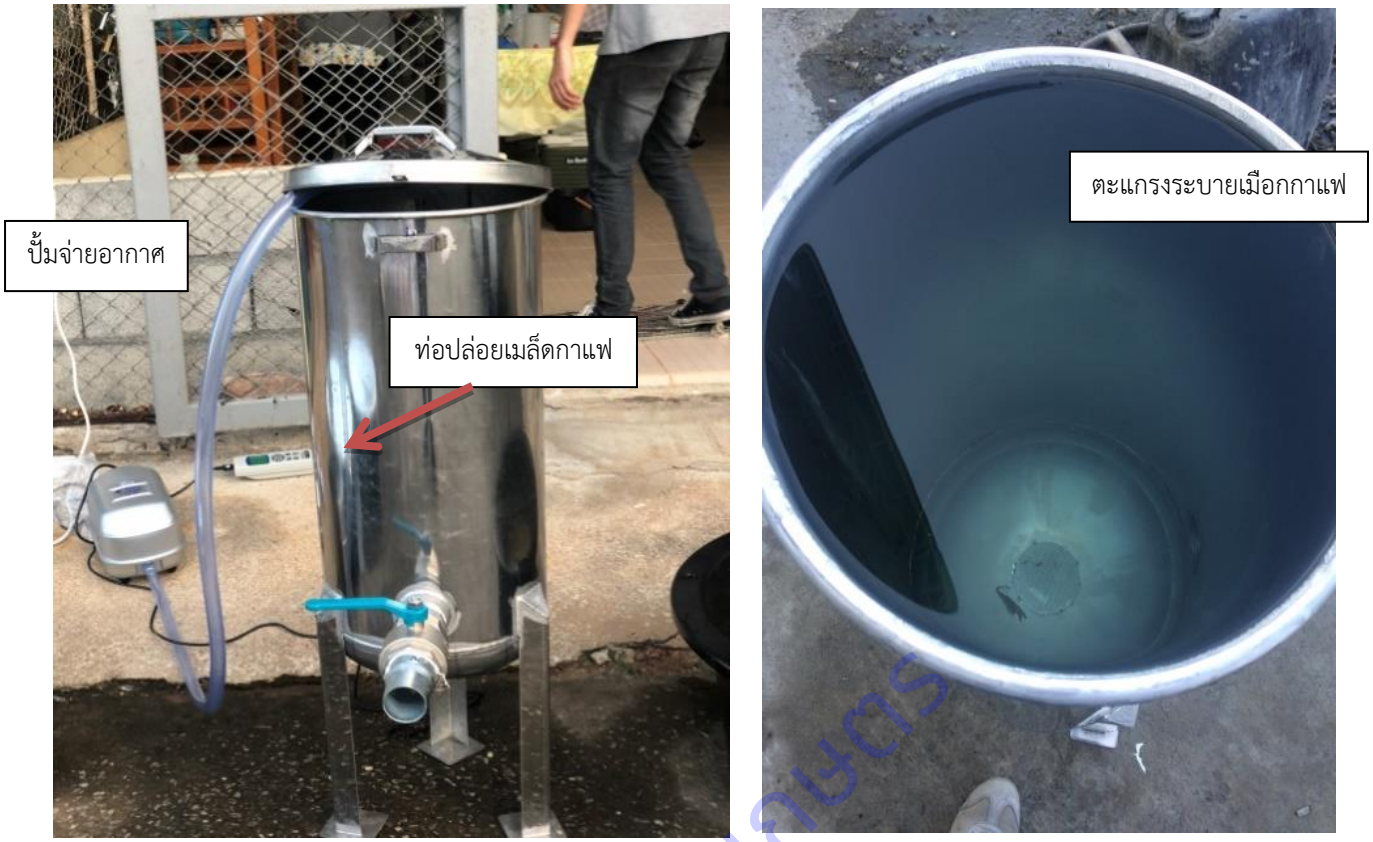


Figure 4 Demonstration model of Coffee Fermenter model 1 – CFerm1

ทดสอบประดิษฐ์ต้นแบบถังหมักขนาด 50 ลิตรใน **Figure 4** โดยใช้วัสดุสแตนเลสเกรด 304 หรือ 18/8 ซึ่งเป็นสแตนเลสที่มีสารโครเมี่ยมอยู่ร้อยละ 18 นิกเกิ้ลร้อยละ 8 โดยมีความสามารถทนต่อการเกิดสนิม (Oxidation) และทนการกัดกร่อนต่างๆได้เป็นอย่างดี เนื่องจากมีสารนิกเกิ้ลจึงทำให้แม่เหล็กดูดไม่ติด มีปริมาณคาร์บอนต่ำจึงมีความเหนียวสูง และตรงตามมาตรฐาน มอก. สำหรับถังบรรจุน้ำสำหรับบริโภคมีท่อระบาย 2 จุด ได้แก่ (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

กรมวิชาการเกษตร

2. ผลการทดสอบการหมักจากต้นแบบเครื่องช่วยหมักล้อตามการหมัก

2.1 ผลการทดสอบการหมักแบบ Chloramphenical ที่สามารถกำหนดปริมาณกรดด่างที่เหมาะสม

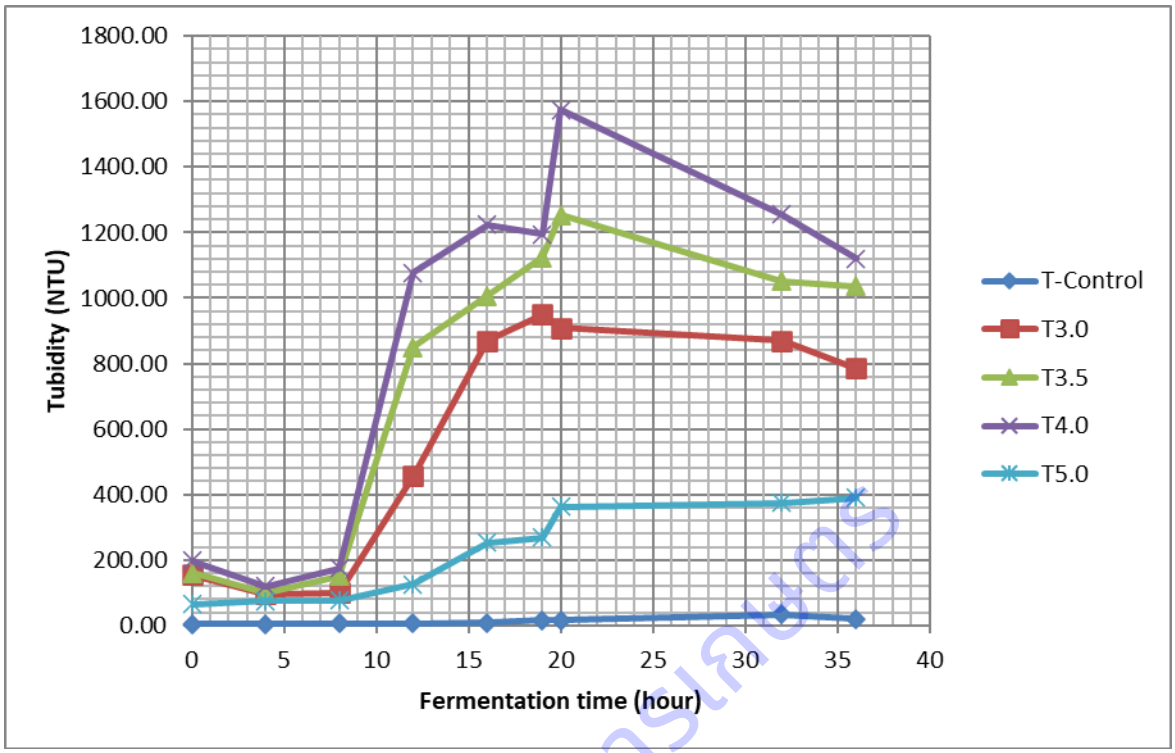


Figure 5 Fermentation results of acidity variation (tartaric acid) following chloramphenicol trial in different condition

ผลจาก **Figure 5** พบว่ากรรมวิธีที่ 4 ที่ได้ทดสอบปรับกรดทาทาริกที่ pH 4.0 ตอบสนองการหลุดลอกของเมือกได้ดีที่สุดโดยพบว่าเมือกหลุดหมดในเวลาไม่เกิน 18 ชั่วโมง (ร้อยละ 99.89 จาก NTU 1,500) โดยในกรรมวิธีที่ 2 และ 3 ที่ปรับ pH ที่ 3.0 และ 3.5 ตามลำดับพบการหลุดลอกของเมือกเช่นเดียวกันแต่ในปริมาณที่ต่ำกว่าที่อัตราร้อยละ 80 และร้อยละ 66.67 ซึ่งในกรรมวิธีที่ 5 พบการหลุดลอกของเมือกที่ชั่วโมงที่ 18 น้อยมากเพียงร้อยละ 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 กว่าร้อยละ 57, Furfural กว่าร้อยละ 25 และ Pyrazine กว่าร้อยละ 44) ผลิตกลิ่นรสที่น่าสนใจได้เพิ่มขึ้นได้แก่ Ethanone (กลิ่นผลไม้), ∂-butyrolactone (กลิ่นนมเนย), β-damascenone (กลิ่นดอกไม้) และสารกลุ่ม Phenol (กลิ่นผลไม้) ทั้งนี้การใช้กระบวนการหมักดังกล่าวส่งผลถึงปริมาณคาเฟอีนอย่างมีนัยสำคัญโดยพบการลดลงของปริมาณคาเฟอีนกว่าร้อยละ 38 อีกด้วย (**Table 2**)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Table 2 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.

กรมวิทยาศาสตร์

2.2 ผลการทดสอบการหมักแบบ Penicillin เพื่อศึกษาเวลาและปริมาณน้ำที่เหมาะสม

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการหมักทั้งระดับน้ำและการหลุดลอกของเวลาการหมักนั้นส่งผลชัดเจนต่อการใช้ต้นแบบถังหมัก (Water fill 50 – 100%) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักตามวิธีดั่งเดิม (เติมน้ำท่วมระดับบ่อหมัก : Submerged with microbial inoculation) จะมีการหลุดลอกของเมือกที่แตกต่างกันและการเจริญเติบโตของเชื้อที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ หากปริมาณน้ำไม่เพียงพอหรือเติมน้อยกว่าร้อยละ 50 แม้จะเกิดการหลุดลอกของเมือกแต่การเจริญเติบโตของเชื้อจะช้ากว่าการใช้น้ำที่ร้อยละ 75 ขึ้นไปและชะลอเมื่อใช้น้ำปริมาณมาก (submerge) ซึ่งนอกจากจะทำให้เกิดการสิ้นเปลืองน้ำในการหมักแล้วการเจริญเติบโตจะช้าลงอีกด้วย ปัจจัยที่ส่งผลต่อการใช้ถังหมักที่สำคัญคือปริมาณน้ำที่เหมาะสมระดับไม่น้อยกว่าร้อยละ 75 – 100 ของปริมาณกาแฟและระยะเวลาในการหมักไม่เกิน 24 ชั่วโมง (18 ชั่วโมงตามเวลาแนะนำของ AAF techniques, โกเมศ (2560) นอกจากนี้พบผลการทดสอบตาม **Table 3** ว่าการใช้ถังหมักนี้สามารถพัฒนาการหมักกาแฟแบบยังยืนยันการผลิตกลิ่นรสเฉพาะของกาแฟได้แก่การเพิ่มขึ้นของ Ethanone (กลิ่นผลไม้), ∂-butyrolactone (กลิ่นนมเนย), β-damascenone (กลิ่นดอกไม้) และสารกลุ่ม Phenol (กลิ่นผลไม้) ซึ่งเวลาการหมักและปริมาณน้ำนี้ยังลดทรัพยากรในการหมัก ต้นทุนและสามารถนำไปทดลองกระบวนการที่เหมาะสมของกาแฟในพื้นที่ต่างๆที่จะนำถังหมักไปทดสอบได้ โดยสามารถกำหนดระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อการหมักให้ได้คุณภาพดีและส่งเสริมการลดต้นทุนการผลิตอีกด้วย โดยผลการเปรียบเทียบผลการใช้ถังหมักและวิธีหมักแบบบ่อหมักเดิม พบการผลิตกลิ่นที่แตกต่างชัดเจนตาม **Figure 6**

Table 3 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%

กรมวิชาการเกษตร

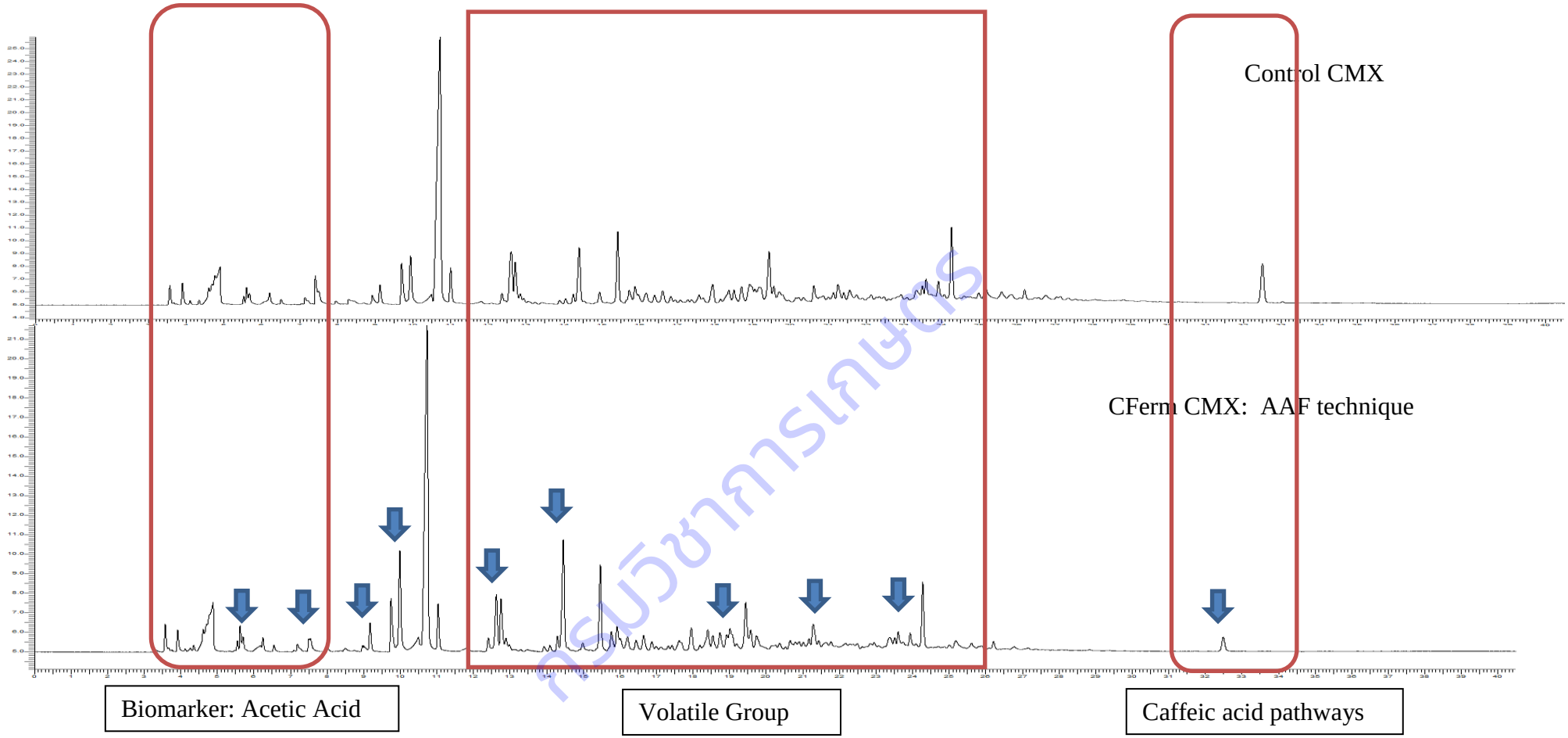


Figure 6 Chromatogram of flavor and chemical profile of coffee fermentation using AAF techniques in Fermenter model CFerm 1 comparing to typical fermentation method, observed the variation of 3 component chemical profiled such as organic compound (referred to fermentation method, flavor profile and caffeic acid pathways

2.3 ผลการปรับปรุงต้นแบบเครื่องช่วยหมักที่แก้ไขระบบจ่ายอากาศและการเก็บผลผลิต

การปรับปรุงต้นแบบเครื่องช่วยหมักกาแฟจากผลการทดสอบการหมักกาแฟจากรุ่น CFerm1 พบว่าระบบที่มีปัญหาต่อการหมักคือ “ระบบจ่ายอากาศ” ซึ่งระบบเดิมจะใช้ท่อจ่ายอาหารและหัวจ่ายแบบพ่นฝอยเทอบีนที่ระดับต่ำทำให้ระดับการเติมอากาศที่คาดไว้ต่ำกว่า 6 ลิตรต่อนาทีโดยเฉพาะเมื่อเมือกกาแฟเริ่มหลุดเกิดการทับถมของเมือกบริเวณจุดจ่ายอากาศ ซึ่งถังหมักรุ่นที่พัฒนาใหม่จะมีการพัฒนาระบบจ่ายอากาศแบบเทอบีนฝังส่วนฝาโดยมีรูเจาะความยาวร้อยละ 80 ของตัวถังเพื่อให้ระบบจ่ายอากาศสามารถมีการจ่ายอากาศที่สม่ำเสมอลดอัตราการทับถมของเมือกกาแฟระหว่างการหลุดทำให้ได้อัตราการเติมอากาศที่สม่ำเสมอที่ 6 ลิตรต่อนาทีและปริมาณการไหลของอากาศ (flux air) ตลอดกระบวนการหมักตามที่ต้องการที่ 600 ลิตร ตาม **Figure 7**

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

ความแตกต่างของถังหมักที่ออกแบบเพิ่มเติมตาม **Table 4** เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมักและง่ายต่อการเก็บเมือกกาแฟและเก็บสารกาแฟที่หมักเสร็จแล้วโดยการเพิ่มท่อสำหรับป้อนอาหารทางด้านบนป้องกันการรั่วซึมของแก๊สและยกตะแกรงสูงเพื่อสะดวกต่อการเก็บเมือกและแยกสารกาแฟจากเมือกกาแฟได้ เพิ่มโครงเหล็กสี่เส้นเป็นฐานที่สามารถยกออกได้รอบถัง พบว่าชุดปรับปรุงที่ 2 มีประสิทธิภาพการหมักที่ดีขึ้นกว่าชุดที่ 1 และดีกว่าบ่อหมักกาแฟโดยสามารถควบคุม pH และ Turbidity ได้ดีในทุกพื้นที่ทดสอบและลดเวลาการหมักอย่างชัดเจน ส่วนสำหรับต้นทุนการผลิต **Table 5** พร้อมการนำไปใช้ประโยชน์พบว่าการใช้ถังหมักเพิ่มต้นทุนที่ 5 บาทจากวิธีแบบเดิมซึ่งยังถูกกว่าการใช้เครื่องคัดเมือกเอนไซม์และวิธีทางเคมี นอกจากนี้วิธีเดิมจะใช้น้ำและมีสิ่งเหลือใช้เยอะมาก ทำให้ต้นแบบถังหมักถือเป็นทางเลือกที่ดีในการแปรรูปกาแฟชนิดใหม่ที่มีคุณภาพ

กรมวิชาการเกษตร

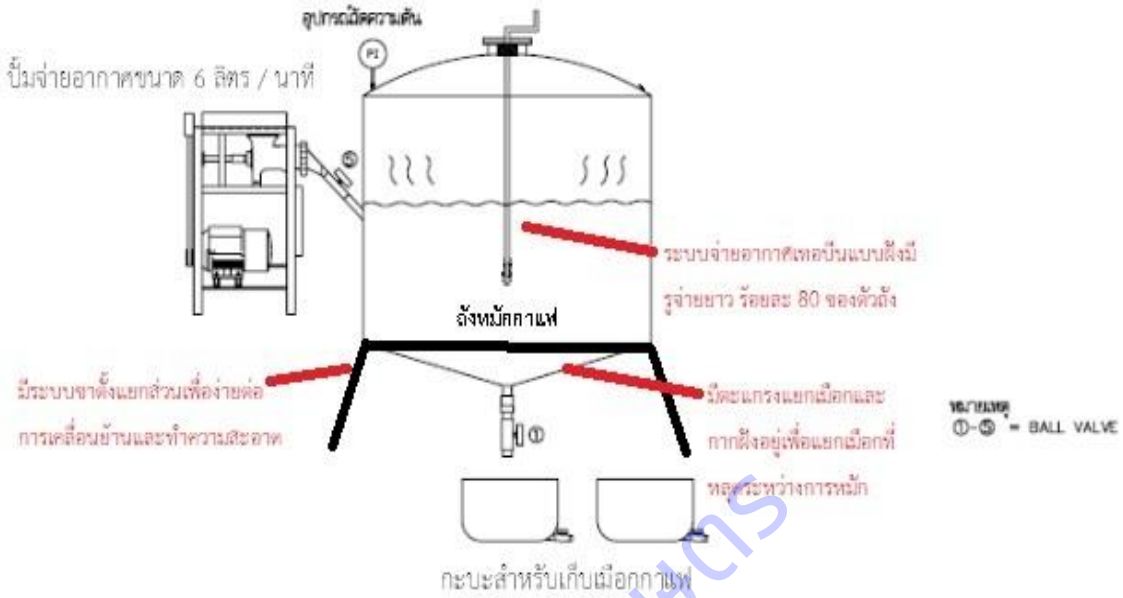


Figure 7 Demonstration of new model of coffee fermenter-CFerm2

Table 4 Summarize of two model of coffee fermenters CFerm2 comparing to CFerm1

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

กรมวิชาการเกษตร

Table 5 Investment of Coffee fermenter compared to coffee bean capacity of 50 kilogram described in time used and production cost (water used, electricity, labour, equipment and maintenance)

Process	*ต้นทุน*	*เวลา*	*ข้อเสีย*
Original	60 บาท	60 ชั่วโมงขึ้นไป	- ใช้เวลานาน
Wet process			- ใช้น้ำมากและเมือกไม่หลุดในบางกรณี
AAF technique	25 บาท	18 ชั่วโมง	

3. ผลการทดสอบการหมักในพื้นที่ทดสอบจริง

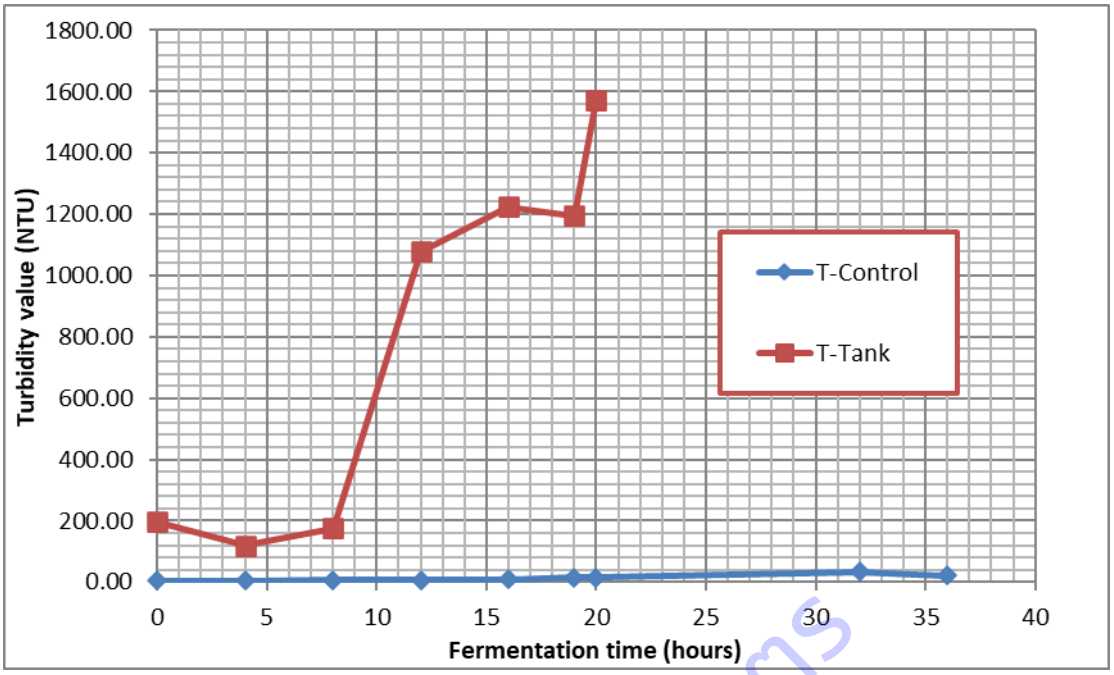
ผลการทดสอบต้นแบบถังหมัก(ปรับปรุง 2) โดยถังหมักขนาด 100 ลิตรได้ดำเนินการทดสอบในพื้นที่ทดลองทั้งสิ้น 4 ศูนย์วิจัยในการทดสอบการหมักกาแฟอะราบิก้า พบผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของการทดสอบหมักโดยถังหมักและการหมักแบบดังเดิมพบผลวิเคราะห์โปรไฟล์กลิ่นโดยเครื่อง GC-SPME-FID-O-MS ตาม **Table 6** โดยพบความแตกต่างในกลุ่มสาร Furfural, Pyrazine และ 2-formylthiophene, Ethanone ที่มีปริมาณมากซึ่งเป็นสารให้กลิ่นผลไม้ เมื่อใช้ถังหมักต้นแบบและพบสาร 5-methyl-2-furancarboxaldehyde และ 2-methylbutanal ที่ให้กลิ่นน้ำตาลไหม้ในชุดควบคุมมากกว่าแสดงให้เห็นว่าถังหมักสามารถควบคุมการผลิตกลิ่นสารสำคัญได้ดีจากการหมักนอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ถังหมักนี้มีการลดลงของเวลาการหมักและความคงตัวของปริมาณกรดด่างตาม **Figure 8-11** ในพื้นที่ทดสอบทั้ง 4 แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการใช้ถังหมักในการหมักกาแฟที่ควบคุมได้

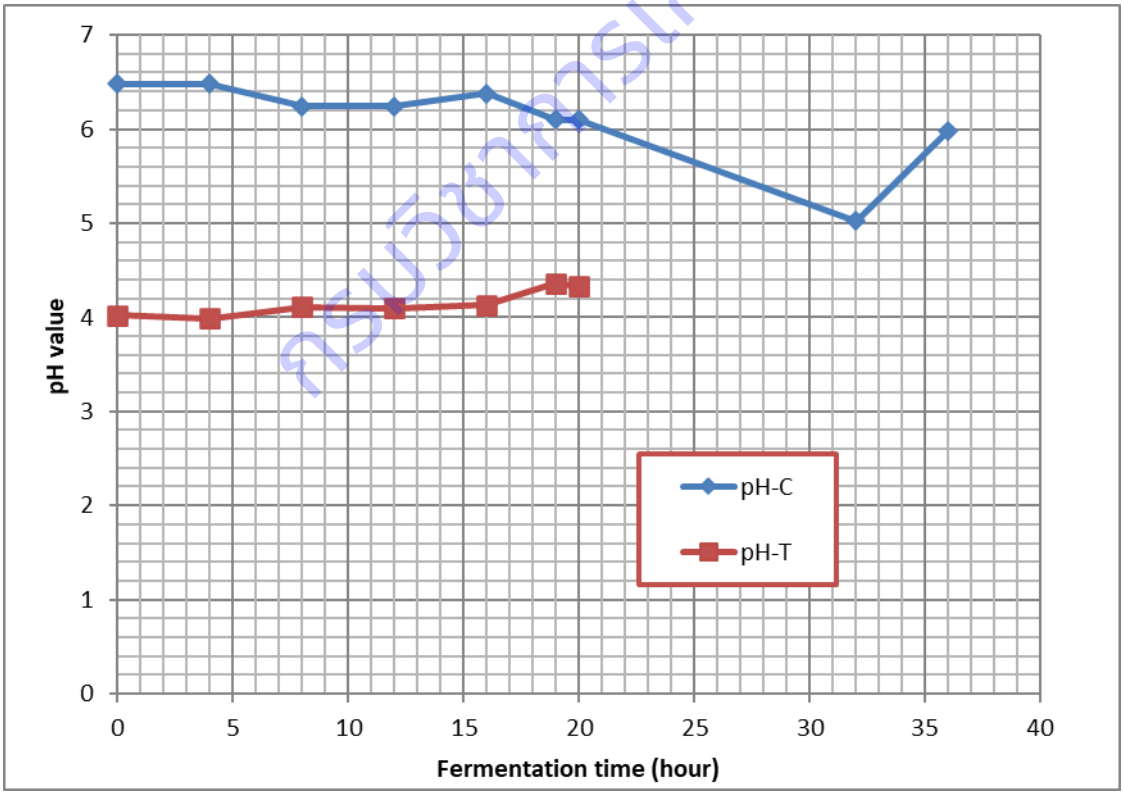
Table 6 Summarize of field trial of coffee fermenter at Khao koh (600 meter above sea level) and Khun wang station (1,200 meter above sea level) compared to typical method

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

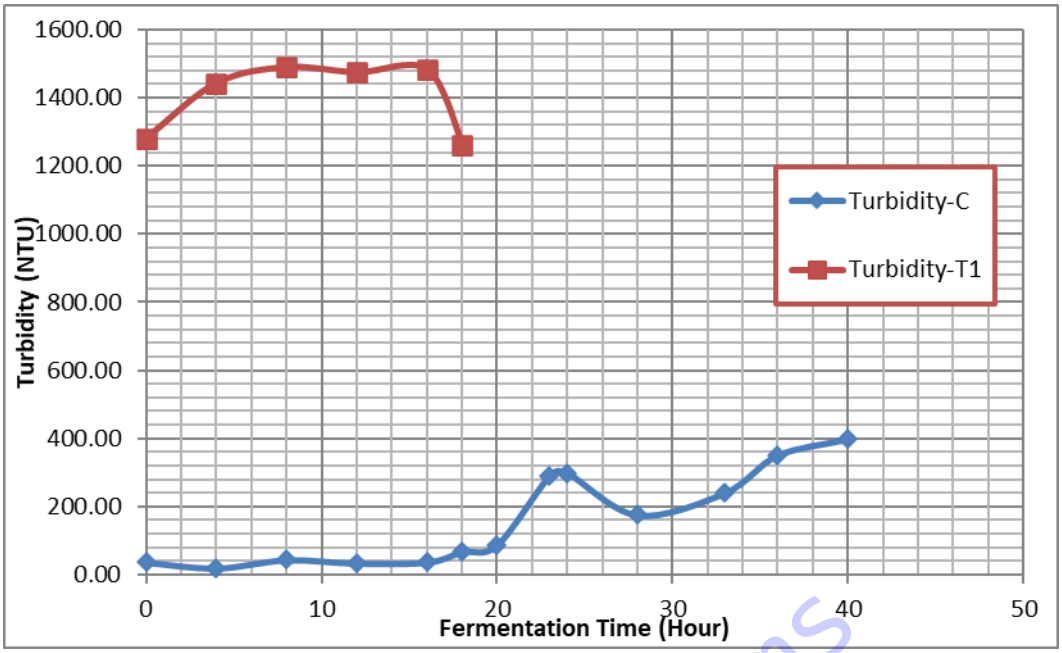
กรมวิทยาศาสตร์

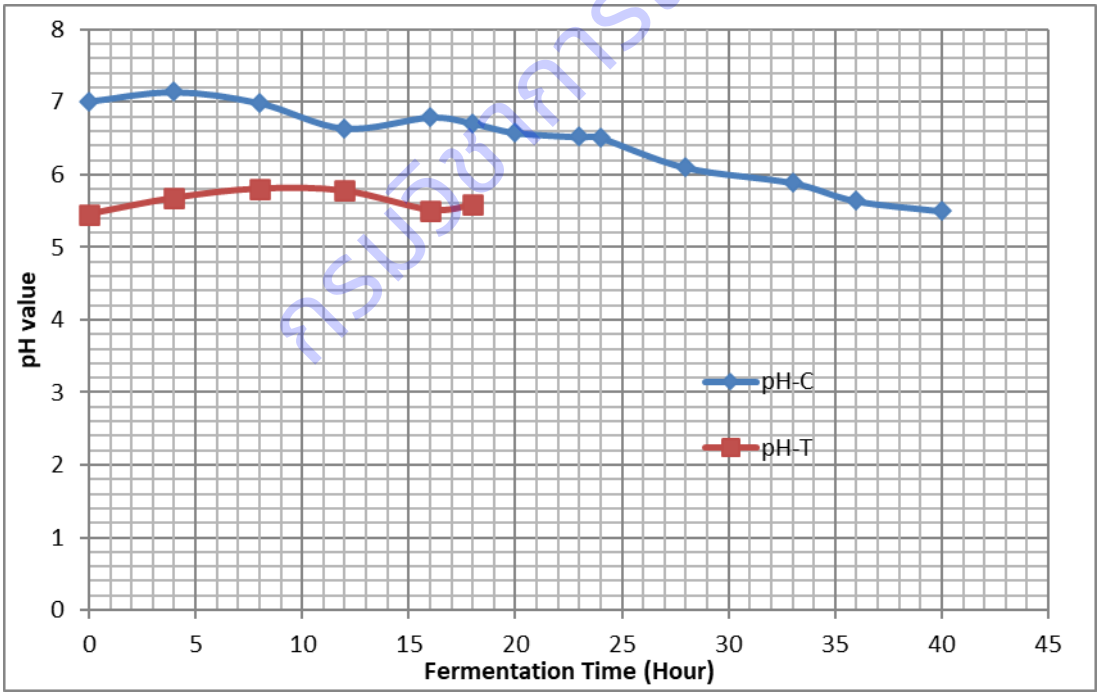




กรมวิทยาศาสตร์

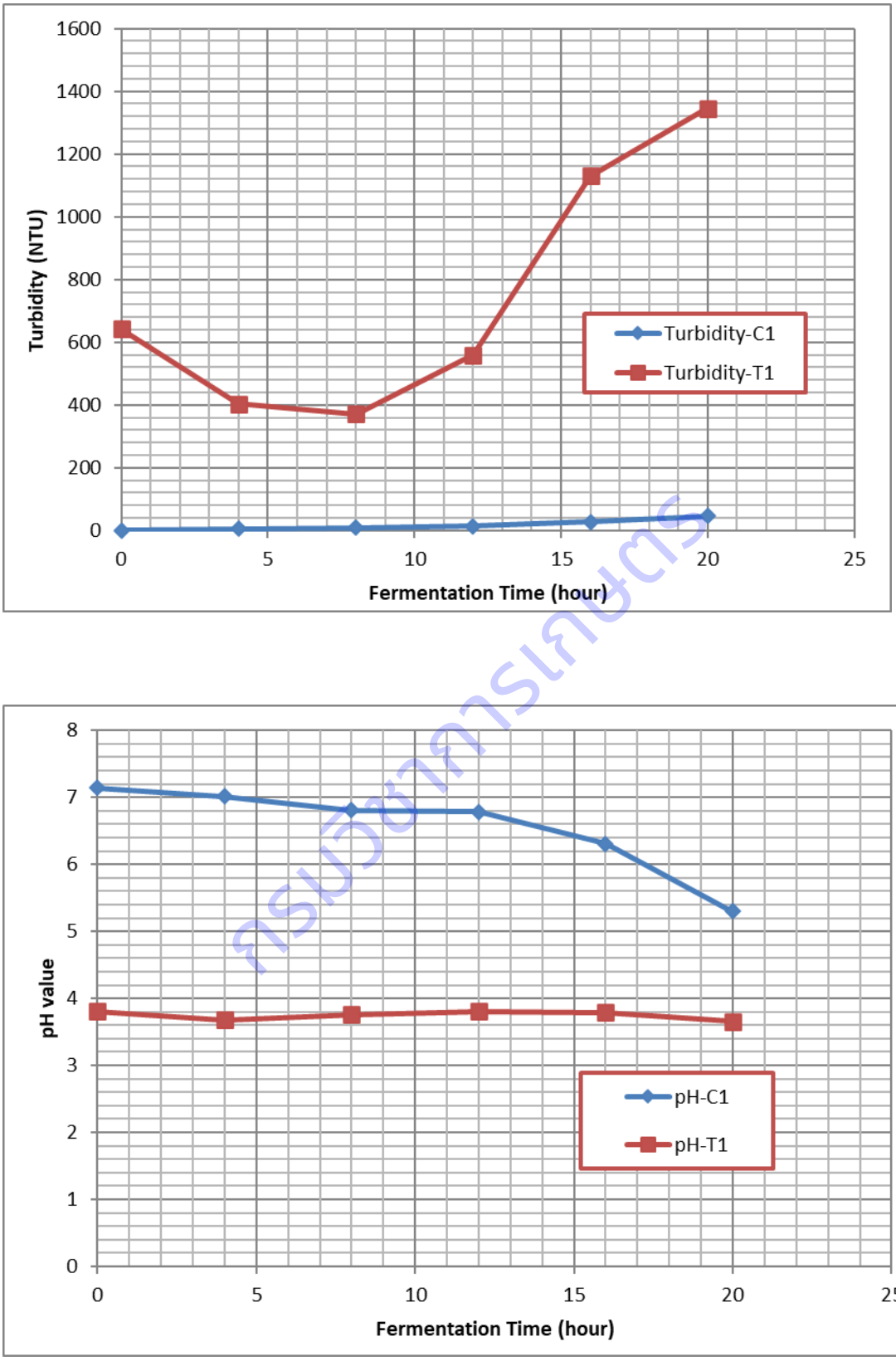
Figure 8 AAF techniques fermentation result with chloramphenicol trial at pH 4.0 at Wawi station, Chiang rai





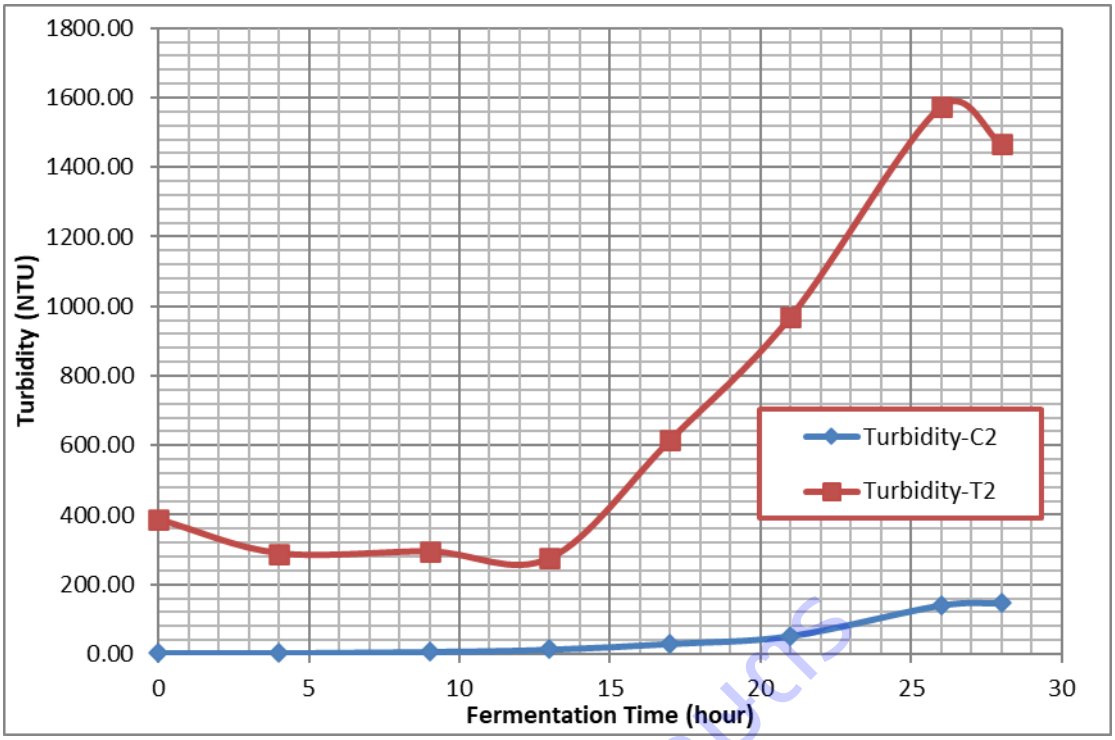
กรมวิชาการเกษตร

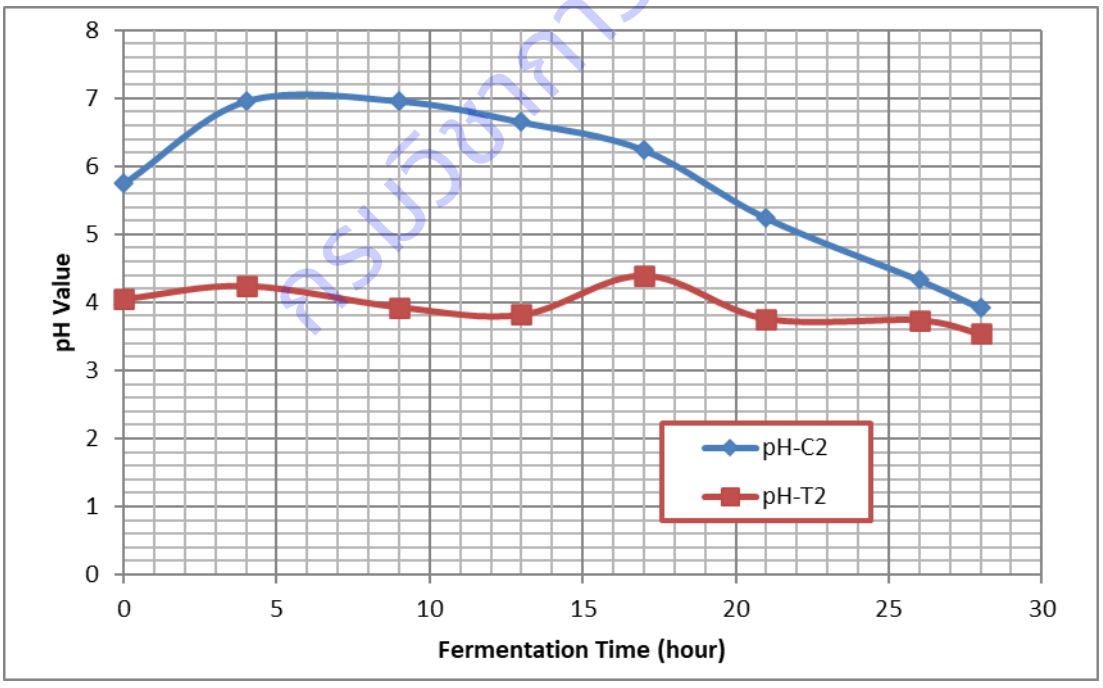
Figure 9 AAF techniques fermentation result with chloramphenicol trial at pH 4.0 at Khun wang station, Chiang Mai



กรมวิชาการเกษตร

Figure 10 AAF techniques fermentation result with chloramphenicol trial at pH 4.0 at Muser station, Tak





กรมวิทยาศาสตร์

Figure 11 AAF techniques fermentation result with chloramphenicol trial at pH 4.0 at Khao Koh station, Petchabun

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

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 มิลลิกรัมต่อลิตร และการทดสอบการหมักแบบ Penicillin จะใช้ปัจจัยควบคู่ที่ปริมาณน้ำร้อยละ 75 ถึง 100 ของปริมาณเมล็ดกาแฟที่เวลาไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง โดยการใช้ถังหมักยังส่งผลต่อการลดความขมจากการผลิตกรดอินทรีย์ที่มากเกินไปจากบ่อหมักปกติ เพิ่มการผลิตสารให้กลิ่นกลุ่ม Ethanone (กลิ่นผลไม้), *a*-butyrolactone (กลิ่นนมเนย), β-damascenone (กลิ่นดอกไม้) และสารกลุ่ม Phenol (กลิ่นผลไม้) และยังสามารถควบคุมปริมาณหรือลดคาเฟอีนได้ร้อยละ 38 ในบางชุดการทดลองซึ่งให้ผลทดสอบที่ดีในแปลงทดสอบอีกด้วย โดยต้นทุนการใช้ถังหมักอยู่ที่ 25 บาทต่อกาแฟหมัก 50 กิโลกรัมหรือ (0.45 บาทต่อกิโลกรัม) ต่างจากวิธีปกติที่ 1.2 บาทต่อกิโลกรัม

10. การนำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

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

2. ด้านสังคม ได้แก่ นำเทคโนโลยีการหมักกาแฟไปเผยแพร่เพื่อให้เกษตรกรสามารถพัฒนากระบวนการหมักกาแฟอาราบิก้าคุณภาพได้ เพื่อพัฒนากรรมวิธีการหมักกาแฟอาราบิก้าคุณภาพที่รวดเร็วต้นทุนต่ำและนำไปใช้ประโยชน์และยอมรับในวงกว้าง พร้อมทั้งนำเสนอความคิดใหม่ในการพัฒนากาหมักกาแฟอาราบิก้าคุณภาพดังกล่าวเพื่อเป็นทางเลือกที่ทำรายได้ให้กับเกษตรกรต่อไป

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

12. เอกสารอ้างอิง

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.

กรมวิชาการเกษตร

โกเมศ สัตยาวุธ, สุกัญญา นิติยนต์, สุภัทรา เลิศวัฒนาเกียรติและฉัตรนภา ข่มอาวุธ, 2560. การหมักกาแฟโดยเชื้อจุลินทรีย์. รายงานการประชุมวิชาการการกองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ปี 2560, 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. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 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.

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.

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

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.

กองวิชาการเกษตร

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.

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.

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.

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.

Nasanit R. and K. Satayawut. 2014. Microbial communities during wet fermentation process of *Coffea Arabica* var. *chiangmai 80.* Kasetsart University Journal.

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.

Silva, CF. Vilela, DM. Cordeiro, CLDS. 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.

กรมวิทยาศาสตร์

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

Varnam, H.A. 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.

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร