รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : วิจัยและพัฒนากาแฟ

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนากระบวนการหมักกาแฟอาราบิก้าคุณภาพ

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การใช้ผลิตผลพลอยได้จากเปลือกหุ้มเมล็ดและเมือกกาแฟ

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Research and development on utilization of coffee cherry and mucilage

4. คณะผู้ดำเนินงาน

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

5. บทคัดย่อ

ผลิตผลพลอยได้จากการหมักกาแฟเป็นวัตถุดิบที่สร้างมูลค่าเพิ่มจากการหมักกาแฟที่สร้างความยั่งยืนต่ออุตสาหกรรมกาแฟได้ โดยเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟที่มีปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 31.30 และไฟเบอร์ร้อยละ 21.40 นั้นถือเป็นวัตถุดิบต้นของการพัฒนาผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มได้ 2 รูปแบบ ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบหมักแบบ Solid state fermentation โดยเชื้อ *Aspergillus niger* PRO17 ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ Pectin Methyl Esterase สูงถึง 70.7 mU สามารถช่วยยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา *Collectoticum gleosporiodes* ที่ก่อโรคแอนแทรคโนสในต้นกาแฟโดยใช้สารสกัดเพียงร้อยละ 20 สามารถยับยั้งเชื้อในสภาวะห้องปฏิบัติการและโรงเรือนของกาแฟระยะปีกผีเสื้อได้ นอกจากนี้หากมีการนำเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟมาหมักโดยเชื้อ *Streptococcus spp.* ก่อนนำไปตากโดยแสงอาทิตย์เป็นเวลา 14 วันจนความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 8 สามารถนำไปใช้ในการผลิตสารปรุงรสอาหารที่หลากหลายโดยแยกตามขนาดของการนำไปใช้ประโยชน์โดยผงเปลือกกาแฟขนาดเล็กกว่า 400 µm จะสามารถนำไปพัฒนาเป็นไซรัปจากเชอร์รี่กาแฟ ขนาด 400 – 600 µm สามารถพัฒนาเป็นผงปรุงรส และขนาดใหญ่กว่า 600 µm จะพัฒนาเป็นแป้งเปลือกกาแฟได้ ซึ่งสามารถเพิ่มมูลค่าเพิ่มจากเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟที่ต้องกำจัดจากผลผลิตที่มีปริมาณกว่าร้อยละ 30 ของผลกาแฟที่ใช้ในการแปรรูป นอกจากนี้เมือกกาแฟและน้ำหมักกาแฟที่มีปริมาณเพคตินสูง และมีน้ำทิ้งที่ใช้จากการแปรรูปกาแฟในอัตราการแปรรูป 1 ตันกาแฟต่อปริมาณน้ำ 20,408 ลิตร หากสามารถสกัดเพคตินมาเพื่อใช้ในการเคลือบผลไม้จะสามารถเพิ่มมูลค่าจากเพคตินจากกาแฟได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้งานวิจัยชิ้นนี้มุ่งสร้างทางเลือกที่สามารถสร้างรายได้ที่ยั่งยืนและลดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อมส่งเสริมการผลิตกาแฟที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เพื่อตอบโจทย์กระบวนการแปรรูปแบบ BCG model

คำหลัก : เปลือกกาแฟ, เมือกกาแฟ, น้ำหมักกาแฟ, สารแต่งรส, ชีวภัณฑ์กำจัดรา

กรมวิชาการเกษตร

Produce by-product from coffee fermentation states value-added material from coffee fermentation that can create sustainability for the coffee industry. The coffee cherry contains more than 31.30% nitrogen and 21.40% fiber which is considered the primary raw material for the development of two high value-added products : (1) Fungicide, with their own enzyme ability of pectin methyl esterase up to 70.7 mU, can help inhibit the growth of fungi. *Collectoticum gleosporiodes*, the cause of anthracnose in coffee plant. When apply the fermented coffee cherry from *Aspergillus niger* PRO17 only 20% of the extracts were able to inhibit the infection in the laboratory and greenhouse conditions of the butterfly period coffee. In addition, if the coffee cherry is fermented by yeast *Streptococcus spp.* can be developed into (2) Aromat syrup from 400 - 600 µm coffee cherries and larger size than 600 µm will develop into coffee peel flour. Coffee fermented by-products increase the value-added of coffee processing from actual coffee waste more than 3 0%, which cause significant effect to the coffee production society and the surrounding of air-pollution, water pollution as well as the unpleasant odor. In addition, coffee mucilage and coffee wastewater contain high pectin with the effluent from coffee processing rate of 1 ton of coffee per 20,408 liters of water. The reutilization of coffee pectin extracted was tried for fruit coating, it can effectively increase the value of the pectin from the coffee. This research aims to create sustainable alternatives that can generate income and reduce environmental pollution and promote environmentally friendly coffee production to rend the sustainability for coffee farmer answering the pioneer of circular-green agriculture processing.

Keywords: Coffee Cherry, Coffee Mucilage, Coffee wastewater, Aromat, Biofungicide

กรมวิชาการเกษตร

6. คำนำ

การหมักกาแฟเพื่อพัฒนาคุณภาพสู่กาแฟเฉพาะตั้งแต่การเพิ่มปริมาณกรด พัฒนากลิ่นและรสชาติซึ่งกลิ่นรสในกาแฟนั้นเกิดจากสารเคมีกว่า 1,500 ชนิดแบ่งเป็นสารให้กลิ่นกว่า 850 ชนิด (volatile) ซึ่งเมื่อเมล็ดกาแฟผ่านการหมักโดยน้ำสารละลายในกาแฟที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic compounds) ที่รวมถึงน้ำมัน ไขมัน ไตรกลีเซอไรท์และกรดไขมันจะยังอยู่เมล็ดกาแฟรวมทั้งสารที่ไม่ละลายน้ำได้แก่ คาร์โบไฮเดรต เช่นเซลลูโลส น้ำตาลที่ย่อยไม่ได้ ลิกนิน กรดฟีนอลิกโมเลกุลใหญ่และสารให้กลิ่นต่างๆที่ยังมีในส่วนของน้ำมันกาแฟซึ่งนอกจากในสารกาแฟแล้วยังมีในส่วนอื่นนอกเหนือจากเมล็ดกาแฟที่อุตสาหกรรมกาแฟจัดเป็นผลผลิตพลอยได้ (Coffee production waste) หรือ by-products ซึ่งผลิตผลพลอยได้สำคัญจากการหมักกาแฟนั้นคือเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟที่มีปริมาณมากกว่าร้อยละ 30 ของปริมาณผลผลิตทั้งหมดนอกจากนี้ยังมีเมือกกาแฟและน้ำเสียจากการหมักกาแฟ ซึ่งขั้นตอนการหมักกาแฟนั้นถือเป็นขั้นตอนการใช้น้ำในการผลิตที่สูงมากตั้งแต่ขั้นตอนการการล้างถึงการหมักก่อให้เกิดน้ำเสียจากการผลิตในปริมาณมากโดยมีการสำรวจว่าการผลิตกาแฟเพียง หนึ่งกิโลกรัมจะใช้น้ำ

ในการผลิตถึง 200 ลิตรอย่างต่ำ นอกจากนี้นั้นน้ำจากกระบวนการหมักยังมีปริมาณคาร์บอนทั้งจากผลผลิตกาแฟและขั้นตอนการแปรรูปปริมาณสูงก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอย่างชัดเจน

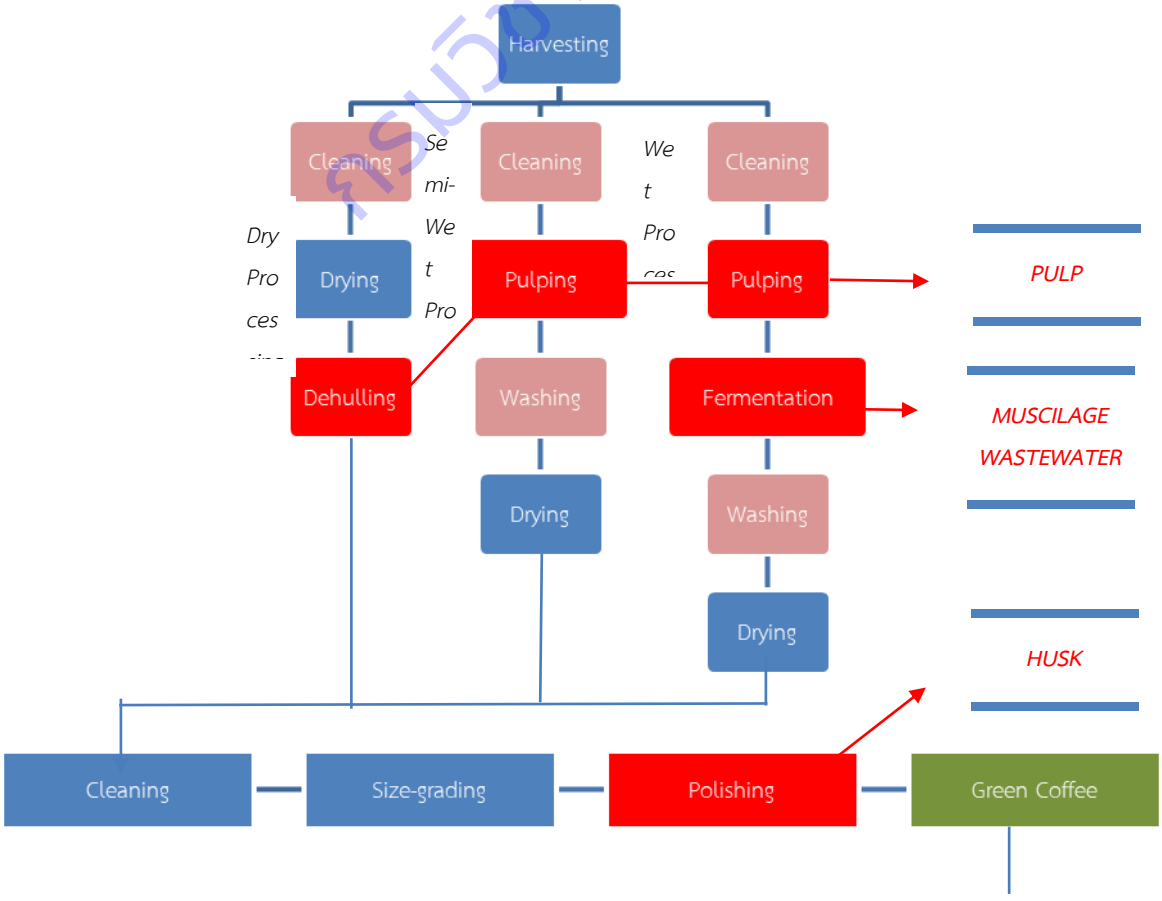
ผลผลิตกาแฟที่ถือเป็นเครื่องดื่มที่มีการบริโภคมากที่สุดในโลกรองจากน้ำมีการประมาณว่าจะมีปริมาณ 3.5 ล้านล้านแก้วต่อวันทั่วโลก ซึ่งกาแฟถือเป็นพืชที่มีการเพาะปลูกในพื้นที่กว่า 70 ประเทศทั่วโลกและมีผลผลิตกว่า 16 ล้านล้านปอนด์ต่อปี (Padmapriya, 2013) แสดงให้เห็นได้ว่าผลผลิตที่มีความต้องการกาแฟดังกล่าวจะมีการผลิตผลผลิตพลอยได้ด้วยในปริมาณมหาศาลซึ่งเกิดตั้งแต่กระบวนการหลังการเก็บเกี่ยวกาแฟใน **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 รวมทั้งการทดลองการผลิตไบโอแกส ไบโอเอทานอลแต่ยังมีการนำไปใช้ประโยชน์ในการอุตสาหกรรมอาหารและการใช้สารสำคัญจากเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟน้อยมากซึ่งได้มีการทดสอบนำเปลือกหุ้มเมล็ดมาหมักเป็นเครื่องดื่มและสามารถพัฒนาเป็นเครื่องดื่มฟองได้ผลเป็นอย่างดีโดยการศึกษาเบื้องต้นพบการเพิ่มขึ้นของปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มฟีนอลลิกและแทนนินที่สามารถพัฒนาต่อยอดสู่การใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์เพิ่มมูลค่าลดต้นทุนในการผลิตกาแฟและสร้างรายได้เสริมแก่เกษตรกรมากกว่าการทิ้งให้เป็นขยะระหว่างการแปรรูปกาแฟ

เมือกกาแฟและน้ำเสียจากการหมักกาแฟถือเป็นประเด็นสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอย่างมากโดยเฉพาะในการผลิตกาแฟอะราบิก้าคุณภาพที่มีการส่งเสริมให้เกษตรกรแปรรูปแบบเปียกหรือกึ่งเปียกที่ใช้น้ำในปริมาณมาก ซึ่งเมื่อตรวจสอบคุณภาพเบื้องต้นของน้ำที่ใช้ในการผลิตกาแฟนั้นพบปริมาณของสารประกอบอินทรีย์ที่สูงมากเกินค่ามาตรฐานที่จะปล่อยสู่สิ่งแวดล้อม โดยในบางพื้นที่น้ำเสียจากการหมักกาแฟนี้ยังเป็นพิษโดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์เพื่อการหมักกาแฟจากสายพันธุ์ที่ทราบโดยแน่ชัดและสายพันธุ์ท้องถิ่นส่งผลให้น้ำที่ได้จากการหมักกาแฟนั้นมีปริมาณออกซิเจนต่ำมากสู่ภาวะแอนแอโรบิกหรือภาวะไร้ออกซิเจนซึ่งส่งผลอย่างมากต่อสัตว์น้ำตามธรรมชาติ จากการประมาณการใช้น้ำในการหมักกาแฟพบว่าการใช้เครื่องขัดเมือกในการผลิตกาแฟจะใช้น้ำปริมาณ 1 ลูกบาศก์เมตรต่อกาแฟหนึ่งตันในการลอกเมือกกาแฟในขณะที่การหมักกาแฟโดยวิธีดั้งเดิมจะให้น้ำสูงถึง 20 ลูกบาศก์เมตรต่อกาแฟหนึ่งตันซึ่งการใช้น้ำในปริมาณมากดังกล่าวส่งผลกระทบในการแปรรูปกาแฟของเกษตรกรไทยในพื้นที่สูงที่มักเก็บเกี่ยวกาแฟในฤดูหนาวหรือฤดูแล้งที่มีแหล่งน้ำในการผลิตน้อยส่งผลต่อการแย่งน้ำและข้อขัดแย้งระหว่างเกษตรกรและชุมชนในการจัดการปัญหาน้ำระหว่างการผลิตกาแฟ ซึ่งประเด็นน้ำทิ้งจากการแปรรูปกาแฟนั้นก็ถือเป็นสิ่งสำคัญในการจัดการการผลิตโดยค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำให้เหมาะเพื่อปล่อยคืนสู่แหล่งน้ำธรรมชาตินี้มีราคาที่สูงมาก ซึ่งน้ำเสียที่ได้รับการบำบัดนั้นต้องไม่มีสารอินทรีย์อยู่นั้นเองซึ่งสารอินทรีย์ดังกล่าวประกอบด้วยน้ำตาลหมักและโปรตีน ซึ่งระหว่างการหมักนั้น hydrolysed pectin ที่เป็นเมือกกาแฟจะ

กรมวิชาการเกษตร

ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เป็นเพคตินขนาดเล็กหรือสาร oligosaccharides ที่ละลายในสารละลายอัลคาไลท์ แต่ด้วยน้ำหมักมักมีความเป็นกรดสูงทำให้สารเพคตินที่ได้จากการหมักจะอยู่ในสภาพกรดและเมื่อมีปริมาณแคลเซี่ยมและไอออนชนิดต่างๆปนอยู่มากจะมีการฟอร์มเจลเป็นลักษณะของ Calcium pectate (Von Enden, 2002) ทำให้ค่า BOD (Biological Oxygen Demand) มีปริมาณสูงกว่า 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตรจากการหมักในบ่อปกติและปริมาณสูงกว่า 8,000 มิลลิกรัมต่อลิตรจากการหมักในถังหมักซึ่งมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องบำบัดน้ำให้มีค่า BOD ต่ำกว่า 200 มิลลิกรัมต่อลิตรก่อนจะปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ

การนำเมือกกาแฟและการทดสอบการบำบัดน้ำเสียจากการหมักกาแฟจึงถือเป็นการแก้ปัญหาขั้นต้นเพื่อการปรับปรุงคุณภาพน้ำหมักกาแฟก่อนปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ ทั้งนี้การศึกษาระบบการบำบัดน้ำหมักกาแฟถือเป็นประเด็นเร่งด่วนทางสิ่งแวดล้อมด้วยการขยายตัวของธุรกิจกาแฟในประเทศไทยที่มีการเติบโตสูงมาก อย่างไรก็ตามนักวิจัยด้านกาแฟยังยืนยันถึงกระบวนการผลิตกาแฟให้ได้คุณภาพที่ยังจำเป็นต้องผ่านการหมักกาแฟที่มีการพัฒนากระบวนการหมักที่หลากหลาย ผลผลิตพลอยได้จากการหมักกาแฟจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะสามารถเพิ่มรายได้ให้เกษตรกรเพื่อต่อยอดการผลิตขั้นต้น การจัดการกระบวนการผลิตกาแฟที่ดีจะส่งผลให้ต้นทุนการผลิต เวลาในการแปรรูปและปัญหาด้านแรงงานลดลงทั้งนี้การนำผลิตผลพลอยได้มาใช้ประโยชน์ถือเป็นสิ่งจำเป็นต่อคุณภาพชีวิตเกษตรและสิ่งแวดล้อม ด้วยพืชกาแฟถือเป็นเกษตรกรรมที่ใกล้ชิดกับธรรมชาติ หากมีการสนับสนุนการผลิตที่เป็นประโยชน์แก่ทุกฝ่ายนอกจากจะส่งผลดีต่อภาพลักษณ์การผลิตกาแฟแล้วยังสร้างรายได้ที่ยั่งยืนแก่เกษตรกรได้อีกด้วย



ศูนย์วิทยทรัพยากร

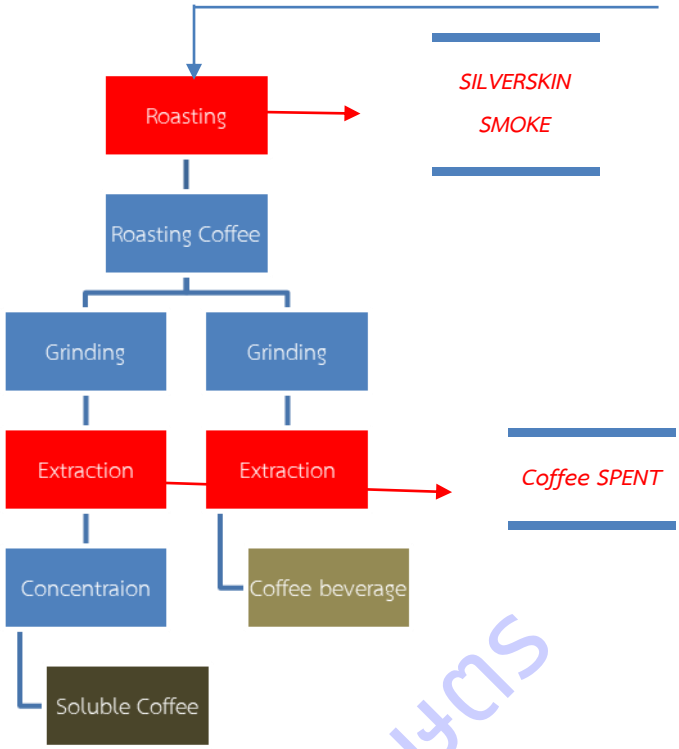


Figure 1 The life cycle of coffee products and residues generation steps (red boxes indicate major steps of coffee by-products)

กรมวิชาการเกษตร

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1.วัสดุทดลอง

1.1 กาแฟ สายพันธุ์ *Coffea arabica cv. Chiangmai 80* ชั่วที่ 7 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

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 Wine (Nez du cafe) จากบริษัท Aromes de VIN ประกอบไปด้วย 54 กลิ่นหลักในกาแฟเพื่อใช้ในการฝึกและทดสอบ Cup tasting

-วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 การประเมินคุณภาพวัสดุเหลือใช้จากกระบวนการหมักกาแฟ

ประเมินคุณภาพวัสดุเหลือใช้ที่ได้จากกระบวนการหมักกาแฟโดยเฉพาะอย่างยิ่งเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟ เมือกกาแฟ และน้ำเสียที่ใช้ในการหมักกาแฟเกี่ยวกับส่วนประกอบและสารพิษตกค้าง

ขั้นตอนที่ 2 การนำเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟไปใช้ประโยชน์

1. ศึกษาคุณภาพและคุณสมบัติของเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟโดยการวิเคราะห์ทางกายภาพและส่วนประกอบทางเคมีและการเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักแบบแห้ง (Solid-state fermentation) โดยมุ่งเน้นคุณค่าทางอาหารเป็นหลัก

2. ศึกษาปริมาณกรดอินทรีย์ที่ได้จากการหมักเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟ โดยเครื่องโครมาโตกราฟีแรงดันสูงในเปลือกหุ้มกาแฟภาวะปกติและภาวะที่เกิดจากการหมักแบบแห้ง

แผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD 3 กรรมวิธี 5 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์

กรรมวิธีที่ 2 เติมเชื้อจุลินทรีย์ *Aspergillus niger (ที่ไม่ผลิตสารพิษ)*

กรมวิชาการเกษตร

กรรมวิธีที่ 3 เติมเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus* spp.

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

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

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

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

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

3.1 การเตรียมสารสกัดสำหรับใช้ในการทดลอง โดยนำสารสกัดมาปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 0 หลังจากนั้นนำมากรองด้วย syringe filter ขนาด 0.45 และ 0.22 um เพื่อให้สารสกัดปลอดเชื้อ

3.2 การการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เตรียมอาหาร PDA แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำอาหาร PDA มาผสมกับสารสกัดที่เตรียมไว้ข้างต้น โดยมีอัตราส่วนของสารสกัดอยู่ที่ 20, 40 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยใช้สารสกัดที่ได้จากการหมักเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟที่หมักเป็นเวลานาน 30 และ 60 วัน จากนั้นนำอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดมาเทลง plate แล้วทิ้งเป็นเวลา 1 วัน เพื่อให้ผิวหน้า PDA plate แห้ง และเพื่อเช็คว่าสารสกัดที่ผสมกับ PDA มีการปนเปื้อนหรือไม่

3.3 **การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gleosporoides*** นำเชื้อรา *Colletotrichum gleosporoides* ที่เลี้ยงใน PDA plate เป็นเวลา 7 วัน โดยใช้ Cork border เจาะบริเวณขอบของโคโลนี แล้วนำชิ้นวุ้นของเชื้อรามาใช้ในทดสอบ จากนั้นนำชิ้นวุ้นของเชื้อรามาวางบน plate PDA ที่มีการผสมสารสกัดในอัตราส่วนต่างๆ บริเวณกึ่งกลาง plate แล้วบ่มไว้เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลการทดลองโดยจะมีการเก็บ

กรมวิชาการเกษตร

ข้อมูลเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่เจริญ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย พร้อมคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย

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

หมายเหตุ: A; เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่เจริญในตำรับควบคุม

B; เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนผิวหน้าอาหารที่ใช้ในการทดสอบ

การบันทึกข้อมูล คุณสมบัติการยับยั้งเชื้อรา (Clear-zone distance), ปริมาณเซลล์ที่เหลือ และลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมีของเชื้อรา

4. ศึกษาการผลิตกรดซิตริกจากเปลือกหุ้มเมล็ดโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus* spp.และเพื่อพัฒนาเครื่องปรุงรส Aromat และผลิตภัณฑ์เบเกอร์รี่

แผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 กรรมวิธี 3 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม ไม่เติมหัวเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 ใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus lactis* ร้อยละ 2

กรรมวิธีที่ 3 ใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus thermophilus* ร้อยละ 2

กรรมวิธีที่ 4 ใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus faecium* ร้อยละ 2

จากนั้นนำขวดหมักที่บรรจุเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปิดฝา ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเริ่มทำการหมัก ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมงเพื่อนำมาทำการวิเคราะห์ผล

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

ทดลองผลิตสารสำคัญที่ได้จากเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟและนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในอาหารประเภทเบเกอรี่และเครื่องดื่มเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด

5. สรุปผลการทดลอง คำนวณต้นทุนการทดลองและถ่ายทอดผลงาน

-เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2559 – กันยายน 2561

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

กรมวิชาการเกษตร

8.ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการประเมินคุณภาพผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการหมักกาแฟ ผลพลอยได้จากกระบวนการหมักกาแฟจนถึงกระบวนการตากกาแฟแบ่งออกเป็น 3 ผลผลิตได้แก่

1.1 เปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟ (Cherry)

ผลการศึกษาคุณภาพของเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟตาม Table 2 ที่มีปริมาณร้อยละ 60 ของผลผลิตกาแฟ พบว่ามีปริมาณของสารประกอบไนโตรเจนมากถึงร้อยละ 31.30 ตามด้วยปริมาณ Crude fiber ร้อยละ 21.40 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 12.40 โปรตีนร้อยละ 10.10 แทนนิน 7.80 และสารประกอบอื่นๆ ร้อยละ 17 ซึ่งสามารถนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารโดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ปรุงรสเนื่องจากสารกลุ่มไนโตรเจนที่มีอยู่มากตอบสนองดีต่อการหมัก และสารแทนนินและ Reducing Sugar สามารถนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ในแปลงทดสอบได้

Table 2 Average ratio of composition of coffee pulp in Thai Coffee

Contents	*Proportions (%)*
Nitrogen-free extract	31.30
Crude fiber	21.40
Reducing sugars	12.40
Crude protein	10.10
Tannins	7.80
Pectin substances	6.50
Chlorogenic acid	2.60
Caffeine	2.30
Nonreducing sugar	2.00
Ash	1.50
Ether extract	0.48
Total caffeic acid	1.60

กรมวิชาการเกษตร

1.2 เมือกกาแฟ (Mucilage)

- ผลการศึกษาเมือกกาแฟที่ได้จากการหมักโดยมีปริมาณเพียงร้อยละ 10 ของเมล็ดกาแฟพบว่าตาม Table3 มีปริมาณน้ำที่สูงพบว่ามีน้ำเป็นส่วนประกอบถึงร้อยละ 84.20 และโปรตีนร้อยละ 8.00 และสารประกอบอื่นร้อยละ 7.8 โดยพบว่าสามารถนำเมือกกาแฟไปใช้ประโยชน์ได้หลายรูปแบบโดยเฉพาะปริมาณโปรตีนและน้ำตาลที่เหลือในเมือกกาแฟสามารถพัฒนาเป็นสารเคลือบผลไม้ได้เพราะมีสารเพคตินเป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ยังสามารถนำกากใยไปพัฒนาเป็นสารสกัดมูลค่าสูงได้เพราะมีโปรตีน

Table 3 Average ratio of composition of coffee mucilage in Thai Coffee

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

1.3 น้ำเสียจากการหมักกาแฟ (Waste water)

ผลการวิเคราะห์ Table 4 พบปริมาณน้ำที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปกาแฟจากการสีเปลือก หมักและล้างเมล็ดกาแฟมีปริมาณมากโดยปริมาณกาแฟ 49 กรัมจะใช้น้ำในการแปรรูปที่ 1 ลิตร ซึ่งหากผลิตกาแฟ 1 ตันจะใช้น้ำในการแปรรูปสูงถึง 20,408 ลิตร โดยเมื่อนำน้ำที่ใช้ในการหมักกาแฟมาตรวจคุณภาพพบว่าค่าความเป็นกรดด่างอยู่ที่ 4.27 – 4.40 ค่า COD อยู่ที่ 9,270 – 14,800 ค่า BOD อยู่ที่ 472 – 551 โดยพบว่าในน้ำเสียจากการหมักกาแฟนั้นเมื่อเทียบกับมาตรฐานของ ISI standards พบว่าจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีและน้ำดังกล่าวจะเน่าเสียได้ง่าย แต่อย่างไรก็ตามยังพบสารประกอบสำคัญมากมายได้แก่ Unrefined pectin ที่มีปริมาณ dietary fiber สูง หรือสารสำคัญจาก antioxidant กลุ่ม flavonoids ที่เกิดจากกระบวนการ deesterified ของเมือกกาแฟดังนั้นการเก็บน้ำหมักผสมกับเมือกจึงเป็นกระบวนการที่เหมาะสมในการนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ได้

Table 4 Average ratio of characteristics of coffee fermented wastewater

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

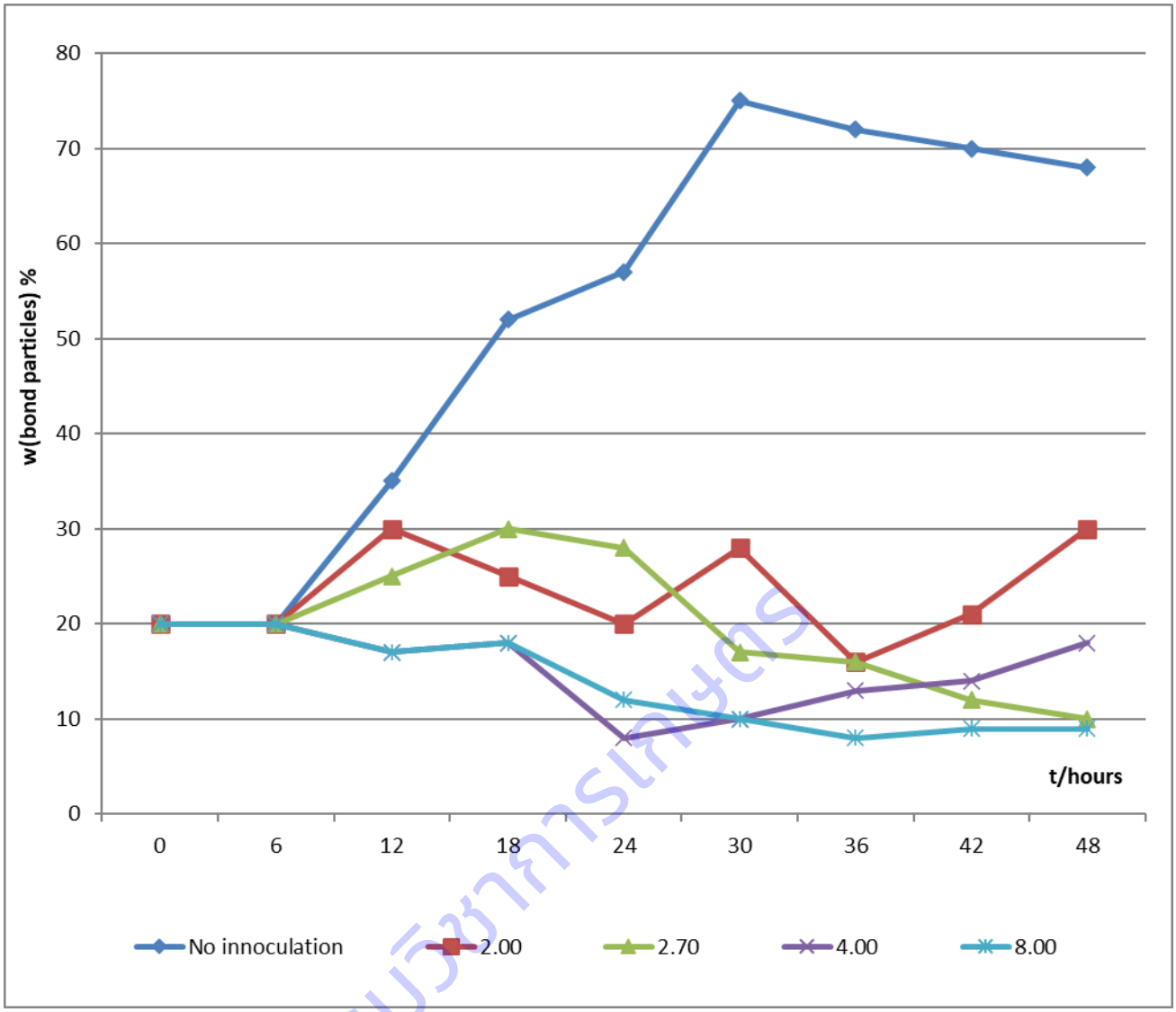
กรมวิชาการเกษตร

2. การนำเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟไปใช้ประโยชน์

2.1 ผลทดสอบการหมักแบบ Solid state fermentation ของเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟ

ผลการทดสอบการศึกษาการหมักแบบ Solid state fermentation (SSF) ของเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟโดยใช้ความร้อนโดยการทดสอบผลของ Mycelium activity และ Sporulation ของเชื้อราต้นแบบ *Aspergillus niger* strain PRO17 ที่ไม่ผลิตสารพิษภายใต้ปัจจัยที่ส่งผลสูงสุดของเชื้อรา (static condition) โดยใช้การเติมหัวเชื้อในเวลาต่างๆกันต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยในเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟโดยในชุดควบคุมที่ไม่มีการเพิ่มเชื้อต่อวันพบการเจริญเติบโตของเชื้อที่ร้อยละ 32 ที่ ชั่วโมงที่ 12 และสูงสุดที่ร้อยละ 75 หลังจากชั่วโมงที่ 33 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการเติมเชื้อต่อเนื่องพบว่าค่า bonded particle จะมีค่าไม่เกินร้อยละ 33 โดยปริมาณต่ำสุดที่เติมอยู่ที่ร้อยละ 2 ต่อวันโดยปริมาณ bonded particle จะไม่เกินร้อยละ 30 ตลอดกระบวนการหมัก SSF โดยในปริมาณที่มากขึ้นกลับทำให้ค่า bonded particle ลดลงตามลำดับซึ่งมีผลชัดเจนต่อการหมักแบบ SSF นั่นเองโดยผลการทดสอบปริมาณ bonded particle เมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 48 ชั่วโมงอยู่ที่ร้อยละ 28.7±1.2 ขณะที่ปริมาณสูงสุดของการเติมเชื้อทดสอบที่ 8.0 ต่อวันมีค่าเพียงร้อยละ 8.9±0.2 โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ซึ่งผลการทดสอบนี้ส่งผลให้ทราบถึงปริมาณเชื้อ *A. niger* strain PRO17 ที่นำไปใช้ทดสอบในการหมักแบบ SSF กับเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด นอกจากนี้พบว่าค่า PME activity มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ 47 mU ต่อกรัมของวัตถุดิบโดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นกว่า 70.7 mU (Figure 2) เมื่อมีการเติมเชื้อต่อเนื่องแสดงให้เห็นว่าวิธีการนี้ส่งผลต่อการผลิตสารสำคัญเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์เพิ่มขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพได้ โดยเมื่อทำการศึกษาการหมักแบบ SSF ในระบบปิดและในเอกสารอ้างอิงพบว่าปริมาณของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราและสามารถนำไปทดสอบการผลิตสารที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อเนื่องได้ โดยมีการทดสอบต่อเนื่องในการนำไปผลิตสาระสำคัญใน (1.) อุตสาหกรรมอาหารได้แก่ การผลิตกรดซิตริกและสารปรุงแต่งอาหาร (2.) การผลิตกรดอินทรีย์เพื่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคในกาแฟ

กรมวิชาการเกษตร



กรมวิชาการเกษตร

Figure 2 Bonded particle fraction during the solid-state fermentation of coffee pulp by *A. niger* strain PRO17 in bottle reactors. After a static period of 12 hours, four different daily frequencies were applied: 0.00, 2.00, 2.70, 4.00, and 8.00 day^{-1}

2.2 ผลของการทดสอบการหมักปริมาณสารสำคัญในเมล็ดกาแฟโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีแรงดันสูงในเปลือกหุ้มกาแฟภาวะปกติและภาวะที่เกิดจากการหมักแบบแห้งพบว่า Table 5 แสดงปริมาณของกรดอินทรีย์ปริมาณมากที่เกิดจากการทดสอบหมักโดยเชื้อกลุ่ม *Streptococcus spp.* ปริมาณมากกว่า 5.26 mg/l โดยมีปริมาณกรด chlorogenic acid และ cafeic acid ด้วยซึ่งแสดงให้เห็นว่าเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์กรดสูง โดยใช้เชื้อ *Streptococcus spp.* ส่วนการทดสอบโดย *Aspergillus niger* พบว่ามีการสกัดแทนนินสูงและปริมาณกรดอินทรีย์สูงเช่นเดียวกันซึ่งมีความสามารถนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชได้

Table 5 Chemical compounds content of Cherry pod solution after solid state fermentation trial for 60 days using different microbial sources.

Parameter	*Control*	*Aspergillus niger*	*Streptococcus spp.*
Nitrogen-free extract (%)	25.63	8.25	16.36
Total Acid Content (mg/l)	1.26	4.12	5.26
Crude protein (%)	8.10	7.36	7.21
Tannins (Ethanol index)	12,300	18,940	16,520
Pectin substances (DE%)	62.5	63.6	59.6
Chlorogenic acid (ug/l)	2.90	3.69	3.58
Caffeine (%)	2.12	2.35	4.31
Reducing sugars (%)	6.40	4.25	4.36
Non-reducing sugar (%)	1.20	0.36	0.25
Ether extract (%)	0.12	0.39	0.69

2.3 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา (Biofungicide) ในรูปแบบสารสกัดเอทานอลจากเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟ พบผลการทดสอบคุณสมบัติการเกิด Clear-zone ตาม Table 6 -7 ในการยับยั้งเชื้อราจากสารสกัดโดยใช้ *Aspergillus Niger* หมักในรูปแบบ Solid state fermentation และผลการยับยั้งเชื้อราในห้องปฏิบัติการตาม Figure 3 โดยการใช้สารสกัดจากเปลือกกาแฟเพียง 40%

Table 6 Colony diameter of *Colletotrichum gleosporoides* (in centrimetre) during 4 to 7 days of experiment

	Days of Experiment			
Treatment	4	5	6	7
T_1	4.92	6.16	7.94	8.42
T_2	1.42	2.28	3.34	4.30
T_3	0.00	0.00	0.00	0.00
T_4	0.00	0.00	0.00	0.00
T_5	0.00	0.00	0.00	0.00
T_6	0.00	0.00	0.00	0.00
T_7	0.00	0.00	0.00	0.00

กรมวิชาการเกษตร

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

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

กรมวิชาการเกษตร

Control 40% of Coffee Cherry extract

Figure 3 Growth of *Colletotrichum gleosporoides* in control compared to 40% CPE (Cherry Pod Extract) in NA for 30 days of experiment

การใช้สารสกัดที่ได้จากการหมักเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟในการยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gleosporoides* ให้ช้าลง สังเกตได้จากการทดลองที่ทำการผสมสารสกัดที่ได้จากการหมักเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato dextrose agar) หลังจากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Colletotrichum gleosporoides* เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าตำรับที่ผสมสารสกัดที่ได้จากการหมักเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ 40 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราดังกล่าวมีขนาดเล็กกว่าเมื่อเทียบกับตำรับควบคุม และตำรับที่ผสมสารสกัดที่ได้จากการหมักเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ 40 และ60 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบเส้นใยและโคโลนีของเชื้อรา ดังนั้นแสดงว่าสารสกัดที่ได้จากการหมักเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟมีความสามารถในการยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gleosporoides* ที่ทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนสได้

Figure 2 Application on nursery for young coffee plant (butterfly state) using 40% of CPE and control replication with *in prior* infected by *Colletotrichum gleosporoides*

จากการพ่นสารสกัด CPE (Cherry Pod Extract) ที่ร้อยละ 40 ในต้นกาแฟระยะใบผีเสื้อคุมในระบบโรงเรือนและทำการ inoculation เชื้อรา *Colletotrichum gleosporoides* ไปเป็นเวลา 1 สัปดาห์โดยการพ่น พบการแสดงออกของโรคแอนแทรคโนสในชุดควบคุมที่ร้อยละ 83.33 จากกลุ่มตัวอย่าง 30 ต้น (30:30) โดยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.01 (p-value <0.01) โดยพบว่าสารสกัด CPE สามารถควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสในต้นกาแฟระยะปีกผีเสื้อได้โดยมีความจำเป็นต้องนำไปทดสอบในแปลงทดสอบเพื่อการยืนยันผลการนำชีวภัณฑ์ไปใช้ประโยชน์ โดยสารสกัด CPE นี้มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำด้วยใช้วัตถุดิบในแปลงเกษตรกรที่เหลือทิ้งจากการแปรรูปกาแฟทำให้มีค่าใช้จ่ายเพียงการผลิตเชื้อ *Aspergillus niger* ที่มีต้นทุนการผลิตหัวเชื้อที่หลอดละ 5 บาทเพื่อการใช้หมักผลเชอร์รี่ 500 กิโลกรัม เพื่อให้ได้สารสกัด 50 ลิตร

กรมวิชาการเกษตร

2.4 ศึกษาการผลิตกรดซิตริกจากเปลือกหุ้มเมล็ดโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus spp.*

2.4.1 การทดสอบการทำแห้งเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟ Cherry โดยการใช้กระบวนการตากแห้ง (sun-dryer method) เป็นเวลา 14 วันจนความชื้นต่ำกว่า 8% และตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมี

Table 8 Physiology parameter of Cherry pods composition of *Coffea Arabica*

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

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

Figure 3 Cherry pod transformation for on-purpose utilization on food products using sun-drying method (14 days of exposed sun-dry)

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

Figure 4 Cherry pod classification for on-purpose utilization separated by grind size

2.4.2 การทดสอบการผลิตกรดซิตริกโดยการหมักแบบแห้ง

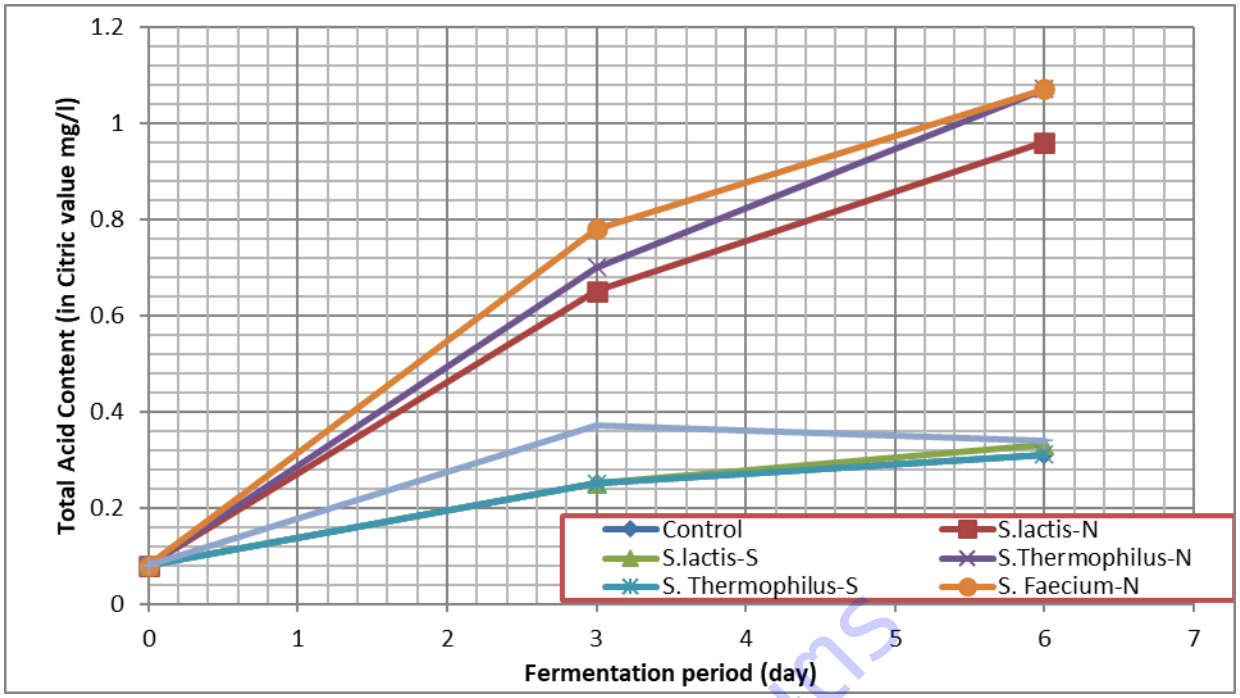


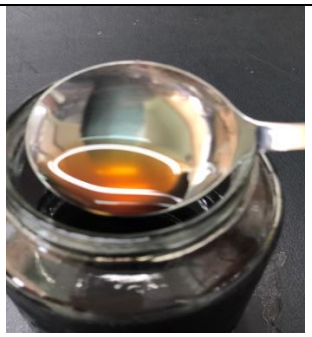
Figure 5 Citric acid production from solid state fermentation trial of *Streptococcus spp.* (*S. lactis, S. Thermophillus, S. Faecium*) with fresh cherry pod autoclaved (S) and non-autoclaved(N) in total acid content.

2.4.3 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ปรุงรส (aromat) จากเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟในการทดสอบผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆโดยสามารถแบ่งชนิดของผง GCP ได้เป็น 3 ชนิดตามการนำไปใช้โดยผงละเอียดที่สุดคือ

- GCP400 ที่สามารถนำไปทำซอสปรุงรสได้ที่ความหวาน 35 องศาบริกซ์เนื่องจากมีปริมาณ Sucrose สูง โดยเมื่อผสมกับ Glucose Syrup เพื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลสามารถพัฒนาซอสปรุงรสได้ ,
- GCP600 ที่สามารถนำไปเป็นผงโรยปรุงรสอาหารได้โดยเน้นอาหารคาว โดยการปรุงแต่งรสกับสมุนไพรและธัญพืช
- ขนาดใหญ่สุดที่ GGCP ที่นำไปผสมกับแป้งเค้กใช้ในผลิตภัณฑ์เบเกอร์รี่โดยสามารถนำไปทดแทนแป้งสาลีได้

เมื่อทดสอบการเก็บรักษาที่ 30 วันในถุง HDPE เปรียบเทียบกับถุง PE พบว่าถุง HDPE สามารถยืดอายุการเก็บรักษาผง GCP ได้ในเวลา 30 วันโดยสามารถควบคุมสี ความชื้นและกลิ่นของสาร Ethanone (กลิ่นผลไม้) ในการทดสอบผง GCP ทั้ง 3 ชนิด

กรมวิชาการเกษตร

ชนิดของ GCP ตาม size	*ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่พัฒนา*
GCP400	 GCP Aromat syrup
GCP600	GCP Aromat flavoring
GGCP	GCP Aromat powder

กรมวิชาการเกษตร

Table 9 Result of GCP storage explained in colors, moisture content and Ethanone (Fruity flavor) in HDPE packaging

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

กรมวิทยาศาสตร์

3. การนำเมือกกาแฟไปใช้ประโยชน์

3.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในเมือกกาแฟเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์

ผลการทดสอบการสกัดเพคตินจากเปลือกและเมือกกาแฟพบว่าสารสกัดเมือกกาแฟ (Coffee pectin extract : PCE) มีลักษณะเด่นประกอบไปด้วยสารประกอบหลากหลายโดยมีทำการสกัดด้วยกรดและละลายในแอลกอฮอล์นั้นผลการทดสอบพบว่าเป็นสารสกัดชนิด High Methoxyl Pectin (HM) ซึ่งจะไม่ถือเป็นสารก่อเจลเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความหวานและความเป็นกรดสูงโดยผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่าสารสกัดดังกล่าวประกอบด้วยกรดยูโรนิกสูง

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

Decanted Coffee Mucilage Coffee Pectin Extract (PCE)

Figure 6 Coffee Pectin presented after coffee fermentation and their extract

3.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางเคมีและการใช้สารเคลือบร่วมกับการเคลือบผิวผลไม้

ทดลองใช้เพคติน (PCE) เพื่อเป็นสารเคลือบผิวส้มโดยใช้วิธีการทดสอบเคลือบผิวโดยวิธีของ Ciolacu,2014 โดยการใช้ส่วนผสมระหว่าง high methoxyl pectin (2%) ผสมกับกลีเซอรอล น้ำมันดอกทานตะวันและแคลเซียมครอไรท์ พบว่าสามารถใช้ทดสอบเคลือบส้มได้และเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

กรมวิชาการเกษตร

Figure 7 Effect of using PCE coating on orange for extending shelf-life after storage for 30 days

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การใช้ประโยชนจากผลิตผลพลอยได้จากการหมักกาแฟทั้งสามชนิดในกระบวนการผลิตกาแฟเพื่อเพิ่มมูลค่านั้นเป็นทางเลือกการเพิ่มรายได้จากวัสดุเหลือใช้ ตั้งแต่การใช้เปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟที่มีปริมาณไนโตรเจนและไฟเบอร์สูงในการพัฒนาชีวภัณฑ์ป้องกันโรคแอนแทรคโนสในต้นกาแฟโดยการหมักแบบแห้งด้วย *A. niger* และการหมักกรดซิตริกด้วย *Steptococcus spp.* เพื่อพัฒนาเป็นสารปรุงรสอาหารได้แก่ซฮส, ผงปรุงรสและแป้งเปลือกกาแฟ นอกจากนี้เมือกกาแฟและน้ำหมักกาแฟที่มีปริมาณเพคตินสูงสามารถนำไปทดสอบสกัดเพคตินที่ทำการทดสอบเคลือบส้มให้ยืดอายุได้ ซึ่งการนำวัสดุเหลือใช้ทั้งหมดนี้ถือเป็นการสร้างรายได้เพิ่มขึ้นแก่เกษตรกรผู้แปรรูปกาแฟเพื่อใช้ประโยชน์ในชุมชน นอกจากนั้นยังลดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมจากการทิ้งวัสดุเหลือใช้ทั้งหมดที่ปัจจุบันสร้างความขัดแย้งให้ชุมชนอย่างมากก่อให้เกิดข้อพิพาทที่สำคัญของผู้ประกอบการกาแฟและชุมชนรอบข้างทั้งนี้งานวิจัยชิ้นนี้มุ่งสร้างทางเลือกที่สามารถสร้างรายได้ที่ยั้งยืนและลดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อมส่งเสริมการผลิตกาแฟที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมที่ยั่งยืน

10. การนำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ด้านวิชาการและเศรษฐกิจ ได้แก่ การนำเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟไปผลิตเป็นชีวภัณฑ์กำจัดเชื้อราและสารปรุงแต่งเพิ่มมูลค่าในการหมักกาแฟและการใช้เมือกกาแฟสกัดเพคตินเพื่อลดการทิ้งสู่ธรรมชาติ

2. ด้านสังคม ได้แก่ นำเทคโนโลยีการใช้ประโยชน์จากเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟไปเผยแพร่เพื่อให้เกษตรกรสามารถพัฒนาระบบการหมักกาแฟอะราบิก้า ลดต้นทุนและนำผลิตภัณฑ์ไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นทางเลือกที่ทำรายได้ให้กับเกษตรกรต่อไป

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) –

กรมวิชาการเกษตร

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.

โกเมศ สัตยาวุธ, สุกัญญา นิติยนต์, สุภัทรา เลิศวัฒนาเกียรติและฉัตรนภา ข่มอาวุธ, 2560. การหมักกาแฟโดยเชื้อจุลินทรีย์. รายงานการประชุมวิชาการการกองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว และแปรรูปผลิตผลเกษตร 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. วารสาร วิทยาศาสตร์เกษตร. 39(3), 401-404.

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

ศูนย์วิจัยและพัฒนากาแฟบนที่สูง. 2542. การปลูกกาแฟและผลิตกาแฟอาราบิก้าบนที่สูง. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

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

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.

สงวนลิขสิทธิ์เกษตร

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.

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

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

Pandey, A. Soccol, CR. Nigam, P. Brand, D. Mohan, R. 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, 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.

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.

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

กรมวิทยาศาสตร