การพัฒนาหัวเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายสำหรับใช้ในกระบวนการหมักกาแฟอะราบิกาเพื่อเพิ่มคุณภาพด้านกลิ่นรสของกาแฟ

IMPROVEMENT OF MUTANT YEAST STRAIN AS STRATER CULTURE TO ENHANCE FLAVOR QUALITY OF ARABICA COFFEE

เยาวภา มีอำพันธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2565

การพัฒนาหัวเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายสำหรับใช้ในกระบวนการหมักกาแฟอะราบิกาเพื่อเพิ่มคุณภาพด้านกลิ่นรสของกาแฟ

เยาวภา มีอำพันธ์

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

IMPROVEMENT OF MUTANT YEAST STRAIN AS STRATER CULTURE TO ENHANCE FLAVOR QUALITY OF ARABICA COFFEE

YAOWAPA MEEAMPUN

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of MASTER OF SCIENCE

(Applied Microbiology)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2022

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาหัวเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายสำหรับใช้ในกระบวนการหมักกาแฟอะราบิกาเพื่อเพิ่มคุณภาพด้านกลิ่นรสของกาแฟ

ของ

เยาวภา มีอำพันธ์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

.....

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุขุมาภรณ์ กระจ่างสังข์)

..... ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธนศักดิ์ ล้อมทอง)

..... ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์สุริษา สุวรรณรังษี)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พิชาภัค ศรียาภัย)

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาหัวเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายสำหรับใช้ในกระบวนการหมักกาแฟอะราบิกาเพื่อเพิ่มคุณภาพด้านกลิ่นรสของกาแฟ
ผู้วิจัย	เยาวภา มีอำพันธ์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุขุมาภรณ์ กระจ่างสังข์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ สุริษา สุวรรณรังษี

กาแฟอะราบิกาเป็นกาแฟที่นิยมและจำหน่ายได้มูลค่าสูง แต่ด้วยปัญหาจากกระบวนการต้นน้ำเป็นสาเหตุให้เมล็ดกาแฟไทยมีคุณภาพไม่คงที่และมีราคาต่ำ ในกระบวนการหมักกาแฟจุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญในการสร้างสารเมทาบอไลต์ และ volatile compound ชนิดต่างๆ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกลายพันธุ์ การคัดเลือก และศึกษาคุณลักษณะของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย Wickerhamomyces anomalus สายพันธุ์ YWP1-3 ที่มีประสิทธิภาพในการเป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักกาแฟอะราบิกาเพื่อเพิ่มคุณภาพทางด้านกลิ่นรสกาแฟ จากการศึกษาพบว่ามีเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย 6 สายพันธุ์มีความสามารถผลิตเอนไซม์เพกติเนสบนอาหารแข็งสูงกว่าสายพันธุ์ปกติ โดยเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย UV22-2 มีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อเนื่องจากมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพกติเนสบนอาหารแข็งสูงถึง 50.2 เปอร์เซ็นต์ และมีกิจกรรมของเอนไซม์เพกติเนสในอาหารเหลวเท่ากับ 332.35 U/ml เจริญได้ดีในอาหาร YM broth และ Mucilage broth โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.59 and 0.49 ต่อชั่วโมงตามลำดับ มีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้หลากหลายชนิดซึ่งมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมถึง 6 ชนิดและจากผลการประเมินคุณภาพกาแฟด้วยวิธีการชิมมีคะแนนสูงถึง 86 คะแนน และมีกลิ่นถั่ว แอปเปิลเขียว สับปะรด คาราเมล แอปเปิลไซเดอร์ ดอกไม้สีเหลือง และน้ำผึ้ง ซึ่งใกล้เคียงกับผลที่วิเคราะห์ทางเคมีที่พบ furfuryl alcohol และ furfuryl acetate สูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์สารพันธุกรรมทั้งหมดของ UV22-2 พบลำดับเบสของยีนที่มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิมหลายตำแหน่ง ดังนั้นการใช้เชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย W. anomalus UV22-2 เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนหมักกาแฟอะราบิกาสามารถช่วยเพิ่มคุณภาพทางด้านกลิ่นรสของกาแฟได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ : กาแฟ, กระบวนการหมัก, ยีสต์, การกลายพันธุ์

Title	IMPROVEMENT OF MUTANT YEAST STRAIN AS STRATER CULTURE TO ENHANCE FLAVOR QUALITY OF ARABICA COFFEE
Author	YAOWAPA MEEAMPUN
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2022
Thesis Advisor	Assistant Professor Dr. Sukhumaporn Krajangsang
Co Advisor	Dr. Surisa Suwanrangsee

Arabica coffee was the most popular and best-selling type of coffee. However, Thai coffee beans are low quality and priced due to issues in upstream processing. In coffee fermentation, microorganisms are essential in producing metabolites and volatile compounds. This work aims to study the mutation, selection, and characterization of the Wickerhamomyces anomalus strain YWP1-3 as a starter culture to enhance the flavor quality of Arabica coffee. The results revealed that six mutant strains could produce higher levels of pectinase enzyme on pectin agar medium than the wild-type strain. UV22-2 could produce pectinase enzyme on pectin agar medium with Pectin degrading index (PDI) up to 50.2% and had an enzyme activity of 332.35 U/ml. It grew well in YM and Mucilage broth with a maximum specific growth rate of 0.59 and 0.49 per hour, respectively. It can use various types of sugar. The sensory cupping evaluation of coffee quality received the highest score of 86 points and had taste notes of green apples, pineapple, caramel, apple cider, yellow flowers, and honey, which were similar to the volatile compounds and the analysis found higher levels of furfuryl alcohol and furfuryl acetate than other samples. Furthermore, the complete genome analysis revealed that UV22-2 had many mutation sites compared to the wild-type strain. These findings suggested that UV22-2 could be an influential starter culture for Arabica coffee fermentation.

Keyword : coffee, fermentation process, yeast, mutation

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดีเป็นเพราะผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจาก อาจารย์ ผศ.ดร.สุขุมาภรณ์ กระจ่างสังข์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และ ดร.สุริษา สุวรรณรังษี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ซึ่งเสียสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการจัดทำงานวิจัย ทำให้งานนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี รวมทั้ง ดร.วัลลภา หล่อเหลี่ยม รศ.ดร. ธนศักดิ์ ล้อมทอง และ รศ.ดร. พิชาภัค ศรียาภัย ที่ร่วมเป็นกรรมการในการสอบ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา ซึ่งทำให้ผู้วิจัยนำความรู้มาประยุกต์ใช้ในการจัดทำงานวิจัยครั้งนี้ และยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนาประเทศ ตามเจตนารมณ์ของการศึกษาตามหลักสูตรของภาควิชาจุลชีววิทยาต่อไป

เยาวภา มีอำพันธ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ

กิตติกรรมประกาศ ..... ช

สารบัญ ..... ฌ

สารบัญตาราง ..... ฐ

สารบัญรูปภาพ ..... ฑ

บทที่ 1 บทนำ 1

ภูมิหลัง 1

ความมุ่งหมายของงานวิจัย 2

ขอบเขตของงานวิจัย 2

สมมติฐานในการวิจัย 3

ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

1. กาแฟ 4

2. กาแฟสายพันธุ์อะราบิกา 4

3. อุตสาหกรรมกาแฟในประเทศไทย 5

4. ส่วนประกอบของเมล็ดกาแฟ 5

5. องค์ประกอบของเมือกกาแฟ 7

6. กระบวนการหมักกาแฟ 10

7. การประเมินคุณภาพของกาแฟทางด้านกลิ่นและรสชาติของกาแฟ 10

8. เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักกาแฟแบบเปียก 13

9. การปรับปรุงคุณภาพกาแฟด้านกลิ่นรสโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 16
10. การผลิตเอนไซม์เพกติเนสในการเพิ่มคุณภาพกลิ่นและรสของกาแฟ 22
11. การศึกษาการกลายพันธุ์เชื้อยีสต์ 23
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 25
อุปกรณ์และสารเคมี 25
1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง 25
2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 26
วิธีการดำเนินงานวิจัย 28
1. การศึกษาอัตราการเจริญของ *Wickerhamomyces anomalus* YWP1-3 28
2. การกลายพันธุ์และการคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย 28
2.1 การกลายพันธุ์ด้วยวิธีการฉายรังสียูวี 28
2.2 การกลายพันธุ์ด้วยวิธีการใช้สารเคมี 29
3.การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย 30
3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา 30
3.2 การศึกษาการผลิตเอนไซม์เพกติเนสบนอาหาร 30
3.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายในอาหารชนิดต่างๆ 30
3.4 การศึกษากิจกรรมเอนไซม์เพกติเนส เซลลูเลส และอะไมเลสในอาหารเหลว mucilage broth 31
3.4.1 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เพกติเนส 31
3.4.2 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 32
3.4.3 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส 32
3.5 การศึกษาความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ 33
4. กระบวนการหมักกาแฟด้วยหัวเชื้อยีสต์พันธุ์กลาย 33

4.1 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับการหมักกาแฟ 33
4.2 การทดสอบการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักกาแฟ 33
4.3 การเก็บเกี่ยวเมล็ดกาแฟหลังจากการหมักและการคั่วกาแฟ 34
5. การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ และชีวเคมีของกระบวนการหมักกาแฟอะราบิกา 34
5.1 การวัดค่าพีเอช ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ และค่าบริกซ์ 34
5.2 การนับจำนวนจุลินทรีย์ก่อนและหลังกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟ 34
5.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลในน้ำหมักเมล็ดกาแฟ 34
5.4 การวิเคราะห์สาร volatile compound ในเมล็ดกาแฟคั่ว 35
6. การประเมินคุณภาพของเมล็ดกาแฟคั่วด้วยการทดสอบประสาทสัมผัส 35
7. การศึกษาลำดับดีเอ็นเอทั้งหมดของยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีศักยภาพในการหมักกาแฟอะราบิกา 35
8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 36
บทที่ 4 ผลการทดลอง 37
1. การศึกษาอัตราการเจริญ ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี และลักษณะสัณฐานวิทยาเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อ *Wickerhamomyces anomalus* YWP1-3 37
2. การกลายพันธุ์ *W. anomalus* YWP1-3 ด้วยการฉายรังสียูวีและการใช้สารเคมี 39
3. การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักกาแฟอะราบิกาที่มีศักยภาพ 41
3.1 การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี และลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย 41
3.2 การศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายในอาหาร YMB, pectin broth และ mucilage broth 44
3.3 การศึกษาการผลิตเอนไซม์เพกติเนสบนอาหาร 47

3.4 การศึกษากิจกรรมเอนไซม์ เซลลูเลส อะไมเลส และเพกติเนส ในอาหาร mucilage broth 48
3.5 การศึกษาความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ 50
4. การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของกระบวนการหมักกาแฟอะราบิกา 52
5. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงประจุกรจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก 54
6. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำหมักเมล็ดกาแฟ 57
7. การประเมินคุณภาพของเมล็ดกาแฟด้วยการทดสอบประสาทสัมผัส 59
8. การวิเคราะห์สารเมแทบอไลต์ในเมล็ดกาแฟคั่ว 60
9. การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอทั้งหมดของยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีศักยภาพในการหมักกาแฟอะราบิกา 64
บทที่5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง 69
บรรณานุกรม 78
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 85
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี 89
ประวัติผู้เขียน 90

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 แสดงองค์ประกอบของเมือกกาแฟอะราบิกา 9

ตาราง 2 แสดงชนิดของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักกาแฟแบบเปียก 13

ตาราง 3 เครื่องมือที่ใช้การทดลอง 25

ตาราง 4 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 26

ตาราง 5 ตารางแสดงจำนวนเชื้อหลังการกลายพันธุ์ 41

ตาราง 6 ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี และลักษณะสัณฐานวิทยาเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม 42

ตาราง 7 ตารางคะแนนการทดสอบชิมและการประเมินกลิ่น 59

ตาราง 8 ค่าพื้นที่ใต้กราฟของสาร volatile compound ที่พบในเมล็ดกาแฟคั่วที่ได้จากการหมักกาแฟอะราบิกาด้วยหัวเชื้อยีสต์ 61

ตาราง 9 ตัวอย่างรายละเอียดการเกิดการกลายพันธุ์ของยีนที่สนใจจำนวน 3 ยีน ในจีโนมของ *W. anomalus* สายพันธุ์ UV22-2 66

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 ส่วนประกอบของผลกาแฟ 7

ภาพประกอบ 2 แนวทางการปรับปรุงคุณภาพด้านกลิ่นรสของกาแฟตั้งแต่หลังการเก็บเกี่ยวจนถึงมือผู้บริโภค โดยเส้นทึบเป็นแนวทางที่มีการศึกษาวิจัยแล้ว เส้นประเป็นแนวทางที่ควรศึกษาวิจัยในอนาคต 18

ภาพประกอบ 3 แสดงภาพรวมของบทบาทของสารตั้งต้นในการสร้างกลิ่นรสในกาแฟในระหว่างการคั่วและจากการสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิจากกระบวนการหมักกาแฟด้วยจุลินทรีย์..... 20

ภาพประกอบ 4 กลไกการปรับเปลี่ยนรสชาติของกาแฟโดยการหมักแบบหัวเชื้อยีสต์ผสมและ *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 21

ภาพประกอบ 5 ฉายรังสียูวีปลอดเชื้อ (Sterile UV box) 29

ภาพประกอบ 6 การเจริญของ *W. anomalus* YWP1-3 สายพันธุ์ดั้งเดิม ในอาหาร YMB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที..... 37

ภาพประกอบ 7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีของ *W. anomalus* YWP1-3 บนอาหาร YMA (ก) และภาพลักษณะสัณฐานเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1000 เท่า (ข) 38

ภาพประกอบ 8 การรอดชีวิตและการตายของ W. anomalus YWP1-3 หลังการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสียูวี (ก) และการใช้สาเคมี EMS (ข) 40

ภาพประกอบ 9 ภาพลักษณะสัณฐานเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1000 เท่า ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย 6 สายพันธุ์ 43

ภาพประกอบ 10 กราฟการเจริญของ W. anomalus YWP1-3 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย 6 สายพันธุ์ในอาหาร YMB (ก) pectin broth (ข) และ mucilage broth (ค) เมื่อทำการบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที..... 46

ภาพประกอบ 11 การเปรียบเทียบร้อยละดัชนีการย่อยเพกติน ของ W. anomalus YWP1-3 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย 6 สายพันธุ์บนอาหาร pectin agar ที่ทำการบ่มเป็นเวลา 4 วัน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 47

ภาพประกอบ 12 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส และเพกติเนส ของ W. anomalus YWP1-3 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย 6 สายพันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร mucilage broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที 49

ภาพประกอบ 13 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส และเพกติเนส ของ W. anomalus YWP1-3 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย 6 สายพันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร mucilage broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที 49

ภาพประกอบ 14 การเจริญของ W. anomalus YWP1-3 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย 6 สายพันธุ์ในอาหาร nitrogen yeast base ที่มีน้ำตาลต่างกัน 10 ชนิด หลังจากการบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 51

ภาพประกอบ 15 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช (ก) ปริมาณของแข็งละลายน้ำ (ข) และบริกซ์ (ค) ในระหว่างกระบวนการหมักกาแฟอะราบิกาด้วยหัวเชื้อ W. anomalus YWP1-3 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย 6 สายพันธุ์ 53

ภาพประกอบ 16 จำนวนจุลินทรีย์รวมทั้งหมด (ก) ยีสต์ (ข) และแบคทีเรียแลกติก (ค) ที่ได้จากกระบวนการหมักกาแฟอะราบิกาที่ 0 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง 56

ภาพประกอบ 17 ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส (ก) กลูโคส (ข) และอะราบิโนส (ค) ในน้ำหมักเมล็ดกาแฟที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 58

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

กาแฟเป็นเครื่องดื่มยอดนิยมของคนทั่วโลกซึ่งเป็นพืชยืนต้นที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจโลกโดยมีกว่า 50 ประเทศที่ทำการเพาะปลูกและเป็นสินค้าหลักในการส่งออกที่สร้างรายได้ให้กับเกษตรกรเป็นอย่างมาก ซึ่งพบว่าแหล่งการเพาะปลูกของกาแฟอยู่บริเวณเส้นศูนย์สูตรที่อยู่เหนือระดับน้ำทะเลเนื่องจากเป็นบริเวณที่มีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมในการเพาะปลูกกาแฟและให้ผลผลิตที่มีคุณภาพดี แต่ในปัจจุบันในประเทศไทยเกษตรกรนิยมปลูกพืชชนิดอื่นที่ให้ผลตอบแทนดีกว่าเนื่องจากกาแฟของประเทศไทยมีคุณภาพต่ำลง โดยกาแฟที่มีคุณภาพต่ำทำให้ไม่สามารถแข่งขันในตลาดโลกได้ และอีกทั้งมีค่าใช้จ่ายสูงในการผลิตแต่ขายได้ในราคาต่ำ ซึ่งทำให้เกิดปัญหาด้านการตลาดของกาแฟไทย ส่งผลให้ผู้ผลิตกาแฟพยายามหาวิธีการที่จะเพิ่มคุณภาพของกาแฟโดยเฉพาะคุณภาพทางด้านรสชาติ โดยกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟเป็นกระบวนการสำคัญที่สามารถเพิ่มคุณภาพด้านกลิ่นรสได้ ซึ่งจุลินทรีย์เป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยให้กระบวนการหมักประสบความสำเร็จและสามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์กาแฟได้ในหลายประเทศ เช่น บราซิล เอธิโอเปีย เกาหลี เป็นต้น โดยนำยีสต์ที่แยกได้จากกระบวนการผลิตกาแฟเป็นหัวเชื้อยีสต์เพื่อใช้ในกระบวนการหมักทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ และในพื้นที่จริงที่ทำการผลิตกาแฟของเกษตรกร ซึ่งการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนากระบวนการหมักกาแฟอะราบิกาในประเทศไทยโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์มีไม่มากนัก นอกจากนี้พบว่ายังไม่มีการรายงานการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์กลายในการหมักกาแฟ โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้ มีการคัดแยกเชื้อยีสต์จากกระบวนการหมักกาแฟแบบเปียก ณ ดอยผาตั้ง จังหวัดเชียงราย ผลจากการทดสอบ *Wickerhamomyces anomalus* สายพันธุ์ YWP1-3 พบว่าสามารถใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักกาแฟอะราบิกาได้โดยสามารถเพิ่มคุณภาพด้านกลิ่นและรสของกาแฟ นอกจากนี้เมื่อศึกษาคุณสมบัติพบว่าสายพันธุ์ YWP1-3 สามารถผลิตเอนไซม์เพกติเนสได้ โดยเอนไซม์เพกติเนสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยเพกตินซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของเมล็ดกาแฟและสร้างสารเมแทบอไลต์ และสารระเหยต่างๆ (volatile compound) ออกมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการกลายพันธุ์ยีสต์ *Wickerhamomyces anomalus* YWP1-3 แบบชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induced mutation) และทำการศึกษาคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์และการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ โดยเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่ถูกคัดเลือกนำไปใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักกาแฟเพื่อให้ได้คุณภาพด้านกลิ่นรสที่ดียิ่งขึ้น

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

1. เพื่อกลายพันธุ์และคัดเลือกเชื้อยีสต์พันธุ์กลาย *Wickerhamomyces anomalus* YWP1-3 ที่มีประสิทธิภาพในการเป็นหัวเชื้อในขั้นตอนกระบวนการหมักกาแฟ

2. เพื่อศึกษาคุณลักษณะของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย

3. เพื่อนำหัวเชื้อยีสต์พันธุ์กลายมาประยุกต์ในใช้ขั้นตอนกระบวนการหมักกาแฟ

4. เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมทั้งหมดของเชื้อยีสต์พันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิม

ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้ศึกษาการกลายพันธุ์เชื้อยีสต์ *Wickerhamomyces anomalus* YWP1-3 เพื่อใช้ในการผลิตเป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักกาแฟอะราบิกาแบบเปียก โดยทำการกลายพันธุ์เชื้อยีสต์ด้วยวิธีการฉายรังสียูวีและการใช้สารเคมี จากนั้นเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่ถูกคัดเลือกจะถูกศึกษาคุณสมบัติการเจริญในอาหารเหลวชนิดต่างๆ การผลิตเอนไซม์เพกติเนส เซลลูเลส และอะไมเลส รวมทั้งความสามารถในการใช้น้ำตาลหลากหลายชนิด และนำไปผลิตเป็นหัวเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายเพื่อใช้ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟอะราบิกาแบบเปียก โดยทำการทดสอบเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม และการหมักกาแฟแบบธรรมชาติโดยไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก ตัวอย่างน้ำหมักกาแฟในระหว่างการหมักถูกวัดค่าบริกซ์ (°Brix) ค่าพีเอช (pH) ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TDS) และวิเคราะห์หาชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รวมไปถึงการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์รวมทั้งหมด ยีสต์ และแบคทีเรียกรดแลคติก ก่อนและหลังกระบวนการหมัก เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟถูกนำไปตากให้แห้งและคั่ว เพื่อทดสอบคุณภาพของเมล็ดกาแฟด้านกลิ่นรสด้วยวิธีการชิมเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ทางเคมีด้วย Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) เชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่ได้รับการคัดเลือกว่ามีประสิทธิภาพในการพัฒนาคุณภาพกลิ่นรสกาแฟถูกนำไปวิเคราะห์การหาลำดับเบสของสารพันธุกรรมทั้งหมด (Whole genome sequencing) เพื่อศึกษาลักษณะที่แตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม

สมมติฐานในการวิจัย

เชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่ได้รับการคัดเลือกมีความสามารถในการเป็นหัวเชื้อที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมักและทำให้เมล็ดกาแฟอะราบิกามีคุณภาพ โดยให้กลิ่นและรสชาติที่ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักด้วยสายพันธุ์ดั้งเดิมและการหมักกาแฟแบบธรรมชาติ

ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ได้เชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพเมื่อนำไปใช้ในกระบวนการหมักกาแฟ
2. ได้หัวเชื้อยีสต์และขั้นตอนการผลิตกาแฟที่ทำให้ได้เมล็ดกาแฟอะราบิกาที่มีคุณภาพ
3. ได้ข้อมูลความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมทั้งหมดของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิม

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. กาแฟ

กาแฟ ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Coffea* spp. จัดอยู่ในวงศ์ Rubiaceae สกุล *Coffea* นิยมปลูกตามบริเวณแถบเส้นศูนย์สูตร แบ่งออกเป็น 4 พื้นที่เพาะปลูกที่สำคัญ คือ แถบแอฟริกาและแหลมอาหรับ แถบอเมริกากลางและอเมริกาใต้ แถบอินโดนีเซีย และแถบบริเวณอื่นๆ ชนิดของเมล็ดกาแฟที่ปลูกในพื้นที่แตกต่างกันจะให้รสชาติและมีเอกลักษณ์แตกต่างอีกกันออกด้วย กาแฟเป็นพืชตระกูลเชอร์รี่ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในประเทศแถบเส้นศูนย์สูตร ทำให้พื้นที่การปลูกกาแฟของโลกมีลักษณะคล้ายเข็มขัด หรือ Coffee Belt ประเทศที่อยู่ในแถบเส้นศูนย์สูตรยกตัวอย่าง เช่น บราซิล เวียดนาม โคลอมเบีย อินโดนีเซีย เอธิโอเปีย ฮอนดูรัส อินเดีย ยูกานดา เม็กซิโก กัวเตมาลา และไทย เป็นต้น ต้นกาแฟถูกจัดเป็นต้นไม้ประเภทไม่ผลัดใบ มีขนาดสูงถึง 3-5 เมตร ดอกของต้นกาแฟมีลักษณะสีขาว มีกลิ่นหอม ส่วนใหญ่ดอกกาแฟจะออกจากข้อของกิ่งกาแฟ โดยเริ่มจากข้อที่อยู่ใกล้ลำต้นออกไปหาปลายกิ่ง เมล็ดกาแฟมีลักษณะรูปทรงรี ยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร เมล็ดกาแฟอ่อนจะมีสีเขียว เมื่อสุกสีของเมล็ดจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้มและสีดำในที่สุด ในระยะที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยว คือช่วงที่เมล็ดสุกมีสีแดงเข้ม ภายในผลกาแฟแต่ละผลจะมีเมล็ดอยู่สองเมล็ด แต่ผลกาแฟประมาณ 5-10% ของต้นจะมีเมล็ดเพียงเมล็ดเดียว สายพันธุ์กาแฟที่นิยมบริโภคมี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์อะราบิกา (Arabica) และ พันธุ์โรบัสต้า (Robusta) โดยกลิ่นและรสชาติของกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้าจะค่อนข้างเข้มข้นและขมกว่ากาแฟสายพันธุ์อะราบิกา โดยมีปริมาณของคาเฟอีนสูงกว่า 2% ขึ้นไป จึงทำให้กาแฟอะราบิกาเป็นที่นิยมมากกว่าด้วยกลิ่นและรสชาติที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะในพื้นที่ปลูกนั้นๆ รวมทั้งรสชาติกลมกล่อม นุ่มนวล ดื่มง่าย และมีปริมาณของคาเฟอีนที่ต่ำมากไม่ถึง 2% ส่งผลให้กาแฟอะราบิกาเป็นที่นิยมและขายได้มากที่สุดในโลกเฉลี่ยถึง 80% ของกาแฟทั่วโลก

2. กาแฟสายพันธุ์อะราบิกา

กาแฟอะราบิกา (*Coffea arabica*) เป็นสายพันธุ์กาแฟที่นิยมบริโภคมากที่สุดทั่วโลก โดยมีถิ่นกำเนิดมากจากที่ราบสูงของประเทศเอธิโอเปีย ลักษณะของเมล็ดที่ค่อนข้างเรียว ส่วนเส้นผ่าตรงกลางมีลักษณะคล้ายอักษรตัว S กาแฟสายพันธุ์อะราบิกาปลูกและดูแลรักษาค่อนข้างยากลำบาก ต้องปลูกในที่สูงเหนือกว่าระดับน้ำทะเลประมาณ 800-1000 เมตรขึ้นไป และอุณหภูมิที่เหมาะสม ในประเทศไทยนิยมปลูกทางตอนเหนือ เช่น เชียงใหม่ เชียงราย น่าน และแม่ฮ่องสอน

เป็นต้น โดยนิยมนำมาคั่ว บด ชงและกรองกากออก ปัจจุบันนิยมเรียกว่า "กาแฟสด" เนื่องจากมีกลิ่นและรสชาติที่กลมกล่อม หอมละมุน มีปริมาณของคาเฟอีนค่อนข้างต่ำ และมีความเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวในแต่ละพื้นที่ปลูก จึงทำให้เป็นที่นิยมของผู้บริโภคเครื่องดื่มกาแฟเป็นอย่างมาก

3. อุตสาหกรรมกาแฟในประเทศไทย

ข้อมูลทางสถิติจาก Euromonitor International ปี พ.ศ. 2562 ระบุว่า คนไทยดื่มกาแฟเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 15% ต่อปี หรือดื่มประมาณ 300 แก้วต่อคนต่อปี ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความต้องการบริโภคกาแฟในไทยมีแนวโน้มเติบโตมากขึ้นสอดคล้องกับปริมาณการนำเข้ากาแฟจากต่างประเทศที่เพิ่มขึ้นต่อเนื่อง เพราะการผลิตในประเทศยังไม่เพียงพอต่อความต้องการบริโภค ในปัจจุบันพฤติกรรมการบริโภคกาแฟของคนไทยที่เปลี่ยนไปส่งผลให้มีความต้องการกาแฟที่มีคุณภาพมากขึ้น ทำให้ทั้งร้านกาแฟระดับพรีเมี่ยมที่เป็นแฟรนไชส์ และร้านกาแฟท้องถิ่นที่เน้นกาแฟคุณภาพสูงยังคงต้องการเมล็ดกาแฟที่มีคุณภาพภายในประเทศ อีกทั้งมีการจ้างงานในสายอาชีพอุตสาหกรรมกาแฟเพิ่มมากขึ้น ได่แก่ บาริสต้า คนทำการแปรรูปกาแฟ และคนคั่วกาแฟ รวมถึงมีจำนวนของผู้เชี่ยวชาญด้านกาแฟ (Q-Grader) ที่ผ่านการรับรองโดยสถาบันคุณภาพกาแฟขึ้นจำนวนมาก ดังนั้นกาแฟที่ดีมีคุณภาพจึงเป็นที่ต้องการเป็นจำนวนมากทั้งในประเทศและต่างประเทศ

4. ส่วนประกอบของเมล็ดกาแฟ

ผลกาแฟ หรือ เชอรี่กาแฟ มีคุณลักษณะ รูปร่าง สี แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของกาแฟ โดยส่วนใหญ่แล้วมีองค์ประกอบหลัก ดังนี้

1. เปลือกกาแฟ (cherry pulp)

เปลือกกาแฟเป็นองค์ประกอบหลักของผลกาแฟคิดเป็น 29% ของน้ำหนักแห้ง โดยมีส่วนประกอบของ ผิว (outer skin) และ เนื้อผลกาแฟ (pulp) โดยสีของผิวจะแตกต่างกันตามชนิดของกาแฟ หรือระดับความสุกของกาแฟ ซึ่งเริ่มจากสีเขียวไปจนถึงสีแดงเมื่อผลกาแฟสุก นับได้ว่าเป็นเนื้อเยื่อชั้นแรกที่คอยปกป้องเมล็ดกาแฟ เปลือกกาแฟประกอบไปด้วย โปรตีน 4%-12% ลิพิด 1%-2% แร่ธาตุ 6%-10% คาร์โบไฮเดรต 45%-89% รวมไปถึงสารประกอบฟีนอลและคาเฟอีน 1.3% [1, 2]

2. เมือกกาแฟ (mucilage)

มิวซีเลจหรือเมือก เป็นชั้นเนื้อเยื่อห่อหุ้มกะลาไว้ มีลักษณะเป็นเมือกลื่นและมีความหวานสูง ซึ่งประกอบด้วย น้ำ 84.2% โปรตีน 8.9% น้ำตาลรีดิวซ์ 4.1% และเพกติน 0.91% ซึ่งเป็นแหล่งอาหารสำคัญสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักกาแฟ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์จะใช้สารอินทรีย์เหล่านี้ในการเจริญและสร้างสารที่ให้กลิ่นรสที่เฉพาะ ทำให้กาแฟอะราบิกามีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น [3]

3. กะลากาแฟ (parchment)

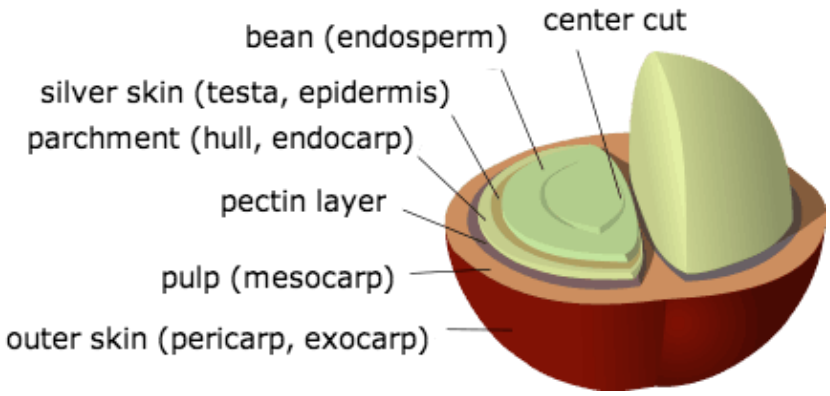
พาร์ชเมนต์หรือกะลา เป็นชั้นในสุดของผลกาแฟ ทำหน้าที่ปกป้องเมล็ดกาแฟที่อยู่ด้านในทั้งก่อนและหลังจากกระบวนการหมัก กะลาจะมีลักษณะคล้ายกับกระดาษ แห้งและเปราะ มีส่วนประกอบของลิกโนเซลลูโลสเป็นหลัก ซึ่งประกอบไปด้วยไฟเบอร์ 89-91% ของน้ำหนักแห้ง [1]

4. เยื่อกาแฟ (silver skin)

เยื่อกาแฟ เป็นเนื้อเยื่อบางๆ ห่อหุ้มเมล็ดกาแฟ ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากโรงคั่วกาแฟ โดยมีองค์ประกอบของไฟเบอร์สูงถึง 62.4% และในไฟเบอร์มีส่วนประกอบของ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยเฮมิเซลลูโลสของเยื่อกาแฟพบกลุ่มน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้แก่ ไซโลส กาแลคโตส อะราบิโนส และแมนโนส เป็นหลัก [1, 2]

5. เมล็ดกาแฟ (bean)

เป็นส่วนที่ใช้สะสมอาหารสำหรับเอ็มบริโอซึ่งเป็นส่วนที่สะสมสารอาหารต่างๆ ที่จะถูกนำไปใช้โดยเอ็มบริโอ้สำหรับการเจริญเติบโตเป็นกาแฟต้นใหม่ และก็ยังเป็นส่วนสำคัญต่อรสชาติของกาแฟ เพราะสารอินทรีย์ที่ถูกสะสมไว้สำหรับเอ็มบริโอจะถูกเปลี่ยนไปเป็นรสชาติของกาแฟระหว่างกระบวนการคั่ว



ภาพประกอบ 1 ส่วนประกอบของผลกาแฟ

5. องค์ประกอบของเมือกกาแฟ

เมือก (mucilage) อยู่ระหว่างผิวและกะลากาแฟ มีลักษณะเป็นเมือกเหนียว สีใส ติดกับเมล็ด ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเมล็ดกาแฟ โดยมีสารประกอบอินทรีย์ชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 1 องค์ประกอบหลักของเมือกกาแฟคือ เพกติน และน้ำตาล โดยจุลินทรีย์จะทำการสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยเพกตินและใช้น้ำตาลที่บริเวณเมือกเพื่อเป็นแหล่งอาหารในการเจริญ และผลิตสารเมแทบอไลต์ต่างๆ ออกมา มีงานวิจัยกล่าวว่าจุลินทรีย์ที่ย่อยเพกตินได้นั้นมีการผลิตเอนไซม์เพกตินไลเอส โพลีกาแลคทูโรเนส และเพกตินเอสเทอเรส ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์เพกติเนส โดยปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ และนอกจากการย่อยเพกตินเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารแล้วยังช่วยในเรื่องของการกำจัดเมือกและลดความเป็นกรดและความขมในเครื่องดื่มกาแฟ [4] จากรายงานในปี 2014 ได้อธิบายว่าการกำจัดเมือกออกนั้นช่วยให้บริเวณรอบเมล็ดกาแฟมีเมือกที่บางลงและสารเมแทบอไลต์ต่างๆ สามารถแทรกซึมเข้าสู่ตัวเมล็ดได้เพิ่มขึ้นและส่งผลต่อรสชาติของเครื่องดื่มกาแฟ [5] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแบคทีเรียและยีสต์ที่แยกได้จากกระบวนการกำจัดเมือก หรือกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟสามารถย่อยสลายเพกตินได้ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้จากเมือกของเมล็ดกาแฟไม่จำเป็นต้องมีความสามารถในการย่อยสลายเพกตินได้ [6] เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่รวมกันในกระบวนการหมักนั้นอาจจะใช้น้ำตาลที่มีอยู่และน้ำตาลที่ได้จากการย่อยพอลิแซคคาไรด์ในการเจริญ และส่งเสริมการสร้างกลิ่นรสที่ดีให้กาแฟได้เช่นกัน

เมือกภายในเมล็ดกาแฟมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งเป็นแหล่งอาหารสำคัญของเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักกาแฟเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างเมแทบอไลต์ต่างๆ ออกมา โดยน้ำตาลที่อยู่ภายในเมล็ดกาแฟในพื้นที่หรือภูมิภาคที่เพาะปลูกต่างกัน ส่งผลให้ชนิดและปริมาณของน้ำตาลภายในเมล็ดกาแฟแตกต่างกันออกไป โดยจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มมีข้อจำกัด

ในการใช้น้ำตาลแต่ละชนิด ดังนั้นจึงทำให้จุลินทรีย์ท้องถิ่นในกาแฟแต่ละพื้นที่แตกต่างกัน น้ำตาลในเมล็ดกาแฟและเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อคุณภาพของกาแฟทางด้านกลิ่นและรสชาติ ปี 2015 มีการรายงานว่าพบน้ำตาลกลูโคส 35.65 กาแลคโตส 36.67 และแลคโตส 1.06 กรัมต่อลิตร ซึ่งพบในเมือกกาแฟสายพันธุ์อะราบิกาที่ได้จาก เมืองราสโรซาส ทางตอนใต้ของประเทศเม็กซิโก [7] และงานวิจัยในปี 2000 เมือกกาแฟอะราบิกาจากเมืองฮาลาปา ประเทศเม็กซิโก ที่ทำการปลอกเปลือกกาแฟด้วยมือพบว่ามีน้ำตาลแรมโนส 9.6 % ฟรุกโตส 1.3 % อะราบิโนส 52.5 % ไซโลส 8.9 % แมนโนส 0.8 % กาแลคโตส 19.7 % และ กลูโคส 7.8 %Mole ของ constituent monosaccharides [8]

ตาราง 1 แสดงองค์ประกอบของเมือกกาแฟอะราบิกา

Parameter	Mucilage
Physical	
pH	5.6 ± 0.32
Moisture (%)	94.39 ± 0.51
Chemical composition	
Protein (g/100g)	0.67 ± 0.21
Non reducing sugar (g/100g)	1.01 ± 0.42
Reducing sugar (g/100g)	3.78 ± 0.51
Pectin (g/100g)	3.0 ± 0.83
Cellulose (g/100g)	0.29 ± 0.01
Total ash (g/100g)	0.36 ± 0.01
Crude fiber (g/100g)	2.26 ± 0.02
Fat (g/100g)	2.2 ± 0.34
Carbohydrate by difference (mg/mL)	2.6 ± 0.32
Calorific value (Kcal/100g)	33.32 ± 1.24
Minerals	
Iron (mg/100 mL)	1.36 ± 0.01
Sodium (mg/100 mL)	5.3 ± 0.21
Calcium (mg/100 mL)	32.63 ± 2.11
Magnesium (mg/100 mL)	4.63 ± 0.62
Potassium (mg/100 mL)	90.0 ± 3.29
Zinc (mg/100 mL)	0.36 ± 0.01

6. กระบวนการหมักกาแฟ

ในกระบวนการผลิตกาแฟมี 3 กระบวนการหลักที่นิยมใช้ในการแปรรูปกาแฟ ได้แก่ กระบวนการหมักแบบเปียก (Wet process) แบบแห้ง (Dry process) และแบบกึ่งแห้ง (Semi process) กระบวนการหมักแบบเปียก (Wet process) คือ การนำผลกาแฟสุกปอกเปลือกและแช่น้ำเพื่อเริ่มต้นกระบวนการหมัก โดยมีจุลินทรีย์เข้ามาบทบาทในการเปลี่ยนเมือกและน้ำตาลที่ติดอยู่บริเวณกาแฟกะลาเป็นสารเมแทบอไลต์ต่างๆ ทำให้เกิดสารระเหย (Volatile compound) ภายในเมล็ดกาแฟ โดยกระบวนการหมักแบบเปียกนี้ทำให้ได้กาแฟคุณภาพสูง ช่วยลดปัญหาการเน่าเสียของเมล็ดกาแฟระหว่างการตาก มีรสชาติที่ซับซ้อนและรสชาติที่สะอาดกว่าแบบอื่นๆ ซึ่งช่วยลดปัญหาเรื่องรสชาติที่ไม่พึงประสงค์ กระบวนการหมักแบบแห้ง (Dry process) คือ การนำผลกาแฟสุกโดยไม่มีการปอกเปลือกนำไปตากแดด เมื่อแห้งแล้วนำมาปอกเปลือก โดยดั้งเดิมแล้วกระบวนการหมักแบบแห้งนิยมใช้กับกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า ซึ่งไม่ต้องการคุณภาพกาแฟที่สูง เนื่องจากมีขั้นตอนน้อย และประหยัดต้นทุน ต่อมามีการนำมาประยุกต์ใช้กับการหมักกาแฟสายพันธุ์อะราบิกา กระบวนการหมักแบบแห้งจะยังคงลักษณะกลิ่นและรสชาติของกาแฟไว้ได้มากจึงเหมาะกับการนำเสนอความหลากหลายทางด้านกลิ่นและรสชาติของกาแฟที่แตกต่างกันในแต่ละแหล่งเพาะปลูกหรือสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน กระบวนการหมักแบบกึ่งแห้ง (Semi process) คือ การนำผลกาแฟสุกปอกเปลือกและกาแฟกะลาที่ยังคงมีเมือกติดอยู่ไปตาก โดยกาแฟที่ผ่านกระบวนการหมักแบบกึ่งแห้งนั้นจะมีรสชาติความหวานแบบตามธรรมชาติ เนื่องจากมีน้ำตาลของเมือกกาแฟเคลือบที่เมล็ดกาแฟระหว่างการตาก โดยวิธีนี้นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในทวีปอเมริกากลางเพื่อใช้ในการแปรรูปกาแฟ

7. การประเมินคุณภาพของกาแฟทางด้านกลิ่นและรสชาติของกาแฟ

การประเมินคุณภาพของกาแฟทางด้านกลิ่นและรสชาติอ้างอิงตามแบบฟอร์มการทดสอบการชิมกาแฟโดยสมาคมกาแฟพิเศษ (SCA หรือ Specialty Coffee Association) ซึ่งเป็นสมาคมที่ไม่แสวงหากำไร โดยรวบรวมสมาชิกผู้ที่มีความเชี่ยวชาญทางด้านกาแฟทั้งเกษตรกรผู้เพาะปลูกกาแฟ บาริสต้า รวมไปถึงนักคั่วกาแฟ ซึ่งเป็นการผนวกความรู้ของผู้เชี่ยวชาญในด้านต่างๆ เพื่อขับเคลื่อนอุตสาหกรรมกาแฟให้ดียิ่งขึ้น การประเมินคุณภาพของกาแฟของ SCA สำหรับการประเมินและการคัดแยกคุณภาพเมล็ดกาแฟสารนั้น เริ่มมาจากโครงการส่งเสริมของ International Coffee Organization เมื่อปีพ.ศ. 2542 ซึ่งแบบฟอร์มถูกจัดเป็นเครื่องมืออ้างอิงที่เชื่อถือได้ซึ่งก่อตั้งขึ้นโดยผู้เชี่ยวชาญในสาขาวิชาที่มีความรู้

โดยแบบแบบฟอร์มการคัปปิ้งกาแฟ SCA นั้น ประกอบการประเมินไปด้วย 10 คุณลักษณะของคุณภาพกาแฟ ได้แก่

1.กลิ่น (Fragrance / Aroma) หมายถึง ความรู้สึกถึงกลิ่นหอมของผงกาแฟที่บดไว้ไม่เกิน 15 นาที และกลิ่นหอมของกาแฟที่ระเหยออกมาเมื่อทำการเทน้ำร้อนลงยังผงกาแฟ เป็นเวลานาน 3-4 นาที

2. รสสัมผัส (Flavor) หมายถึง ความรู้สึกถึงรสสัมผัสของกาแฟ เมื่อเราได้สูด (Slurp) กาแฟเข้าไป เริ่มประเมินที่เวลา 8-10 นาที เริ่มนับจากการเทน้ำร้อนลงบนกาแฟ ณ อุณหภูมิห้องที่ 25 องศาเซลเซียส

3. ความคงค้าง (Aftertaste) หมายถึง ความยาวนานของกลิ่นรสที่ยังคงค้างอยู่ในลมหายใจ หลังจากที่เรากลืนกาแฟเข้าไปแล้วหรือว่าบ้วนออกมา หากความรู้สึกนั้นสั้น หรือเป็นความรู้สึกที่ไม่ดี คะแนนจะถูกจัดอยู่ในเกณฑ์ต่ำ เริ่มประเมินที่เวลา 8-10 นาที

4. ความเปรี้ยว (Acidity) หมายถึง ลักษณะความเป็นกรดในกาแฟ ในคุณลักษณะนี้ต้องระบุทั้งในส่วนที่เป็นคุณภาพและความเข้มข้นของความเป็นกรดของกาแฟด้วย โดยเริ่มประเมินที่เวลา 10-12 นาที

5. ความหนาหนัก (Body) หมายถึง การประเมินเมื่อของเหลวเข้าไปในปากและใช้ความรู้สึกระหว่างส่วนกลางของลิ้นกับเพดานปาก ในหัวข้อนี้จะมีการระบุทั้งในส่วนที่เป็นคุณภาพและความเข้มข้นของเนื้อสัมผัส โดยเริ่มประเมินที่เวลา 10-12 นาที

6. ความสมดุล (Balance) หมายถึง ความสมดุลหรือความรู้สึกถึงสัดส่วนที่เท่าๆกันของ กลิ่น รสสัมผัส ความคงค้าง ความเปรี้ยว และความหนาหนักของกาแฟ เริ่มประเมินที่เวลา 10-12 นาที

7. ความสม่ำเสมอ (Uniformity) หมายถึง ความไม่แตกต่างจากกัน โดยในหนึ่งตัวอย่างกาแฟ จะแบ่งออกเป็น 5 แก้ว แก้วที่มีความแตกต่างจากแก้วอื่น ๆ จะถูกตัดคะแนนออกไปจากสกอร์ชีท (1 แก้ว เท่ากับ 2 คะแนน) เริ่มประเมินที่เวลา 20 นาที

8. ความสะอาด (Clean cup) หมายถึง ความรู้สึกสะอาดในรสชาติกาแฟ ซึ่งหมายถึงกาแฟต้องไม่มีข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นกับเมล็ดกาแฟสาร ไม่ว่าจะเป็นขั้นตอนของเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว การแปรรูป หรือการจัดเก็บเพื่อรักษาก่อนการนำไปคั่ว แก้วที่มีกลิ่นหรือรสอันมาจากความไม่สะอาดนั้นจะถูกตัดคะแนนออกไปจากสกอร์ชีท (1 แก้ว เท่ากับ 2 คะแนน) เริ่มประเมินที่เวลา 20 นาที

9. ความหวาน (Sweetness) หมายถึง ความหวานในรสกาแฟ อันเกิดจากแป้งที่เปลี่ยนแปลงด้วยความร้อนเป็นน้ำตาล โดยแก้วที่มีข้อบกพร่องอย่างรุนแรง แก้วที่เปรี้ยวฝาด หรือแก้วที่มีกลิ่นเหม็นเขียว แก้วนั้นๆจะถูกตัดคะแนนออกไปจากสกอร์ชีท (1 แก้ว เท่ากับ 2 คะแนน) เริ่มประเมินที่เวลา 20 นาที

10. คะแนนโดยรวม (Overall) หมายถึง คะแนนโดยรวมหรือคะแนนจากนักชิม (Cupper Point) ซึ่งนักชิมให้คะแนนตามคุณลักษณะสำคัญโดยรวมของกาแฟ โดยไม่มีความเกี่ยวข้องกับความชื่นชอบหรือความคิดเห็นส่วนบุคคลของนักชิม

ส่วนที่1-6 เป็นการประเมินคุณลักษณะทางกายภาพต่าง ๆ ของเมล็ดกาแฟ และส่วนที่ 7-9 เป็นการประเมินถึงคุณภาพของเมล็ดกาแฟสาร ซึ่งหมายถึงคุณภาพของการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว การแปรรูป และรวมไปถึงการจัดเก็บเพื่อรักษาคุณภาพของกาแฟก่อนการนำไปคั่ว

8. เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักกาแฟแบบเปียก

ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1900 มีการรายงานชนิดของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักกาแฟแบบเปียก ดังนี้

ตาราง 2 แสดงชนิดของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักกาแฟแบบเปียก

จุลินทรีย์	สปีชีส์
แบคทีเรีย	*Klebsiella ozaenae*
	Klebsiella oxytoca
	Erwinia herbicola
	Erwinia dissolvens
	Hafnia spp.
	Enterobacter aerogenes
	Bacillus pumilus
	Lysinibacillus fusiformis
	Brevibacillus parabrevis
	Psychrobacillus psychrotolerans
	Paenibacillus illinoisensis
	Paenibacillus konsidensis
	Rhizobium radiobacter
	Rhodococcus pyridinivorans
	Pantoea vagans
	Pantoea agglomerans
	Microbacterium paraoxydans
	Microbacterium testaceum
แบคทีเรียกรดแลคติก	*Leuconostoc mesenteroides*
	Lactobacillus brevis
	Lactobacillus rhamnosus
	Lactobacillus plantaru
	Paenibacillus cookii
	Paenibacillus lactis

ตาราง 2 (ต่อ)

จุลินทรีย์	สปีชีส์
ยีสต์	*Kloeckera apiculata* var. *apis*
	Candida guilliermondii
	Candida tropicalis
	Candida parapsilosis
	Cryptococcus albidus
	Cryptococcus laurentii
	Pichia kluyveri
	Hanseniaspora uvarum
	Saccharomyces cerevisiae
	Debaryomyces hansenii
	Torulaspora delbrueckii
	Rhodotorula mucilaginosa
	Wickerhamomyces anomalus
	Saccharomycopsis fibuligera
	Papiliotrema flavescens
	Pichia kudriavzevii

นอกจากนี้มีรายงานว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากเมล็ดกาแฟอะราบิกาของประเทศเม็กซิโกที่ผ่านการหมักส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่มชอบอากาศ (Aerobic Gram-negative bacteria) ได้แก่ *Erwinia, Klebsiella* และพบแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์มากที่สุดเมื่อใช้อาหาร pectin medium ในการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมักกาแฟ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบมาก ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides* และ *Lactobacillus brevis* ในขณะที่ยีสต์ที่พบมาก ได้แก่ *K. apiculata* var. *apis, Crytococcus laurentii, Cryptococcus albidus* และ *Candida guilliermondii* ซึ่งแบคทีเรียและยีสต์เหล่านี้สามารถย่อยสลายเพกตินได้ แต่ก็พบว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้จากเมือกกาแฟไม่จำเป็นต้องมีความสามารถในการย่อยสลายเพกตินได้ [(6)]

ปี2018 มีงานวิจัยศึกษาเกี่ยวกับ pectinolytic microflora จากกระบวนการหมักกาแฟ เนื่องจากมีบทบาทในการส่งเสริมการย่อยเมือกกาแฟ โดยพบ pectinolytic microflora ได้แก่ *Klebsiella* spp., *Erwinia* spp., *Aerobacter* spp., *Escherichia* spp. และ *Bacillus* spp. เป็นต้น และยีสต์ ได้แก่ *S. marxianus, S. banyanus, S. cerevisiae* และ *Schizosaccharomyces* spp. เป็นต้น ในกระบวนการย่อยเมือกกาแฟนี้ส่งผลต่อปฏิกิริยา Caramelization และ Maillard reactions ในขั้นตอนการคั่วกาแฟเนื่องจากการย่อยเมือกกาแฟนั้นมีผลต่อปริมาณน้ำตาลที่อยู่ในเมล็ดกาแฟสด ทำให้เครื่องดื่มกาแฟนั้นมีความหวาน กลิ่น และรสชาติที่แตกต่างออกไป และในปี 2018 นักวิจัยทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากเปลือกกาแฟจากประเทศเอธิโอเปียที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์เพกติเนสพบจุลินทรีย์ ได้แก่ *Bacillus methylotrophicus, B. pumilus, B. subtilis, B. amyloliquefaciens, Exiguobacterium* sp., *Pusillimonas ginsengisoli,* และ *Staphylococcus* sp. [9]

ปี 2014 มีนักวิจัยได้ทำการคัดแยกยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมักแบบเปียกของกาแฟอะราบิกาจากประเทศบราซิลพบว่าเป็น *Candida glabrata, Saccharomyces* sp., *Pichia gulliermondii, Pichia caribbica* และ *Hanseniaspora opuntiae* [5] งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักเพื่อปรับปรุงคุณภาพของกาแฟในปี 2014 มีนักวิจัยใช้หัวเชื้อยีสต์ 4 สายพันธุ์ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* UFLA YCN727, *S. cerevisiae* UFLA YCN724, *Candida parapsilosis* UFLA YCN448 และ *Pichia guilliermondii* UFLA YCN731 ที่แยกได้จากผลกาแฟในกระบวนการผลิตกาแฟแบบแห้งและกึ่งแห้ง มาใช้ในการหมักกาแฟอะราบิกาที่ประเทศบราซิลพบว่ายีสต์สามารถเจริญได้ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟจนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก จากการตรวจสอบเมล็ดกาแฟหลังการคั่วไม่ พบกรดโพรพิโอนิกและบิวไทริก นอกจากนี้ยังพบสารระเหยทั้งหมด 48 ชนิด ซึ่งส่วนใหญ่จัดเป็นสารในกลุ่มแอลกอฮอล์ ฟูแรน แอลดีไฮด์ โดยกาแฟที่หมักโดยใช้หัวเชื้อยีสต์พบว่า มีรสชาติที่ดีกว่าการทดลองควบคุมโดยพบกลิ่นคาราเมล สมุนไพร และผลไม้ในกาแฟ [10]

งานวิจัยในปี 2014 นักวิจัยศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของประชากรยีสต์ในกระบวนการหมักกาแฟประเทศบราซิลโดยพบว่าประชากรของยีสต์หลังการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นจาก 6.60 เป็น 7.89 log CFU/g โดยมีการใช้น้ำตาลจากเปลือกกาแฟและผลิตกรดอินทรีย์ โดยผลิตกรดอะซิติกและกรดแล็กติกเป็นหลัก และผลจากการศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ยีสต์ก่อนและหลังกระบวนหมักพบว่าเริ่มต้นกระบวนการหมักพบประชากรยีสต์ทั้งหมด 35 สายพันธุ์ ได้แก่ *Saccharomyces* sp. 17 สายพันธุ์, *Torulaspora delbrueckii* 6

สายพันธุ์, *Pichia kluyveri* 7 สายพันธุ์, *Hanseniaspora uvarum* 2 สายพันธุ์, *Meyerozyma caribbica* 1 สายพันธุ์ และ *Torulaspora* sp. 1 สายพันธุ์ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักพบเหลือเพียง *Saccharomyces* sp. และ *Pichia kluyveri* เป็นหลัก นอกจากนี้ยังพบ *Hanseniaspora vineae* โดย *H. Vineae* ถูกพบมากในองุ่นซึ่งสามารถผลิตสารกลุ่ม acetate ester ในปริมาณมาก เช่น 2-phenylethyl acetate และ ethyl ซึ่งช่วยเพิ่มกลิ่นและรสชาติในขั้นตอนกระบวนการหมักองุ่นเพื่อผลิตไวน์ [5]

โดยการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักเมล็ดกาแฟในประเทศไทยมีไม่มากนัก เช่น Nasanit และคณะ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างกาแฟที่เก็บบริเวณจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย เพชรบูรณ์ และตากนั้น เป็นแบคทีเรีย *Enterobacter agglomerans*, *Erwinia dissolvens, Escherichia coli และ Klebsiella pneumonia* แบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus brevis, Lactococcus plantarum และ Enterococcus casseliflavus* แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus cereus* ในขณะที่ยีสต์ที่แยกได้ ได้แก่ *Candida, Pichia, Debaryomyces, Kluyveromyces* และ *Saccharomyces* [11]

9. การปรับปรุงคุณภาพกาแฟด้านกลิ่นรสโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์

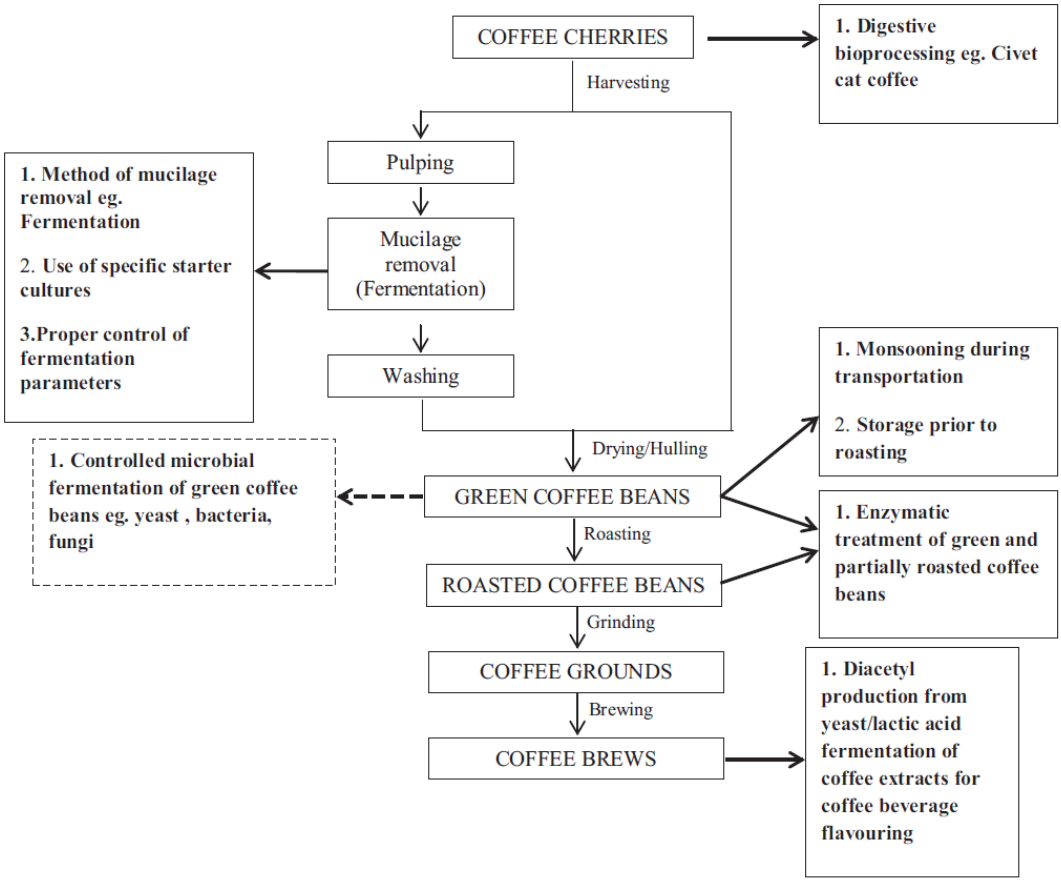
การปรับปรุงคุณภาพกาแฟนั้นมีแนวทางที่หลากหลาย แสดงดังภาพประกอบที่ 2 โดยวิธีการทางชีวภาพสามารถเพิ่มมูลค่าของกาแฟได้

กาแฟขี้ชะมด (Kopi Luwak) ซึ่งเป็นกาแฟชนิดที่มีราคาแพง มีจุดกำเนิดมาจากหมู่เกาะจาวา สุมาตรา และสุราเวสี ประเทศอินโดนิเซียซึ่งมีราคาประมาณ 500 เหรียญต่อปอนด์ เนื่องมาจากกระบวนการผลิตที่เฉพาะตัว [12] กาแฟชนิดนี้ผลิตจากเมล็ดกาแฟที่ชะมดกินและขับถ่ายออกมา โดยมีการผสมกรด เอนไซม์ ที่เกิดจากกระบวนการหมักในระบบย่อยอาหารของชะมด ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะช่วยย่อยโปรตีนทำให้เอนไซม์ชนิดอื่นๆ ซึมผ่านเข้าไปใน endocarp ของเมล็ดกาแฟได้ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดอะมิโนซึ่งทำให้เปลี่ยนแปลงกลิ่นรสของกาแฟได้ในระหว่างการคั่ว นอกจากนี้ยังพบว่าการย่อยสลายโปรตีนทำให้ช่วยลดความขม และทำให้กาแฟขี้ชะมดมีรสชาติเบาและมีรสเปรี้ยว

Black ivory coffee พบว่ามีราคาสูงถึง 800 เหรียญต่อปอนด์ ซึ่งกระบวนการผลิตกาแฟทำจากอุจาระของช้างซึ่งกระบวนการผลิตคล้ายกับกาแฟชะมดคือการให้ช้างกินเมล็ดกาแฟและใช้ระบบการย่อยของช้างในการหมักเมล็ดกาแฟ แต่พบว่า กรด เอนไซม์ และกระบวนการหมักแตกต่างจากกาแฟชะมด เนื่องจากระบบการย่อยของช้างและชะมดแตกต่างกัน

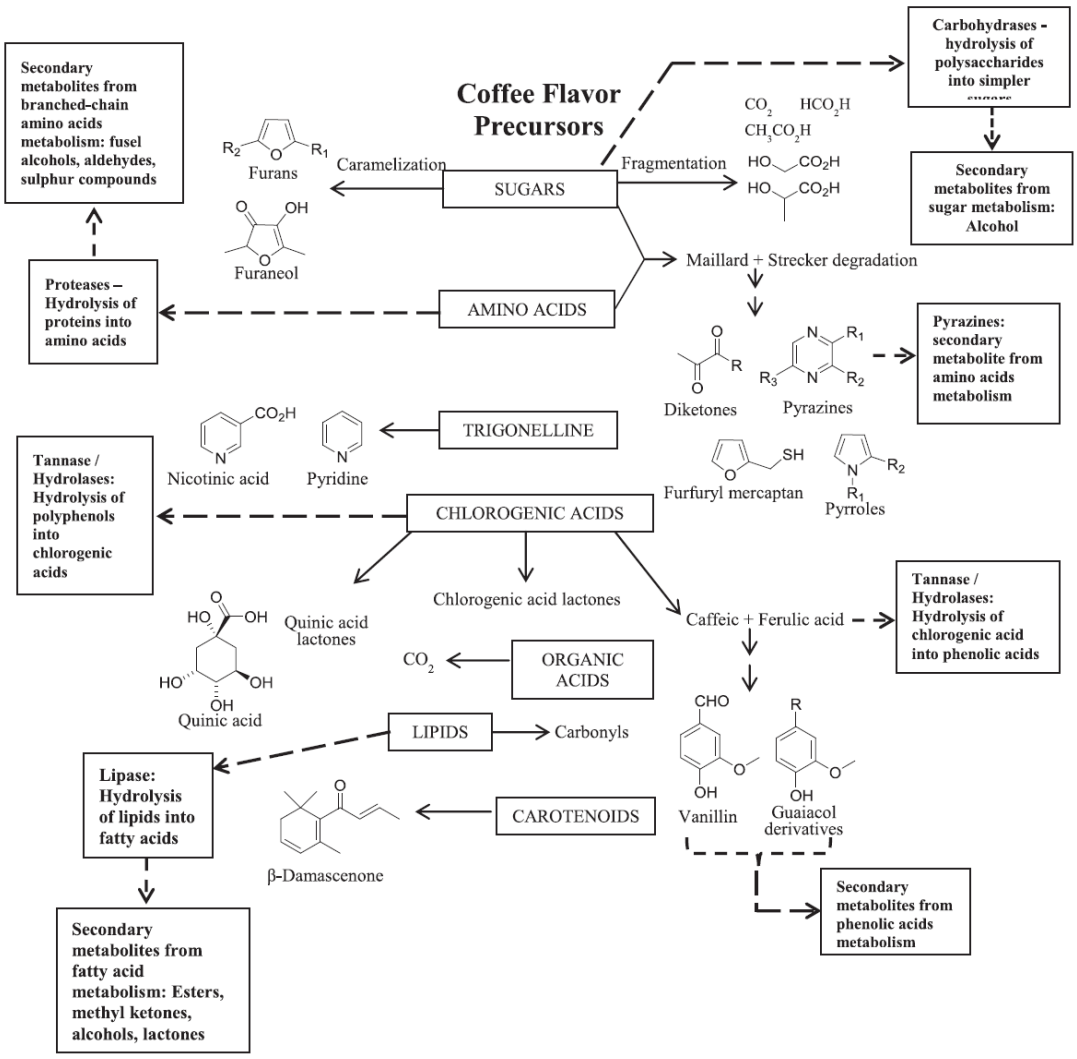
วิธีการผลิตกาแฟแบบ monsooning เป็นกระบวนการที่เริ่มต้นจากประเทศอินเดีย[13] โดยเป็นกระบวนการผลิตกาแฟเกิดจากการเก็บเมล็ดกาแฟในคลัง ในช่วงมรสุมทำให้เกิดความชื้นและมีเชื้อจุลินทรีย์เจริญได้ที่ผิวหน้าของเมล็ดกาแฟ ซึ่งเมื่อทำการศึกษาพบว่าพบเชื้อแบคทีเรีย 10^8 CFU/g และรา 10^5 CFU/g ซึ่งมีสูงกว่าเมล็ดกาแฟที่ไม่ใช่ monsooned coffee [13] โดยราที่พบได้แก่ *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Absidia* spp., *Syncephalastrum* spp., *Mucor* spp. และ *Rhizopus* spp.

ในขณะที่ยีสต์และแบคทีเรียมีรายงานว่าสามารถหมักน้ำตาลที่ได้จากเมล็ดกาแฟแล้วสร้างกลิ่นรสที่ดีได้ แต่พบว่าการใช้ยีสต์ในการหมักมักเกิดแอลกอฮอล์ซึ่งทำให้ได้กลิ่นรสของกาแฟที่ไม่ต้องการ ในปี 2003 มีนักวิจัยใช้ยีสต์ที่ไม่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ในการหมักกาแฟที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อนำกาแฟที่หมักได้ไปคั่วและชงดื่มมีกลิ่นรสของผลไม้และดอกไม้ในกาแฟ เนื่องจากมีการเปลี่ยนสาร 2- และ 3-methylbutanal ไปเป็นแอลกอฮอล์ thiol และสุดท้ายเปลี่ยนเป็น thioacetates และ diketones ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการหมักเมือกของเมล็ดกาแฟ จึงเป็นที่น่าสนใจในการพัฒนาคุณภาพทางด้านกลิ่นรสของกาแฟ [14]



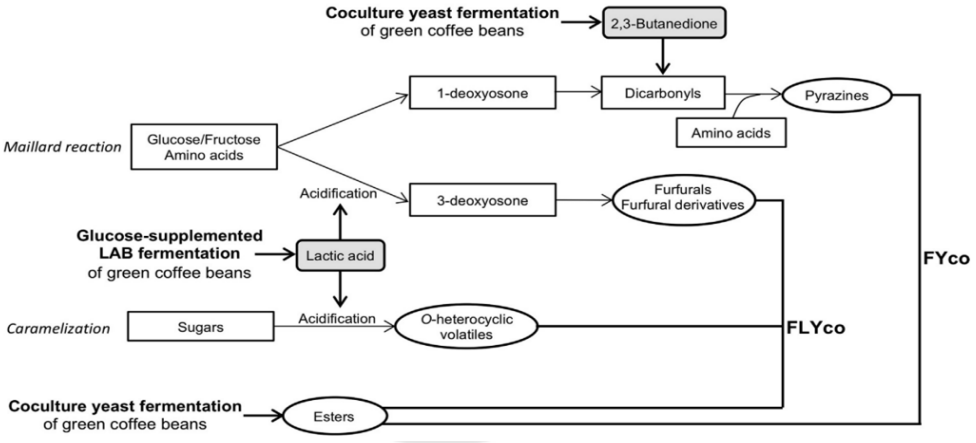
ภาพประกอบ 2 แนวทางการปรับปรุงคุณภาพด้านกลิ่นรสของกาแฟตั้งแต่หลังการเก็บเกี่ยวจนถึงมือผู้บริโภค โดยเส้นทึบเป็นแนวทางที่มีการศึกษาวิจัยแล้ว เส้นประเป็นแนวทางที่ควรศึกษาวิจัยในอนาคต

จากภาพประกอบ 2 แสดงแผนภูมิสรุปสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องในการสร้างกลิ่นรสในกาแฟที่เกิดจากกระบวนการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ โดยพบว่าเอนไซม์และกรดอินทรีย์ที่ผลิตได้จากการหมักด้วยราหรือยีสต์ และแบคทีเรียกรดแลคติก มีผลในการช่วยย่อยสารโมเลกุลใหญ่ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน พอลีฟีนอล ให้ได้เป็นสารตั้งต้นในการสร้างสารกลิ่นรสในกาแฟ เช่น น้ำตาลรีดิวซ์ กรดอะมิโน กรดคลอโรเจนิก รวมทั้งสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่เชื้อผลิตได้ระหว่างการหมักสามารถทำให้เกิดกลิ่นรสได้เช่นกัน ในปัจจุบันนี้พบรายงานสิทธิบัตรเพียงแค่ 2 รายงานเท่านั้นที่ใช้เอนไซม์หรือเชื้อจุลินทรีย์ในการปรับปรุงกลิ่นรสของกาแฟ โดย Small และ Asquith (1989) พบว่าการคั่วกาแฟที่ผ่านการทรีทด้วยเอนไซม์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต เอนไซม์โปรติเอส ไลเปส และฟีนอล อ๊อกซิเดส ทำให้ได้กลิ่นรสที่ดีและมีความขมที่น้อยลง ในขณะที่ Pei-Jung Li, 2010 พบว่าการปรับปรุงกลิ่นรสของกาแฟสามารถทำได้โดยใช้การหมักเมล็ดกาแฟแบบของแข็ง (solid state fermentation) โดยใช้รา *Antrodia camphorata* เป็นเวลา 15-60 วัน ที่ 15-30 องศาเซลเซียสโดยพบว่ามีสารให้กลิ่นรส เช่น เทอพีน และ เซสควิเทอพีน ผลิตขึ้นหลังกระบวนการหมักและนำกาแฟไปคั่ว[15] แต่อย่างไรก็ตามไม่มีการวิเคราะห์ผลหรือการวิจารณ์ผลการวิจัยในสิทธิบัตรดังกล่าว



ภาพประกอบ 3 แสดงภาพรวมของบทบาทของสารตั้งต้นในการสร้างกลิ่นรสในกาแฟในระหว่างการคั่วและจากการสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิจากกระบวนการหมักกาแฟด้วยจุลินทรีย์

ในปี 2020 ประเทศสิงคโปร์ ได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับการใช้หัวเชื้อผสม ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* และ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* หมักเมล็ดกาแฟสาร (green coffee bean) ปราศจากเชื้อ จากผลการทดลองพบว่าในกระบวนการหมักด้วยหัวเชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* และ *P. kluyveri* หรือสภาวะ FYco ผลิต Isoamyl acetate, 2-phenylethyl acetate, และ ethyl octanoate เท่ากับ 5.76, 1.35 และ 0.54 มิลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และการหมักด้วยหัวเชื้อยีสต์ผสมและ *Lc. lactis* subsp. *cremoris* หรือสภาวะ FLYco เพิ่มการผลิต acetate ester มากว่าสภาวะ FYco ถึงสองเท่า โดย ester ที่ผลิตใน FYco และ FLYco บางส่วนหลังจากกระบวนการคั่วทำให้กาแฟคั่วที่มีกลิ่นผลไม้และไวน์เพิ่มขึ้น และการหมักกรดแลคติกของ *Lc. lactis* subsp. *Cremoris* ช่วยเพิ่มความเป็นกรดให้กับเมล็ดกาแฟสารซึ่งส่งผลให้เกิดเฟอร์ฟูรัสที่ทำให้เกิดกลิ่นคาราเมล ดังภาพประกอบ 4 การใช้หัวเชื้อผสมที่เหมาะสมกันอาจส่งผลให้เกิดการทำงานร่วมกันที่ช่วยเพิ่มกิจกรรมในการปรับเปลี่ยนกลิ่นและรสชาติและเพิ่มความซับซ้อนของรสชาติของกาแฟที่ได้อีกด้วย[16] แสดงดังภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 กลไกการปรับเปลี่ยนรสชาติของกาแฟโดยการหมักแบบหัวเชื้อยีสต์ผสมและ *Lc. lactis* subsp. *cremoris*

งานวิจัยในปี 2020 มีการใช้หัวเชื้อยีสต์ผสม ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543, *Torulaspora delbrueckii* CCMA 0684 และ *Candida parapsilosis* CCMA 0544 เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อในกระบวนการหมักกาแฟแบบแห้ง ของเมล็ดกาแฟที่ทำการเพาะปลูกในระดับความสูงต่ำ[17] ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าระดับความสูงของพื้นที่เพาะปลูกมีผลต่อความหลากหลายของจุลินทรีย์และยังส่งผลต่อสารประกอบในเมล็ดกาแฟอีกด้วย[18] และอีกหนึ่งงานวิจัยการศึกษาระดับความสูงพื้นที่เพาะปลูกที่สูงมีความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์กลุ่มฟังไจและแบคทีเรียมากกว่าพื้นที่เพาะปลูกระดับความสูงที่ต่ำดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจการนำหัวเชื้อยีสต์แบบผสมใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักกาแฟเพื่อแก้ปัญหาคุณภาพของเมล็ดกาแฟที่เพาะปลูกในพื้นที่ที่ระดับความสูงต่ำ ผลการทดลองพบว่าการใช้หัวเชื้อยีสต์ผสมระหว่าง *C. parapsilosis* CCMA 0544 และ *T. delbrueckii* CCMA 0684 มีคะแนนจากการชิมสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองชุดการหมักแบบอื่นๆ และการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ และในทุกชุดการทดลองที่มีการเติมหัวเชื้อ *C. parapsilosis* CCMA 0544 พบว่าช่วยเพิ่มกลิ่น ถั่ว และอัลมอนด์[19]

10. การผลิตเอนไซม์เพกติเนสในการเพิ่มคุณภาพกลิ่นและรสของกาแฟ

เอนไซม์เพกติเนสมีความสำคัญเป็นอย่างมากในกระบวนการหมักกาแฟ ซึ่งในปี 2018 มีงานวิจัยของประเทศเอธิโอเปีย ทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากเปลือกกาแฟ โดยพบเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด 95 สายพันธุ์ แบ่งเป็นแอคติโนมัยซีทแบคทีเรีย 21.06% แบคทีเรียทั่วไป 65.26% และฟังไจ 13.68% โดยมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เพกติเนสเท่ากับ 31.58% จากทั้งหมด โดยผู้วิจัยได้อธิบายไว้ว่าเนื่องจากบริเวณเปลือกกาแฟมีองค์ประกอบของ โปรตีน เพกติน น้ำตาล และแร่ธาตุต่างๆ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม pectinolytic microorganisms เจริญได้ดีและผลิตเอนไซม์ต่างๆออกมา[9] และนอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่นำเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus subtillis* สายพันธุ์ Btk27 ที่ทำการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เพกติเนสมาประยุกต์ใช้ในการกำจัดเมือกบนเมล็ดกาแฟ โดยนำเชื้อจุลินทรีย์หมักร่วมกับเมล็ดกาแฟเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเมือกกาแฟลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการหมักกาแฟร่วมกับจุลินทรีย์[20] และงานวิจัยในปี 2019 จากประเทศเกาหลี ได้ทำการแยกและจัดจำแนกเชื้อยีสต์จากขั้นตอนของการหมักกาแฟเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักกาแฟ พบว่าจากเชื้อทั้งหมด 28 สายพันธุ์ มี 8 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพกติเนส ได้แก่ *Wickerhamomyces anomalus* KNU18Y3, *Saccharomycopsis fibuligera* KNU18Y4, *Papiliotrema flavescens* KNU18Y5 และ KNU18Y6, *Pichia kudriavzevii* KNU18Y7 และ KNU18Y8 และ*Saccharomyces cerevisiae*

KNU18Y12 และ KNU18Y13 เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร coffee pulp media และ synthetic pectin media พบว่า *S. fibuligera* KNU18Y4 และ *W. anomalus* KNU18Y3 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ polygalacturonase และ pectin lyase ซึ่งทั้งสองเอนไซม์จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์เพกติเนสจึงเหมาะกับการนำไปผลิตเป็นหัวเชื้อเพื่อใช้ในกระบวนการหมักกาแฟ [3] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการคัดแยกและผลิตหัวเชื้อยีสต์เพื่อใช้ในการกระบวนการหมักกาแฟแบบเปียกในประเทศบราซิลปี 2014 โดยจากผลการวิจัยพบว่า *Pichia fermentans* YC5.2 มีความสามารถในการเพิ่มสารระเหย (volatile compound) มากที่สุด เช่น ethyl acetate และ isoamyl acetate เป็นต้น เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อยีสต์อีก 9 สายพันธุ์ที่ทำการทดสอบ และนอกจากนี้ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เพกติเนสพบว่า เชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces* sp. YC9.15 มีกิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุด ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ดังกล่าวทำการผลิตเป็นหัวเชื้อยีสต์เพื่อใช้ในกระบวนการหมักกาแฟ โดยดำเนินการหมักแบบเชื้อเดี่ยวของ *P. fermentans* YC5.2 และเชื้อผสมของ *P. fermentans* YC5.2 และ *Saccharomyces* sp. YC9.15 พบว่าการใช้หัวเชื้อที่เป็นเชื้อผสมสามารถเพิ่มกลิ่นของกาแฟได้ดีกว่าการหมักที่ไม่ได้ทำการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ และผลการจากการชิมพบว่ามีกกลิ่นของผลไม้ เนย และ กลิ่นหมัก ที่เพิ่มมากขึ้นอีกด้วย[5]

11. การศึกษาการกลายพันธุ์เชื้อยีสต์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมมีทั้งจุลินทรีย์ทั่วไปที่คัดเลือกมาจากธรรมชาติและจุลินทรีย์ที่มีการดัดแปลงทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคต่างๆ เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น โดยการใช้จุลินทรีย์เหล่านี้มีความเสี่ยงต่ำ และเป็นที่ยอมรับว่าไม่เป็นอัตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ยกเว้นจุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการแพทย์ โดยแนวทางปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพสำหรับการใช้จุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรมในสภาพควบคุมเพื่อใช้ในระดับโรงงานต้นแบบและอุตสาหกรรมได้อธิบายว่า จุลินทรีย์ที่เกิดจากเทคนิค mutagenesis ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่น (non-homologous DNA) ถือว่าไม่จัดเป็นจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรม หรือ Genetically modified microorganism (GMMs) คือ จุลินทรีย์ที่ถูกตัดต่อพันธุกรรมให้ต่างจากเดิมที่ไม่สามารถพบได้ตามธรรมชาติทั่วไป โดยการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสี และการปฏิบัติทางด้านเคมี จะไม่ถือว่าเป็น GMMs โดยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Wickerhamomyces anomalus* เป็นตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและอาหารสัตว์ที่มีการอ้างอิงจาก European Food Safety Authority (EFSA) และ Technical Rules for Biological Agents (TRBA) โดยใช้กับงานประเภท Good Industrial Large Scale Practice

(GILSP) มีการอธิบายว่าเป็นงานที่ใช้จุลินทรีย์ที่จัดว่าไม่มีอันตรายและใช้แนวทางปฏิบัติที่ดีในการใช้จุลินทรีย์ที่ไม่มีอันตรายในระดับโรงงานต้นแบบและอุตสาหกรรม ควรใช้ระดับสภาพควบคุมอย่างน้อยระดับ GILSP งานที่จัดเป็นงานประเภท GILSP เป็นงานที่ใช้จุลินทรีย์ที่ปลอดภัยและมีประวัติการใช้มายาวนาน โดยตัวอย่างจุลินทรีย์ที่อยู่ในประเภท GILSP ได้แก่ *Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Streptococcus thermophilus* และ *Wickerhamomyces anomalus* เป็นต้น ซึ่งการฉายรังสียูวีพบว่า รังสีประเภทนี้มักทำให้เบสไทมีนจับกันเองเป็นไทมีนไดเมอร์ ทำให้โครงสร้างดีเอ็นเอผิดปกติ ส่งผลให้กระบวนการจำลองสายดีเอ็นเอเกิดความผิดพลาด และเกิดการกลายพันธุ์แบบ frameshift หรือ point mutation Transition mutation การใช้สารเคมี EMS เป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับคู่เบสในดีเอนเอประเภทเดียวกัน ได้แก่ เปลี่ยนจากเบสพิวรีนเป็นเบสพิวรีน เช่น เปลี่ยนเบสอะดีโนซีนเป็นเบสกวานีน เป็นต้น และเปลี่ยนจากเบสไพริมิดีนเป็นเบสไพริมิดีน เช่น เปลี่ยนเบสไซโทซีน เป็นเบสไทมีน เป็นต้น เกิดกลายพันธุ์ Transversion mutation คือการเปลี่ยนแปลงลำดับคู่เบสในเอนเอต่างชนิดกัน ได้แก่ เปลี่ยนจากเบสพิวรีนเป็นเบสไพริมิดีน เช่น เปลี่ยนเบสอะดีโนซีนเป็นเบสไทมีน เป็นต้น และปลี่ยนจากเบสไพริมิดีน เป็นเบสพิวรีน เช่น เปลี่ยนเบสไซโทซีน เป็นเบสกวานีน เป็นต้น โดย *W. anomalus* ถูกนำมาศึกษาเกี่ยวกับการกลายพันธุ์โดยวิธีการฉายรังสียูวีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกลีเซอรอล ผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการผลิตกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นถึง 16.97% [21] แต่อย่างไรก็ตามการใช้เทคนิคการกลายพันธุ์ สำหรับใช้ในกระบวนการหมักกาแฟอะราบิกาเพื่อให้ได้กลิ่นรสที่ดียังไม่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง 3 เครื่องมือที่ใช้การทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
1. เครื่องชั่งสารเคมี รุ่น EK-i Series (Dual range analytical balance)	AND
2. ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น BBS-DDC (Biosafety cabinet: laminar flow)	BIOBASE
3. ตู้บ่มเชื้อ รุ่น C1565 (Incubator)	Shel-lab
4. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น ZWYR-211C (Shaking incubator)	Labwit
5. หม้อนึ่งความดันไอ รุ่น ES-315 (Autoclave)	TOMY
6. เครื่องวัดพีเอช รุ่น SP-2100 (pH meter)	Suntex
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น Model 3700 (High speed centrifuge)	KUBOTA
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WNE 22 (Water bath)	Memmert
9. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น UV1280 (UV-visible Spectrophotometer)	SHIMADZU
10. เครื่องผสมสารละลาย รุ่น G560E (Vortex)	Scientific Industries

ตาราง 3 (ต่อ)

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
11. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น E202Ti/LED (Light microscope)	Olympus
12. ตู้ฉายรังสียูวีปลอดเชื้อ (Sterile UV box)	-

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ตาราง 4 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัท	ยี่ห้อ
1. ยีสต์สกัด (Yeast extract)	Himedia Laboratories	Himedia
2. มอลต์สกัด (Malt extract)	Himedia Laboratories	Himedia
3. เปปโตน (Peptone)	Sisco Research Laboratories Pvt, Ltd.	SRL
5. เพกติน (Pectin)	Wako Chemicals USA Inc.	FUJIFILM
6. ไนโตเจนยีสต์เบส (Nitrogen yeast base)	Himedia Laboratories	Himedia
7. plate count agar (PCA)	Himedia Laboratories	Himedia
8. de Man Rogosa Sharpe (MRS)	Himedia Laboratories	Himedia
9. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univer
10. ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univer
11. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univer
12. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univer
13. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univer

ตาราง 4 (ต่อ)

อาหารเลี้ยเชื้อและสารเคมี	บริษัท	ยี่ห้อ
14. กลูโคส (Glucose)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univer
15. ฟรุตโตส (Fructose)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univer
16. มอลโตส (Maltose)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univer
17. แมนโนส (Mannose)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univer
18. อะราบิโนส (Arabinose)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univer
19. แลคโตส (Lactose)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univer
20. แรมโนส (Rhamnose)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univer
21. ไซโลส (Xylose)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univer
22. กาแลคโตส (Galactose)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univer
23. ซูโคส (Sucrose)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univer
24. โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univer
25. โซเดียมไทโอซัลเฟต (Sodium thiosulfate)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univer
26. สารละลายไอโอดีน (Gram's iodine solution)	Wako Chemicals USA Inc.	FUJIFILM
27. สีย้อม Lactophenol Cotton Blue	-	Q RëC™
28. สารเอทิลเมทานิซัลโฟเนต (Ethyl methanesulphonate: EMS reagent)	Sigma-Aldrich Co. LLC	SIGMA-ALDRICH
29. สารอะซีโตไนไตรล์ (Acetonitrile for HPLC)	-	Q RëC™

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. **การศึกษาอัตราการเจริญของ *Wickerhamomyces anomalus* YWP1-3**

นำ *W.anomalus* YWP1-3 เพาะเลี้ยงลงบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (YMA) (ภาคผนวก ก ข้อ 2) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร yeast extract-malt extract broth (YMB) (ภาคผนวก ก ข้อ 1) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดปรับปริมาตรหัวเชื้อให้มีความเข้มข้นที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 ถ่ายเชื้อลงในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร YMB 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร จากนั้นนำมาสร้างกราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโต ณ ช่วงเวลาต่างๆ และหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate; μ) และอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (maximum specific growth rate; μmax)

2. **การกลายพันธุ์และการคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย**

2.1 **การกลายพันธุ์ด้วยวิธีการฉายรังสียูวี**

นำ *W. anomalus* YWP1-3 เพาะเลี้ยงในอาหาร YMB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองและบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ โดยถ่ายหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร หรือเท่ากับปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร YMB 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 30 มิลลิลิตร ถ่ายลงหลอดเซนทริฟิวจ์และทำการปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสและล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงทำซ้ำสองครั้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ในสารละลาย สารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำสารละลาย 10 มิลลิลิตร ถ่ายลงสู่จานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อและใส่ขดลวดปราศจากเชื้อขนาด 1 นิ้ว วางบนเครื่องกวนภายในตู้ฉายรังสียูวีปลอดเชื้อ (Sterile UV box) ที่มีหลอดยูวี (TOSHIBA UV lamp GL15) โดยวางจานเพาะเชื้อตั้งฉากกับหลอดยูวีห่างจากหลอดยูวี 30 เซนติเมตร และฉายรังสียูวีเป็นเวลา 2 นาทีจากนั้นเก็บตัวอย่างเพื่อทำการเจือจางและเกลี่ยลงบนอาหาร pectin agar (ภาคผนวก ก ข้อ 4) เพื่อคัดเลือกเชื้อพันธุ์กลาย

ภาพประกอบ 5 ฉายรังสียูวีปลอดเชื้อ (Sterile UV box)

2.2 การกลายพันธุ์ด้วยวิธีการใช้สารเคมี

นำ *W. anomalus* YWP1-3 เพาะเลี้ยงในอาหาร YMB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ เมื่อครบกำหนดนำหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร หรือเท่ากับปริมาตร 5 มิลลิลิตร ถ่ายเชื้อลงในอาหาร YMB 50 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นปรับความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 2×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำการปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย sodium phosphate buffer pH 7 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 3) และเติมสาร Ethyl methanesulphonate (EMS) ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เมื่อครบกำหนดหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย Sodium thiosulfate ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และทำการปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที และล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย sodium phosphate buffer pH 7 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซ้ำสองครั้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการเจือจาง และเกลี่ยลงบนอาหาร pectin agar เพื่อคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย

2.3 การคัดเลือกและการทดสอบเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย

โดยคัดเลือกจากคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์เพกติเนสบนอาหาร pectin agar และทดสอบคุณสมบัติดังกล่าวด้วยวิธี Gram's Iodine assay ทำได้โดยเติมสารละลาย Gram's Iodine (ภาคผนวก ข ข้อ 1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 5 นาที และ

ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นวัดขนาดโคโลนีและขนาดของบริเวณใสรอบโคโลนี และทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายจากขนาดบริเวณใสรอบโคโลนีใหญ่กว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกจะถูกนำไปทดสอบ

3.การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย

3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายคัดเลือกจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ UV22-2, UV22-3, UV41-1, UV32-1, UV49-2 และ EMS146 เพาะเลี้ยงลงบนอาหาร YMA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาศึกษารูปร่างลักษณะตัวเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า และศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อยีสต์บนอาหาร YMA

3.2 การศึกษาการผลิตเอนไซม์เพกติเนสบนอาหาร

นำเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายคัดเลือกทั้ง 6 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ดั้งเดิม เพาะเลี้ยงในอาหาร YMB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1 โดยเจือจางด้วยอาหาร YMB จากนั้นนำเชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร pectin agar ที่กลางจานเพาะเชื้อและบ่มเป็นเวลา 4 วัน และทดสอบการผลิตเอนไซม์เพกติเนสด้วยวิธี Gram's Iodine assay วิธีดังแสดงในข้อ 2.3 จากนั้นทำการวัดขนาดโคโลนีและขนาดของบริเวณใสรอบโคโลนี เพื่อใช้ในการคำนวณร้อยละดัชนีการย่อยสลายเพกติน (Pectin degradation index ; PDI%) โดยมีวิธีคำนวน ดังนี้

$$\text{ร้อยละดัชนีการย่อยสลายเพกติน} = \frac{\text{ขนาดของบริเวณใสรอบโคโลนี (เซนติเมตร) -ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)}}{\text{ขนาดของโคโลนี (เซนติเมตร)}} \times 100$$

3.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายในอาหารชนิดต่าง ๆ

เชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายคัดเลือกทั้ง 6 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ดั้งเดิมบนอาหาร YMA ที่บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหาร YMB เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำหัวเชื้อปรับความเข้มข้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายเชื้อลงในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหาร YMB, pectin broth (ภาคผนวก ก ข้อ 4) และ mucilage broth (ภาคผนวก ก ข้อ 5) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร จากนั้นนำมาสร้างกราฟแสดงการเจริญเติบโต ณ ช่วงเวลาต่างๆ และหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate; μ) และอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (maximum specific growth rate; μmax)

3.4 การศึกษากิจกรรมเอนไซม์เพกติเนส เซลลูเลส และอะไมเลสในอาหารเหลว mucilage broth

3.4.1 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เพกติเนส

ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เพกติเนสด้วยวิธี The dinitrosalicylic acid (DNS) method โดยเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย 6 สายพันธุ์ ในอาหาร mucilage broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร และปั่นหวี่ยงความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายเพกตินความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ในสารละลาย sodium phosphate buffer pH 7 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 2) แล้วนำไปต้มเดือดเป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส โดยกำหนดให้ 1 หน่วยยูนิตของเอนไซม์เพกติเนส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 ไมโครโมลของน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสับเสตรท ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด สำหรับการคำนวณกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ด้วยวิธี Lowry method โดยนำเอนไซม์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองและนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและเติม 1 มิลลิลิตรของสารละลาย complex-forming reagent (ภาคผนวก ข ข้อ 4) ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เมื่อครบกำหนดเติมสาร Folin reagent ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน (Bovine serum albumin: BSA) สร้างกราฟมาตรฐานโดยค่าการดูดกลืนแสง 750 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของโบวินซีรัมอัลบูมินและ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเอนไซม์

3.4.2 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธี DNS method โดยเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย 6 สายพันธุ์ ในอาหาร mucilage broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร และปั่นหวี่ยงความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย Carboxymethylcellulose (CMC) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ในสารละลาย sodium phosphate buffer pH 7 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มเดือดเป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส โดยกำหนดให้ 1 หน่วยยูนิตของเอนไซม์เซลลูเลส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 ไมโครโมลของน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสับเสตรท ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเอนไซม์ดังวิธีข้างต้น

3.4.3 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสด้วยวิธี DNS method โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย 6 สายพันธุ์ ในอาหาร mucilage broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร และปั่นหวี่ยงความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย soluble starch ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ในสารละลาย sodium phosphate buffer pH 7 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มเดือดเป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส โดยกำหนดให้ 1 หน่วยยูนิตของเอนไซม์อะไมเลส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 ไมโครโมลของน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสับเสตรท ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเอนไซม์ดังวิธีข้างต้น

3.5 การศึกษาความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ

นำเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายคัดเลือกทั้ง 6 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ดั้งเดิมเพาะเลี้ยงในอาหาร Nitrogen yeast base (YNB) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก ข้อ 6.1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิห้อง จากนั้นถ่ายหัวเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหาร YNB ที่ประกอบด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก ข้อ 6.2) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยทำการทดสอบน้ำตาลทั้งหมด 10 ชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส มอลโทส แมนโนส อะราบิโนส แลคโตส แรมโนส ไซโลส กาแลคโตส และซูโครส บ่มเป็นเวลา24-48 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดทำการวัดการเจริญของเชื้อด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

4. กระบวนการหมักกาแฟด้วยหัวเชื้อยีสต์พันธุ์กลาย

4.1 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับการหมักกาแฟ

นำเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายคัดเลือกทั้ง 6 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ดั้งเดิมเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร YMA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร YMB บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและนำส่วนตะกอนเซลล์ไปใช้เป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักกาแฟต่อไป

4.2 การทดสอบการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักกาแฟ

นำหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้มาทำการหมักเมล็ดกาแฟ โดยออกแบบการทดลองดังนี้

- เติมหัวเชื้อยีสต์ที่สายพันธุ์กลาย 6 สายพันธุ์
- เติมหัวเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม
- การทดลองควบคุมโดยการไม่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (natural fermentation)

ทำการถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ตามการออกแบบการทดลองที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยมวล ลงในถังพลาสติกขนาด 10 ลิตร ที่มีการเติมเมล็ดกาแฟอะราบิกาที่ปอกเปลือกแล้วจำนวน 7 กิโลกรัม เติมน้ำให้ท่วมเมล็ดกาแฟ 6 ลิตร กวนผสมให้หัวเชื้อ น้ำ และเมล็ดกาแฟผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ณ วิสาหกิจชุมชน ต.เทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทุก 6 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักกาแฟ 3 จุด โดยเก็บตัวอย่างบริเวณตรงกลางของชั้นน้ำของถังหมัก เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

4.3 การเก็บเกี่ยวเมล็ดกาแฟหลังจากการหมักและการคั่วกาแฟ

เมื่อครบกำหนดเวลาเทน้ำที่ใช้หมักเมล็ดกาแฟทิ้งและเก็บเมล็ดกาแฟมาทำให้แห้ง โดยตากแดดให้มีระดับความชื้นเท่ากับ 10-12% เมื่อได้ระดับความชื้นที่เหมาะสม ทำการกระเทาะเปลือก และนำไปคั่วที่อุณหภูมิ 240 องศาฟาเรนไฮต์ โดยมีค่าสีประมาณ 55-65 Agtron เป็นระยะเวลา 9-10 นาที ตามวิธีการมาตรฐานของ SCAA cupping protocol จากนั้นนำไปตรวจสอบคุณภาพการชิมโดย Q-Arabica grader และวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมีต่อไป

5. การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ และชีวเคมีของกระบวนการหมักกาแฟอะราบิกา

5.1 การวัดค่าพีเอช ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ และค่าบริกซ์

เก็บตัวอย่างน้ำหมักกาแฟ 5 มิลลิลิตร ทุก 6 ชั่วโมง นำมาวัดค่าบริกซ์ (ºBrix) ด้วยเครื่อง Refractometer วัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (Total dissolved solids; TDS) ด้วยเครื่องวัด TDS Meter และวัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดค่า pH Meter

5.2 การนับจำนวนจุลินทรีย์ก่อนและหลังกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟ

นำตัวอย่างน้ำหมักกาแฟมาเจือจางในสารละลาย Normal saline ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ให้ได้ระดับการเจือจางเท่ากับ 10^{-1}-10^{-8} จากนั้นทำการหยดลงบนอาหารปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยอาหาร YMA ใช้สำหรับนับจำนวนเชื้อยีสต์ อาหาร plate count agar (PCA) (ภาคผนวก ก ข้อ7) ใช้สำหรับนับจุลินทรีย์รวมทั้งหมด บ่มที่อุณหภูมิห้องเท่ากับ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24- 48 ชั่วโมง และอาหาร de Man Rogosa Sharpe (MRS) agar (ภาคผนวก ก ข้อ 8) ใช้สำหรับนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

5.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลในน้ำหมักเมล็ดกาแฟ

นำตัวอย่างน้ำหมักกาแฟมาวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของน้ำตาล 10 ชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส มอลโทส แมนโนส อะราบิโนส แลคโตส แรมโนส ไซโลส กาแลคโตส และซูโครส โดยนำตัวอย่างน้ำหมักกาแฟปริมาตร 1 มิลลิลิตร กรองผ่านจุกกรองที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 0.22 ไมโครเมตรใส่ใน vial ที่ใช้สำหรับเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ในระบบ reversed phase และใช้คอลัมน์ชนิด High Performance Carbohydrate Column (WAT044355) ยี่ห้อ Waters ขนาด 4.6 × 250 มิลลิเมตร โดยมีสารละลายตัวพาประกอบด้วย สารละลายที่มีอัตราส่วนของ acetonitrile

ในน้ำกลั่นเท่ากับ 25 ต่อ 75 ร้อยละโดยปริมาตร อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1 มิลลิลิตร ต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 195 นาโนเมตร ปริมาตรที่ฉีดสารละลาย 10 ไมโครลิตร ใช้เวลาในการทดสอบ 15 นาที และอุณหภูมิของคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส

5.4 การวิเคราะห์สาร volatile compound ในเมล็ดกาแฟคั่ว

ทำการวิเคราะห์สาร volatile compound ในเมล็ดกาแฟคั่วทั้ง 3 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่วที่หมักร่วมกับหัวเชื้อยีสต์ ได้แก่ เชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย UV22-2 โดยเปรียบเทียบกับกาแฟคั่วที่ไม่ได้เติมเชื้อในกระบวนการหมัก และกาแฟทางการค้า โดยใช้เครื่อง Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) ที่เชื่อมต่อกับ gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) โดยเตรียมตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่วทำให้เป็นผงด้วยเครื่องบดเย็น (CryoMill) และนำผงกาแฟที่ได้ปริมาณ 1 กรัมใส่ขวดที่มีฝาปิดสนิททำการวิเคราะห์ volatile compound โดยเปรียบเทียบ volatile compound ที่ได้จากการหมักในแต่ละสภาวะ

6. การประเมินคุณภาพของเมล็ดกาแฟคั่วด้วยการทดสอบประสาทสัมผัส

ทำการประเมินรสชาติของกาแฟที่ทำการคั่วและบดละเอียด ภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากการคั่ว โดยแช่น้ำที่อุณหภูมิ 92-94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นชิมโดย Q- Arabica grader จำนวน 3 ท่าน ที่ได้รับใบรับรองจากสถาบัน coffee quality institute (CQI) เพื่อประเมินรสชาติของกาแฟแต่ละชนิดที่ทำการทดลอง ทำการประเมินในด้านความหวาน ความเปรี้ยว ความสะอาด ความสมดุล ความคงค้างของกาแฟหลังจากการดื่ม เนื้อสัมผัส และความเหมือนกันของรสชาติ ในแต่ละถ้วยตัวอย่าง

7. การศึกษาลำดับดีเอ็นเอทั้งหมดของยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีศักยภาพในการหมักกาแฟอะราบิกา

ทำการศึกษาลำดับดีเอ็นเอทั้งหมด (whole genome sequencing) ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย UV22-2 ที่มีศักยภาพในการหมักกาแฟ โดยการใช้เทคนิค next generation sequencing นำข้อมูลเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมของเชื้อยีสต์ที่ใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักกาแฟอะราบิกา ขั้นตอนในการสกัด genomic DNA นำโคโลนียีสต์สายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิม 1 ลูป ละลายใน lysis buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบกำหนดเติมสารละลาย potassium acetate pH 7.5 ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์ ผสมให้เข้ากัน และแช่ในน้ำแข็ง 1 ชั่วโมง เก็บส่วนของเหลวทำการปั่นเหวี่ยงความเร็ว 13,000 รอบ

ต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เติมสารละลาย Chlofrom:Isoamyl alcohol ที่อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยทำซ้ำสองรอบ จากนั้นเติม isopropanol ที่เย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบกำหนดนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 นาที ทิ้งส่วนใสและล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย ethanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการล้างซ้ำอีกครั้งด้วยสารละลาย ethanol ความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้แห้งและละลายตะกอนดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 20-30 ไมโครลิตร โดยตัวอย่าง genomic DNA ทำการตรวจสอบคุณภาพโดย gel electrophoresis และวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโน (Nano drop) ก่อนนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค next generation sequencing

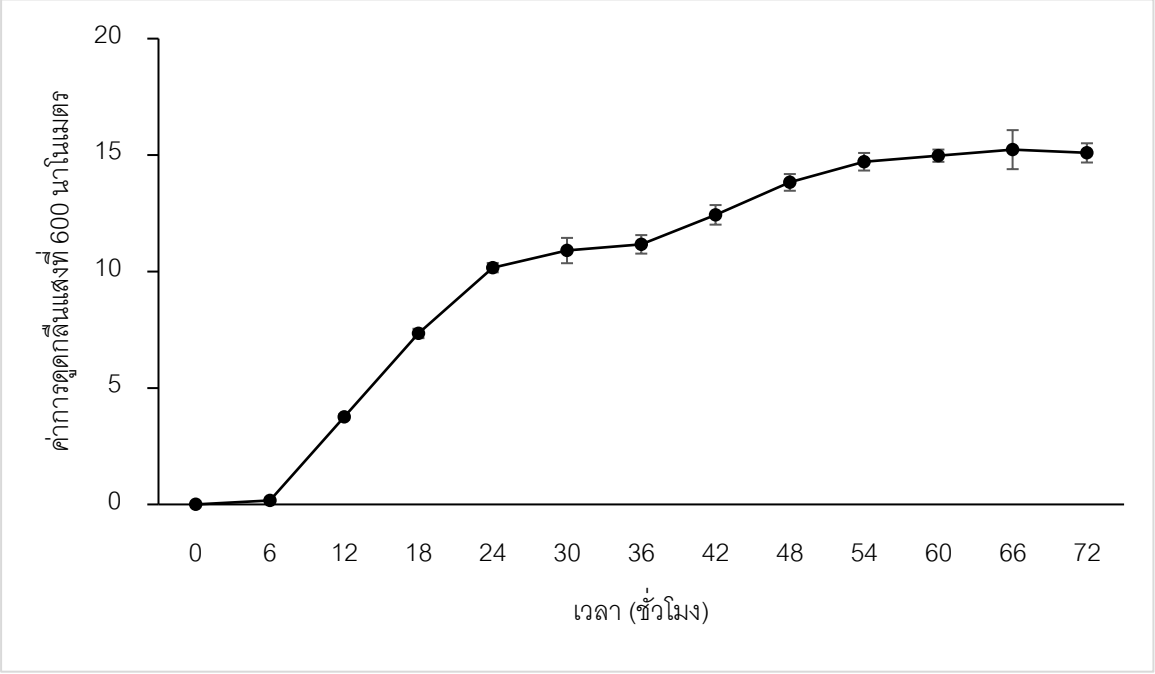
8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยในชุดข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) พร้อมทั้งจัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างซึ่งทำการทดสอบหลังการวิเคราะห์ (post hoc test) โดยใช้สถิติ Least -Significant Different (LSD) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p-value<0.05 โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 24 (2016)

บทที่ 4
ผลการทดลอง

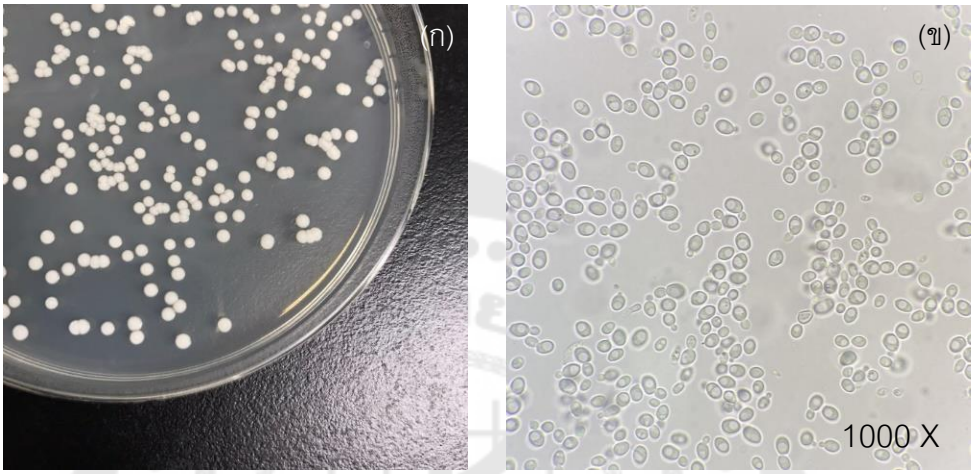
1. การศึกษาอัตราการเจริญ ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี และลักษณะสัณฐานวิทยาเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อ *Wickerhamomyces anomalus* YWP1-3

W. anomalus YWP1-3 เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมที่แยกมาจากกระบวนการหมักกาแฟ ณ ดอยผาตั้ง อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย ซึ่งมีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์เพกติเนส จึงนำมาใช้เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมในการศึกษาการกลายพันธุ์ในงานวิจัยนี้ ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร YMB เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และวัดการเจริญของเชื้อด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร จากผลการทดลองพบว่า ช่วงระยะเวลา 0-6 ชั่วโมง เป็นการเจริญของเชื้อในช่วง lag phase ช่วงระยะเวลา 6-54 ชั่วโมง เป็นการเจริญของเชื้อในช่วง log phase ช่วงระยะเวลาหลังจาก 54 ชั่วโมง เป็นการเจริญของเชื้อในช่วง stationary phase แสดงดังภาพประกอบ 6 โดยสายพันธุ์ YWP1-3 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดในช่วงเวลา 6-12 ชั่วโมง เท่ากับ 0.51 ต่อชั่วโมง



ภาพประกอบ 6 การเจริญของ *W. anomalus* YWP1-3 สายพันธุ์ดั้งเดิม ในอาหาร YMB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี *W. anomalus* YWP1-3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร YMA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ามีลักษณะดังนี้ โคโลนีขนาดปานกลาง สีครีม เนื้อสัมผัสเรียบ รูปทรงกลม ลักษณะโค้งนูนเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวหน้าขรุขระ แสดงดังภาพประกอบ 7(ก) และจากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีลักษณะทรงรี มีการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ แสดงดังภาพประกอบ 7(ข)



ภาพประกอบ 7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีของ *W. anomalus* YWP1-3 บนอาหาร YMA (ก) และภาพลักษณะสัณฐานเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1000 เท่า (ข)

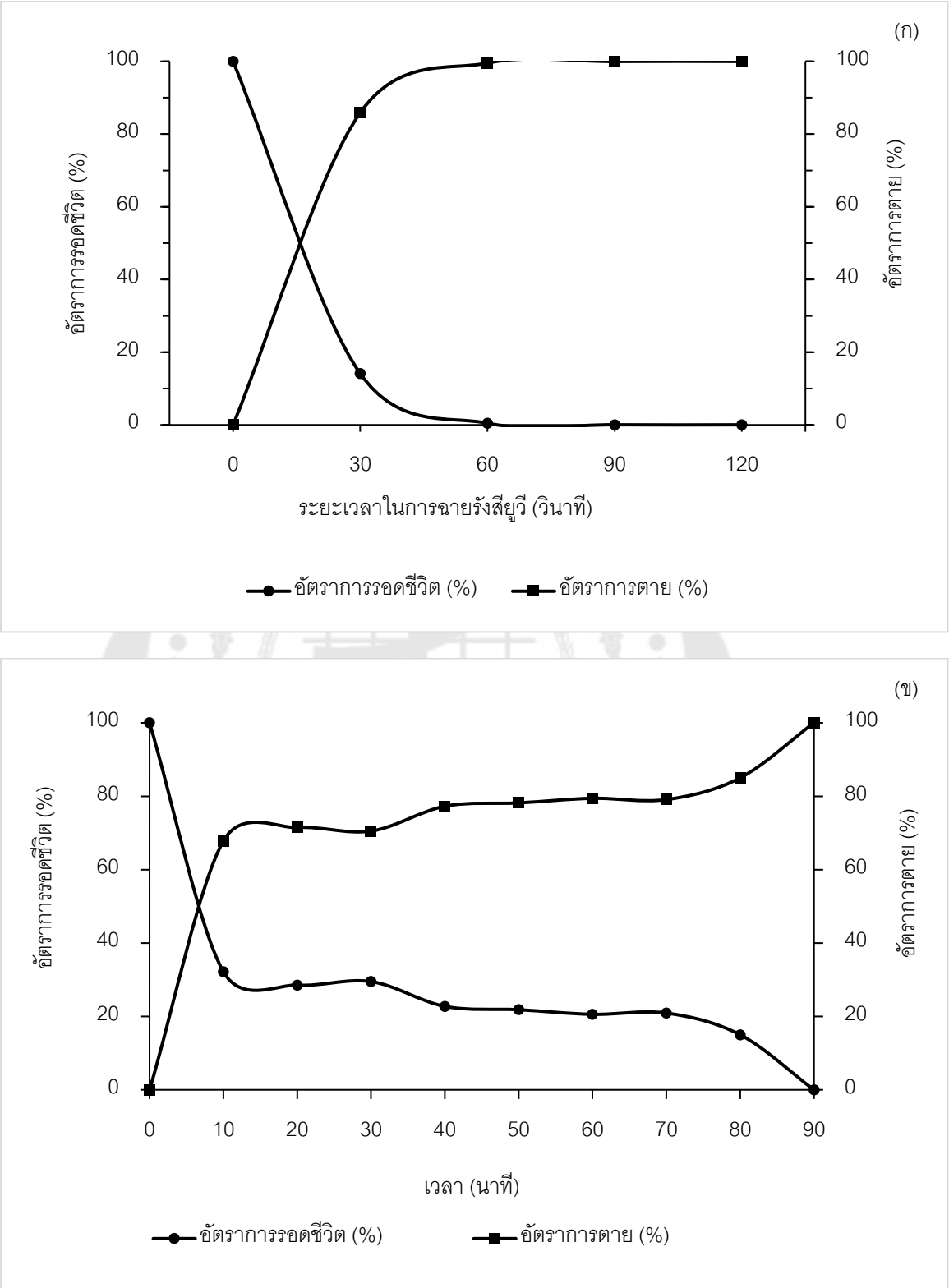
2. การกลายพันธุ์ *W. anomalus* YWP1-3 ด้วยการฉายรังสียูวีและการใช้สารเคมี

จากการกลายพันธุ์ *W. anomalus* YWP1-3 ด้วยวิธีการกลายพันธุ์ 2 วิธี คือ การกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสียูวี และการใช้สารเคมี EMS

การกลายพันธุ์ด้วยวิธีการฉายรังสียูวี เป็นเวลา 120 วินาที และเก็บตัวอย่างทุก 30 วินาที เพื่อหาร้อยละอัตราการรอดชีวิตและอัตราการตาย จากนั้นคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพกติเนส โดยคัดเลือกจากความสามารถในการสร้างเอนไซม์เพกติเนสบนอาหาร pectin agar จากผลการทดลองพบว่า การฉายรังสียูวีเป็นเวลา 120 วินาที มีอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ 0.02% แสดงดังภาพประกอบ 8(ก) นำยีสต์ที่ได้จากอัตราการรอดชีวิตนี้ไปใช้ในการคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย ซึ่งจากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมินี้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายได้ทั้งหมด 167สายพันธุ์

การกลายพันธุ์ด้วยวิธีการใช้สารเคมี ทำโดยการบ่มสารเคมี EMS ร่วมกับ *W. anomalus* YWP1-3 เป็นเวลา 60 นาที และเก็บตัวอย่างทุก 10 นาที เพื่อหาร้อยละอัตราการรอดชีวิตและอัตราการตาย โดยคัดเลือกจากความสามารถในการสร้างเอนไซม์เพกติเนสบนอาหาร pectin agar จากผลการทดลองพบว่า การบ่มสารเคมี EMS ร่วมกับเชื้อยีสต์เป็นเวลา 60 นาที ทีมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังภาพประกอบ 8(ข) นำยีสต์ที่ได้จากอัตราการรอดชีวิตนี้ไปใช้ในการคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย ซึ่งจากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมินี้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายได้ทั้งหมด 38 สายพันธุ์

จากผลการทดลองการกลายพันธุ์ทั้ง 2 วิธีข้างต้นพบว่า เชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายจากการฉายรังสียูวีจำนวนทั้งหมด 167 สายพันธุ์ คัดเลือกนำไปศึกษาต่อ 5 สายพันธุ์ แสดงดังตาราง 5 ได้แก่ UV22-2, UV22-3, UV41-1, UV32-1 และ UV49-2 และจากการใช้สารเคมี EMS พบว่าได้เชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายจำนวนทั้งหมด 38 สายพันธุ์ คัดเลือกนำไปศึกษาต่อ 1 สายพันธุ์ แสดงดังตาราง 5 ได้แก่ EMS146 โดยเชื้อยีสต์ที่ถูกคัดเลือกทั้ง 6 สายพันธุ์ นั้นมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เพกติเนสบนอาหาร pectin agar ได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยมีค่า %PDI โดยมีค่าอยู่ในช่วง 33.0 – 49.1% ยีสต์สายพันธุ์กลายทั้ง 6 สายพันธุ์ ถูกนำไปศึกษาคุณสมบัติอื่นๆ เพื่อใช้ในกระบวนการหมักกาแฟต่อไป



ภาพประกอบ 8 การรอดชีวิตและการตายของ *W. anomalus* YWP1-3 หลังการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสียูวี (ก) และการใช้สาเคมี EMS (ข)

ตาราง 5 ตารางแสดงจำนวนเชื้อหลังการกลายพันธุ์

วิธีการกลายพันธุ์	จำนวนเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย	จำนวนเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่ถูกคัดเลือก
การฉายรังสียูวี	167	5
การใช้สารเคมี EMS	38	1

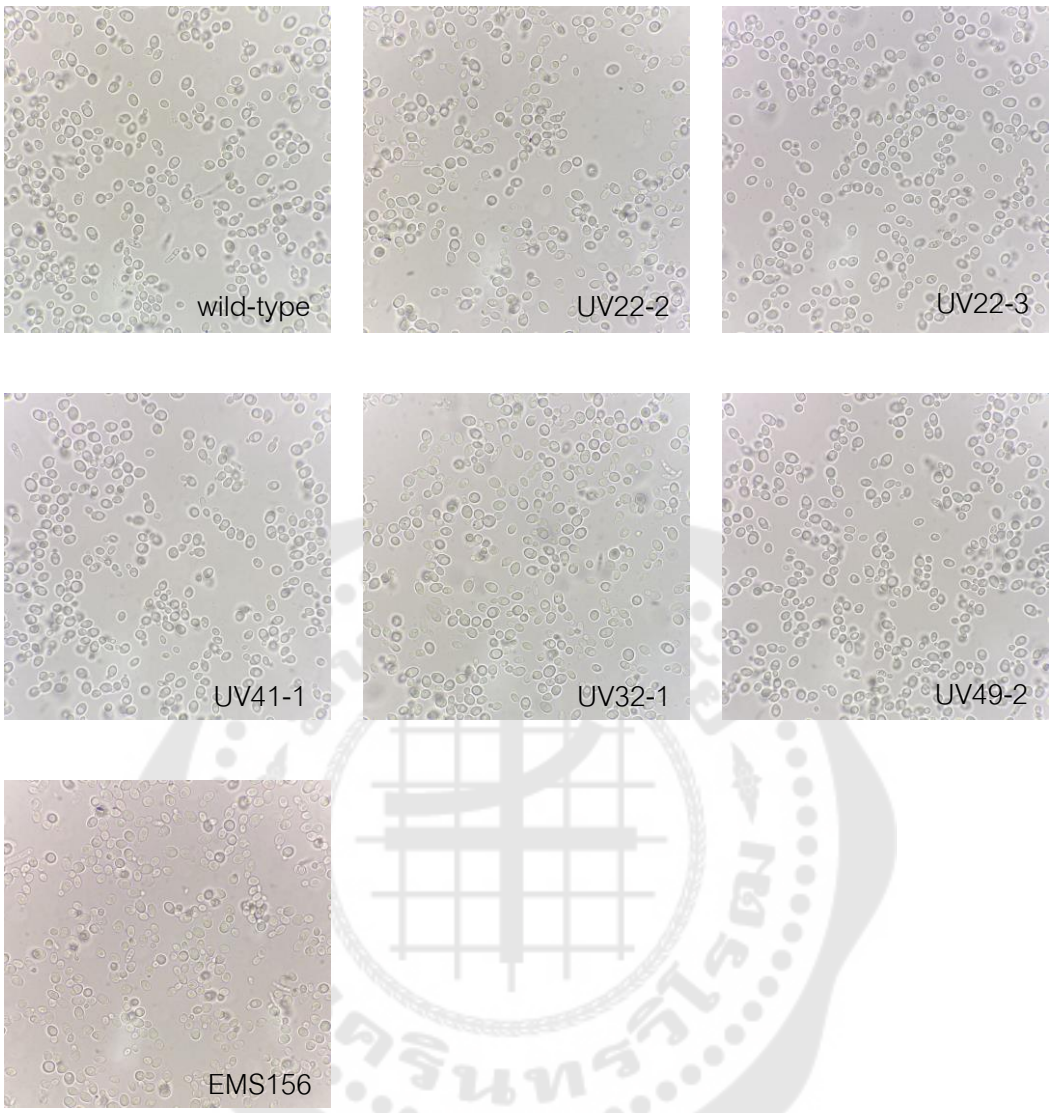
3. การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักกาแฟอะราบิกาที่มีศักยภาพ

3.1 การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี และลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย

การศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายแสดงดังตารางที่ 6 ทำการเพาะเลี้ยงยีสต์แต่ละสายพันธุ์บนอาหาร YMA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าลักษณะของโคโลนีของสายพันธุ์ UV22-2, UV22-3 และ UV32-1 มีลักษณะดังนี้ ขนาดโคโลนีขนาดปานกลาง สีครีม เนื้อสัมผัสเรียบ รูปทรงกลม ลักษณะโค้งนูนเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ และจากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์รูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีลักษณะทรงรี มีการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์ UV41-1, UV49-2 และ EMS146 มีดังนี้ ขนาดโคโลนีขนาดกลาง สีครีม เนื้อสัมผัสเรียบ รูปทรงกลม ลักษณะโค้งนูนเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวหน้าขรุขระ และจากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์รูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยมีลักษณะทรงรี มีการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ จากการทดลองพบว่าสายพันธุ์กลาย มีลักษณะสัณฐานวิทยาต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิม อาทิเช่น สายพันธุ์ UV22-2 UV22-3 และ UV32-1 มีผิวหน้าเรียบต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีผิวหน้าขรุขระ แสดงดังตาราง 6 และภาพประกอบ 9

ตาราง 6 ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี และลักษณะสัณฐานวิทยาเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

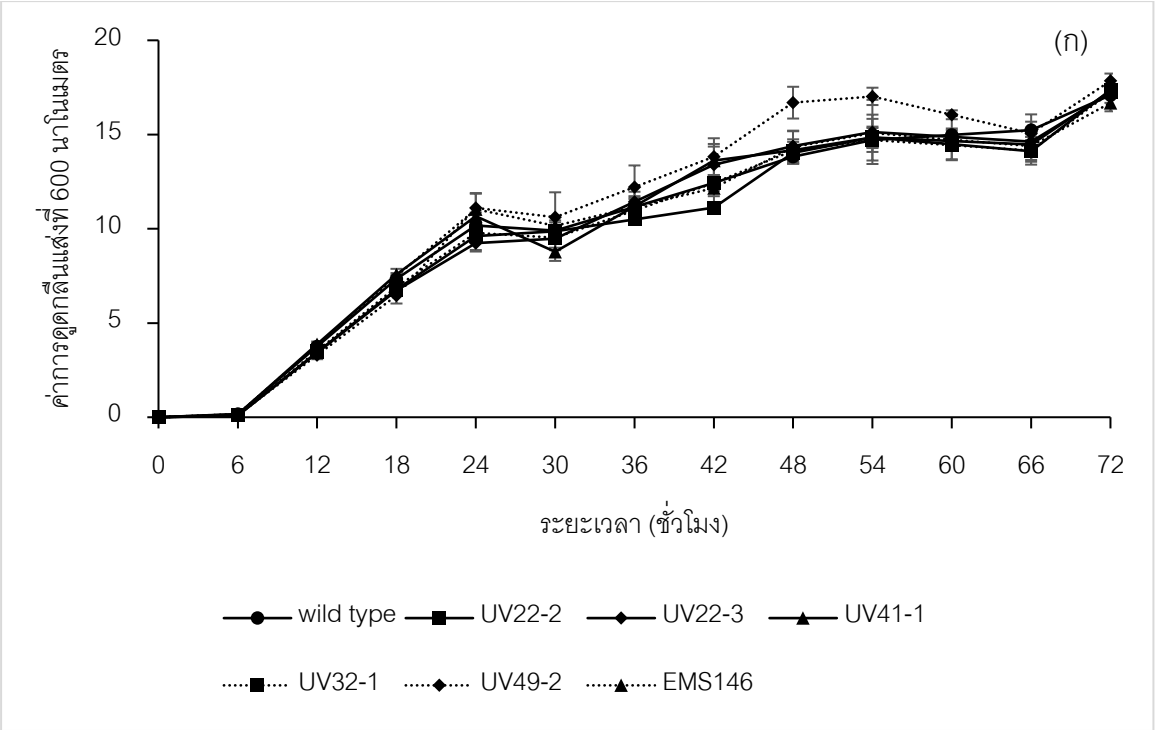
คุณลักษณะ	สายพันธุ์ยีสต์						
	สายพันธุ์ดั้งเดิม	UV22-2	UV22-3	UV41-1	UV32-1	UV49-2	EMS146
ขนาดโคโลนี	กลาง	กลาง	กลาง	กลาง	กลาง	กลาง	กลาง
สี	ครีม	ครีม	ครีม	ครีม	ครีม	ครีม	ครีม
เนื้อสัมผัส	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ
ความสูง	โค้งนูน	โค้งนูน	โค้งนูน	โค้งนูน	โค้งนูน	โค้งนูน	โค้งนูน
รูปร่าง	กลม	กลม	กลม	กลม	กลม	กลม	กลม
ขอบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ
ผิวหน้า	ขรุขระ	เรียบ	เรียบ	ขรุขระ	เรียบ	ขรุขระ	ขรุขระ

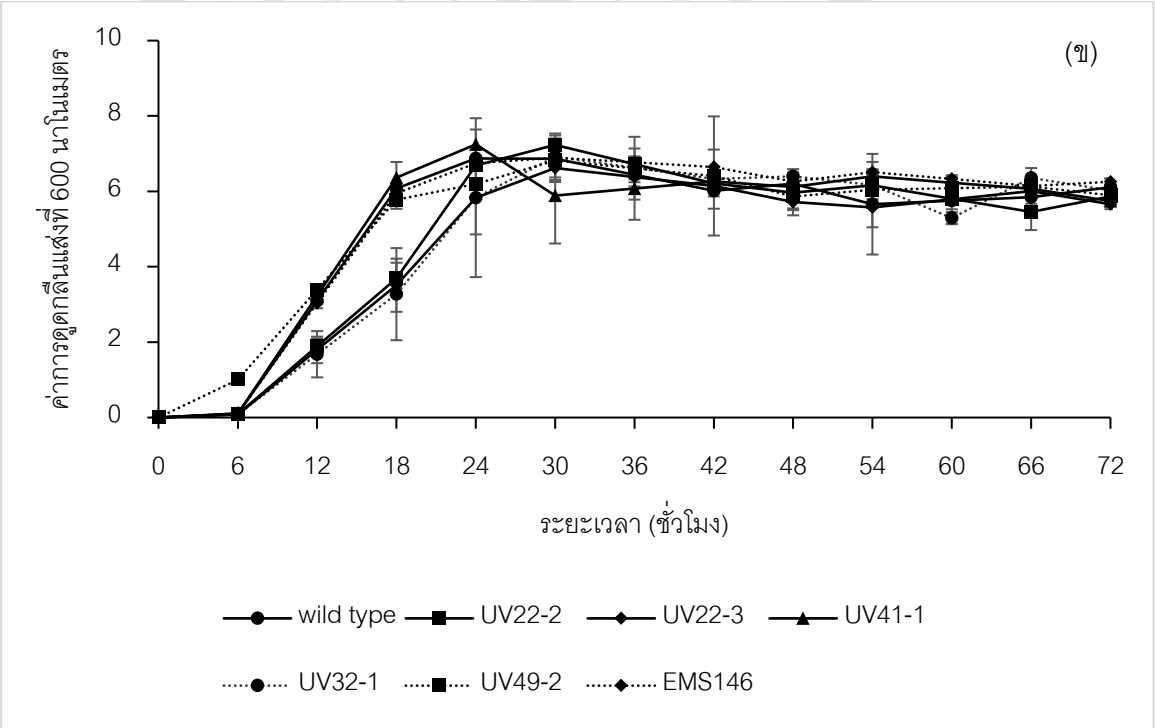


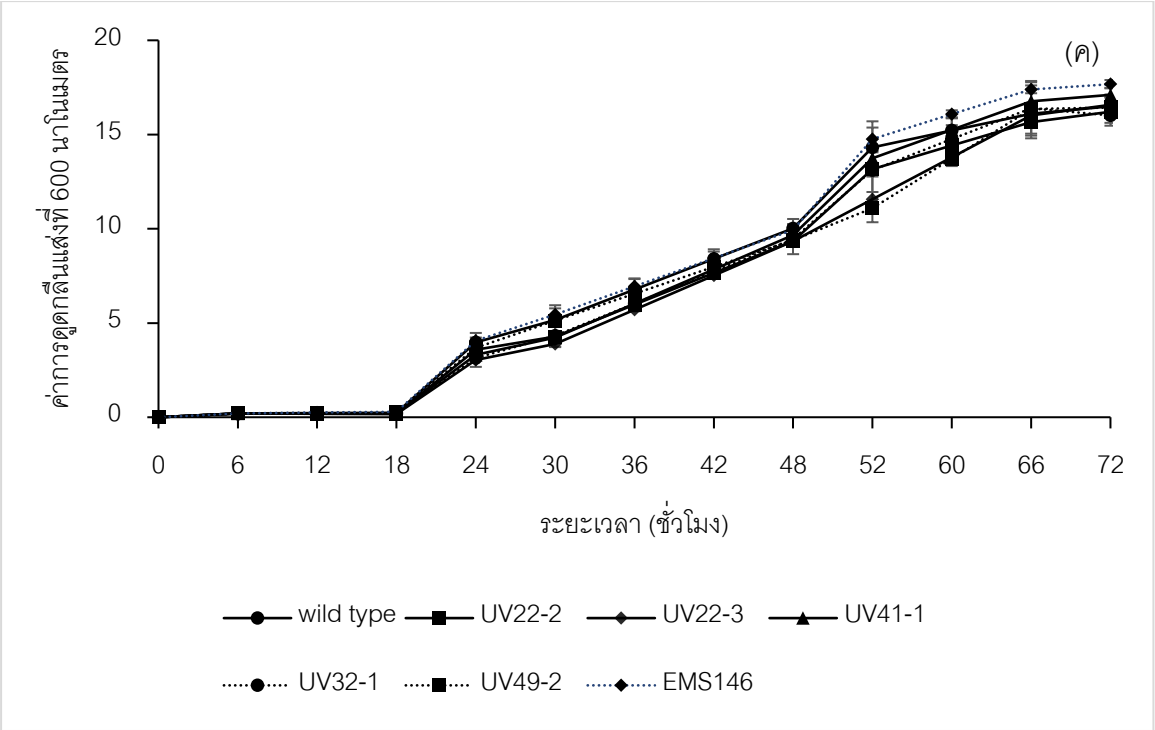
ภาพประกอบ 9 ภาพลักษณะสัณฐานเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1000 เท่า ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย 6 สายพันธุ์

3.2 การศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายในอาหาร YMB, pectin broth และ mucilage broth

จากศึกษาการเจริญของเชื้อในอาหารต่างชนิดกัน ได้แก่ YMB , pectin broth และ mucilage broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และวัดการเจริญของเชื้อด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร จากผลการทดลองพบว่า อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดในช่วงเวลา 6-12 ชั่วโมง ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ได้แก่ UV22-2, UV22-3, UV41-1, UV32-1, UV49-1 และ EMS146 ในอาหาร YMB เท่ากับ 0.51, 0.59, 0.59, 0.53, 0.54, 0.54 และ 0.52 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ แสดงดังภาพประกอบ 10(ก) ในอาหาร pectin broth อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดในช่วงเวลา 6-12 ชั่วโมง ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายทั้งหมด 6 สายพันธุ์ เท่ากับ 0.56, 0.51, 0.52, 0.57, 0.50, 0.54 และ 0.55 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ แสดงดังภาพประกอบ 10(ข) และในอาหาร mucilage broth อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดในช่วงเวลา 18-24 ชั่วโมง ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายทั้งหมด 6 สายพันธุ์ เท่ากับ 0.47, 0.49, 0.47, 0.46, 0.47, 0.45 และ 0.44 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ แสดงดังภาพประกอบ 10(ค) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเชื้อยีสต์ทุกสายพันธุ์เจริญได้ดีในอาหาร YMB ในขณะที่การเจริญในอาหาร pectin broth และ mucilage broth น้อยกว่า นอกจากนี้ยังพบว่า UV22-2 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดในอาหาร YMB และ mucilage broth และ UV41-1 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดในอาหาร pectin broth


(ก)
ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร
20
15
10
5
0
0 6 12 18 24 30 36 42 48 54 60 66 72
ระยะเวลา (ชั่วโมง)
wild type
UV22-2
UV22-3
UV41-1
UV32-1
UV49-2
EMS146

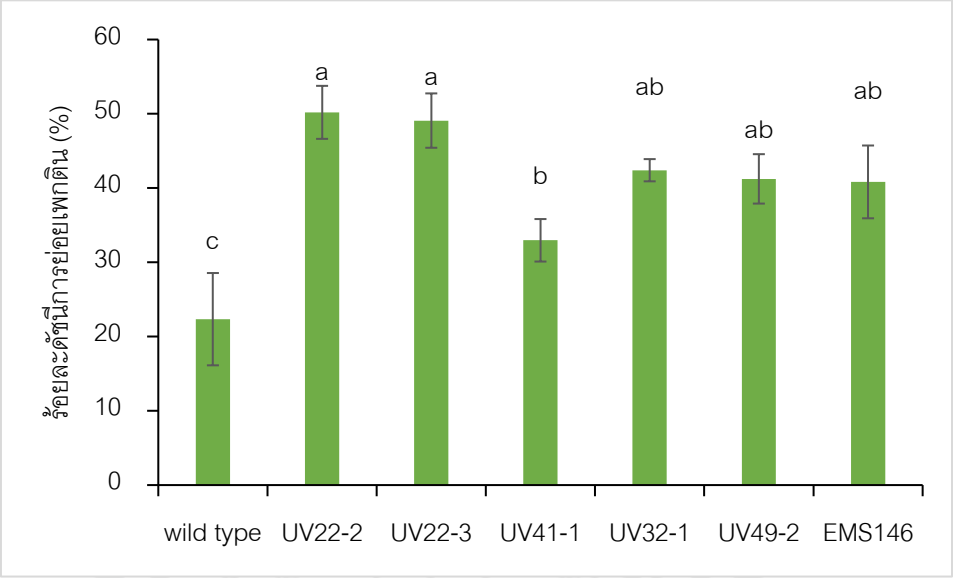

(ข)
ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร
10
8
6
4
2
0
0 6 12 18 24 30 36 42 48 54 60 66 72
ระยะเวลา (ชั่วโมง)
wild type
UV22-2
UV22-3
UV41-1
UV32-1
UV49-2
EMS146



ภาพประกอบ 10 กราฟการเจริญของ W. anomalus YWP1-3 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย 6 สายพันธุ์ในอาหาร YMB (ก) pectin broth (ข) และ mucilage broth (ค) เมื่อทำการบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที

3.3 การศึกษาการผลิตเอนไซม์เพกติเนสบนอาหาร

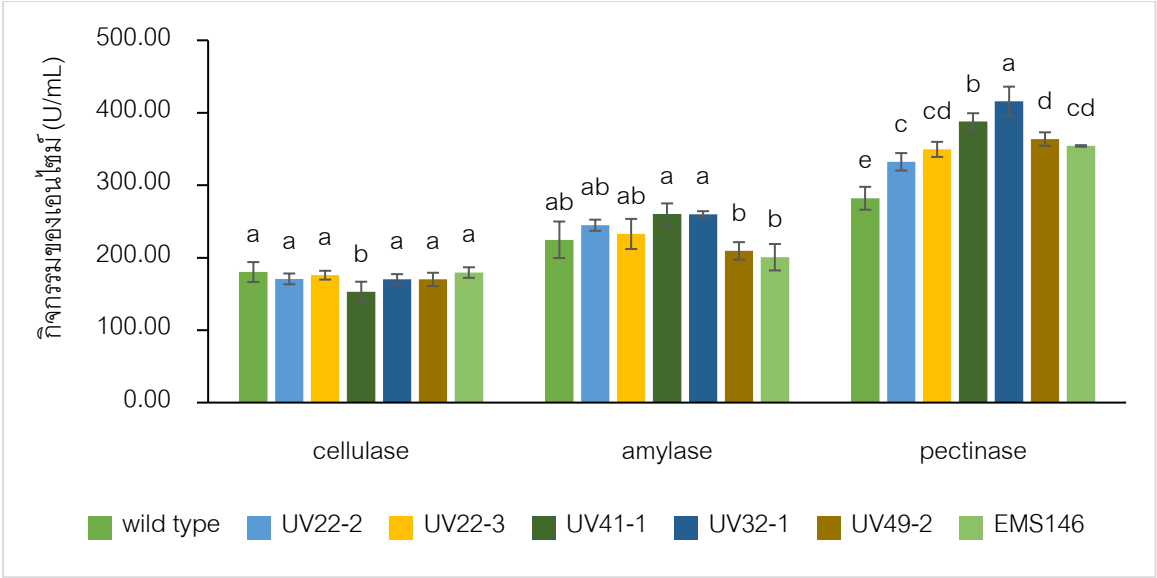
จากการทดสอบคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์เพกติเนสของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายบนอาหาร pectin agar เป็นเวลา 4 วันพบว่า ผลร้อยละดัชนีการย่อยเพกตินของสายพันธุ์กลายทั้ง 6 สายพันธุ์ มีร้อยละดัชนีการย่อยเพกตินมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ สายพันธุ์ดั้งเดิมมีค่า%PDI เท่ากับ 22.3% และ UV22-2 มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 50.2% และเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายอื่นๆมีค่า %PDI อยู่ในช่วง 33.0 – 49.1% (ภาพประกอบ 11)



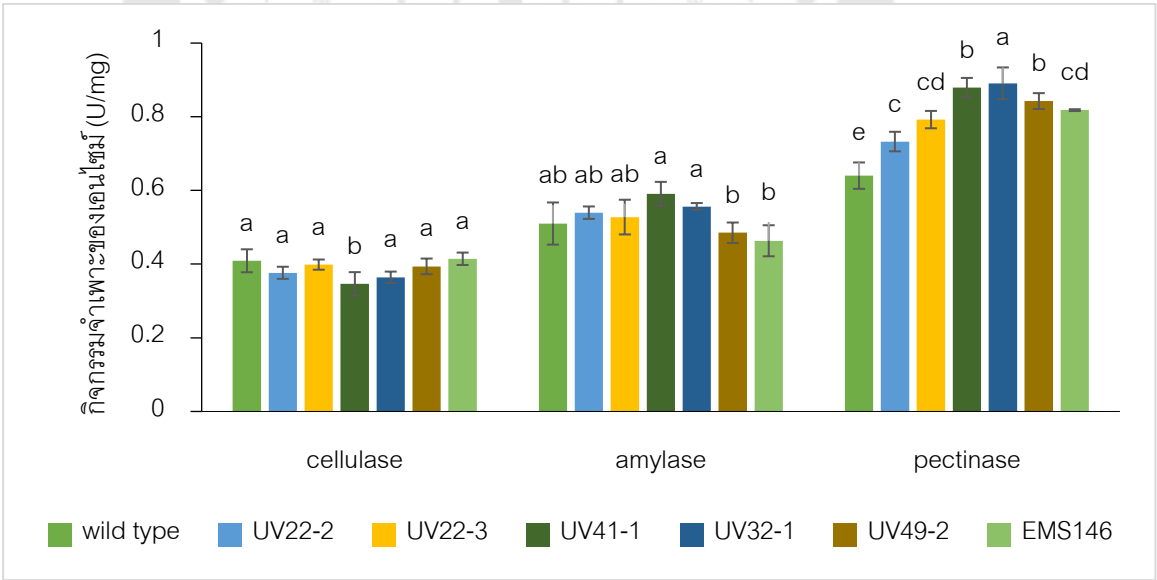
ภาพประกอบ 11 การเปรียบเทียบร้อยละดัชนีการย่อยเพกติน ของ W. anomalus YWP1-3 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย 6 สายพันธุ์บนอาหาร pectin agar ที่ทำการบ่มเป็นเวลา 4 วัน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.4 การศึกษากิจกรรมเอนไซม์ เซลลูเลส อะไมเลส และเพกติเนส ในอาหาร mucilage broth

การศึกษาคุณสมบัติของยีสต์ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส และเพกติเนส ทำได้โดยเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหาร mucilage broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้มาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธี DNS method และหาค่าปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford Protein Assay เพื่อใช้ในการคำนวณหากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ พบว่าที่ 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ผลของกิจกรรมเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลส สายพันธุ์ดั้งเดิมและเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นสายพันธุ์ UV41-1 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้น้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของ UV41-1 เท่ากับ 152.88 U/mL และสายพันธุ์ดั้งเดิม 180.24 U/mL เมื่อพิจารณาผลของการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อะไมเลส พบว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมและเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นสายพันธุ์ UV49-2 และ EMS146 ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้น้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ โดยกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสของ UV49-2 และ EMS146 มีค่าเท่ากับ 363.72 และ 365.24 U/mL ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ดั้งเดิมมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 282.01 U/mL นอกจากนี้พบว่าผลการวัดกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพกติเนสของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายทั้ง 6 สายพันธุ์ สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ โดย UV32-1 มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 415.88 U/mL สายพันธุ์ UV22-2, UV22-3, UV41-1, UV49-2 และ EMS149 มีค่าเท่ากับ 332.32, 349.49, 387.79, 363.72 และ 354.24 U/mL ตามลำดับ โดยสายพันธุ์ดั้งเดิมมีค่าเท่ากับ 282.01 U/mL (ภาพประกอบ 12 และ 13)



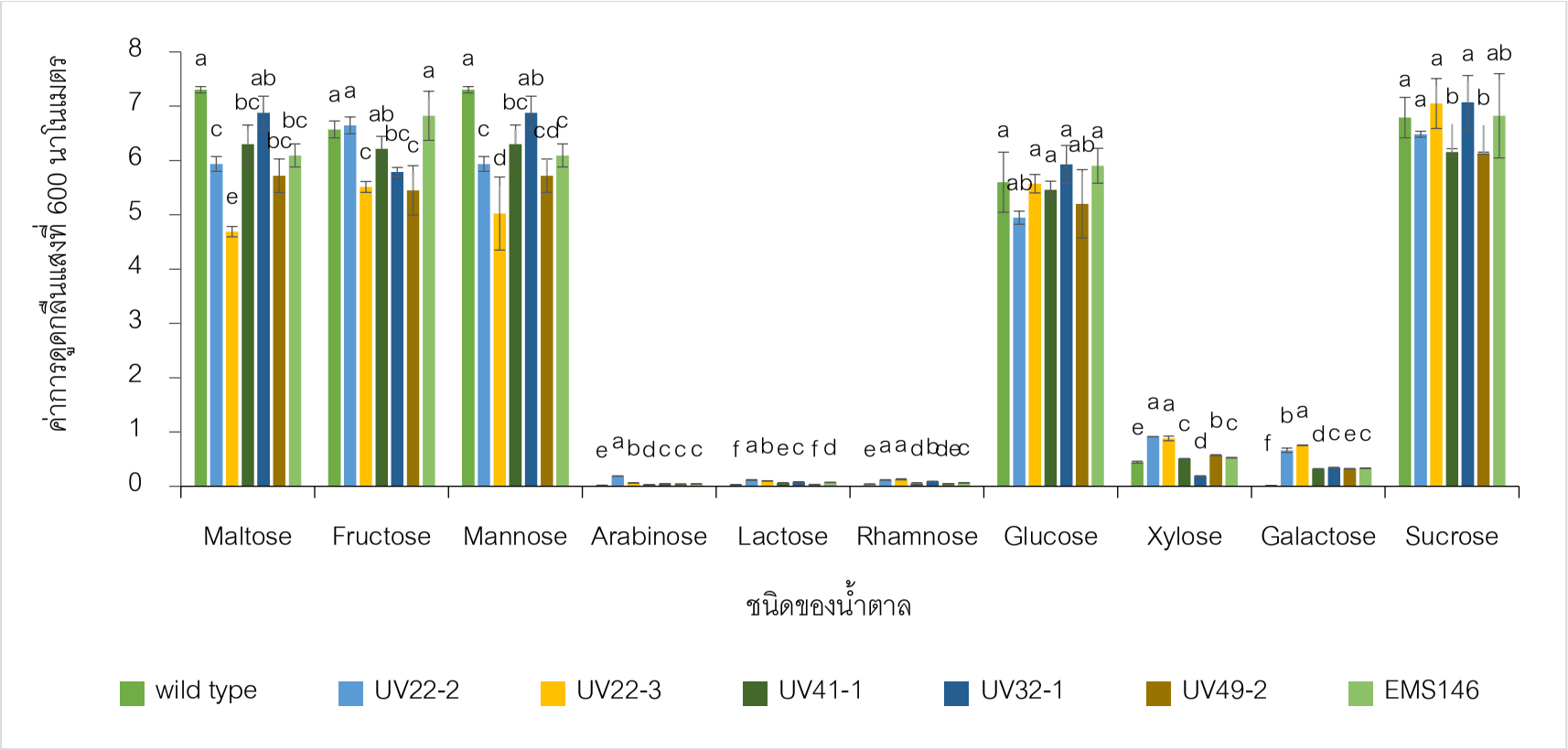
ภาพประกอบ 12 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส และเพกติเนส ของ W. anomalus YWP1-3 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย 6 สายพันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร mucilage broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที



ภาพประกอบ 13 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลส และเพกติเนส ของ W. anomalus YWP1-3 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย 6 สายพันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร mucilage broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที

3.5 การศึกษาความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ

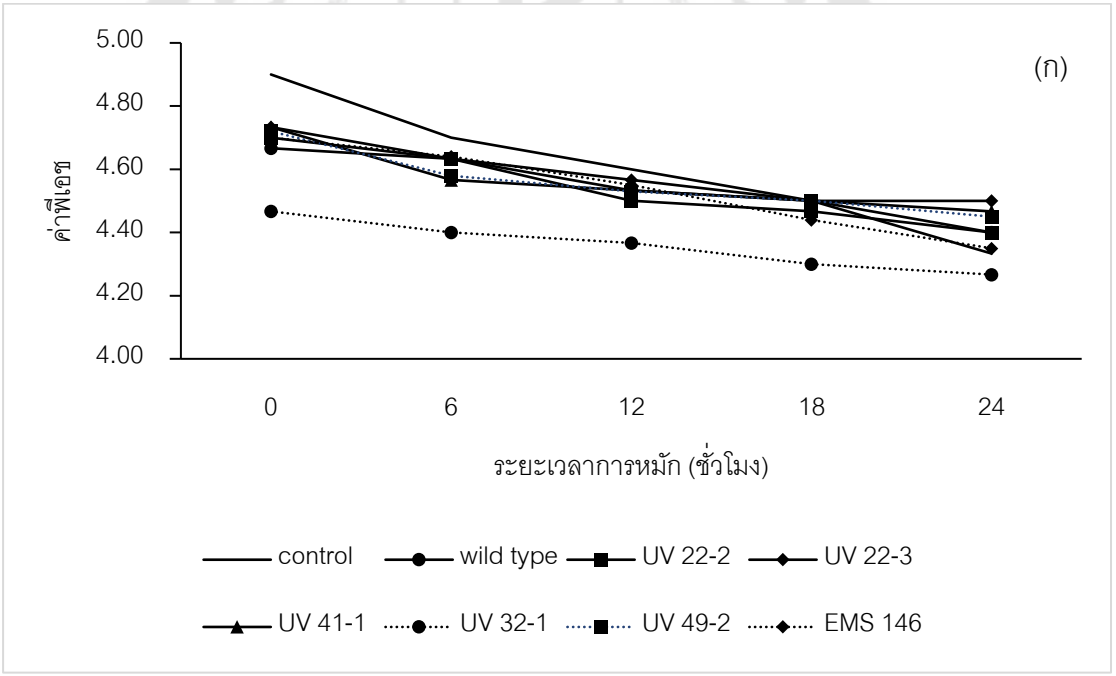
จากการศึกษาการเจริญของเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายทั้ง 6 สายพันธุ์ในอาหารที่มีการเติมน้ำตาลต่างชนิดกัน 10 ชนิด เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และวัดการเจริญของเชื้อด้วยการวัดความขุ่น ที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายทั้ง 6 สายพันธุ์มีการเจริญน้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญในน้ำตาลมอลโตส การเจริญของเชื้อในอาหาร NYB ที่มีน้ำตาลอะราบิโนส ไซโลส และกาแลคโตส พบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายทุกสายพันธุ์มีการเจริญสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้การเจริญของเชื้อในอาหารที่มีน้ำตาลแลคโตส เชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายทุกสายพันธุ์มีการเจริญสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมยกเว้นสายพันธุ์ UV49-2 ที่ไม่แตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ UV22-2 สามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลายชนิด ได้แก่ น้ำตาลอะราบิโนส แลคโตส แรมโนส ไซโลส และกาแลคโตส โดยมีการเจริญสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ แสดงดังภาพประกอบ 14

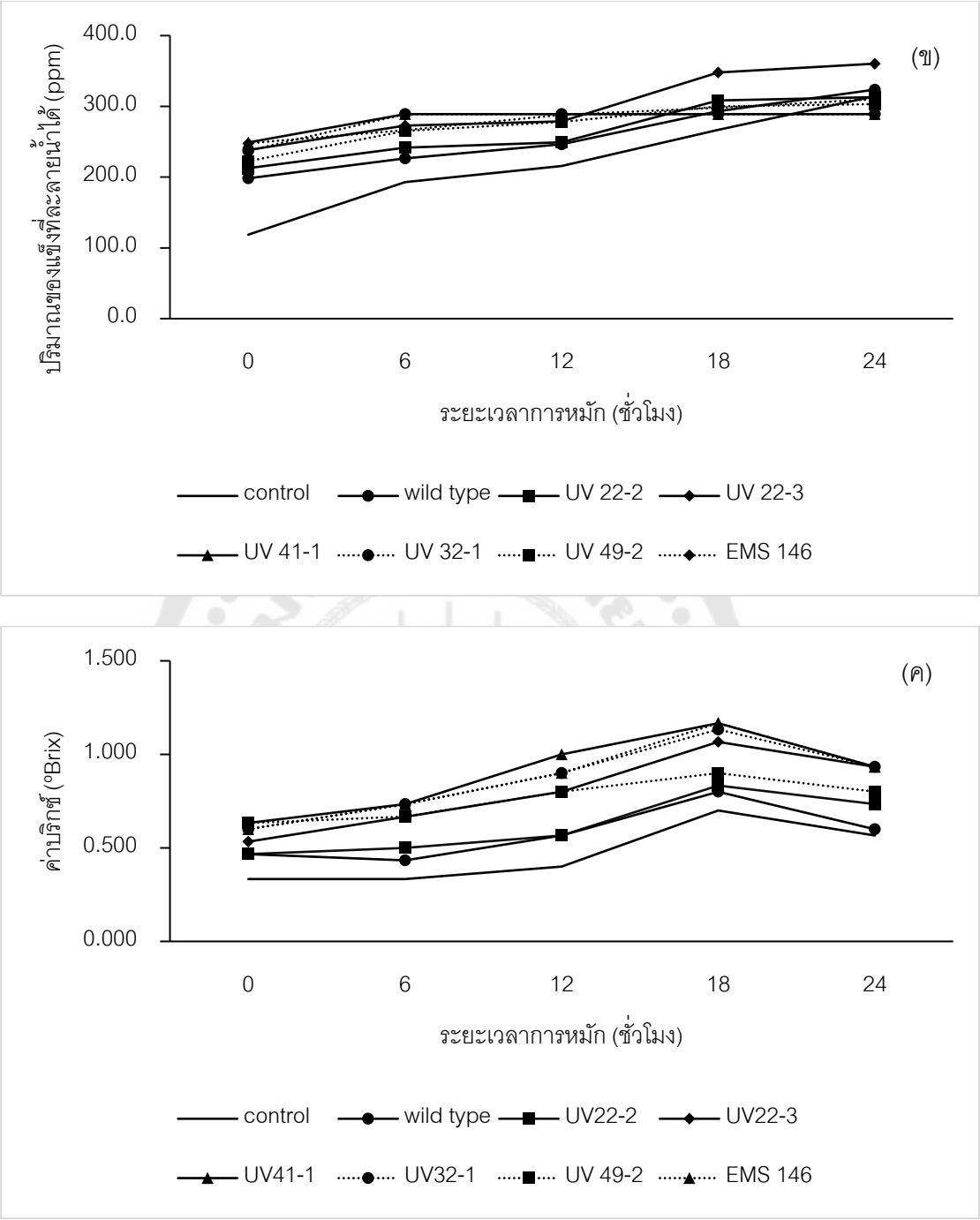


ภาพประกอบ 14 การเจริญของ W. anomalus YWP1-3 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย 6 สายพันธุ์ในอาหาร nitrogen yeast base ที่มีน้ำตาลต่างกัน 10 ชนิด หลังจากการบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของกระบวนการหมักกาแฟอะราบิกา

จากการศึกษาการใช้หัวเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมละและสายพันธุ์กลายทั้ง 6 สายพันธุ์ ในการหมักเมล็ดกาแฟอะราบิกา และวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ ค่าพีเอช (pH) ปริมาณของแข็งละลายน้ำ (TDS) และบริกซ์ (°Brix) พบว่าค่าต่างๆมีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกัน โดยค่า pH มีแนวโน้มลดลง เริ่มต้นกระบวนการหมักมีค่าเท่ากับ 4.5-4.9 เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักมีค่าเท่ากับ 4.4-4.2 แสดงดังภาพประกอบ15(ก) ค่า TDS มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 118.7-249.0 ppm เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักมีค่าเท่ากับ 303.2-360.3 ppm แสดงดังภาพประกอบ15(ข) และค่าบริกซ์โดยเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 0.33-0.63 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึง 18 ชั่วโมง ซึ่งสูงถึง 0.70-1.17 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักมีค่าลดลงเล็กน้อยเท่ากับ 0.57-0.930 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังภาพประกอบ15(ค) นอกจากนี้พบว่าเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักสายพันธุ์กลายทุกสายพันธุ์มีค่าพีเอช และค่าบริกซ์สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ





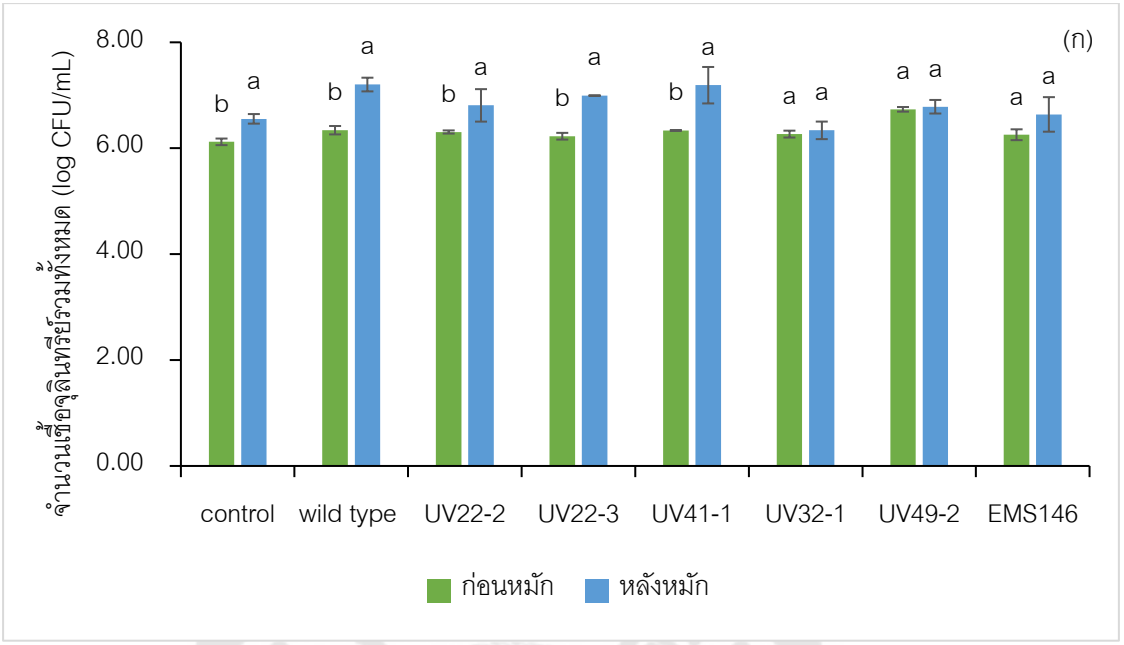
ภาพประกอบ 15 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช (ก) ปริมาณของแข็งละลายน้ำ (ข) และบริกซ์ (ค) ในระหว่างกระบวนการหมักกาแฟอะราบิกาด้วยหัวเชื้อ W. anomalus YWP1-3 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย 6 สายพันธุ์

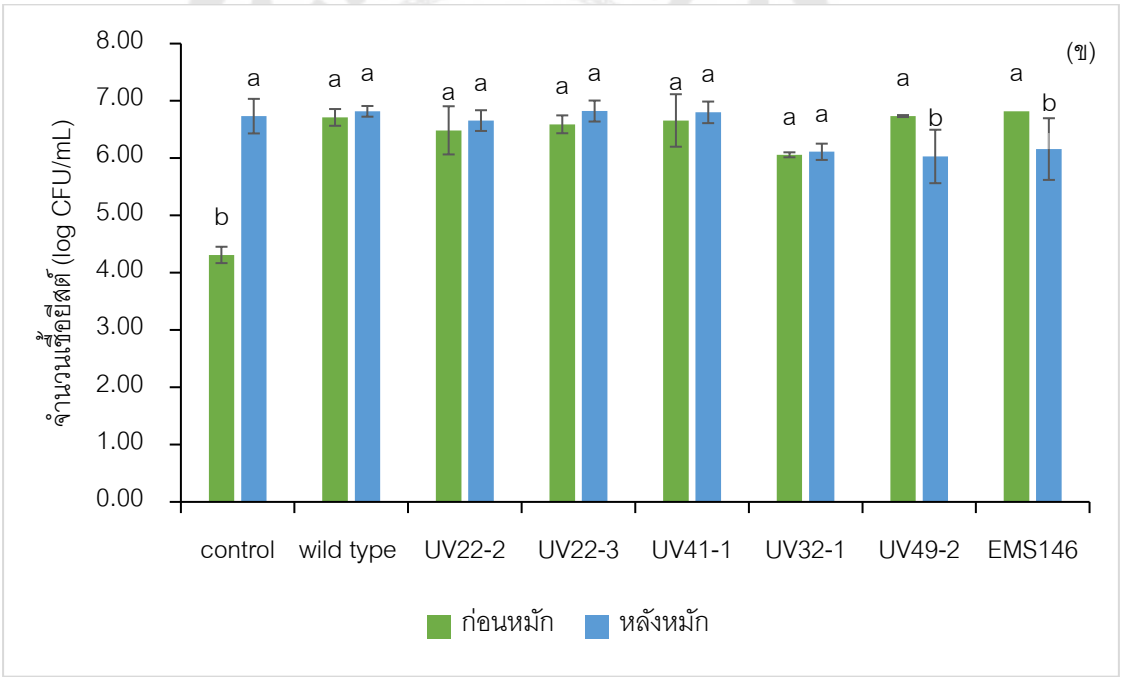
5. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก

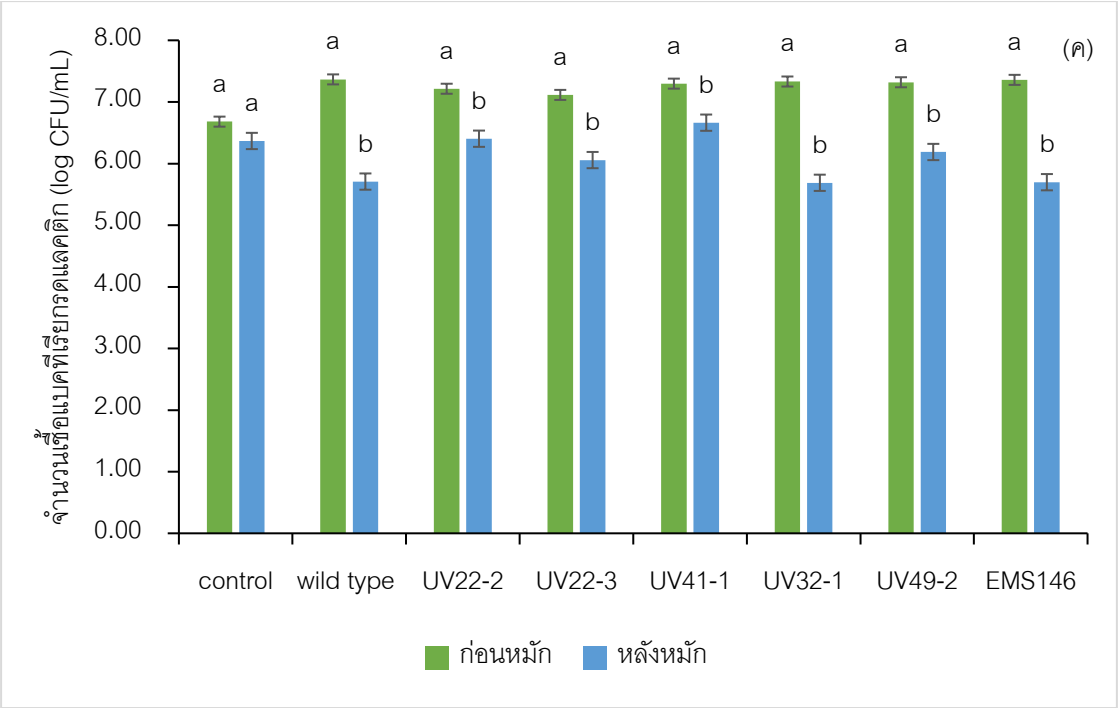
จากการทดลองนำหัวเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและ สายพันธุ์กลายทั้ง 6 สายพันธุ์ หมักเมล็ดกาแฟอะราบิกา และเก็บตัวอย่างน้ำหมักกาแฟเพื่อนับจำนวนเชื้อก่อนและหลังกระบวนการหมัก โดยนับเชื้อจุลินทรีย์รวมทั้งหมดบนอาหาร plate count agar (PCA) นับจำนวนเชื้อยีสต์บนอาหาร YMA และนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร MRS agar โดยใช้วิธีการ Serial dilution และ drop-plating ในการนับจำนวนเชื้อ โดยบ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จำนวนเชื้อจุลินทรีย์รวมทั้งหมด ของการทดลองควบคุม สายพันธุ์ดั้งเดิม UV22-2 UV22-3 และ UV41-1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีจำนวนเชื้อก่อนหมักเท่ากับ 6.12, 6.34, 6.31, 6.23, และ 6.34 log CFU/mL ตามลำดับ และมีจำนวนเชื้อหลังหมักเท่ากับ 6.56, 7.20, 6.81, 6.99 และ 7.19 log CFU/mL ตามลำดับ ซึ่งสายพันธุ์ดั้งเดิมพบจำนวนจุลินทรีย์รวมทั้งหมดเพิ่มขึ้นสูงจากจำนวนเชื้อก่อนหมักเท่ากับ 0.86 log CFU/mL แสดงดังภาพประกอบ16(ก)

จำนวนเชื้อยีสต์ของการทดลองที่มีการเติมหัวเชื้อพบว่า มีเชื้อยีสต์ก่อนหมักเริ่มต้นอยู่ในช่วง 6.06-6.82 log CFU/mL ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการทดลองควบคุมเท่ากับ 4.31 log CFU/mL หลังจากกระบวนกาหมักพบว่าการทดลองที่มีการเติมหัวเชื้อมีจำนวนยีสต์อยู่ในช่วง 6.03-6.82 log CFU/mL ซึ่งเป็นจำนวนใกล้เคียงเมื่อเทียบกับก่อนหมัก แต่จำนวนของเชื้อหลังการหมักในการทดลองควบคุมที่เท่ากับ 6.73 log CFU/mL ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างนัยสำคัญจากก่อนกระบวนการหมักประมาณ 2.42 log CFU/mL แสดงดังภาพประกอบ16(ข)

จำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ก่อนหมักพบว่าอยู่ในช่วง 7.11-7.37 log CFU/mL หลังจากกระบวนการหมักในการทดลองที่มีการเติมหัวเชื้อลงไปหมักร่วมด้วยพบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกลดลง โดยมีจำนวนเชื้อเท่ากับ 5.69-6.66 log CFU/mL แต่การทดลองควบคุมหลังสิ้นสุดกระบวนการหมักมีการลดลงของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเพียงเล็กน้อย จาก 6.68 log CFU/mL ลดลงเหลือ 6.63 CFU/mLแสดงดังภาพประกอบ16(ค)


(ก)
จำนวนเชื้อจุลินทรีย์รวมทั้งหมด (log CFU/mL)
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
control
wild type
UV22-2
UV22-3
UV41-1
UV32-1
UV49-2
EMS146
ก่อนหมัก
หลังหมัก

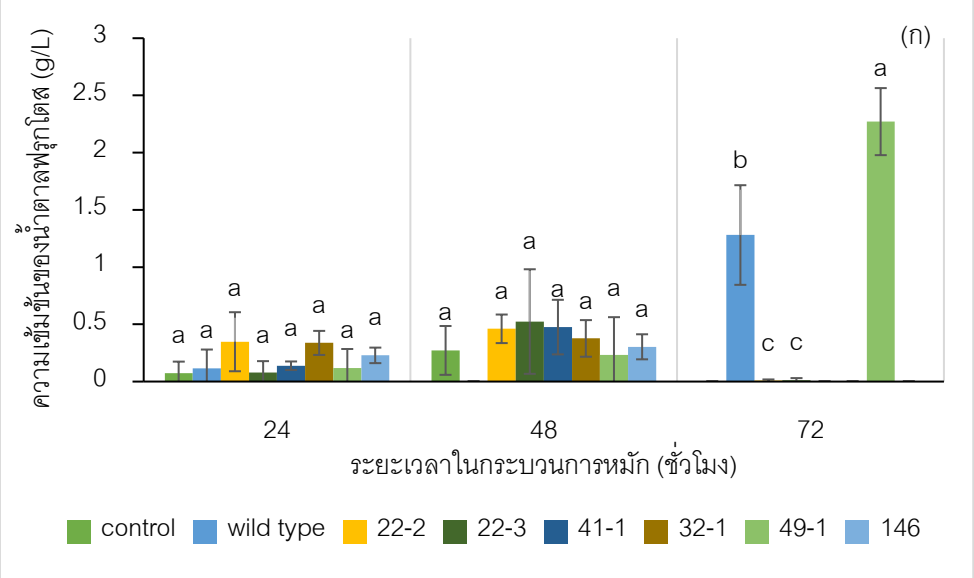

(ข)
จำนวนเชื้อยีสต์ (log CFU/mL)
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
control
wild type
UV22-2
UV22-3
UV41-1
UV32-1
UV49-2
EMS146
ก่อนหมัก
หลังหมัก

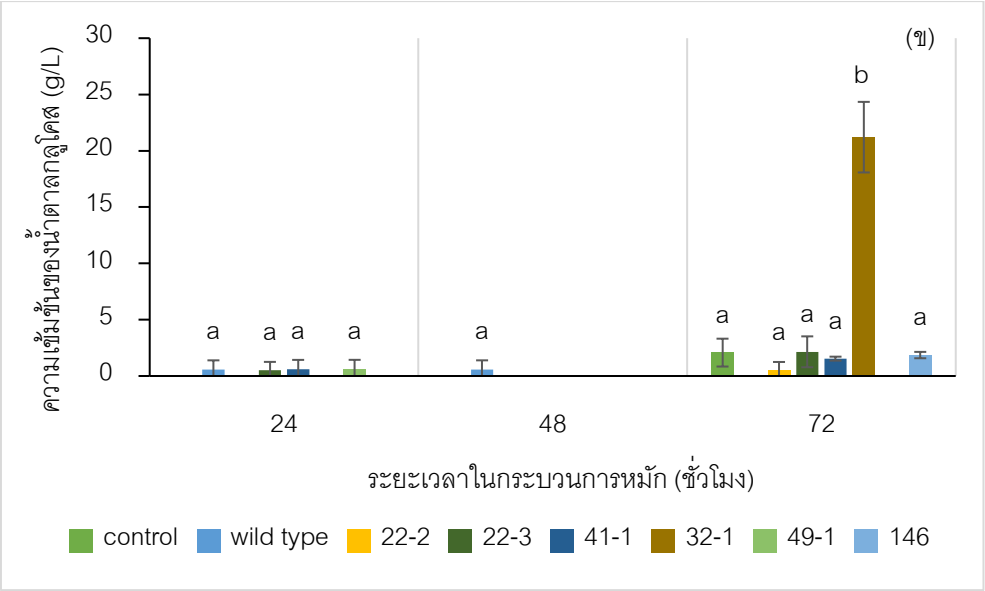


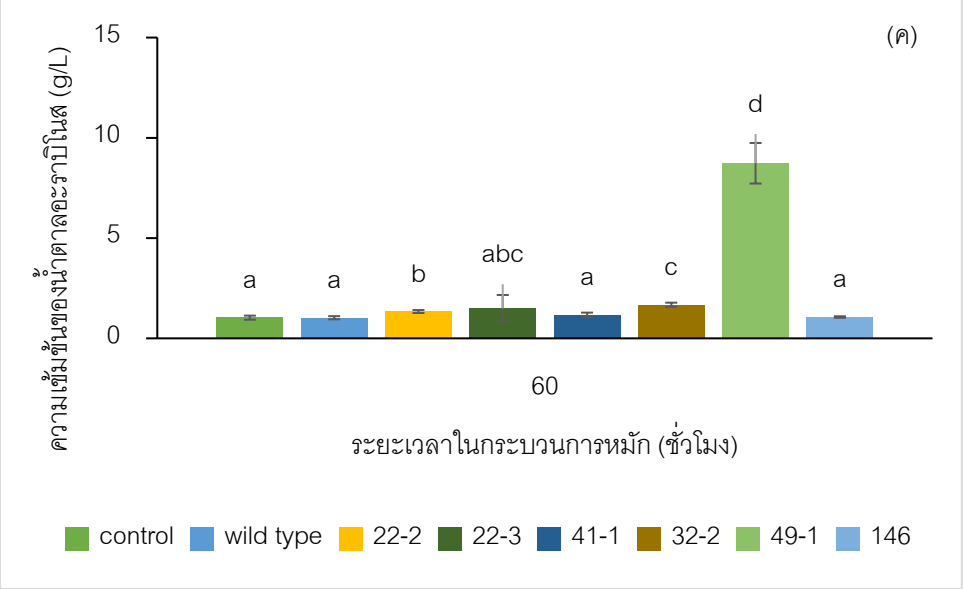
ภาพประกอบ 16 จำนวนจุลินทรีย์รวมทั้งหมด (ก) ยีสต์ (ข) และแบคทีเรียแลกติก (ค) ที่ได้จากกระบวนการหมักกาแฟอะราบิกาที่ 0 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง

6. **การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำหมักเมล็ดกาแฟ**

จากการทดสอบหาชนิดและปริมาณน้ำตาลในน้ำหมักเมล็ดกาแฟ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยหมักเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์น้ำตาลทั้ง 10 ชนิด พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ฟรุกโตส กลูโคส และอะราบิโนส ใน 4 ช่วงเวลา ได้แก่ 24, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง จากผลการวิเคราะห์พบว่ามีปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสที่ 24 ชั่วโมง อยู่ในช่วง 0.067-0.258 g/L เมื่อระยะเวลาผ่านไปปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสลดลง จนบางสภาวะไม่พบน้ำตาลฟรุกโตสเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก แสดงดังภาพประกอบ17(ก) ได้แก่ การทดลองที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อ UV41-1 UV32-1 และ EMS146 และการหมักกาแฟด้วยหัวเชื้อ สายพันธุ์ดั้งเดิม และ UV 49-2 มีปริมาณของน้ำตาลฟรุกโตสที่ 72 ชั่วโมงสูงขึ้นโดยมีค่าเท่ากับ 0.435 และ 0.293 g/L ตามลำดับ จากการวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสพบว่าที่ 24 ชั่วโมงของกระบวนการหมักมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสอยู่ในช่วง 0.191-0.595 g/L และที่ 72 ชั่วโมงมีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่สภาวะที่เติมหัวเชื้อพันธุ์กลาย UV32-1 มีปริมาณของน้ำตาลกลูโคสสูงสุดเท่ากับ 21.201 g/L แสดงดังภาพประกอบ16(ข) และที่ 60 ชั่วโมงพบว่าภายในน้ำหมักกาแฟที่มีการเติมหัวเชื้อพันธุ์กลาย UV49-1 มีปริมาณของน้ำตาลอะราบิโนสสูงเท่ากับ 8.732 g/L และสภาวะอื่นๆมีปริมาณน้ำตาลอะราบิโนสอยู่ในช่วง 1.028-1.618 g/L แสดงดังภาพประกอบ16(ค) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่ายีสต์สายพันธุ์กลายมีความสามารถในการใช้น้ำตาลในการเจริญและสร้างกลิ่นรสต่างกัน







ภาพประกอบ 17 ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส (ก) กลูโคส (ข) และอะราบิโนส (ค) ในน้ำหมักเมล็ดกาแฟที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

7. การประเมินคุณภาพของเมล็ดกาแฟด้วยการทดสอบประสาทสัมผัส

จากการประเมินคุณภาพของเมล็ดกาแฟด้วยการทดสอบประสาทสัมผัสของตัวอย่างเมล็ดกกาแฟคั่วทั้ง 4 ตัวอย่างได้แก่ กาแฟที่หมักโดยเกษตรกร กาแฟที่หมักแบบไม่เติมเชื้อ กาแฟที่หมักแบบเติมเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม และกาแฟที่หมักแบบเติมเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย UV22-2 ผลการทดสอบพบว่า มีคะแนนการชิม โดย Q-Arabica grader เท่ากับ 72.5, 75.5, 80.25 และ 83.5 คะแนน ตามลำดับ โดยพบว่าตัวอย่างกาแฟคั่วที่หมักแบบเติมเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย UV22-2 มีคะแนนที่สูง และกลิ่นที่โดดเด่นมากกว่าตัวอย่างอื่นๆ ได้แก่ ถั่ว แอปเปิลเขียว สับปะรด คาราเมล แอปเปิลไซเดอร์ ดอกไม้สีเหลือง น้ำผึ้ง เป็นต้น แสดงดังตาราง 7

ตาราง 7 ตารางคะแนนการทดสอบชิมและการประเมินกลิ่น

ตัวอย่างกาแฟ	คะแนนการชิม	กลิ่นและรสชาติ
กาแฟที่หมักโดยเกษตรกร	72.5	หญ้าแห้ง ถั่ว เครื่องเทศ เมล็ดเขียว
กาแฟที่หมักแบบไม่เติมเชื้อ	75.5	ดอกไม้ วานิลลา พริกหยวก ผักใบเขียว ฟางข้าว ถั่ว มีความหวาน กรดไม่ชัดเจน รสที่คงค้างสั้นมาก มีความขมมาก
กาแฟที่หมักแบบเติมเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม	80.25	ดอกไม้ วานิลลา คาราเมล มอลต์ โกโก้ พรุน น้ำผึ้ง ช็อคโกแลต แอปเปิลแดง ดอกไม้สีเหลืองและขาว มีความเป็นกรดสูง มีความหวานมาก มีความคงค้างยาวนาน
กาแฟที่หมักแบบเติมเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย UV22-2	83.5	ถั่ว แอปเปิลเขียว สับปะรด คาราเมล แอปเปิลไซเดอร์ ดอกไม้สีเหลือง น้ำผึ้ง กาแฟที่มีความเปรี้ยวสว่าง แต่ความเปรี้ยวต่ำ มีความหวานชัดเจน รสที่คงค้างสั้น

8. การวิเคราะห์สารเมแทบอไลต์ในเมล็ดกาแฟคั่ว

ผลการวิเคราะห์ volatile compound ด้วยเครื่อง Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) ที่เชื่อมต่อกับ gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่วที่หมักร่วมกับหัวเชื้อยีสต์ ได้แก่ เชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย UV22-2 โดยเปรียบเทียบกับกาแฟคั่วที่ไม่ได้เติมเชื้อในกระบวนการหมัก และกาแฟทางการค้า วิเคราะห์โดยการเปรียบเทียบแมสสเปกตรัมเชิงคุณภาพกับฐานข้อมูลแมสสเปกตรัม Wiley โดยใช้ match factor ที่สูงกว่า 80% ผลการวิจัยพบว่า volatile compound profile และการจำแนกสารของตัวอย่างทั้งหมดมีความคล้ายคลึงกัน ซึ่ง volatile compound ที่มีปริมาณมากที่สุดในตัวอย่าง ได้แก่ furan (49.91-51.85%) รองลงมาคือ pyrazines (22.32-27.98%) ketones (2.76-4.06%) pyrroles (1.27-1.77%) และ aldehydes (0.51% -0.97%)

โดย volatile compound ที่ตรวจพบในกาแฟคั่วของการทดลองควบคุม พบว่ามี furan มากที่สุดเท่ากับ 50.95% รองลงมาคือ pyrazines เท่ากับ 25.64%, ketones เท่ากับ 3.33%, pyrroles เท่ากับ 1.47% และ aldehydes เท่ากับ 1.00% ในทางเดียวกัน กาแฟคั่วเชิงพาณิชย์พบ furan (47.52%) เป็น volatile compound หลัก ตามด้วย pyrazines (23.75%) ketones (3.03%) pyrroles (2.74%) และ aldehydes (0.34%) โดยตัวอย่างกาแฟคั่ว ที่หมักด้วยเชื้อ UV22-2 มีเปอร์เซ็นต์พื้นที่รวมของ furan ในตัวอย่าง เท่ากับ (51.85%) สูงกว่าชุดควบคุม (50.95%) และกาแฟคั่วเชิงพาณิชย์ (47.52%) และชนิดของ furan ที่มีมากที่สุดใน UV22-2 คือ furfuryl alcohol (16.56%) รองลงมาคือ furfural (11.64%) และ furfuryl acetate (8.79%)

Pyrazines เป็น volatile compound อันดับสองที่พบได้ในกาแฟทุกตัวอย่าง โดย Alkylpyrazines พบในตัวอย่างกาแฟของการทดลองควบคุมและกาแฟเชิงพาณิชย์มีปริมาณสูงที่สุด และการศึกษานี้ยังตรวจพบ ketones ในกาแฟคั่วทุกชุดการทดลอง จากตัวอย่างเมล็ดกาแฟที่หมักกับหัวเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมพบว่ามีปริมาณ ketones สูงสุด (4.06%) เช่น 1-acetyloxy-2-butanone และ 2,3-butanedione นอกจากนี้ยังพบ volatile compounds อื่นๆ ได้แก่ pyrroles aldehydes acetic acid และ pyridine ในทุกตัวอย่าง แสดงดังตาราง

ตาราง 8 ค่าพื้นที่ใต้กราฟของสาร volatile compound ที่พบในเมล็ดกาแฟคั่วที่ได้จากการหมักกาแฟอะราบิกาด้วยหัวเชื้อยีสต์

RT	สารประกอบ	Relative percentages of peak area (%area)			
		กาแฟเชิงพาณิชย์	กาแฟชุดควบคุม	กาแฟที่เติมหัวเชื้อยีสต์	
		commercial	control	WT	UV22-2
	Ketones				
1.9571	2,3-Butanedione		0.4116	0.3612	0.3442
12.093	2-Butanone, 1-(acetyloxy)-	1.0781	1.2637	1.7	1.2241
2.9321	2,3-Pentanedione		1.2658	1.3172	1.158
3.1628	2-Butanone, 3-hydroxy-		0.3931	0.5	0.41
17.744	Ethanone, 1-(1-cyclohexen-1-yl)-	1.9527			
22.185	4-(4'-Fluorophenyl)-3-butyn-2-one			0.1857	
	รวม	3.0308 c	3.3342 b	4.0641a	3.1363 b
	Furans				
2.0494	Furan, 2-methyl- (furfuryl alcohol)	1.1252	0.7468	0.7958	0.7124
6.3994	Furfural	2.5824	11.8999	11.6369	11.6403
7.6608	2-Furanmethanol	18.606	15.7443	16.6515	16.5628
9.214	2-Furylmethyl formate	1.3969	0.951	0.8986	1.082
11.322	1-(2-Furyl)-2-propanone	0.7096	0.4288	0.4077	0.4881
11.885	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	3.8747	9.622	8.2485	9.6145
13.395	2-Furanmethanol, acetate (Furfuryl acetate)	15.4963	8.6445	6.9459	8.7904
17.467	Furan, 2,2'-methylenebis-	1.423	0.6314		
18.589	2,5-Furandione, 3-ethyl-4-methyl-	0.4019			

ตาราง 8 (ต่อ)

RT	สารประกอบ	Relative percentages of peak area (%area)			
		กาแฟเชิงพาณิชย์	กาแฟชุดควบคุม	กาแฟที่เติมหัวเชื้อยีสต์	
		commercial	control	WT	UV22-2
22.305	2, 3-Dihydro-6-methylthieno[2,3c]furan				0.1843
27.694	Furan, 2,2'-[oxybis(methylene)]bis-	0.1953			
5.4042	3(2H)-Furanone, dihydro-2-methyl-	1.155	1.483	2.3075	1.9803
11.028	2,5-Dimethyl-3(2H)furanone	0.5531	0.8032	0.8626	0.7982
	รวม	47.5194 d	50.9549 b	48.755 c	51.8533 a
	Pyrazines				
3.6348	Pyrazine (CAS)	0.295	0.3849		0.3331
5.9127	2-methyl pyrazine	4.9234	6.7311	6.4241	6.2458
9.454	Pyrazine, 2,5-dimethyl-	9.83	14.4	11.1018	13.22
9.5083	Pyrazine, ethyl-	2.9168			
9.6735	Pyrazine, 2,3-dimethyl-	2.2699	1.3495	1.4409	1.3531
13.461	Pyrazine, 2-ethyl-5-methyl-			0.8934	
13.564	Pyrazine, 2-ethyl-3-methyl-			0.7266	
13.529	Pyrazine, trimethyl-	2.3121	1.9868	1.248	1.8228
17.219	Pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl-	1.2015	0.7852	0.4897	0.6911
	รวม	23.7487 b	25.6375 a	22.3245 c	23.6659 b
	Phenols				
26.624	Guaiacol, 4-ethyl-	0.2527			
28.205	2-Methoxy-4-vinylphenol (4-vinyl guaiacol)	0.3789			
	รวม	0.6316 a			

ตาราง 8 (ต่อ)

RT	สารประกอบ	Relative percentages of peak area (%area)			
		กาแฟเชิงพาณิชย์	กาแฟชุดควบคุม	กาแฟที่เติมหัวเชื้อยีสต์	
		commercial	control	WT	UV22-2
	Pyrroles				
3.7533	1H-Pyrrole, 1-methyl-	0.2296	0.2256		0.1899
13.65	1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde, 1-methyl-	1.5015	0.9545	1.1357	1.0434
16.772	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	0.49			
16.967	Ethanone,1-(1-methyl-1H-pyrrole-2-yl)-	0.52			
22.177	1H-Pyrrole, 1-(2-furanylmethyl)-		0.2861	0.19	0.3251
	รวม	2.7411 a	1.4662 c	1.3257 d	1.5584 b
	Aldehydes				
2.4501	Butanal, 3-methyl-	0.3448	0.5455	0.5142	0.4224
15.481	Benzeneacetaldehyde		0.4559		0.4672
	รวม	0.3448 d	1.0014 a	0.5142 c	0.8896 b
	Others				
2.3781	Acetic acid	3.0866	5.0537	5.0591	5.0476
3.891	Pyridine	4.0877	0.764	0.9382	1.0252
18.894	2-Indanone, hexahydro, trans-	0.26			
12.97	1,6-Octadiene, 7-methyl-3-methylene-				0.2625
	beta-Myrcene	0.35		0.2487	
22.306	3-Ethyl-2-formylthiophene	0.17	0.1859	0.18	
	รวม	7.9543 a	6.0036 d	6.426 b	6.3353 c

9. การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอทั้งหมดของยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีศักยภาพในการหมักกาแฟอะราบิกา

เมื่อทำการวิเคราะห์จีโนมทั้งหมด (whole genome sequencing) เปรียบเทียบกับยีสต์ *W. anomalus* สายพันธุ์ดั้งเดิมพบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย UV22-2 มีลำดับดีเอ็นเอแตกต่างจากยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมดังนี้

1. บริเวณเอกซอน (exon) และดาวน์สตรีม (downstream) ของยีนที่สร้างเอนไซม์1,3-β-D-glucan endohydrolases, 1,3;1,4-β-D-glucan endohydrolases และ 1,3 1,3-β-D-glucan exohydrolase จากสายพันธุ์ UV22-2 มีการกลายพันธุ์ทั้งที่มีการเปลี่ยนแปลงของรหัสโคดอนที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน (synonymous) และการกลายพันธุ์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของรหัสโคดอนที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน(nonsynonymous)

2.บริเวณเอกซอน (exon) และ การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นการเปลี่ยนแปลงของรหัสโคดอนที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน (nonsynonymous)

3. บริเวณเอกซอน (exon) ของยีนที่สร้าง α-amylase (EC 3.2.1.1); oligo-1,6-glucosidase (EC 3.2.1.10); α-glucosidase (EC 3.2.1.20); pullulanase (EC 3.2.1.41); cyclomaltodextrinase (EC 3.2.1.54); maltotetraose-forming α-amylase (EC 3.2.1.60) และ isoamylase มีการกลายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของรหัสโคดอนที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน (synonymous)

4. บริเวณเอกซอน (exon) และดาวน์สตรีม (downstream) ของยีนที่สร้างเอนไซม์ transglycosylase จากสายพันธุ์ UV22-2 มีการกลายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของรหัสโคดอนที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน (synonymous)

5. บริเวณเอกซอน (exon) ของยีนที่สร้างเอนไซม์ ในกลุ่ม Cellulase family A ได้แก่ endoglucanase หรือ cellulase, endomannanase, exoglucanases, exomannanases, β-glucosidase และ β-mannosidase โดยมีการกลายพันธุ์ทั้งที่มีการเปลี่ยนแปลงของรหัสโคดอนที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน (synonymous) และ การกลายพันธุ์ที่เกิดขการเปลี่ยนแปลงของรหัสโคดอนที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน (nonsynonymous) และ เกิดการกลายพันธุ์ที่เปลี่ยนโคดอนอย่างน้อยหนึ่งเบส นำไปสู่การหยุดโคดอนก่อนเวลาอันควร (ได้โคดอน "หยุด") ในทางกลับกัน ส่งผลให้การแปล RNA ของผู้ส่งสารไปเป็นโปรตีนก่อนเวลาอันควร และมักเป็นผลิตภัณฑ์โปรตีนที่ไม่เสถียรและไม่สามารถทำงานได้ (stop gain)

6. บริเวณเอกซอน (exon) ของยีนที่สร้างเอนไซม์ keratan-sulfate endo-1,4-β-galactosidases (EC 3.2.1.103), endo-1,3-β-galactanases (EC 3.2.1.-), endo-1,3-β-glucanases (EC 3.2.1.39), endo-1,3(4)-β-glucanases (EC 3.2.1.6), licheninases (EC 3.2.1.73), β-agarases (EC 3.2.1.81), (β-porphyranases (EC 3.2.1.178), κ-carrageenases (EC 3.2.1.83) และ endo-xyloglucanases (EC 3.2.1.151) จากสายพันธุ์ UV22-2 โดยมีการกลายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของรหัสโคดอนที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน (synonymous)

7. บริเวณเอกซอน (exon) และอัพสตรีม (upstream) ของยีนที่สร้างเอนไซม์ exo-acting α-mannosidases โดยมีการกลายพันธุ์ทั้งที่มีการเปลี่ยนแปลงของรหัสโคดอนที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน (synonymous) และ การกลายพันธุ์ที่เกิดขการเปลี่ยนแปลงของรหัสโคดอนที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน (nonsynonymous)

9. บริเวณเอกซอน (exon) ของยีนที่สร้างเอนไซม์เอ็นโด endo-acting α-mannanases โดยมีการกลายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของรหัสโคดอนที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน (synonymous)

8. บริเวณเอกซอน (exon) และดาวน์สตรีม (downstream) ของยีนที่สร้างเอนไซม์ α-mannosidases โดยมีการกลายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของรหัสโคดอนที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน (synonymous)

9. บริเวณเอกซอน (exon) ของยีนที่สร้างเอนไซม์ Mannosyl oligosaccharide glucosidase โดยมีการกลายพันธุ์ทั้งที่มีการเปลี่ยนแปลงของรหัสโคดอนที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน (synonymous) และ การกลายพันธุ์ที่เกิดขการเปลี่ยนแปลงของรหัสโคดอนที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน (nonsynonymous)

10. บริเวณเอกซอน (exon) ของยีนที่สร้างเอนไซม์ sucrase-isomaltase และ lysosomal alpha-glucosidase โดยมีการกลายพันธุ์ทั้งที่มีการเปลี่ยนแปลงของรหัสโคดอนที่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน (synonymous) และ การกลายพันธุ์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของรหัสโคดอนที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน (nonsynonymous)

ตาราง 9 ตัวอย่างรายละเอียดการเกิดการกลายพันธุ์ของยีนที่สนใจจำนวน 3 ยีน ในจีโนมของ *W. anomalus* สายพันธุ์ UV22-2

หมายเลขยีน	**เอนไซม์**	**ลักษณะการกลายพันธุ์**	**ตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์**	Hom **หรือ** Het	Depth	**ความถี่** (%)
g14493	sucrase-isomaltase และ lysosomal alpha-glucosidase	non synonymous	เบส A เปลี่ยนเป็น C ที่ตำแหน่ง 399 ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Lysine เป็น Asparagine (g14493:g14493.t1:exon1: c.A399C:p.K133N)	het	185	53
		synonymous	เบส T เปลี่ยนเป็น C ที่ตำแหน่ง 348 ทำให้กรดอะมิโนไม่เปลี่ยน เป็น Phenylalanine เช่นเดิม (g14493:g14493.t1:exon1: c.T348C:p.F116F,)	het	205	56

ตาราง 9 (ต่อ)

หมายเลขยีน	เอนไซม์	ลักษณะการกลายพันธุ์	ตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์	Hom หรือ Het	Depth	ความถี่ (%)
	Cellulase family A ได้แก่ endoglucanase cellulase, endomannanase, exoglucanases, exomannanases, β-glucosidase และ β-mannosidase	non synonymous	เบส T เปลี่ยนเป็น A ที่ตำแหน่ง 852 ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Aspartic acid เป็น Glutamic acid (g2135:g2135.t1:exon1: c.T852A:p.D284E,)	het	132	52
		synonymous	เบส T เปลี่ยนเป็น C ที่ตำแหน่ง 471ทำให้กรดอะมิโนไม่เปลี่ยนยังคงเป็น Isoleucine (g2135:g2135.t1:exon1: c.T471C:p.I157I,)	het	154	36
		stopgain	เบส T เปลี่ยนเป็น A ที่ตำแหน่ง 437 ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนเป็นรหัสหยุด (g2135:g2135.t1:exon1: c.T437A:p.L146X,)	het	141	40
		non synonymous	เบส T เปลี่ยนเป็น G ที่ตำแหน่ง 436 ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Leucine เป็น Valine (g2135:g2135.t1:exon1: c.T436G:p.L146V,)	het	140	40

หมายเลขยีน	เอนไซม์	ลักษณะการกลายพันธุ์	ตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์	Hom หรือ Het	Depth	ความถี่ (%)
g12588	α-amylase (EC 3.2.1.1); oligo-1,6-glucosidase (EC 3.2.1.10); α-glucosidase (EC 3.2.1.20); pullulanase (EC 3.2.1.41); cyclomaltodextrinase (EC 3.2.1.54); maltotetraose-forming α-amylase (EC 3.2.1.60) isoamylase	non synonymous	เบส T เปลี่ยนเป็น G ที่ตำแหน่ง 88 ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Phenylalanine เป็น Valine (g12588:g12588.t1:exon1:c.T88G:p.F30V,)	het	132	14
		synonymous	เบส G เปลี่ยนเป็น A ที่ตำแหน่ง 495 แต่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน ยังคงเป็น Glutamic acid (g12588:g12588.t1:exon1:c.G495A:p.E165E,)	het	302	48

บทที่5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

Wickerhamomyces anomalus YWP1-3 เป็นยีสต์ที่แยกได้จากกระบวนการหมักกาแฟ ณ ดอยผาตั้ง จังหวัดเชียงราย โดยจากรายงานก่อนหน้านี้พบว่า *W. anomalus* YWP1-3 สามารถเพิ่มคุณสมบัติทางด้านกลิ่นรสของกาแฟอะราบิกา ซึ่งมีคะแนนการชิมสูงเท่ากับ 84.75 คะแนน เมื่อเทียบกับการทดลองควบคุมที่มีคะแนนเท่ากับ 73.75 คะแนน[22] และอีกหนึ่งงานวิจัยของการหมักเมล็ดกาแฟอะราบิกาด้วยหัวเชื้อผสมได้แก่ *Pichia kluyveri* YWP1-5, YMP1-1, YML1-1 และ *W. anomalus* YWP1-3 พบว่ามีคะแนนการชิมเท่ากับ 82.4 คะแนน[23] ดังนั้นจึงนำมาใช้เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมในการพัฒนาสายพันธุ์กลายด้วยวิธีการฉายรังสียูวีและการใช้สารเคมีเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับใช้ในกระบวนการหมักกาแฟอะราบิกา จากการศึกษาอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม พบว่าสูงสุดที่ 6-12 ชั่วโมง เท่ากับ 0.51 ต่อชั่วโมง และมีลักษณะโคโลนีดังนี้ มีขนาดปานกลาง สีครีม เนื้อสัมผัสเรียบ รูปทรงกลม ลักษณะโค้งนูนเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวหน้าขรุขระ จากงานวิจัยในปี 2019 ศึกษาการแยกและจัดจำแนกเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพกติเนส เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อหมักกาแฟ พบว่า *W. anomalus* KNU18Y3 ที่แยกได้มีลักษณะโคโลนี ทรงกลม สีขาว โค้งนูน ผิวหน้าเรียบ และ ขอบเรียบ[3] ซึ่งมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อยกับลักษณะโคโลนีของ *W. anomalus* YWP1-3

ในงานวิจัยครั้งนี้ จากการกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวีสามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายได้ทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ จากวิธีการฉายรังสียูวี 5 สายพันธุ์ ได้แก่ UV22-2 UV22-3 UV41-1 UV32-1 และ UV49-2 และจากวิธีการจากวิธีการใช้สารเคมี 1 สายพันธุ์ ได้แก่ EMS146 จากงานวิจัยในปี 2019 นำ *W. anomalus* HH16 กลายพันธุ์ด้วยวิธีฉายรังสียูวีเพื่อเพิ่มการผลิตกลีเซอรอล[21] และอีกหนึ่งงานวิจัยรายงานว่าการย่อยวัตถุดิบแป้งแบบเชิงกล 2 ขั้นตอนเพื่อแปรสภาพแป้งเป็นน้ำตาลโดยใช้เชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่ได้จากการฉายรังสียูวีสำหรับการหมักน้ำตาลเป็นสาโทพบว่าเอทานอลเพิ่มขึ้น[24] นอกจากนี้การกลายพันธุ์แบบสุ่มในยีสต์ด้วยสารเคมีหรือการฉายรังสียูวี เป็นวิธีที่นำไปใช้ในการปรับปรุงการผลิตไขมัน[25] การผลิตเอทานอล [26] และการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์[27] อีกด้วย ในงานวิจัยครั้งนี้พบว่าการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการฉายรังสียูวีหลังการฉายรังสีเป็นเวลา 30 นาทีจำนวนอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 10% และเมื่อฉายรังสีเป็นเวลา 60 วินาที อัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 3% และที่ 120 วินาที อัตราการรอดชีวิตลดลงเหลือ 0.02% จากรายงานผลการทดลองการกลายพันธุ์ *W. anomalus* HH16 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกลีเซอรอล แสดงให้เห็นว่าเมื่อ

ระยะเวลาการฉายรังสีเพิ่มขึ้นส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตลดลงเท่ากับ 12% ในการฉายรังสีเป็นเวลา 5 นาที และเมื่อผ่านไป 10 นาที ลดลงเท่ากับ 5% และที่ 15 และ 20 นาที ไม่พบโคโลนีเชื้อ[21] และอีกหนึ่งงานวิจัยที่อธิบายศึกษาการกลายพันธุ์เชื้อ *Bacillus subtilis* ด้วยการฉายรังสียูวีและการใช้สารเคมีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต เอนไซม์ β-glucosidase โดยคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่คุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ β -glucosidase บนอาหารที่มีส่วนประกอบของ X-glucoside จากความเข้มสีและขนาดของโคโลนี พบว่าจากการคัดเลือกปฐมภูมิการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการฉายรังสียูวีได้เชื้อสายพันธุ์กลาย 3 สายพันธุ์ วิธีการใช้สารเคมี 8 สายพันธุ์ และวิธีการใช้สารเคมีร่วมกับการฉายรังสียูวี 9 สายพันธุ์ จากนั้นศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ β -glucosidase มีเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมเพียง 3 สายพันธุ์เท่านั้น ได้แก่ PS-UM1,PS-CM5 และ PS-CM5-UM3 [28]

การกลายพันธุ์แบบชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Induced Mutation) เป็นวิธีการกลายพันธุ์ที่ง่ายและมีประสิทธิภาพมากที่สุด การกลายพันธุ์ด้วยวิธีการฉายรังสียูวีและการใช้สารเคมี EMS สามารถเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมได้ ซึ่งสำคัญต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิต ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตดั้งเดิมกลายเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ การฉายรังสียูวีพบว่า รังสีประเภทนี้มักทำให้เบสไทมีนจับกันเองเป็นไทมีนไดเมอร์ ทำให้โครงสร้างดีเอ็นเอผิดปกติ ส่งผลให้กระบวนการจำลองสายดีเอ็นเอเกิดความผิดพลาด และเกิดการกลายพันธุ์แบบ frameshift หรือ point mutation โดยการใช้สารเคมี EMS อยู่ในกลุ่ม alkylating agents ซึ่งสารกลุ่มนี้จะเข้าไปเติมหมู่ methyl หรือ ethyl ให้กับเบส ทำให้การจับคู่เบสผิดปกติไป เมื่อโครงสร้างของโมเลกุลเปลี่ยนแปลง ทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสแบบ transition ดังนั้นการใช้สาร EMS จึงถูกนำมาใช้เป็นสารก่อกลายพันธุ์ทางเคมีที่ใช้บ่อยที่สุดในการทดลองการกลายพันธุ์ ในการศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ของยีสต์ในงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการฉายรังสียูวีและการใช้สารเคมี EMS เนื่องจากไม่จัดอยู่ในประเภทจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรม (Genetically Modified Microorganism, GMM) การกลายพันธุ์ทั้งสองวิธีนี้สามารถควบคุมและจัดการได้ง่ายในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน มีรายงานมากมายเกี่ยวกับการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการฉายรังสียูวีและการใช้สารเคมี EMS เพื่อปรับปรุงการผลิตผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม แต่ยังไม่มีไม่มีรายงานการกลายพันธุ์ยีสต์เพื่อผลิตเป็นหัวเชื้อสำหรับการหมักกาแฟอะราบิกา

การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายเพื่อเป็นหัวเชื้อพบว่าลักษณะโคโลนี มีลักษณะแตกต่างกันเล็กน้อยโดยส่วนใหญ่พบว่า โคโลนีขนาดกลาง สีครีม เนื้อสัมผัสเรียบ รูปทรงกลม ลักษณะโค้งนูนเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวหน้าขรุขระ ยกเว้น UV22-2 UV22-3 และ UV32-1 ที่มี

ผิวหน้าเรียบ และลักษณะสัณฐานวิทยาเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย มีลักษณะทรงรี มีการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาการวัดการเจริญในอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ YMB, pectin broth และ mucilage broth การเจริญของเชื้อในอาหาร YMB พบว่า UV22-2 และ UV22-3 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 0.59 ต่อชั่วโมง ในอาหาร pectin broth สายพันธุ์ UV41-1 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 0.57 ต่อชั่วโมง และ mucilage broth สายพันธุ์ UV22-2 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 0.49 ต่อชั่วโมง การเจริญของเชื้อแตกต่างกันเพราะแต่ละอาหารมีองค์ประกอบแตกต่างกัน อาหาร YM มี yeast extract และ malt extract ที่เซลล์นำไปใช้ได้ง่าย ทำให้เชื้อเจริญได้อย่างรวดเร็ว ในขณะที่อาหาร pectin broth เชื้อจำเป็นต้องสร้างเอนไซม์มาย่อยสลายองค์ประกอบของเพกตินก่อนนำไปใช้ และในอาหาร mucilage broth มีน้ำตาลที่จุลินทรีย์ใช้ได้ง่ายไม่มากนัก จึงจำเป็นต้องสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยเช่นกัน มีการรายงานว่าในกาแฟเชอรี่มีสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์หลากหลายชนิด ดั้งนั้นการเจริญในอาหาร mucilage broth เป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญในคัดเลือกเชื้อในขั้นปฐมภูมิสำหรับใช้ในกระบวนการหมักกาแฟ [22]

ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์เพกติเนสบนอาหารพบว่าค่าร้อยละดัชนีการย่อยสลายเพกตินของ UV22-2 มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 50.2% และเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายอื่นๆมีค่า %PDI อยู่ในช่วง 33.0 – 49.1% ซึ่งค่า%PDI ของสายพันธุ์กลายทั้งหมดสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ พบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายทุกสายพันธุ์มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ ของเอนไซม์เซลลูเลสและอะไมเลส ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่กิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพกติเนสแสดงให้เห็นว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายทั้ง 6 สายพันธุ์ มีค่าสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ โดย UV32-1 มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 415.88 U/mL เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมมีค่าเท่ากับ 282.01 U/mL

การคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุกลายในการศึกษานี้ คัดเลือกจากความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพกติเนส โดยชั้นเมือกของเมล็ดกาแฟที่ปลอกเปลือกแล้ว ประกอบด้วยน้ำ 84.2% โปรตีน 8.9% น้ำตาล 4.1% เพกติน 0.91% และเถ้า 0.7%[29] และจากการการวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มเติมพบว่าส่วนประกอบที่ไม่ละลายน้ำประกอบด้วยเพกติน 30% เซลลูโลส 8% และ non-cellulosic polysaccharides 18% ซึ่งประกอบด้วยโมโนแซ็กคาไรด์ เช่น อะราบิโนส ไซโลส กาแลคโตส และน้ำตาลเชิงเดี่ยวอื่นๆ[30] โดยสารตั้งต้นของการเกิดกลิ่นที่สำคัญคือ น้ำตาล โปรตีน กรดอะมิโน และสารประกอบฟีนอล ซึ่งมีอยู่ในสารกาแฟและมีบทบาทในการสร้างกลิ่นของ

กาแฟ การย่อยสลายเมือกโดยการใช้จุลินทรีย์ในการหมักแบบเปียกทำให้เกิดเอนไซม์ออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายเมือก เช่น เพคติเนส โปรตีเอส และเซลลูเลส [31] โดยเอนไซม์ที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักกาแฟได้ คือ polygalacturonase (PG), pectin lyase (PL) และ pectin methylesterase (PME)[3] โดยทั้งสามเอนไซม์มีความสามารถในการย่อยเพกตินให้เป็น galacturonic acid ในงานวิจัย ปี 2022 ใช้เชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพกติเนสการเจริญได้ดีในอาหาร mucilage broth และ ความสามารถในการใช้น้ำตาลหลากหลายชนิดผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการหมักกาแฟอะราบิกา แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ YWP1-3 มีคะแนนการชิมสูง[22] และมีการรายงานว่า *Wickerhamomyces anomalus* KNU18Y3 ที่แยกได้จากกระบวนการหมักกาแฟแบบเปียก และมีความสามรถในการผลิตเอนไซมสูง โดยประกอบไปด้วยเอนไซม์ polygalacturonase และ pectin lyase[3]

ในการทดสอบการวัดเอนไซม์ เซลลูเลส อะไมเลส และ เพกติเนส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mucilage broth จากผลการทดลองพบว่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากในเมือกกาแฟประกอบไปด้วยเซลลูโลสในปริมาณน้อยมาก ส่งผลให้การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ mucilage broth ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ[30] โดยเซลลูเลสเป็นเอนไซม์ทำหน้าที่ทำลายพันธะโมเลกุลของเซลลูโลสและได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว หรือ simple sugars เช่น เบต้า-กลูโคส หรือ พอลีแซคคาไรด์สายสั้นและ โอลิโกแซคคาไรด์[32] นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสียูวีและการใช้สารเคมีไม่ได้ส่งผลต่อนิวคลีโอไทด์ของ encode ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส การกลายพันธุ์ตำแหน่งที่ตรงกันและหยุดการกลายพันธุ์อาจส่งผลให้มีการผลิตเอนไซม์เท่ากัน แต่ UV41-1 และUV32-1 แสดงกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม สำหรับเอนไซม์เพกติเนสจากผลการทดลองพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 300-400 U/mL โดยสายพันธุ์กลาย UV32-1 มีกิจกรรมของเอนไซม์เพกติเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อ mucilage broth สูงที่สุดเท่ากับ 415.88 U/mL ซึ่งจากความสามารถในการผลิตเอนไซม์สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า เชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย JU-A10-T สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงกว่า wild type สายพันธุ์ 114-2 ปริมาณ 9 เท่า เอนไซม์ไซลาเนสได้สูงกว่า 8 เท่า และผลิตโปรตีนได้สูงกว่าถึง 8 เท่าในอาหาร cellulose-wheat bran (CW) medium[33] และจากงานวิจัยในปี 1993 แสดงให้เห็นว่าเชื้อราสายพันธุ์กลาย Aspergillus niger dgrAW99-iii สามารถผลิตเอนไซม์เพกติเนสจากกระบวนการหมักแบบแห้งได้สูงกว่าสายพันธุ์ wild type ถึง 300% [34] และมีการรายงานว่าเชื้อราสายพันธุ์กลาย M03 และ M05

มีขนาดของ pectin degradation zones สูงกว่า wild type จึงถูกเลือกเพื่อใช้สำหรับกระบวนการผลิตเอนไซม์ pectin lyase ในอาหาร liquid medium [35]

จากนั้นเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายทั้ง 6 สาย นำไปผลิตเป็นหัวเชื้อหมักกาแฟ และทำการวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ โดย ค่าพีเอช มีแนวโน้มลดลงโดยเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 4.5-4.9 เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักมีค่าเท่ากับ 4.4-4.2 ค่า TDS มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 118.7-249.0 เมื่อสิ้นสุดมีค่าเท่ากับ 303.2-360.3 และค่าบริกซ์เริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 0.33-0.63 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นถึง 18 ชั่วโมง สูงถึง 0.70-1.17 และลดลงเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักมีค่าเท่ากับ 0.57-0.93 จากงานวิจัยปี 2013 ที่ศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในกระบวนการหมักกาแฟที่เติมโดยพบว่าทุกชุดการทดลองมีการลดลงของค่าพีเอชเล็กน้อย จาก 5.43 ลดลงเหลือ 4.71 เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก โดยการลดลงของค่าพีเอชเนื่องจากการย่อยเมือกกาแฟของจุลินทรีย์ และได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งทำให้จุลินทรีย์เกิดการผลิตกรดในกระบวนการหมัก[36] Total dissolved solids คือ ปริมาณของแข็ง สารอนินทรีย์และอินทรีย์ทั้งหมดที่ละลายอยู่ในน้ำ โดยค่า TDS สามารถแสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เป็นของแข็งที่สารละลายได้ ดังนั้นค่า TDS จะแปรผันใกล้เคียงกับปริมาณของน้ำตาลที่อยู่ในน้ำหมักกาแฟ จากการศึกษาเกี่ยวกับการนำเมล็ดกาแฟแช่ในน้ำที่มีเอนไซม์เพกติเนสเป็นส่วนประกอบพบว่าหลังจากแช่เป็นเวลา 4 ชั่วโมง มีค่า TDS เพิ่มขึ้น เนื่องจากเอนไซม์เพกติเนสย่อยสลายเมือกกาแฟได้ galacturonic acid และเกิดน้ำตาลธรรมชาติหลายชนิด เช่น กาแลคโตส อะราบิโนส และไซโลส ดังนั้นการย่อยเพกตินสามารถเพิ่มปริมาณของ Total dissolved solids ในกระบวนการหมักกาแฟ[37] การลดลงของค่าบริกซ์สามารถอธิบายถึงปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักและจุลินทรีย์มีบทบาทในการใช้น้ำตาล เนื่องจากมีการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโต โดยการลดลงของน้ำตาลระหว่างการหมักจะมาพร้อมกับการสะสมของกรด เช่น กรดแลกติก กรดอะซิติก และกรดซัคซินิก[38]

จากการทดลองการหมักเมล็ดกาแฟร่วมกับหัวเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายทั้ง 6 สายพันธุ์ ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักกาแฟเพื่อนับจำนวนเชื้อก่อนและหลังกระบวนการหมัก โดยทำการนับเชื้อจุลินทรีย์รวมทั้งหมดบนอาหาร PCA นับจำนวนเชื้อยีสต์บนอาหาร YMA และนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร MRS agar โดยใช้วิธีการ serial dilution และ drop-plating ในการนับจำนวนเชื้อโดยบ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากการวัดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์รวมทั้งหมดในระหว่างกระบวนการหมักกาแฟพบว่าการทดลองควบคุม และสภาวะที่มีการเติมหัวเชื้อยีสต์ UV22-2, UV22-3 และ 41-1 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก จากการวิจัย

ก่อนหน้านี้พบว่าแบคทีเรีย เช่น Enterobacteriaceae และ LAB บางชนิดได้รับการระบุว่าเป็น pectinolytic bacteria ซึ่งมีอยู่ทั่วไปตลอดกระบวนการหมัก[11]

ผลการทดลองการนับจำนวนเชื้อยีสต์เริ่มต้นของการทดลองที่เติมหัวเชื้อพบว่ามีจำนวนเชื้อยีสต์สูงขึ้นเท่ากับ 6.06-6.82 CFU/ mL และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักทุกชุดการทดลองของที่มีการเติมหัวเชื้อยีสต์มีจำนวนใกล้เคียงเมื่อเทียบกับก่อนหมัก แต่ชุดการทดลองควบคุม ก่อนหมักมีจำนวนเชื้อเท่ากับ 4.31 log CFU/mL และหลังหมักมีจำนวนเพิ่มขึ้นเท่ากับ 6.73 CFU/mL ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ การใช้ *W. anomalus* YWP1-3 ในกระบวกการหมักกาแฟเพิ่มปริมาณของจำนวนเชื้อยีสต์ประมาณ 1 log CFU/mL[23] นอกจากนี้งานวิจัยการใช้เชื้อยีสต์ 6 สายพันธุ์ในกระบวนการหมักกาแฟ พบว่าก่อนหมักมีจำนวนประชากรของยีสต์ประมาณ 4 log CFU/g และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักเป็นเวลา 36 ชั่วโมงเพิ่มขึ้นเท่ากับ 5.5 log CFU/g [39] จากการรายงานการเพิ่มขึ้นของ pectinolytic yeasts ได้แก่ *S. cerevisiae* KNU18Y13 เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักเพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 8.23 log CFU/mL เมื่อหมักเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ยีสต์ที่พบในกระบวนการหมักสามารถปรับตัวและอยู่รอดได้ในสภาพแวดล้อมที่รุนแรงที่ เช่น สภาวะที่เป็น hypertonic ความร้อนที่ค่อนข้างสูง ค่า pH ต่ำ และการสะสมของกรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์[5]

จำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกหลังจากการหมักพบว่าการทดลองที่เติมหัวเชื้อยีสต์หมักร่วมด้วยมีปริมาณเชื้อลดลง ยกเว้นการทดลองควบคุมมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกก่อนและหลังกระบวนการหมักไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการเติมหัวเชื้อยีสต์เข้าไปในกระบวนการหมักส่งผลต่อจำนวนประชากรของแบคทีเรียกรดแลคติกส่งผลให้จำนวนเชื้อลงลด

จากการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณน้ำตาลในน้ำหมักเมล็ดกาแฟ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาล 3 ชนิด ได้แก่ ฟรุกโตส กลูโคส และอะราบิโนส โดยปกตินำ้ตาลที่พบในเมือกกาแฟ ได้แก่ มอลโตส ฟรุตโตส อะราบิโนส แลคโตส แรมโนส กลูโคส ไซโลส กาแลกโตส และซูโคส ในปี 2015 มีการรายงานว่าเมือกจากการวิเคราะห์กาแฟอะราบิกา พบว่ามีน้ำตาลกลูโคส 35.65 (g/L) กาแลตโตส 36.67 (g/L) และแลคโตส 1.06 (g/L)[7] นอกจากนี้ยังมีการรายงานน้ำตาลในเมือกกาแฟจากประเทศแมกซิโก พบน้ำตาลแรมโนส 6% ฟรุตโตส 1.3% อะราบิโนส 52.5% ไซโลส 8.9% แมนโนส 0.8% กาแลคโตส 19.7% และกลูโคส 7.8%[8] ความสามารถในการใช้น้ำตาลเป็นอีกหนึ่งคุณสมบัติของเชื้อการคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายสำหรับผลิตหัวเชื้อหมักกาแฟที่มีประสิทธิภาพ เคยมีการรายงานว่าความสามารถในการใช้น้ำตาลของยีสต์ที่ใช้สำหรับหมักกาแฟนั้นเป็นปัจจัยสำคัญในการคัดเลือกเชื้อเพื่อใช้สำหรับหมักกาแฟ[22]

จากรายงานก่อนหน้านี้นำหัวเชื้อ YWP1-3 ถูกนำไปหมักเมล็ดกาแฟอะราบิกาปริมาณ 7 กิโลกรัม และผลการทดสอบการชิมมีคะแนนเท่ากับ 79.7 ให้กลิ่น พริกไทย ถั่ว สมุนไพร น้ำหอม กุหลาบ ดอกไม้ คาราเมล พริกหยวก ถั่วฝักยาว กลิ่นคั่ว ส้ม และแอปเปิลเขียว[23] ซึ่งมีคะแนนและผลการประเมินกลิ่นใกล้เคียงกับผลการทดลองของงานวิจัยครั้งนี้ โดยมีคะแนนเท่ากับ 80.25 คะแนน ให้กลิ่น ดอกไม้ วานิลลา คาราเมล มอลต์ โกโก้ พรุน น้ำผึ้ง ช็อคโกแลต แอปเปิลแดง และจากผลการวิเคราะห์ volatile compound ด้วยเครื่อง HS-SPME ที่เชื่อมต่อกับ GC-MS ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่วที่หมักร่วมกับหัวเชื้อยีสต์ พบว่า volatile compound profile และการจำแนกสารของตัวอย่างทั้งหมดมีความคล้ายคลึงกัน โดย volatile compound ที่ตรวจพบในเปอร์เซ็นต์พื้นที่รวมของ furan ในตัวอย่าง UV22-2 สูงกว่าชุดควบคุม และกาแฟคั่วเชิงพาณิชย์ furfuryl alcohol และ furfuryl acetate รสชาติที่มีลักษณะเฉพาะของ furfuryl alcohol และ furfuryl acetate เป็นที่รู้จักกันในรสหวาน กลิ่นผลไม้ กลิ่นคล้ายคาราเมล และรสคั่ว[40] ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบประสาทสัมผัสของ Q-Arabica grader ในการศึกษาครั้งนี้ โดยพบว่าในตัวอย่างของ UV22-2 มีกลิ่นหอมหวาน ผลไม้ และคล้ายคาราเมล จึงอาจเป็นไปได้ว่าเกิดจากอนุพันธ์ของ furan เหล่านี้ในการช่วยเพิ่มกลิ่น อีกทั้งยังพบ Pyrazines เป็น volatile compound อันดับสองที่พบได้ในตัวอย่างกาแฟทุกตัวอย่าง โดย Alkylpyrazines พบในตัวอย่างกาแฟของการทดลองควบคุมและกาแฟเชิงพาณิชย์มีปริมาณสูงที่สุด ซึ่งมีส่วนทำให้เกิดกลิ่นโกโก้ กลิ่นถั่ว และกลิ่นคั่ว [41] ในการศึกษาปี 2006 ยังตรวจพบ ketones ในกาแฟคั่วทุกชุดการทดลอง ซึ่งให้รสชาติคล้ายเนยและคาราเมล[42] จากตัวอย่างที่มีการเติมหัวเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมพบว่ามีปริมาณ ketones สูงสุด (4.06%) เช่น 1-acetyloxy-2-butanone และ 2,3-butanedione ซึ่งมีส่วนทำให้เกิดกลิ่นเนยและมีกลิ่นหอมคล้ายคาราเมลมากกว่าตัวอย่างอื่นๆ และยังพบ volatile compounds อื่นๆ ได้แก่ pyrroles aldehydes acetic acid และ pyridine ในทุกตัวอย่าง โดนสารประกอบเหล่านี้พบในปริมาณน้อย จึงอาจไม่ส่งผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่อกลิ่นและรสชาติของกาแฟ

จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอนเอทั้งหมดของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย UV22-2 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมพบว่า มียีนหลายตำแหน่งที่เปลี่ยนแปลงไป ยกตัวอย่างเช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ sucrase-isomaltase, lysosomal alpha-glucosidase, cellulase family A และ α-amylase ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวมีความสำคัญเป็นอย่างมากเกี่ยวกับการย่อยสลายองค์ประกอบของเมือกกาแฟ เช่น เพกติน คาร์โบไฮเดรต แป้ง และน้ำตาลชนิดต่างๆ จากงานวิจัยในปี 2020 ได้ศึกษาเกี่ยวกับการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสียูวีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพเอนไซม์ endoglucanase ของ *Bacillus amyloliquefaciens* SS35 จากผลการศึกษาพบว่า บริเวณยีน*Ba*GH5 ซึ่งเกี่ยวข้อง

กับการผลิตเอนไซม์ endoglucanases ของสายพันธุ์กลาย UV2 เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์แบบ single transition mutation จากเบสอะดีนีนถูกแทนที่ด้วยเบสกวานีน และส่งผลให้โคดอน GAC เปลี่ยนเป็น GGC จากกรดอะมิโนแอสปาร์ติกเปลี่ยนเป็นไกลซีน โดยการแทนที่ไกลซีนช่วยเพิ่มเสถียรภาพในสภาวะที่ค่าพีเอชอยู่ในช่วงที่เป็นกรด และยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เนื่องจากไกลซีนเป็นกรดอะมิโนที่บริเวณ side chain ไม่มีขั้ว[43] นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า การฉายรังสียูวีและการใช้สารเคมี EMS ในการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ α-amylase ผลการศึกษาพบว่า gene copy number เพิ่มขึ้นและส่งผลต่อการแสดงออกของยีน[44]

W. anomalus YWP1-3 ถูกนำมาใช้เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมสำหรับการกลายพันธุ์ในการศึกษาครั้งนี้ จากการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการฉายรังสียูวี และการใช้สารเคมี คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพกติเนสได้ทั้งหมดจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ UV22-2 UV22-3 UV41-1 UV32-1 UV49-2 และ EMS146 จากการศึกษาคุณสมบัติของหัวเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการหมักกาแฟ พบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย UV22-3 UV22-2 และ UV32-1 มีลักษณะโคโลนีต่างจากสายพันธุ์อื่นๆ คือผิวหน้าโคโลนีเรียบ และค่าดัชนีการย่อยเพกติเนสบนอาหาร pectin agar แสดงให้เห็นว่า UV22-2 มีค่าสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม และสูงที่สุดโดยค่าเท่ากับ 50.2% จากนั้นนำไปศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เพกติเนสพบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายทุกสายพันธุ์มีกิจกรรมเอนไซม์เพกติเนสสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม โดย UV32-1 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 415.88 U/ml แต่กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลสมีค่าใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ผลการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลสรุปได้ว่าสายพันธุ์ UV22-2 สามารถใช้น้ำได้ทั้ง 10 ชนิด โดยเฉพาะน้ำตาลอะราบิโนส แลคโตส แรมโนส ไซโลส และกาแลคโตส ที่มีค่าการเจริญสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมและเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ UV22-2 เหมาะสำหรับการผลิตเป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักกาแฟเนื่องจากค่า %PDI ที่สูงและกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 332.32 U/mL รวมถึงความสามารถในการใช้น้ำตาลได้หลายชนิดจึงถูกนำผลิตหัวเชื้อเพื่อใช้ในกระบวนการหมัก ผลจากการวิเคราะห์สาร volatile compound ในเมล็ดกาแฟคั่ว การประเมินรสชาติทางประสาทสัมผัสพบว่า ยีสต์สายพันธุ์กลาย UV22-2 จากผลการทดสอบพบว่ามีคะแนนการชิมสูงที่สุดเท่ากับ 83.5 คะแนน และมีกลิ่น ถั่ว แอปเปิลเขียว สับปะรด คาราเมล แอปเปิลไซเดอร์ ดอกไม้สีเหลือง น้ำผึ้ง ซึ่งตรงกับผลการทดสอบการวิเคราะห์ volatile compound พบสารกลุ่ม furan ได้แก่ furfuryl alcohol และ furfuryl acetate สูงกว่าตัวอย่างกาแฟคั่วจากการทดสอบควบคุม และกาแฟเชิงพาณิชย์ โดยสารดังกล่าวเป็นที่รู้จักกันใน

รสหวาน กลิ่นผลไม้ กลิ่นคล้ายคาราเมล และรสคั่ว และผลจากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอทั้งหมดของยีสต์สายพันธุ์กลาย UV22-2 พบว่ามีกลายพันธุ์หลายตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ เช่น sucrase-isomaltase, lysosomal alpha-glucosidase, Cellulase family A และ α-amylase เป็นต้น ดังนั้น UV22-2 จึงเหมาะสำหรับการผลิตเป็นหัวเชื้อหมักสำหรับกาแฟที่มีประสิทธิภาพในด้านการเพิ่มคุณภาพทางด้านกลิ่นและรสชาติของกาแฟได้

บรรณานุกรม

1. Iriondo-DeHond A, Iriondo-DeHond M, Del Castillo MD. Applications of compounds from coffee processing by-products. Biomolecules. 2020;10(9):1219.

2. Klingel T, Kremer JI, Gottstein V, Rajcic de Rezende T, Schwarz S, Lachenmeier DW. A review of coffee by-products including leaf, flower, cherry, husk, silver skin, and spent grounds as novel foods within the European Union. Foods. 2020;9(5):665.

3. Haile M, Kang WH. Isolation, identification, and characterization of pectinolytic yeasts for starter culture in coffee fermentation. Microorganisms. 2019;7(10):401.

4. Tai E-S, Hsieh P-C, Sheu S-C. Effect of polygalacturonase and feruloyl esterase from Aspergillus tubingensis on demucilage and quality of coffee beans. Process Biochemistry. 2014;49(8):1274-80.

5. de Melo Pereira GV, Soccol VT, Pandey A, Medeiros ABP, Lara JMRA, Gollo AL, et al. Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. International journal of food microbiology. 2014;188:60-6.

6. Avallone S, Guyot B, Brillouet J-M, Olguin E, Guiraud J-P. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. Current microbiology. 2001;42(4):252-6.

7. Pérez-Sariñana BY, De León-Rodriguez A, Saldaña-Trinidad S, Joseph SP. Optimization of bioethanol production from coffee mucilage. BioResources. 2015;10(3):4326-38.

8. Avallone S, Guiraud JP, Guyot B, Olguin E, Brillouet JM. Polysaccharide constituents of coffee - bean Mucilage. Journal of food science. 2000;65(8):1308-11.

9. Oumer OJ, Abate D. Screening and molecular identification of pectinase producing microbes from coffee pulp. BioMed research international. 2018;2018.

10. Evangelista SR, Silva CF, da Cruz Miguel MGP, de Souza Cordeiro C, Pinheiro ACM, Duarte WF, et al. Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. Food Research International. 2014;61:183-95.

11. Nasanit R, Satayawut K. Microbiological study during coffee fermentation of Coffea arabica var. chiangmai 80 in Thailand. Agriculture and Natural Resources. 2015;49(1):32-41.

12. Marcone MF. Composition and properties of Indonesian palm civet coffee (Kopi Luwak) and Ethiopian civet coffee. Food Research International. 2004;37(9):901-12.

13. Ahmad R, Magan N. Microfloral contamination and hydrolytic enzyme differences between monsooned and non - monsooned coffees. Letters in Applied Microbiology. 2002;34(4):279-82.

14. Duboc P, Milo C. European Patent No. EP 1527695A1. Munich, Germany: European Patent Office; 2003.

15. Pei-Jung Li C-CL, Chao-Hsiang Li, inventorMethod for manufacturing coffee by solid state fermentation. U.S.2010.

16. Wang C, Sun J, Lassabliere B, Yu B, Liu SQ. Coffee flavour modification through controlled fermentation of green coffee beans by Saccharomyces

cerevisiae and Pichia kluyveri: Part II. Mixed cultures with or without lactic acid bacteria. Food Research International. 2020;136:109452.

17. Martins PMM, Batista NN, Miguel MGdCP, Simão JBP, Soares JR, Schwan RF. Coffee growing altitude influences the microbiota, chemical compounds and the quality of fermented coffees. Food Research International. 2020;129:108872.

18. Veloso TGR, da Silva MdCS, Cardoso WS, Guarçoni RC, Kasuya MCM, Pereira LL. Effects of environmental factors on microbiota of fruits and soil of Coffea arabica in Brazil. Scientific reports. 2020;10(1):1-11.

19. Bressani APP, Martinez SJ, Batista NN, Simão JBP, Dias DR, Schwan RF. Co-inoculation of yeasts starters: A strategy to improve quality of low altitude Arabica coffee. Food Chemistry. 2021;361:130133.

20. Oumer OJ, Abate D. Characterization of pectinase from Bacillus subtilis strain Btk 27 and its potential application in removal of mucilage from coffee beans. Enzyme research. 2017;2017.

21. Hawary H, Rasmey A-HM, Aboseidah AA, El-Morsi E-S, Hafez M. Enhancement of glycerol production by UV-mutagenesis of the marine yeast Wickerhamomyces anomalus HH16: kinetics and optimization of the fermentation process. 3 Biotech. 2019;9(12):1-14.

22. Krajangsang S, Seephin P, Tantayotai P, Mahingsapun R, Meeampun Y, Panyachanakul T, et al. New approach for screening of microorganisms from Arabica coffee processing for their ability to improve Arabica coffee flavor. 3 Biotech. 2022;12(7):143.

23. Mahingsapun R, Tantayotai P, Panyachanakul T, Samosorn S, Dolsophon K, Jiamjariyatam R, et al. Enhancement of Arabica coffee quality with selected

potential microbial starter culture under controlled fermentation in wet process. Food Bioscience. 2022;48:101819.

24. Revin V, Atykyan N, Lyovina E, Dragunova Y, Ushkina V. Effect of ultraviolet radiation on physiological and biochemical properties of yeast Saccharomyces cerevisiae during fermentation of ultradispersed starch raw material. Electronic Journal of Biotechnology. 2018;31:61-6.

25. Tapia V E, Anschau A, Coradini AL, T Franco T, Deckmann AC. Optimization of lipid production by the oleaginous yeast Lipomyces starkeyi by random mutagenesis coupled to cerulenin screening. AMB express. 2012;2(1):1-8.

26. Watanabe T, Watanabe I, Yamamoto M, Ando A, Nakamura T. A UV-induced mutant of Pichia stipitis with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance. Bioresource technology. 2011;102(2):1844-8.

27. Zhang G, Lin Y, Qi X, Wang L, He P, Wang Q, et al. Genome shuffling of the nonconventional yeast Pichia anomala for improved sugar alcohol production. Microbial Cell Factories. 2015;14(1):1-10.

28. Agrawal R, Satlewal A, Verma AK. Development of a β -glucosidase hyperproducing mutant by combined chemical and UV mutagenesis. 3 Biotech. 2013;3:381-8.

29. Belitz H-D, Grosch W, Schieberle P. Coffee, tea, cocoa. Food chemistry. 2009:938-70.

30. Lee LW, Cheong MW, Curran P, Yu B, Liu SQ. Coffee fermentation and flavor–An intricate and delicate relationship. Food chemistry. 2015;185:182-91.

31. Elhalis H, Cox J, Zhao J. Coffee fermentation: Expedition from traditional to controlled process and perspectives for industrialization. Applied Food Research. 2022:100253.

32. Ohishi T, Fukutomi R, Shoji Y, Goto S, Isemura M. The beneficial effects of principal polyphenols from green tea, coffee, wine, and curry on obesity. Molecules. 2021;26(2):453.

33. Cheong MW, Tong KH, Ong JJM, Liu SQ, Curran P, Yu B. Volatile composition and antioxidant capacity of Arabica coffee. Food Research International. 2013;51(1):388-96.

34. Agate A, Bhat J. Role of pectinolytic yeasts in the degradation of mucilage layer of Coffea robusta cherries. Applied microbiology. 1966;14(2):256-60.

35. Lima JO, Pereira JF, Araújo EFd, Queiroz MVd. Pectin lyase overproduction by Penicillium griseoroseum mutants resistant to catabolite repression. brazilian journal of microbiology. 2017;48:602-6.

36. Velmourougane K. Impact of natural fermentation on physicochemical, microbiological and cup quality characteristics of Arabica and Robusta coffee. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences. 2013;83:233-9.

37. Tawali A, Laga A, editors. The effect of soaking time on mucilage removal from the coffee bean using pectinase enzyme. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science; 2021: IOP Publishing.

38. Elhalis H, Cox J, Frank D, Zhao J. The crucial role of yeasts in the wet fermentation of coffee beans and quality. International Journal of Food Microbiology. 2020;333:108796.

39. Elhalis H, Cox J, Frank D, Zhao J. Microbiological and biochemical performances of six yeast species as potential starter cultures for wet fermentation of coffee beans. LWT. 2021;137:110430.

40. Flament I. Coffee flavor chemistry: John Wiley & Sons; 2001.

41. Zakidou P, Plati F, Matsakidou A, Varka E-M, Blekas G, Paraskevopoulou A. Single origin coffee aroma: From optimized flavor protocols and coffee customization to instrumental volatile characterization and chemometrics. Molecules. 2021;26(15):4609.

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

43. Singh S, Dhillon A, Goyal A. Enhanced catalytic efficiency of Bacillus amyloliquefaciens SS35 endoglucanase by ultraviolet directed evolution and mutation analysis. Renewable Energy. 2020;151:1124-33.

44. Shafique S, Bajwa R, Shafique S. Mutation of Alternaria tenuissima FCBP-252 for hyper-active-amylase. 2009.

ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast malt broth (YMB)

yeast extract	3 กรัม
malt extract	3 กรัม
peptone	5 กรัม
glucose	10 กรัม

ทำการปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกรองจนครบปริมาตร 1 ลิตร และละลายส่วนผสมทั้งหมดจนเข้ากัน จากนั้นนำนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะเวลา 15 นาที

2. Yeast malt agar (YMA)

yeast extract	3 กรัม
malt extract	3 กรัม
peptone	5 กรัม
glucose	10 กรัม
agar	15 กรัม

ทำการปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกรองจนครบปริมาตร 1 ลิตร และละลายส่วนผสมทั้งหมดจนเข้ากัน จากนั้นนำนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะเวลา 15 นาที

3. Pectin broth

$NaNO_3$	1 กรัม
KCl	1 กรัม
K_2HPO_4	1 กรัม
$MgSO_4$	0.5 กรัม
Yeast extract	0.5 กรัม
Citrus pectin	10 กรัม

ทำการปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกรองจนครบปริมาตร 1 ลิตร และละลายส่วนผสมทั้งหมดจนเข้ากัน จากนั้นนำนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะเวลา 15 นาที

4. Pectin agar

$NaNO_3$	1 กรัม
KCl	1 กรัม
K_2HPO_4	1 กรัม
$MgSO_4$	0.5 กรัม
Yeast extract	0.5 กรัม
Citrus pectin	10 กรัม
Agar	15 กรัม

ทำการปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกรองจนครบปริมาตร 1 ลิตร และละลายส่วนผสมทั้งหมดจนเข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะเวลา 15 นาที

5. Mucilage broth

นำน้ำจากการล้างเมือกเมล็ดกาแฟหลังจากการปลอกเปลือกกรองผ่านผ้าขาวบาง และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะเวลา 15 นาที

6. Nitrogen yeast base media

6.1สำหรับเตรียมหัวเชื้อ

Nitrogen yeast base	0.67 กรัม
Glucose	0.1 กรัม
Distilled water	100 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประผสมทั้งหมดจนเข้ากัน และทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการกรองผ่านจุกกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

6.2 สำหรับทำการทดสอบ

Nitrogen yeast base	0.67 กรัม
Sugars	0.5 กรัม
Distilled water	100 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประผสมทั้งหมดจนเข้ากัน และทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการกรองผ่านจุกกรองที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 0.22 ไมโครเมตร

7. Plate count agar

อาหารสำเร็จรูป Plate count agar 23.5 กรัม

ทำการปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกรองจนครบปริมาตร 1 ลิตร และละลายส่วนผสมทั้งหมดจนเข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะเวลา 15 นาที

8. MRS agar medium

อาหารสำเร็จรูป Lactobacillus MRS broth	55.5 กรัม
$CaCO_3$	10 กรัม
Agar	15 กรัม

ทำการปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกรองจนครบปริมาตร 1 ลิตร และละลายส่วนผสมทั้งหมดจนเข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1 Gram's iodine solution

Iodine	1 กรัม
Potassium iodide	2 กรัม
Distilled water	300 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดจนเข้ากัน เก็บในขวดสีชาและหลีกเลี่ยงแสง

2. DNS reagent

Potassium tetrahydrate	30 กรัม
dinitrosalicylic acid (DNS)	1 กรัม
2N sodium hydroxide	20 มิลลิลิตร

ทำการละลาย DNS 1 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นค่อยๆทำการเติม Potassium tetrahydrate 30 กรัมกับสารละลาย DNS ที่อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส เมื่อสารละลายเข้ากัน ทำการเติม2N sodium hydroxide 20 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาและหลีกเลี่ยงแสง

3. 0.1M sodium phosphate buffer pH 7

$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	15.487 กรัม
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	5.827 กรัม

ทำการปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกรองจนครบปริมาตร 1 ลิตร และทำการปรับค่าพีเอชสุดท้ายเท่ากับ 7 โดยใช้ HCl และ NaOH

4. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีน ด้วยวิธี Lowry method

เตรียม complex-foming reagent โดย อัตราส่วนของสารละลาย A: B: C เท่า 100: 1: 1 ตามลำดับ

สารละลาย A: 2% (w/v) Na_2CO_3

สารละลาย B: 1% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$

สารละลาย C: 2% (w/v) Potassium sodium tartrate $\bullet 4H_2O$

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	เยาวภา มีอำพันธ์
วัน เดือน ปี เกิด	8 เมษายน 2540
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	- ปี2561 จบการศึกษาในระดับปริญญาตรี สาขาวิชาจุลชีววิทยา หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร - ปี2562 ศึกษาในระดับปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร
ที่อยู่ปัจจุบัน	135/12 อาคาร9 ถ.อาจณรงค์ แขวงคลองเตย เขตคลองเตย กรุงเทพมหานคร รหัสไปรณีย์ 10110
รางวัลที่ได้รับ	จดสิทธิบัตรเชื้อยีสต์ดัดแปลงพันธุกรรม Wickerhamomyces anomalus