รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : วิจัยและพัฒนากาแฟ

2. **โครงการวิจัย** : โครงการวิจัยและพัฒนากระบวนการหมักกาแฟอาราบิก้าคุณภาพ

   กิจกรรม : -

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : ศึกษาการหมักกาแฟโดยจำลองแบบระบบย่อยอาหารของสัตว์

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Study of coffee fermentation process by simulation of animal digestive system

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง :	สุกัญญา นิติยนต์	สังกัด กวป.
ผู้ร่วมงาน :	โกเมศ สัตยาวุธ	สังกัด กวป.
	ฉัตรนภา ข่มอาวุธ	สังกัด สวส.
	สุภัทรา เลิศวัฒนาเกียรติ	สังกัด สวส.

5. **บทคัดย่อ**

กาแฟขี้ชะมดเป็นกาแฟพื้นเมืองของอินโดนีเซียที่มีราคาสูงเนื่องจากมีกลิ่นและรสที่เฉพาะตัว ผลิตโดยการหมักกาแฟในระบบย่อยอาหารของตัวชะมด เมล็ดกาแฟจะถูกย่อยโดยเอนไซม์และจุลินทรีย์ที่พบในระบบทางเดินอาหารของชะมด อย่างไรก็ตามการผลิตกาแฟขี้ชะมดมีข้อด้อยหลายประการ ได้แก่ ผลิตได้ในปริมาณน้อย ยากต่อการควบคุมคุณภาพ และผู้บริโภคบางกลุ่มไม่นิยมบริโภคเนื่องจากคำนึงถึงความสะอาดถูกสุขลักษณะอนามัย งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาการผลิตกาแฟให้มีคุณภาพและมีเอกลักษณ์แตกต่างจากการหมักกาแฟแบบดั้งเดิม (การแปรรูปกาแฟแบบเปียก) โดยการจำลองการหมักกาแฟเลียนแบบระบบย่อยอาหารสัตว์ให้มีคุณภาพใกล้เคียงกับกาแฟขี้ชะมดโดยไม่ใช้สัตว์ในการผลิต หรือได้กาแฟที่มีรสชาติเฉพาะตัวแตกต่างจากกาแฟที่ได้จากการแปรรูปตามวิธีดั้งเดิม จากการคัดแยกจุลินทรีย์พบว่าในขี้ชะมดประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ ได้แก่ แบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* ยีสต์และจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Shigella flexneri, Kurthia gibsonii* และ *Escherichia coli.* เมื่อทดสอบการหมักกาแฟโดยจุลินทรีย์ผสมที่คัดแยกได้จากขี้ชะมดพบว่าคุณภาพทางประสาทสัมผัสของกาแฟดีขึ้น และมีสารที่ให้กลิ่นผลไม้ ถั่ว เครื่องเทศ และกลิ่นโทนหวาน ได้แก่ Furfuryl

กรมวิชาการเกษตร

formate , 5 -methyl-2 -Furancarboxaldehyde, 3 -ethyl-2 ,5 -dimethyl-Pyrazine และ 2 -Methoxy-4-vinylphenol มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณใกล้เคียงกับกาแฟขี้ชะมด เมื่อทดสอบการหมักกาแฟโดยใช้เอนไซม์เปปซินและเอนไซม์จากตับอ่อน สามารถเพิ่มคุณภาพทางประสาทสัมผัสของกาแฟและสารเคมีที่ให้กลิ่นผลไม้และถั่ว ได้แก่ Furfuryl formate , 5-methyl-2-Furancarboxaldehyde และ 3-ethyl-2,5-dimethyl-Pyrazine เปลี่ยนแปลงปริมาณใกล้เคียงกับกาแฟขี้ชะมด จึงแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์และเอนไซม์ต่างมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีในกาแฟ และสามารถนำไปใช้ในการหมักกาแฟโดยการจำลองการหมักกาแฟเลียนแบบระบบย่อยอาหารของสัตว์ได้

Civet coffee has been known as the Indonesia traditional expensive coffee because of its unique aroma and flavor which was produced by a fermentation process in civet digestion system. The coffee beans were digested by enzymes and microbes that can be found in civet digestion. However, 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 microbial screening results revealed that civet feces contains beneficial microorganisms, including lactic acid bacteria. *Lactobacillus plantarum*, yeast and pathogenic microorganisms such as *Shigella flexneri, Kurthia gibsonii* and *Escherichia coli*. Coffee fermentation by using isolated microorganisms showed the higher coffee cupping score than that of traditional wet process. The concentrations of Furfuryl formate, 5-methyl-2-Furancarboxaldehyde, 3-ethyl-2,5-dimethyl-Pyrazine and 2-Methoxy-4-vinylphenol which theirs aroma were described as fruity, nutty, spicy and sweet taste were changed nearly to that of civet coffee. Coffee fermentation using pepsin or pancreatic enzymes could enhanced the coffee cupping score as well. The concentrations of Furfuryl formate, 5-methyl-2-Furancarboxaldehyde, and 3-ethyl-2,5-dimethyl-Pyrazine which theirs aroma were described as fruitty and nutty were changed nearly to that of civet coffee. The results suggested that microorganisms and enzymes affected the chemical composition in coffee and could be used for coffee fermentation process by simulation of animal digestive system.

กรมวิชาการเกษตร

6. คำนำ

กระบวนการหลังการเก็บเกี่ยวในการแปรรูปกาแฟอาราบิก้าเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อคุณภาพของกาแฟ โดยในประเทศไทยนั้นมีการแปรรูป 2 วิธีการ คือ การแปรรูปแบบเปียก (การหมัก) และการแปรรูปแบบแห้ง ซึ่งการแปรรูปกาแฟแบบเปียกถือเป็นวิธีการที่มีคุณภาพในการผลิตกาแฟอาราบิก้า กาแฟที่มีการหมักเพื่อย่อยเมือกหุ้มเมล็ดออก (digested mucilage) จะมีคุณภาพที่ดีกว่าเมล็ดกาแฟที่ล้างแบบธรรมดา (washed bean) และดีกว่าเมล็ดกาแฟที่ไม่เอาเมือกออก (mucilage bean) การหมักกาแฟแบบดั้งเดิมนั้นเกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์ธรรมชาติที่มากับเมล็ดกาแฟมีการเจริญ และย่อยเมือกหุ้มเมล็ดกาแฟ ซึ่งเป็นส่วนของเพคติน น้ำตาล เฮมิเซลลูโลส และส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (Wrigley, 1988) โดยจุลินทรีย์ที่พบส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียและยีสต์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเพคตินได้ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียแลคติกและยีสต์กลุ่มอื่นๆที่ไม่สร้างเอนไซม์ย่อยสลายเพคตินด้วย (Avallone et. al., 2001; Avallone et. al., 2002; Silva et. al. 2013) การศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักกาแฟอาราบิก้าในประเทศไทยพบว่ามีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ ยีสต์สายพันธุ์ *Pichia, Candida, Debaryomyces, Kluyveromyces* และเชื้อแบคทีเรียชนิด Enterobacteriaceae และแบคทีเรียแลคติคได้แก่ *Enterobactor, Bacillus subtilis, Erwinia, Enterococcus* และ *Leuconostoc* มากระหว่างการหมักกาแฟในบ่อหมักปกติ (Nasanit et. al., 2008) อย่างไรก็ตามการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการหมักเมล็ดกาแฟอาราบิก้ายังมีน้อยมากในประเทศไทย โกเมศ และคณะ (2561) และ สุกัญญา และคณะ (2562) ได้ทำการศึกษาพัฒนาการการหมักกาแฟในประเทศไทยโดยใช้จุลินทรีย์ จำนวน 2 วิธีการ ได้แก่ 1) การเร่งการหมักโดยเทคนิคเอเออเอฟ (AAF techniques) และ 2) การเร่งกระบวนการหมักกาแฟโดยใช้จุลินทรีย์ในระบบปิด ซึ่งทั้ง 2 วิธีใช้ยีสต์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการย่อยเมือกกาแฟ โดยกระบวนการเร่งการหมักโดยเทคนิคเอเออเอฟ ใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* BAwine ร่วมกับการควบคุมกรด การให้อากาศ โดยใช้ความเป็นกรดที่ pH 4.5 ทำหมักแบบออกซิเดชันที่ 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิห้อง สามารถลดระยะเวลาการหมักได้ จาก 120 ชั่วโมง ลดลงเหลือเวลาในการหมัก 18 ชั่วโมง และลดการใช้น้ำในกระบวนการหมักลงจากกระบวนการหมักแบบดั้งเดิมถึง 200 เปอร์เซ็นต์ ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสของกาแฟจากเทคนิคเอเออเอฟมีความโดดเด่นจากกาแฟหมักแบบดั้งเดิม ผลจากการทดสอบโดยใช้ Headspace-SPME-Gas Chromatography-Mass Spectrometry พบว่ากาแฟที่หมักโดยใช้เทคนิคเอเออเอฟมีแนวโน้มที่จะมีลักษณะใกล้เคียงกับกลิ่นของผลไม้และดอกไม้ และมีคะแนนทดสอบคุณภาพที่สูงขึ้นเป็น 85 – 87/100

กรมวิชาการเกษตร

(ตามวิธีของสภาภัณฑ์กาแฟพิเศษ) การเร่งกระบวนการหมักกาแฟโดยใช้จุลินทรีย์ในระบบปิด โดยใช้ยีสต์ *Pichia kluyveri* PRO-Y15 สามารถหมักกาแฟได้ดีในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิระหว่าง 14-27 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญกว้าง สามารถใช้น้ำที่มีค่า pH 5-8 ในการหมักกาแฟ โดยเมือกกาแฟจะหลุดจากเมล็ดกาแฟอย่างสมบูรณ์หลังจากเริ่มการหมักภายในเวลา 20-24 ชั่วโมง สามารถลดระยะเวลาการหมักกาแฟ การใช้ทรัพยากรน้ำและแรงงานที่ใช้ในการขัดเมือกกาแฟตามการแปรรูปกาแฟแบบดั้งเดิมลงได้ 80 เปอร์เซ็นต์ และกาแฟที่ได้จากการหมักโดยใช้หัวเชื้อยีสต์ *Pichia kluyveri* PRO-Y15 มีคุณภาพทางประสาทสัมผัสดีกว่าการหมักที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ จากรายงานการศึกษาการหมักกาแฟที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เติมลงในกระบวนการแปรรูปกาแฟนั้น มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มคุณภาพของกาแฟแล้วยังช่วยลดต้นทุนการผลิต

นอกเหนือจากการหมักกาแฟตามกรรมวิธีการผลิตแบบดั้งเดิมแล้ว 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 ยังสามารถคัดแยกจุลินทรีย์กรดแลคติกซึ่งเป็นจุลินทรีย์

กรมวิทยาศาสตร์

ที่มีประโยชน์ในการหมักกาแฟได้จากขี้ของชะมดได้อีกด้วย โดยแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จากขี้ชะมด ได้แก่ *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

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการหมักกาแฟโดยจำลองแบบระบบย่อยอาหารของสัตว์ โดยการคัดแยกจุลินทรีย์ และทดสอบการหมักกาแฟโดยใช้จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้และการหมักโดยใช้เอนไซม์ เพื่อพัฒนาคุณภาพของกาแฟให้มีความแตกต่างจากการหมักกาแฟแบบดั้งเดิม ลดการทรมานสัตว์

กรมวิชาการเกษตร

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. กาแฟ สายพันธุ์ *Coffea Arabica cv. Chiangmai 80*
2. ตัวอย่างขี้ชะมด
3. เครื่องวัดความขุ่น (LUTRON, TU-2016)
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (LUTRON, PH-230SD)
5. เครื่องวัดความชื้น (KETT, PM-450)
6. เครื่องวัดสีกาแฟคั่ว (ROAMI, TRA-300)
7. เครื่องวัดความหวานในกาแฟ (ATAGO, PAL-Coffee (BX/TDS))
8. เครื่องสเปกโตรโฟรโตมิเตอร์ (Hitachi, U5100)

9. เครื่องคั่วกาแฟ (Coffee Pro Direct, Sample pro-100)

10.เครื่องทดสอบกลิ่น (Gas Chromatography – Olfactory spectrometry, Perkin)

11. เครื่องแก้วและถังสำหรับหมักกาแฟ

12. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

13. สารเคมี ได้แก่ Hydrochoric acid, เอนไซม์เปปซิน, เอนไซม์จากตับอ่อน (Pancreatin)

- **วิธีการ**

1. คัดแยกจุลินทรีย์จากกาแฟขี้ชะมด

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

1.2 ตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียและยีสต์แยกได้โดยวิธีทางชีวเคมีและโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

2. ทดสอบการหมักกาแฟด้วยจุลินทรีย์ผสมที่แยกได้จากกาแฟขี้ชะมด

2.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

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

2.2 การหมักกาแฟด้วยจุลินทรีย์

นำผลมากาแฟสุกมาแช่น้ำ ทำการลอกส่วนเปลือกนอกออกด้วยมือ คัดเลือกเมล็ดเสียและเมล็ดที่ลอยน้ำออก ล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด บรรจุเมล็ดกาแฟลงในขวดหมักที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จำนวน 500 กรัม ทำการหมัก 2 วิธีคือ ไม่เติมจุลินทรีย์ (หมักแบบธรรมชาติ), เติมจุลินทรีย์ผสมที่แยกจากกาแฟขี้ชะมด ในข้อ 2.1

แผนการทดลอง

ออกแบบการทดลองแบบ t-test จำนวน 2 กรรมวิธี 10 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม ไม่เติมหัวเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 ใส่จุลินทรีย์ผสมที่แยกจากกาแฟขี้ชะมด ในข้อ 2.1

จากนั้นนำขวดหมักที่บรรจุเมล็ดกาแฟมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปิดฝา บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส หยุดการหมักกาแฟหลังจากหมักนาน 20 ชั่วโมง

3. ทดสอบการหมักกาแฟด้วยกรดและเอนไซม์เพื่อเลียนแบบสภาวะระบบย่อยอาหารของสัตว์

นำผลกาแฟสุกมาแช่น้ำ ทำการลอกส่วนเปลือกนอกออกด้วยมือ คัดเลือกเมล็ดเสียและเมล็ดที่ลอยน้ำออก ล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด บรรจุเมล็ดกาแฟลงในขวดหมักที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จำนวน 500

กรมวิชาการเกษตร

กรัม ทำการหมัก 4 วิธีคือ เติมกรดไฮโดรคลอริก เติมเอนไซม์เปปซิน และเติมเอนไซม์ผสมจากตับอ่อน Pancreatin (ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ไลเปส, เอนไซม์โปรติเอสและเอนไซม์อะไมเลส) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมกรดและเอนไซม์

แผนการทดลอง ออกแบบการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุมที่ไม่เติมกรดและเอนไซม์

กรรมวิธีที่ 2 กรดไฮโดรคลอริก 0.01%

กรรมวิธีที่ 3 เอนไซม์เปปซิน 1.4%

กรรมวิธีที่ 4 เอนไซม์จากตับอ่อน (Pancreatin 1.4%)

จากนั้นนำขวดหมักที่บรรจุเมล็ดกาแฟมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปิดฝา บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เพื่อเริ่มทำการหมัก หยุดการหมักกาแฟหลังจากหมักนาน 20 ชั่วโมง

4. การตรวจสอบคุณภาพกลิ่นรสของกาแฟที่หมักโดยการทดสอบการชิม (Cupping)

หลังจากหมักเสร็จแล้วล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไปตากแดดบนลานปูนซีเมนต์ปูด้วยผ้าใบหรือสแลน ประมาณ 3-4 วัน คอยพลิกกลับเมล็ดจนเมล็ดแห้ง สุ่มตัวอย่างไปวัดความชื้นให้มีเหลือประมาณไม่เกิน 12 % นำไปสีเปลือกกาแฟออกโดยใช้มือแกะเปลือกแห้งออก ทำการบรรจุเก็บ ในถุงพลาสติกสุญญากาศ นำเมล็ดกาแฟที่ผ่านการสีเปลือกออกแล้ว มาคั่วด้วยเครื่องคั่วเมล็ดกาแฟ โดยทำการคั่วในระดับปานกลาง (medium roast) ใช้เวลาการคั่วประมาณ 8-9 นาที เมื่อคั่วเสร็จแล้วจะได้เมล็ดกาแฟคั่วที่มีสีน้ำตาลดำ คัดเลือกเมล็ดที่คั่วไม่หมดซึ่งจะยังมีเปลือกสี น้ำตาลอ่อนบางๆอยู่ออกจากเมล็ดที่คั่วได้หมดซึ่งจะได้เมล็ดกาแฟที่มีสีน้ำตาลดำทั้งเมล็ด เก็บตัวอย่าง เมล็ดกาแฟที่ผ่านการคั่วใส่ถุงพลาสติกสุญญากาศ นำตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่วไปทำการวิเคราะห์ด้าน กายภาพ ได้แก่ ความชื้น สี ความหวาน ความเป็นกรดด่าง ปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำ ปริมาณกรดที่ละลายในน้ำและทดสอบการชิม (Cupping)

กรมวิชาการเกษตร

- **เวลาและสถานที่**

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

สถานที่ดำเนินการ : กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย (วาวี)

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

กาแฟขี้ชะมดที่ผลิตในฟาร์มเพาะเลี้ยงชะมดมีวิธีการผลิตโดยเกษตรกรเก็บและคัดเลือกผลเชอร์รี่กาแฟอาราบิก้าที่สุกเต็มที่จากต้นกาแฟเพื่อใช้เป็นอาหารของชะมด หลังจากที่ชะมดบริโภคเชอร์รี่กาแฟแล้วจะขับถ่ายเมล็ดกาแฟออกจากร่างกายในเช้าวันถัดไป เมล็ดกาแฟจะถูกย่อยอยู่ในระบบย่อยอาหารของชะมด

เป็นเวลาไม่เกิน 24 ชั่วโมง กาแฟขี้ชะมดสดที่ออกจากตัวชะมดมีลักษณะจับตัวเป็นก้อน เกษตรกรจะนำกาแฟขี้ชะมดที่ได้ไปตากแดดจนแห้ง และนำมาลอกกะลากาแฟออกก่อนคั่วกาแฟเพื่อขาย หากเป็นนอกฤดูของการเก็บเกี่ยวผลผลิตกาแฟ เกษตรกรจะใช้ผลไม้ เช่น กล้วย เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงชะมด ลักษณะของขี้ชะมดที่ได้จะเป็นก้อนเหมือนอุจาระทั่วไป (Figure 1)

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

เมื่อทำการทดสอบการหมักกาแฟโดยใช้จุลินทรีย์ผสมที่คัดแยกได้ในขวดหมักที่บรรจุเมล็ดกาแฟและบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง (Figure 3) เพื่อเลียนแบบการกินกาแฟของชะมด เมื่อครบเวลา 20 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของชุดควบคุมและชุดที่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์มีค่าลดลง จาก 5.2-5.4 เป็น 4.3 แสดงให้เห็นว่ามีการสร้างกรดในระหว่างการหมักทั้งสองกรรมวิธี ค่าความหวาน (Brix) มีแนวโน้มสูงขึ้น โดยชุดที่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์มีค่า Brix สูงกว่าชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่ามีกิจกรรมของจุลินทรีย์ในการย่อยเปลี่ยนรูปเพคตินในกาแฟเป็นน้ำตาลได้ดีกว่าชุดควบคุม และค่าความขุ่นของชุดที่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์สูงกว่าชุดควบคุมแสดงให้เห็นว่ามีการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีและมีการหลุดของเมือกหุ้มกาแฟได้ดี (Figure 4) ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการชิม (Cupping test) พบว่ากาแฟที่หมักโดยการเติมหัว

กรมวิชาการเกษตร

เชื้อจุลินทรีย์มีการเปลี่ยนแปลงรสชาติจากชุดควบคุม โดยกาแฟที่หมักโดยการเติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่แยกจากชะมดมีความซับซ้อนของกลิ่นกาแฟมากกว่าชุดควบคุม โดยกลิ่นที่ได้มีรสชาติของผลไม้ มีความเปรี้ยว และมีความนุ่มและรสชาติค้างในปาก (Aftertaste) ดีกว่าชุดควบคุม มีคะแนน Cupping ที่ 80±2 ซึ่งสูงกว่ากาแฟชุดควบคุม (73±2) (Table 1) แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกมาได้มีผลต่อการพัฒนาคุณภาพของกาแฟให้แตกต่างจากการหมักกาแฟแบบเปียก (wet process) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับกาแฟขี้ชะมดยังมีความแตกต่างของรสชาติ

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

กรมวิทยาศาสตร์

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

กรมวิชาการเกษตร

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการหมักกาแฟโดยจำลองแบบระบบย่อยอาหารของสัตว์ เพื่อพัฒนาคุณภาพของกาแฟให้มีความแตกต่างจากการหมักกาแฟแบบดั้งเดิม ลดการทรมานสัตว์ โดยขอบเขตของผลการวิจัยฉบับนี้ประกอบด้วย การคัดแยกจุลินทรีย์จากขี้ชะมด, การทดสอบการหมักกาแฟโดยใช้จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้และทดสอบการหมักโดยใช้เอนไซม์ จากผลการคัดแยกจุลินทรีย์พบว่าในขี้ชะมดประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ ได้แก่ แบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* ,ยีสต์และจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งเมื่อหมักกาแฟด้วยจุลินทรีย์ผสมที่คัดแยกได้ส่งผลให้คุณภาพทางประสาทสัมผัสของกาแฟดีขึ้นและใช้ระยะเวลาในการหมักกาแฟสั้นกว่าจากการหมักกาแฟแบบดั้งเดิม ความเข้มข้นของสารเคมีในกาแฟ ได้แก่ Furfuryl formate , 5-methyl-2-Furancarboxaldehyde, 3-ethyl-2,5-dimethyl-Pyrazine และ 2-Methoxy-4-vinylphenol ซึ่งให้กลิ่น ผลไม้ ถั่ว เครื่องเทศ และกลิ่นโทนหวาน มีการเปลี่ยนแปลงให้มีปริมาณใกล้เคียงกับกาแฟขี้ชะมด เมื่อทดสอบการหมักกาแฟโดยใช้เอนไซม์

เปปซินและเอนไซม์จากตับอ่อน สามารถเพิ่มคุณภาพทางประสาทสัมผัสของกาแฟดีเช่นกัน โดยความเข้มข้นของ Furfuryl formate , 5-methyl-2-Furancarboxaldehyde และ 3-ethyl-2,5-dimethyl-Pyrazine ซึ่งให้กลิ่น ผลไม้และถั่ว มีการเปลี่ยนแปลงให้มีปริมาณใกล้เคียงกับกาแฟขี้ชะมด จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์และเอนไซม์ต่างมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีในกาแฟ และสามารถนำไปใช้ในการหมักกาแฟโดยการจำลองการหมักกาแฟเลียนแบบระบบย่อยอาหารของสัตว์ได้ ซึ่งคณะผู้วิจัยจะทำการศึกษาโดยการรวมปัจจัยของจุลินทรีย์ (เลือกใช้เฉพาะจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรค) เอนไซม์ การปรับสภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหารของสัตว์ได้แก่ pH และอุณหภูมิ เพื่อจำลองแบบระบบการหมักกาแฟเลียนแบบระบบย่อยอาหารสัตว์ต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ด้านวิชาการและเศรษฐกิจ ได้แก่ ข้อมูลการหมักกาแฟโดยจำลองแบบระบบย่อยอาหารของสัตว์ สามารถใช้เพื่อการพัฒนาคุณภาพของกาแฟให้มีความแตกต่างจากการหมักกาแฟแบบดั้งเดิม เพิ่มมูลค่าของกาแฟ ทดแทนการผลิตกาแฟขี้ชะมดซึ่งมีข้อด้อยหลายประการ ได้แก่ ผลิตได้ในปริมาณน้อย ยากต่อการควบคุมคุณภาพ ผู้บริโภคบางกลุ่มไม่ต้องการบริโภคเนื่องจากคำนึงถึงความสะอาดถูกสุขลักษณะอนามัย

2. ด้านสังคม ได้แก่ ข้อมูลการหมักกาแฟโดยจำลองแบบระบบย่อยอาหารของสัตว์ สามารถนำไปเผยแพร่เพื่อให้เกษตรกรสามารถพัฒนากระบวนการหมักกาแฟอาราบิก้าคุณภาพได้ ให้เกษตรกรมีความรู้ความเข้าใจการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์และเอนไซม์ในการหมักกาแฟ พร้อมทั้งนำเสนอความคิดใหม่ในการพัฒนากาหมักกาแฟอาราบิก้าคุณภาพเพื่อเป็นทางเลือกที่ทำรายได้ให้กับเกษตรกรต่อไป ลดการทรมานสัตว์และทดแทนการผลิตกาแฟโดยใช้สัตว์เป็นตัวกลาง เช่น การผลิตกาแฟขี้ชะมด ซึ่งเป็นหนึ่งในกรรมวิธีที่เกษตรนิยมนำมาใช้เพื่อสร้างความแตกต่างและเพิ่มมูลค่าให้กับกาแฟ

กรมวิชาการเกษตร

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : -

12. เอกสารอ้างอิง

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

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

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

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

Batista, N., C. Ramos, D. Dias, A. Pinheiro 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

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. John Wiley & Sons, Ltd.: UK. 396 pp.

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.

Jumhawan, U., P.P. Putri, Yusianto, E. Marwani, T. Bamba 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.

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

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

กรมวิทยาศาสตร์

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.

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

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

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

กรมวิชาการเกษตร

Table 1 Physical properties and cupping score of roasting fermented coffee beans using civet microbes, hydrochloric acid and enzyme (pepsin and pancreatin) for 20 hours.

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

Table 2 Chemical compounds and flavor/aroma description of fermentation coffee

No.	Chemical compound in coffee	Flavor/Aroma
1	3-methyl-Butanal	Chocolate
2	2-Furanmethanol	Bready
3	Methyl-Pyrazine	Nutty
4	3-Furaldehyde	Bready
5	Furfuryl formate	Fruity
6	Ethanone	Almond
7	2,6-dimethyl-Pyrazine	Nutty
8	5-methyl-2-Furancarboxaldehyde	Sweet, Caramel, Nutty
9	Acetate-2-Furanmethanol	Fruity
10	2-ethyl-3-methyl-Pyrazine	Nutty
11	4-Pyridinemethanol	Undescribed
12	Bicyclo[2.2.2]octane, 1-bromo-4-methyl-	Undescribed
13	3-ethyl-2,5-dimethyl-Pyrazine	Nutty
14	Linalool	Floral, Green,Nutty
15	1H-Pyrrole, 1-(2-furanylmethyl)-	Vegetative, Ceral, Bready
16	2-Methoxy-4-vinylphenol	Spicy,Sweet taste
17	Caffeine	Beany roasted coffee

Note. Flavor/Aroma description from Flament, 2002 and Aprotosoaie et. al, 2016

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1 Caged Civet

Figure 2 Appearance of civet feces and isolation of microbial from civet feces.

Figure 3 Fermentation process of coffee in jar, green bean coffee and roasted coffee

Figure 4 Coffee fermentation profiles of traditional wet process (Control) and fermentation by using civet microbes process explain in pH, Brix and Turbidity (NTU) in fermentation jar

กรมวิชาการเกษตร

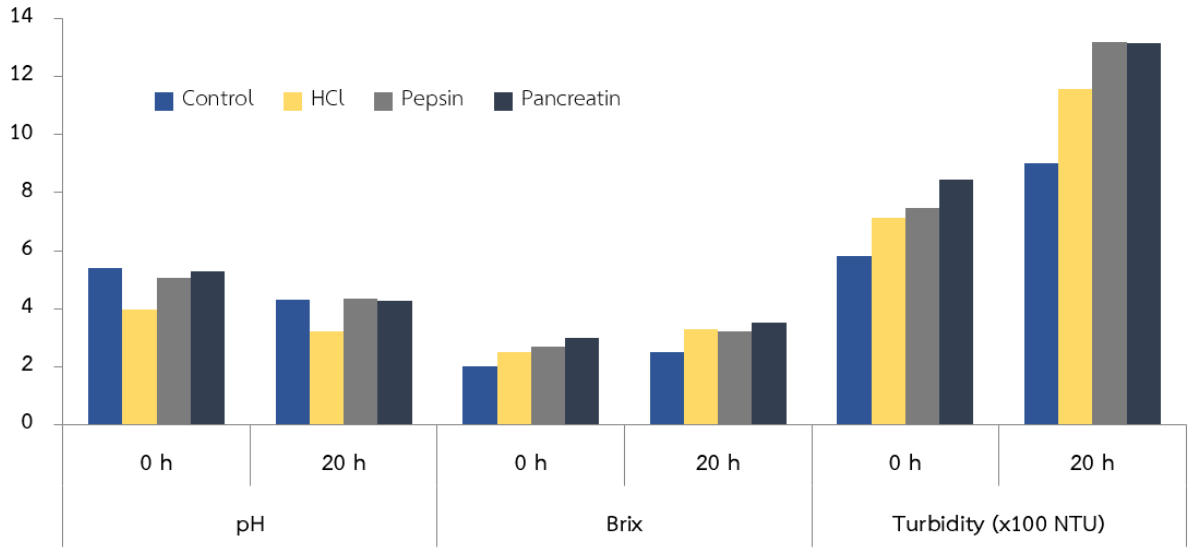

Figure 5 Coffee fermentation profiles of four treatments (Control, HCl, Pepsin and pancreatin) explain in pH, Brix and Turbidity (NTU) in fermentation jar.

กรมวิชาการเกษตร

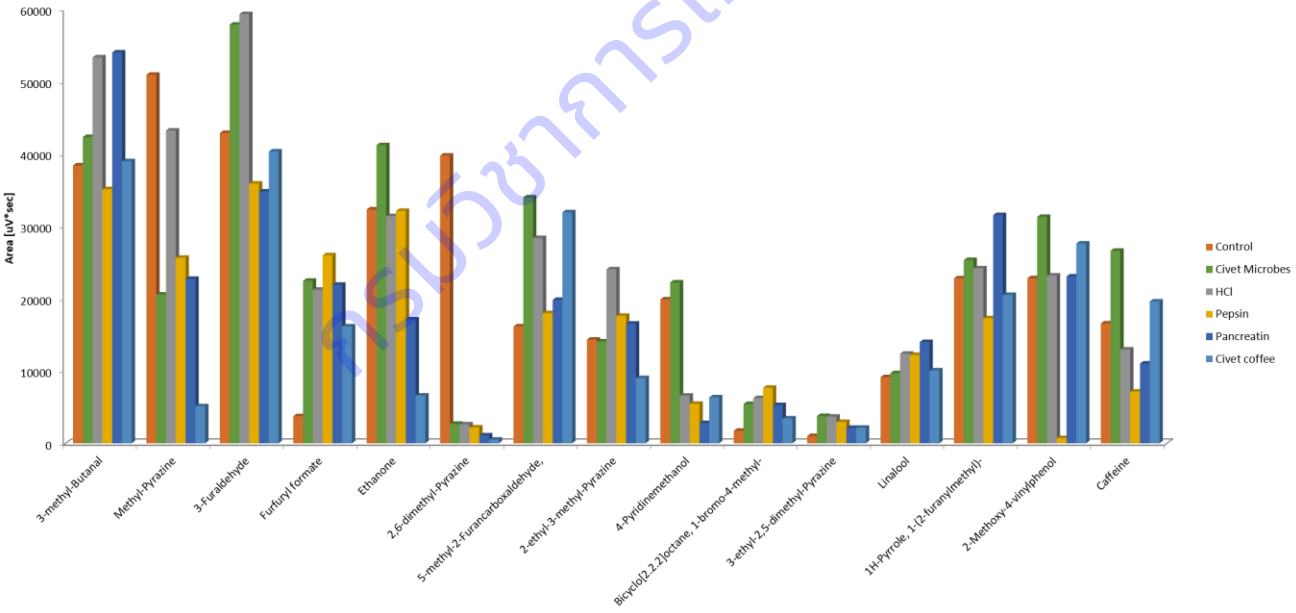

Figure 6 Chemical compounds in roasted fermentation coffee and civet coffee.

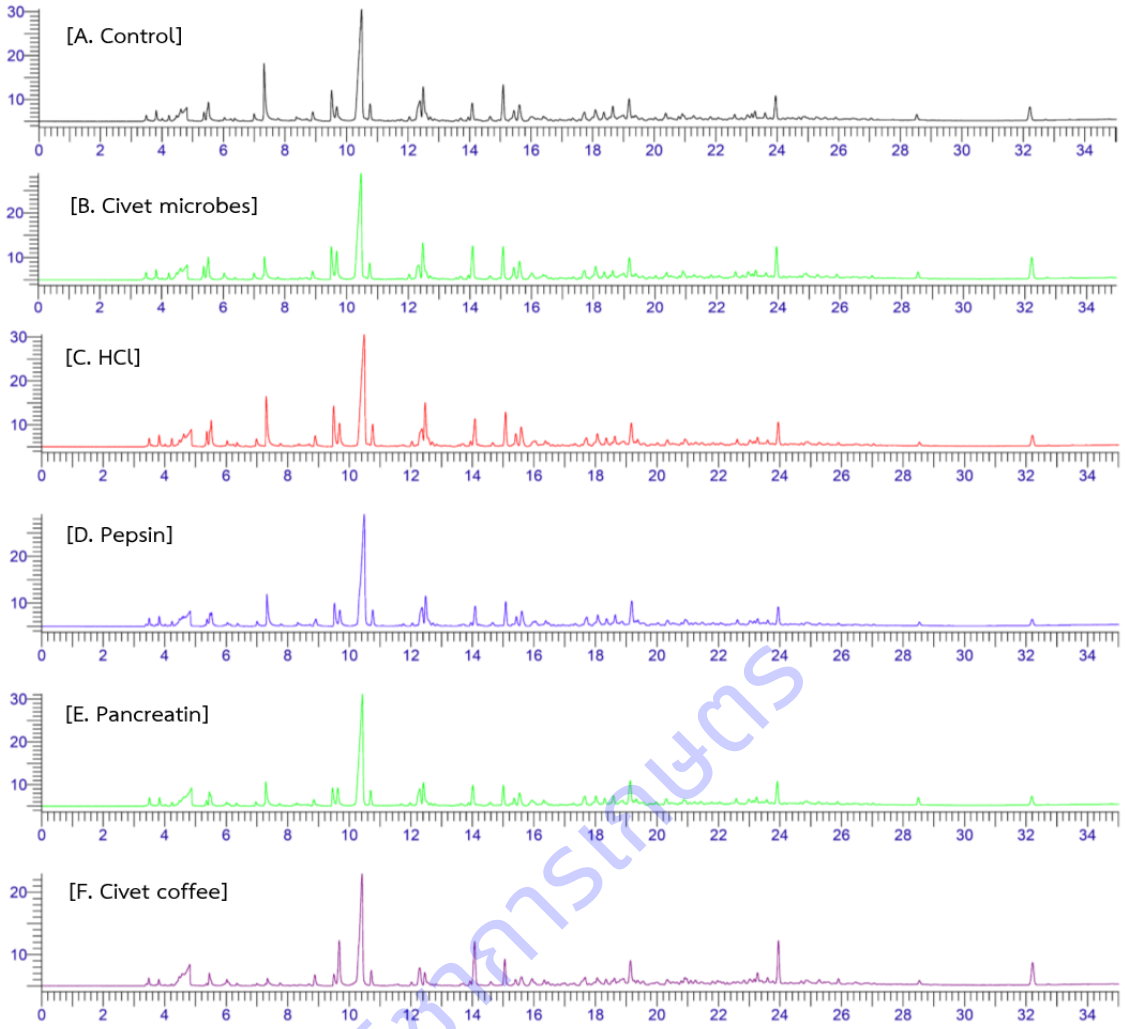

Figure 7 Chromatograms of chemical compounds in roasted fermentation coffee and civet coffee.

กรมวิทยาศาสตร