การพัฒนากระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้าแบบเปียกโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพ

DEVELOPMENT OF WET FERMENTATION PROCESS OF ARABICA COFFEE USING POTENTIAL MICROBIAL SEED CULTURES

รัตติยากร มะหิงษะพันธุ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2565

การพัฒนากระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้าแบบเปียกโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพ

รัตติยากร มะหิงษะพันธุ์

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

DEVELOPMENT OF WET FERMENTATION PROCESS OF ARABICA COFFEE USING POTENTIAL MICROBIAL SEED CULTURES

RATTIYAKORN MAHINGSAPUN

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

การพัฒนากระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้าแบบเปียกโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพ

ของ

รัตติยากร มะหิงษะพันธุ์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

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

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

..... ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร.วัลลภา หล่อเหลี่ยม)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย)

ชื่อเรื่อง	การพัฒนากระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้าแบบเปียกโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพ
ผู้วิจัย	รัตติยากร มะหิงษะพันธุ์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุขุมาภรณ์ กระจ่างสังข์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. วัลลภา หล่อเหลี่ยม

กาแฟเป็นสินค้าทางการเกษตรที่เป็นที่นิยมและรู้จักทั่วโลกเนื่องจากมีกลิ่นและรสชาติที่แตกต่างกันและมีความน่าสนใจ ซึ่งคุณภาพของกาแฟนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด โดยปกติแล้วกระบวนการผลิตกาแฟมักใช้เชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติซึ่งไม่สามารถควบคุมได้ส่งผลให้มีคุณภาพที่ไม่คงที่ ดังนั้นเพื่อเป็นการแก้ปัญหาดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพที่คัดเลือกได้ในกระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้าแบบเปียกในการเพิ่มคุณภาพด้านกลิ่นรส ศึกษาผลของระยะเวลาการหมักต่อคุณภาพของกาแฟ ซึ่งใช้ ยีสต์ แบคทีเรีย และแบคทีเรียกรดแลคติก ที่คัดเลือกได้นำมาใช้เป็นหัวเชื้อในงานวิจัยนี้ โดยจากงานวิจัยได้ทำการออกแบบการทดลองสภาวะในกระบวนการหมักกาแฟทั้งสิ้น 24 สภาวะ และทำการเปรียบเทียบปัจจัยต่างๆ ก่อนและหลังการหมัก 24 ชั่วโมง ได้แก่ ปริมาณจุลินทรีย์ พีเอช ปริมาณน้ำตาล ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าปัจจัยเหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงตลอดกระบวนการหมัก จากนั้นเมื่อนำเมล็ดกาแฟที่ผ่านการหมักไปทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยผู้เชี่ยวชาญ พบว่ากาแฟที่ผลิตได้จาก 10 สภาวะ มีคุณภาพด้านรสชาติดีขึ้นกว่าสภาวะควบคุมและมีลักษณะเฉพาะด้านกลิ่นรส จากนั้นเมื่อทำการขยายขนาดการหมักกาแฟอะราบิก้าโดยใช้ยีสต์ 4 ชนิด ได้แก่ *Pichia kluyveri* สายพันธุ์ YMP1-1, *Pichia kluyveri* สายพันธุ์ YML1-1, *Pichia kluyveri* สายพันธุ์ YWP1-5 และ *Wickerhamomyces anomalus* สายพันธุ์ YWP1-3 โดยทำการหมักที่ไร่กาแฟ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ พบว่ามีคุณภาพด้านกลิ่นรสที่ดีกว่าสภาวะควบคุม และเมื่อนำเมล็ดกาแฟคั่วไปทำการทดสอบด้วยเทคนิค GC-MS และ 1H NMR พบว่ามีสาระสำคัญที่มีความสัมพันธ์กับรสชาติที่ตรวจสอบได้จากการชิมโดย Q-grader ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นว่าคุณภาพของกาแฟอะราบิก้าสามารถพัฒนาให้ดีขึ้นได้จากการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์พร้อมด้วยกระบวนการหมักที่ผ่านการควบคุม

คำสำคัญ : หัวเชื้อจุลินทรีย์, กระบวนการหมักกาแฟแบบเปียก, รสชาติของกาแฟ, การทดสอบทางประสาทสัมผัส

Title	DEVELOPMENT OF WET FERMENTATION PROCESS OF ARABICA COFFEE USING POTENTIAL MICROBIAL SEED CULTURES
Author	RATTIYAKORN MAHINGSAPUN
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2022
Thesis Advisor	Assistant Professor Dr. Sukhumaporn Krajangsang
Co Advisor	Dr. Wanlapa Lorliam

Coffee is a significant agricultural commodity that is well-known and enjoyed all over the world for its distinct flavor and aroma. The quality of coffee is affected by various parameters. The existing coffee processes, which rely on natural microorganisms, are uncontrollable, resulting in product inconsistency. To overcome this problem, this study aims to investigate the potential use of selected microbial inoculants in wet method processing and the effects of fermentation time and temperature on coffee quality. Selected yeasts, bacteria, and lactic acid bacteria, isolated from the coffee fermentation process, were used as the starter cultures. Twenty-four conditions were set. At the 0 and 24 h of fermentation, total bacterial and yeast counts, as well as pH, were measured and trend to change during fermentation. After fermentation, coffee beans were subjected to sensory evaluation by Quality-Arabica Graders. The results indicated that specific microbial starter culture under controlled conditions successfully improved coffee quality, and 10 of 24 types of coffee beans tested were classified as specialty coffee with distinct cupping characteristics. A scaling up experiment was conducted with a mixture of three strains of Pichia kluyveri and Wickerhamomyces anomalus (condition Y4-04) in Doi Saket District of Chiang Mai, Thailand. According to the flavor profile derived from Q-graders, cupping results were related to the volatile and water-soluble compounds identified by GC-MS and 1H NMR analyses. It suggested that the coffee quality can be improved by using starter cultures and carefully managing fermentation settings.

Keyword : Starter culture, Wet process, Coffee beverage, Sensory analysis

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาตราจารย์ดร. สุขุมาภรณ์ กระจ่างสังค์ ที่ปรึกษาหลัก และอาจารย์ดร. วัลลภา หล่อเลี่ยม ที่ปรึกษาร่วมที่ได้ให้คำปรึกษาและการสนับสนุนในทุกๆด้าน ตลอดจนตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดร.ณัฏฐิกา สุวรรณาศัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดร. ประภากร ตันตโยทัย และรองศาสตารจารย์ดร. พิชาภัค ศรียาภัย ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบเค้าโครงวิทยานิพนธ์ และให้ข้อเสนอแนะเพิ่มเติมสำหรับการแก้ไขและปรับปรุงวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.ฐิติพร ปัญญาชนะกุล ที่ได้ให้คำปรึกษาคำแนะนำต่างๆรวมถึงสอนแนวทางการวิจัยและการวิเคราะห์ผลจากงานวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตารจารย์ ดร. สิริธร สโมสร ที่เสียสละเวลาในการวิเคราะห์ลักษณะของสารประกอบ และสารระเหยในเมล็ดกาแฟจากการวิเคราะห์ทางเคมี

ขอน้อมรำลึกถึงคุณบิดามารดาที่สนับสนุนด้านการศึกษา คอยให้ความรักและกำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมา ขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ที่ให้ความช่วยเหลือทางด้านกำลังใจ และกำลังแรงในการดำเนินการทำวิจัยตลอดมา ขอขอบพระคุณผู้มีพระคุณท่านอื่นๆ ที่มิได้กล่าวนามในที่นี้ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้านจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

รัตติยากร มะหิงษะพันธุ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญรูปภาพ ..... ฐ

บทที่ 1 บทนำ 1

ภูมิหลัง 1

ความมุ่งหมายของงานวิจัย 2

ขอบเขตของงานวิจัย 2

ผลที่ได้รับจากงานวิจัย 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

1.กาแฟ 4

2.องค์ประกอบของเมล็ดกาแฟ 5

2.1 ผิว หรือ เปลือก (skin) 5

2.2 มิวซีเลจ (mucilage) 6

2.3 พาร์ชเมนต์ (parchment) 7

2.4 ซิลเวอร์สกิน (silver skin) 7

2.5 เมล็ดกาแฟ (bean) 7

3.คุณภาพของกาแฟ 8

3.1 กลิ่น (aroma) 8

3.2 รสชาติ (taste) 9
3.3 ความหวาน (sweetness) 10
3.4 ความเปรี้ยว (acidity) 10
3.5 เนื้อสัมผัส (body) 11
3.6 ความคงค้างของกาแฟหลังจากการดื่ม (aftertaste) 11
4.กระบวนการหมักกาแฟ 11
4.1 กระบวนการหมักกาแฟแบบเปียก (wet process) 12
4.2 กระบวนการหมักกาแฟแบบแห้ง (dry process) 13
4.3 กระบวนการหมักกาแฟแบบกึ่งแห้ง (semi-dry process หรือ honey process) 14
5. จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักกาแฟ 15
5.1 ความหลากหลายของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก 15
5.2 การใช้จุลินทรีย์เป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักกาแฟ 16
6. การเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดกาแฟที่ผ่านกระบวนการหมัก 18
7. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในกระบวนการหมักกาแฟ 20
7.1 แหล่งคาร์บอน (Carbon source) 20
7.2 แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source) 21
7.3 แหล่งแร่ธาตุ (Mineral source) 21
บทที่ 3 อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย 23
อุปกรณ์และเครื่องมือ 23
อาหารและสารเคมี 24
วิธีดำเนินการวิจัย 26
1.การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในกระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้า 26
1.1 การเตรียมหัวเชื้อ 27

1.2 การเตรียมเมล็ดกาแฟอะราบิก้า 27
1.3 การออกแบบสภาวะการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟอะราบิก้าแบบเปียก 28
1.4 การเก็บเกี่ยวกาแฟอะราบิก้าหลังจากกระบวนการหมัก 31
1.5 การตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดกาแฟโดยการชิม (Sensory analysis) 31
2. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักกาแฟสายพันธุ์อะราบิก้าในกระบวนการหมักแบบเปียก 33
2.1 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้าแบบเปียก 33
3. การขยายขนาดการหมักเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อะราบิก้า 35
4.การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในระหว่างกระบวนการหมักกาแฟอะราบิกาในกระบวนการหมักแบบเปียกโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ 35
4.1 การวิเคราะห์ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลในตัวอย่างน้ำหมักก่อน-หลังกระบวนการหมัก โดยใช้เทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) 35
4.1.1 การเตรียมตัวอย่าง 35
4.1.2 การวิเคราะห์ 35
4.2 การวิเคราะห์สาร Metabolite ในเมล็ดกาแฟคั่วโดยใช้ Nuclear Magnetic Resonance (NMR) 36
4.2.1 การเตรียมตัวอย่าง 36
4.2.2 การวิเคราะห์ 36
4.3 การวิเคราะห์สารเมทาบอไลต์ในเมล็ดกาแฟคั่วโดยใช้ Gas Chromatography -Mass Spectrometer (GC-MS) 37
4.3.1 การเตรียมตัวอย่าง 37
4.3.2 การวิเคราะห์ 37
5. การศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้าแบบเปียก 37

5.1 การศึกษาจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Microbial plating count) 38
6. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์คัดเลือกที่ใช้เป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้า 38
6.1 การศึกษาผลขององค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ 38
6.1.1 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 39
6.1.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 39
6.1.3 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 39
6.1.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 40
6.2 การศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 40
6.2.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 40
บทที่ 4 ผลการทดลอง 42
1.การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในกระบวนการหมักกาแฟ อะราบิก้า 42
2. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้าแบบเปียก 49
3.การขยายขนาดการหมักเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อะราบิก้า 58
3.1 การขยายขนาดการหมักกาแฟอะราบิก้าที่ไร่กาแฟ อ.ห้วยน้ำดัง จ.แม่ฮ่องสอน 58
3.2 การขยายขนาดการหมักกาแฟอะราบิก้าที่ไร่กาแฟ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ 62
3.3 การวิเคราะห์ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลในตัวอย่างน้ำหมักก่อน-หลังกระบวนการหมัก 65
3. 4 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารละลายในเมล็ดกาแฟคั่ว 68
4.การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์คัดเลือกที่ใช้ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อะราบิกา 69
บทที่ 5 สรุป และอภิปรายผลการทดลอง 75
บรรณานุกรม 80

ภาคผนวก.....86

ภาคผนวก.....87

ประวัติผู้เขียน.....90

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 จุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับเป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักกาแฟ 17

ตาราง 2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย 23

ตาราง 3 อาหารและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 24

ตาราง 4 จุลินทรีย์ทั้งหมดที่คัดแยกคัดเลือกได้จากกระบวนการหมักกาแฟที่ดอยผาตั้ง จังหวัดเชียงรายในปี 2561 26

ตาราง 5 การออกแบบสภาวะในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟอะราบิก้าโดยการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ 28

ตาราง 6 การออกแบบระยะเวลาที่เหมาะสม ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟอะราบิก้าโดยการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ 33

ตาราง 7 ค่าความเป็นกรด-เบสในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟ ก่อน-หลังจากกระบวนการหมัก 44

ตาราง 8 คุณลักษณะทางด้านกลิ่นรสและคะแนนของเมล็ดกาแฟที่ผ่านกระบวนการหมัก โดยการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์และเมล็ดกาแฟที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (Control) 47

ตาราง 9 คำอธิบายคุณลักษณะทางด้านกลิ่นรสและคะแนนของเมล็ดกาแฟที่ผ่านกระบวนการหมัก โดยการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์และเมล็ดกาแฟที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (Control) 58

ตาราง 10 คำอธิบายคุณลักษณะทางด้านกลิ่นรสและคะแนนของเมล็ดกาแฟที่ผ่านกระบวนการหมัก โดยการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์และเมล็ดกาแฟที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ ณ ไร่กาแฟ อ.ห้วยน้ำดัง จ.แม่ฮ่องสอน โดยใช้กาแฟเชอรี่ 70 กิโลกรัม 61

ตาราง 11 คุณลักษณะทางด้านกลิ่นรสและคะแนนของเมล็ดกาแฟที่ผ่านกระบวนการหมัก โดยการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์สภาวะ Y4-04 และเมล็ดกาแฟที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (Control) จากไร่กาแฟ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ 65

ตาราง 12 ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลในตัวอย่างน้ำหมักของกระบวนการหมักกาแฟที่ขยายขนาดกระบวนการหมักที่ไร่กาแฟ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ ที่ระยะเวลาต่างๆ 67

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 องค์ประกอบของผลกาแฟ 6

ภาพประกอบ 2 วงล้อกลิ่นและรสชาติกาแฟ (Coffee Taster's Flavor Wheel)..... 9

ภาพประกอบ 3 ภาพรวมกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟแบบแห้งและแบบเปียก 12

ภาพประกอบ 4 ภาพรวมกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟแบบเปียก (wet process) 13

ภาพประกอบ 5 ภาพรวมกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟแบบกึ่งแห้ง (semi-dry process)..... 14

ภาพประกอบ 6 แบบฟอร์มประเมินคุณภาพของกาแฟตามวิธีการมาตรฐานของ SCAA cupping protocol..... 32

ภาพประกอบ 7 แสดงปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมด (ก,ข) และ จำนวนประชากรของเชื้อยีสต์ (ค,ง) ในหน่วย log CFU/ml ที่พบในกระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้าก่อนและหลังกระบวนการหมัก (24 ชั่วโมง) ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแทนปริมาณจุลินทรีย์ที่เปรียบเทียบกันระหว่างก่อนและหลังกระบวนการหมักของแต่ละสภาวะ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05)..... 43

ภาพประกอบ 8 ผลความแตกต่างทางประสาทสัมผัสของเมล็ดกาแฟที่ผ่านกระบวนการหมักแบบเปียกด้วยการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ เทียบกับเมล็ดกาแฟที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (Control) จากการทดสอบโดย Q-graders..... 46

ภาพประกอบ 9 ปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมด (ก) จำนวนประชากรของยีสต์ (ข) และแบคทีเรียกรดแลคติก (ค) ในหน่วย CFU/ml ที่ก่อนและหลังจากกระบวนการหมักในแต่ละช่วงเวลาของสภาวะ YL03 โดย ■ แทนปริมาณจุลินทรีย์ก่อนหมัก และ ■ แทนปริมาณจุลินทรีย์หลังหมัก ข้อมูลจากกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแทนปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เปรียบเทียบกันระหว่างก่อนและหลังกระบวนการหมักของแต่ละช่วงเวลา ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05)..... 51

ภาพประกอบ 10 ปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมด (ก), จำนวนประชากรของยีสต์ (ข) และแบคทีเรียกรดแลคติก (ค) ในหน่วย CFU/ml ที่ก่อนและหลังจากกระบวนการหมักในแต่ละช่วงเวลาของสภาวะ Y4-04 โดย ■ แทนปริมาณจุลินทรีย์ก่อนหมัก และ ■ แทนปริมาณจุลินทรีย์หลังหมัก

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแทนปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เปรียบเทียบกันระหว่างก่อนและหลังกระบวนการหมักของแต่ละช่วงเวลา ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05) 53

ภาพประกอบ 11 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-เบส ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟอะราบิก้า ก่อน-หลังจากกระบวนการหมักโดย (ก) สภาวะ YL03 และ (B) สภาวะ Y4-04 โดย ■ แทนค่าความเป็นกรด-เบสก่อนหมัก และ ■ แทนค่าความเป็นกรด-เบสหลังหมักข้อมูลในกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแทนปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เปรียบเทียบกันระหว่างก่อนและหลังกระบวนการหมักของแต่ละช่วงเวลา ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05) 54

ภาพประกอบ 12 ค่า °Brix ◆ และปริมาณความเป็นกรด ■ ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟอะราบิกาของสภาวะ YL03 แต่ละช่วงเวลา (ก) 12 ชั่วโมง (ข) 24 ชั่วโมง (ค) 48 ชั่วโมง (ง) 72 ชั่วโมง ของสภาวะ YL03 55

ภาพประกอบ 13 ค่า °Brix ◆ และปริมาณความเป็นกรด ■ ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟอะราบิกาของสภาวะ Y4-04 แต่ละช่วงเวลา (ก) 12 ชั่วโมง (ข) 24 ชั่วโมง (ค) 48 ชั่วโมง (ง) 72 ชั่วโมง ของสภาวะ Y4-04 56

ภาพประกอบ 14 ปริมาณของแข็งที่ละลายในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟอะราบิก้าของสภาวะ (ก) YL03 (ข) Y4-04 ในแต่ละช่วงเวลาโดย ■ แทนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำก่อนหมัก และ ■ แทนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำหลังหมัก ข้อมูลที่แสดงดังกราฟเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแทนปริมาณของแข็งที่ละลายที่เปรียบเทียบกันระหว่างก่อนและหลังกระบวนการหมักของแต่ละช่วงเวลา ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05) 57

ภาพประกอบ 15 ปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมด (ก) จำนวนประชากรของยีสต์ (ข) และแบคทีเรียกรดแลคติก (ค) ก่อนและหลังจากกระบวนการหมักที่ไร่กาแฟ อ.ห้วยน้ำดัง จ.แม่ฮ่องสอนโดยใช้ปริมาณกาแฟ 70 กิโลกรัม หมักด้วยจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะต่างๆ โดย ■ แทนปริมาณจุลินทรีย์ก่อนหมัก และ ■ แทนปริมาณจุลินทรีย์หลังหมัก ข้อมูลดังกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแทนปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เปรียบเทียบกันระหว่างก่อนและหลังกระบวนการหมัก ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05) 59

ภาพประกอบ 16 ค่าความเป็นกรด-เบส ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟ ก่อน-หลังจากกระบวนการหมักที่ อ.ห้วยน้ำดัง จ.แม่ฮ่องสอนโดยใช้กาแฟเชอรี่ 70 กิโลกรัม โดย ■ แทนค่าความเป็นกรด-เบส ก่อนหมัก และ ■ แทนค่าความเป็นกรด-เบสหลังหมัก ข้อมูลจากกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแทนการเปรียบเทียบกันระหว่างก่อนและหลังกระบวนการหมัก ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05)...60

ภาพประกอบ 17ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟ ก่อน-หลังจากกระบวนการหมักที่ อ.ห้วยน้ำดัง จ.แม่ฮ่องสอนโดยใช้กาแฟเชอรี่ 70 กิโลกรัมโดย ■ แทนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำก่อนหมัก และ ■ แทนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำหลังหมัก ข้อมูลจากกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแทนปริมาณของแข็งที่ละลายที่เปรียบเทียบกันระหว่างก่อนและหลังกระบวนการหมัก ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05).....61

ภาพประกอบ 18 ปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมด (ก) จำนวนประชากรของเชื้อยีสต์ (ข) และจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก (ค) ก่อนและหลังจากกระบวนการหมักที่ไร่กาแฟ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ โดยใช้กาแฟปริมาณ 70 กิโลกรัม โดย ■ แทนปริมาณจุลินทรีย์ก่อนหมัก และ ■ แทนปริมาณจุลินทรีย์หลังหมัก ข้อมูลจากกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแทนปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เปรียบเทียบกันระหว่างก่อนและหลังกระบวนการหมัก ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05 63

ภาพประกอบ 19 ค่า °Brix ◆ และปริมาณความเป็นกรด ■ ของ (ก) การทดลองควบคุม และ (ข) การขยายกระบวนการหมักโดยการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ สภาวะ Y4-04 ที่ระยะเวลาต่างๆ.....64

ภาพประกอบ 20 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟ ก่อน-หลังจากกระบวนการหมักที่ไร่กาแฟ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ โดยใช้กาแฟปริมาณ 70 กิโลกรัม โดย ■ แทนปริมาณของแข็งที่ละลายได้ก่อนหมัก และ ■ แทนปริมาณของแข็งที่ละลายได้หลังหมัก ข้อมูลจากกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแทนปริมาณของแข็งที่ละลายที่เปรียบเทียบกันทุกสภาวะ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05).....64

ภาพประกอบ 21 สารประกอบอินทรีย์ระเหยในเมล็ดกาแฟคั่วจากการวิเคราะห์โดย GC-MS chromatogram :(1) methyl pyrazine, (2) 1-hydroxy-2-propanone, (3) 2,5-dimethyl pyrazine, (4) 2,6-dimethyl pyrazine, (5) 2-ethyl-6-methyl pyrazine, (6) acetic acid, (7)

furfural, (8) 1-acetyloxy-2-propanone, (9) furfuryl acetate, (10) 5-methyl-2-furancarboxaldehyde, (11) 2-furanmethanol, (12) 3-methyl-1,2-cyclopentanedione, (13) maltol, (14) 2-methoxy-4-vinylphenol, (15) 5-hydroxymethylfurfural 68

ภาพประกอบ 22 การทดสอลทางเคมีโดยวิธีการ ^{1}H NMR spectrum ของเมล็ดกาแฟคั่วที่สกัดด้วย D_2O 69

ภาพประกอบ 23 ผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ (ก) YMP1-1, (ข) YML1-1, (ค) YWP1-5 และ (ง) YWP1-3 เพื่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ ในอาหาร YE ปริมาณ 50 ml เขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 32 ชั่วโมง โดย ◆ แทนน้ำตาลกลูโคส ■ แทนน้ำตาลซูโครส ▲ แทนกลีเซอรอล ✕ แทนน้ำตาลทราย ★ แทนน้ำตาลปี๊ป ● แทนโมลาส และ ✚ ข้อมูลจากกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05) 70

ภาพประกอบ 24 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ (ก) YMP1-1, (ข) YML1-1, (ค) YWP1-5 และ (ง) YWP1-3 เพื่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ ในอาหาร YE ปริมาณ 50 ml เขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดย ◆ แทน 30 กรัมต่อลิตร ■ แทน 60 กรัมต่อลิตร ▲ แทน 90 กรัมต่อลิตร ✕ แทน 120 กรัมต่อลิตร ★ แทน 180 กรัมต่อลิตร และ ● แทน 240 กรัมต่อลิตร ข้อมูลจากกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05 72

ภาพประกอบ 25 ผลของแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ (ก) YMP1-1, (ข) YML1-1, (ค) YWP1-5 และ (ง) YWP1-3 เพื่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ ในอาหาร YE ปริมาณ 50 ml เขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดย ◆ แทน Yeast exteact ■ แทน Malt extract ▲ แทน Beef extract ✕ แทน Peptone ★ แทน Corn steep ● แทน Ammonium sulfate ✚ แทน Sodium sulfate และ – แทน Urea ข้อมูลจากกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05 73

ภาพประกอบ 26 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ (ก) YMP1-1, (ข) YML1-1, (ค) YWP1-5 และ (ง) YWP1-3 เพื่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ ในอาหาร YE ปริมาณ 50 ml เขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดย ◆ แทน 0 กรัมต่อลิตร ■ แทน 5 กรัมต่อลิตร ▲ แทน 10 กรัมต่อลิตร ✕ แทน 15 กรัมต่อลิตร ★ แทน 20 กรัมต่อลิตร ● แทน 25

กรัมต่อลิตร และ + แทน 30 กรัมต่อลิตร ข้อมูลจากกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05 75

ภาพประกอบ 27 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ (ก) YMP1-1, (ข) YML1-1, (ค) YWP1-5 และ (ง) YWP1-3 เพื่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ ในอาหาร YE ปริมาณ 50 ml เขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดย ◆ แทน 5 องศาเซลเซียส ■ แทน 10 องศาเซลเซียส ▲ แทน 15 องศาเซลเซียส ✕ แทน 20 องศาเซลเซียส ✶ แทน 25 องศาเซลเซียส และ ● แทน 30 องศาเซลเซียส ข้อมูลจากกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05 77

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

กาแฟเป็นผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง ส่งผลให้กาแฟเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญลำดับต้นๆของโลก จากรายงานปี 2558 พบว่ากาแฟมีการผลิตอย่างมากในเขตร้อนชื้นแถบเอเชียและแอฟริกา ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่สามารถปลูกกาแฟได้ทั้งสายพันธุ์โรบัสต้าและอะราบิก้า โดยกาแฟสายพันธุ์อะราบิก้ามีการเพาะปลูกกันอย่างแพร่หลายทั่วภาคเหนือของประเทศไทยในพื้นที่และระดับความสูงที่แตกต่างกัน ปัจจุบันอุตสาหกรรมกาแฟยังคงมีการขยายตัวอย่างต่อเนื่องแต่มักพบปัญหาที่เกี่ยวกับคุณภาพของกาแฟซึ่งส่งผลกระทบต่อกลิ่น สี และรสชาติของกาแฟ ซึ่งคุณภาพของกาแฟนั้นมักจะแตกต่างกันไปขึ้นกับพื้นที่ที่ใช้ในการเพาะปลูก สภาพภูมิอากาศ สายพันธุ์ของกาแฟ และกระบวนการในการผลิต นอกจากนี้คุณภาพของกาแฟนั้นเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของสารเคมีในระหว่างกระบวนการคั่ว และกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยว [1, 2]

กระบวนการหลังการเก็บเกี่ยวหรือกระบวนการหมักกาแฟ (Coffee fermentation) ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาตินั้นมักเกิดขึ้นเพื่อกำจัดเมือกออกจากเมล็ดของกาแฟหลังจากนั้นจะนำไปตากแห้งจนมีความชื้นอยู่ที่ 10-12% [3]โดยกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยวกาแฟแบ่งออกเป็น 3 กระบวนการหลักได้แก่ การหมักแบบเปียก (Wet processes) การหมักแบบแห้ง (Dry processes) และการหมักแบบกึ่งแห้ง (Semi-dry processes) [4] กาแฟสายพันธุ์อะราบิก้านั้นมักใช้การแปรรูปโดยใช้กระบวนการหมักแบบเปียกเป็นหลัก ซึ่งจะนำผลกาแฟสุกมาทำการแยกเปลือกออกนำเมล็ดกาแฟไปแช่ในน้ำเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงหรือจนกว่าเมือกกาแฟหมด จากนั้นนำไปตากแห้งจนมีความชื้น 10-12% [5-7] เกษตรกรของประเทศไทยนั้นมักใช้กระบวนการแปรรูปกาแฟแบบเปียกเพื่อให้ได้คุณภาพที่สม่ำเสมอ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสภาพแวดล้อมธรรมชาติในกระบวนการหมักกาแฟและมีการเจริญในระหว่างกระบวนการหมักกาแฟเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อคุณภาพของกาแฟ

ในปัจจุบันกระบวนการหมักกาแฟเป็นกระบวนการแบบดั้งเดิมที่อาศัยเชื้อจุลินทรีย์ในธรรมชาติซึ่งจากรายงานในหลายปีที่ผ่านมามีรายงานพบว่ากระบวนการหมักกาแฟควรมีการควบคุมกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มคุณภาพของกาแฟ ให้มีกลิ่นและรสชาติที่ดีขึ้นและมีคุณภาพที่คงที่ มีการรายพบว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักนั้น เช่น การใส่เชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Pichia fermentans* สายพันธุ์ YC5.2 นั้นทำให้เกิดรสชาติ vanilla และกลิ่น floral

มากยิ่งขึ้น[8] โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักกาแฟนั้นมีการผลิตสารสารเมแทบอไลต์ (Metabolite) ออกมานอกเซลล์และซึมผ่านเข้าสู่เมล็ดกาแฟในระหว่างกระบวนการหมัก การศึกษาการพัฒนาคุณภาพของกาแฟสายพันธุ์อะราบิก้าโดยการจุลินทรีย์ผสมร่วมกันในกระบวนการหมัก เช่น การใช้หัวเชื้อยีสต์ร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติก การใช้หัวเชื้อยีสต์ผสม 4 สายพันธุ์นั้นยังไม่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึง สนใจศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟโดยมีการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักเพื่อเพิ่มคุณภาพของเมล็ดกาแฟให้ดียิ่งขึ้น

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายของการศึกษาวิจัยไว้ดังนี้

1. เพื่อพัฒนาคุณภาพด้านรสชาติของกาแฟสายพันธุ์อะราบิก้าโดยการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในกระบวนการหมักกาแฟแบบเปียก

2. เพื่อศึกษาประชากรของเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักกาแฟในกระบวนการหมักแบบเปียก

3. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักกาแฟโดยการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะจริงในไร่ของเกษตรกร

4.เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ในระดับฟลาสก์ (Shake flask)

5.เพื่อศึกษารูปแบบการผลิตสาร Metabolite ในกระบวนการหมักกาแฟโดยใช้วิธีการทางเคมี

ขอบเขตของงานวิจัย

การนำเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดแยกและคัดเลือกจากกระบวนการหมักกาแฟที่ดอยผาตั้ง จังหวัดเชียงรายในปี 2561 มาใช้เป็นหัวเชื้อเพื่อพัฒนากระบวนการหมักกาแฟ ซึ่งมีการระบุและยืนยันแล้วว่าเชื้อที่มีการคัดเลือกนั้นไม่ได้จัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค นำเชื้อจุลินทรีย์มาทำการศึกษาการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักกาแฟทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและขยายสู่ไร่ของเกษตรกร ศึกษาประชากรของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการนับประชากรของเชื้อจุลินทรีย์ (Microbial plate count) โดยมีการนับประชากรของเชื้อแบคทีเรียทั่วไป ยีสต์ และแบคทีเรียกรดแลคติก ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในกระบวนการหมักกาแฟแบบเปียก วิเคราะห์การผลิตสาร Metabolite ในระหว่างกระบวนการหมัก และตรวจสอบคุณภาพ

ของเมล็ดกาแฟโดยวิธีการทางเคมี อีกทั้งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ในระดับฟลาสก์เพื่อนำหัวเชื้อไปใช้ในการหมักกาแฟต่อไป

ผลที่ได้รับจากงานวิจัย

1.ได้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเพิ่มคุณภาพของกาแฟอะราบิก้า และเกษตรกรสามารถนำไปใช้งานได้ง่าย

2.ได้สภาวะที่เหมาะสมในการหมักกาแฟอะราบิก้าแบบเปียกโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพ

3.ทราบการเปลี่ยนแปลงประชากรเชื้อจุลินทรีย์ ในระหว่างการหมักกาแฟ

4.ทราบข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสาร Metabolite ของเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดในระหว่างกระบวนการหมักกาแฟเพื่อใช้สำหรับเป็นข้อมูลการอ้างอิงการทดสอบทางประสาทสัมผัส

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.กาแฟ

กาแฟเป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมทั่วโลกอย่างแพร่หลายทำให้กาแฟเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญระดับโลก และเป็นสินค้าหลักในการส่งออกที่สร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรเป็นอย่างมาก โดยกาแฟเป็นพืชเขตร้อนจัดจำแนกอยู่ในวงศ์ Rubiaceae หรือพืชในวงศ์เข็ม โดยเชื่อกันว่ามีถิ่นกำเนิดอยู่ในบริเวณแถบร้อนและทางใต้ของแอฟริกาเป็นไม้พุ่มหรือไม้ยืนต้นที่มีใบเดี่ยว ซึ่งการเพาะปลูกกาแฟจำเป็นที่จะต้องมีความเหมาะสมในการเพาะปลูกโดยจะขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างที่เข้ามาเกี่ยวข้องไม่ว่าจะเป็น ชนิดของดิน ภูมิอากาศ ปริมาณฝนและความชื้น และปริมาณของแสง (คลังข้อมูลสารสนเทศระดับภูมิภาคโดยสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร ,2564) ในการเพาะปลูกเมล็ดกาแฟในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันนั้นจะส่งผลให้เมล็ดกาแฟมีลักษณะที่เฉพาะตัวของเมล็ดกาแฟในแต่ละสายพันธุ์ซึ่งพบว่าแหล่งในการเพาะปลูกกาแฟที่เหมาะสมนั้นอยู่บริเวณเส้นศูนย์สูตรที่อยู่เหนือระดับน้ำทะเลเนื่องจากเป็นบริเวณที่มีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมในการเพาะปลูกกาแฟและให้ผลผลิตที่มีคุณภาพดี ในปัจจุบันการปลูกกาแฟแพร่กระจายไปในหลายพื้นที่ทั่วโลกภูมิภาคที่มีการเพาะปลูกกาแฟมากที่สุดของประเทศไทย คือ ภาคเหนือ ที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และ แม่ฮ่องสอน เป็นต้น

กาแฟที่นิยมในการบริโภคนั้นมีหลายสายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์เอ็กซ์เซลซ่า พันธุ์ลิเบอริก้า พันธุ์อะราบิกา และพันธุ์โรบัสต้า ประเทศไทยมีการค้ากาแฟเป็นพืชเศรษฐกิจ โดยนิยมปลูกทางการค้า 2 สายพันธุ์หลักได้แก่ สายพันธุ์โรบัสต้า ซึ่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Coffee canephora Pierre ex Froehner* มีการเพาะปลูกกันอย่างแพร่หลายในแถบจังหวัดชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี กระบี่ และนครศรีธรรมราช และสายพันธุ์อะราบิกา ซึ่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Coffea arabica L*. มีการเพาะปลูกกันอย่างแพร่หลายในแถบจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน และตาก (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2562) ซึ่งพันธุ์อะราบิกานั้นจะได้รับความนิยมในการบริโภคสูงกว่ากาแฟพันธุ์โรบัสต้าเนื่องจากกาแฟสายพันธุ์อะราบิก้านั้นจะมีรสชาติที่มีความหวานและความหอมมากกว่าเนื่องจากองค์ประกอบของน้ำตาลและกรดอินทรีย์ตามธรรมชาติในเมล็ดที่มีมากกว่า แต่ในปัจจุบันเกษตรกรในประเทศไทยนิยมปลูกพืชชนิดอื่นที่ให้ผลตอบแทนดีกว่า เนื่องจากกาแฟของประเทศไทยมีคุณภาพที่ต่ำลงโดยกาแฟที่มีคุณภาพต่ำทำให้ไม่สามารถแข่งขันในตลาดโลกได้และอีกทั้งมีค่าใช้จ่ายสูงในการผลิตแต่ขายได้ในราคาต่ำ ซึ่งทำให้เกิด ปัญหาด้านการตลาดของกาแฟไทยส่งผลให้ผู้ผลิตกาแฟพยายามหาวิธีการที่จะเพิ่ม

คุณภาพของกาแฟโดยเฉพาะคุณภาพทางด้านรสชาติส่วนใหญ่แล้วเกษตรกรไม่มีความรู้เกี่ยวกับการพัฒนากระบวนการผลิตเพื่อเพิ่มมูลค่าด้านกลิ่นรสของกาแฟ โดยกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟเป็นกระบวนการที่สำคัญที่สามารถเพิ่มคุณภาพด้านกลิ่นรสได้โดยจุลินทรีย์เป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยให้กระบวนการหมักประสบความสำเร็จและสามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์กาแฟได้

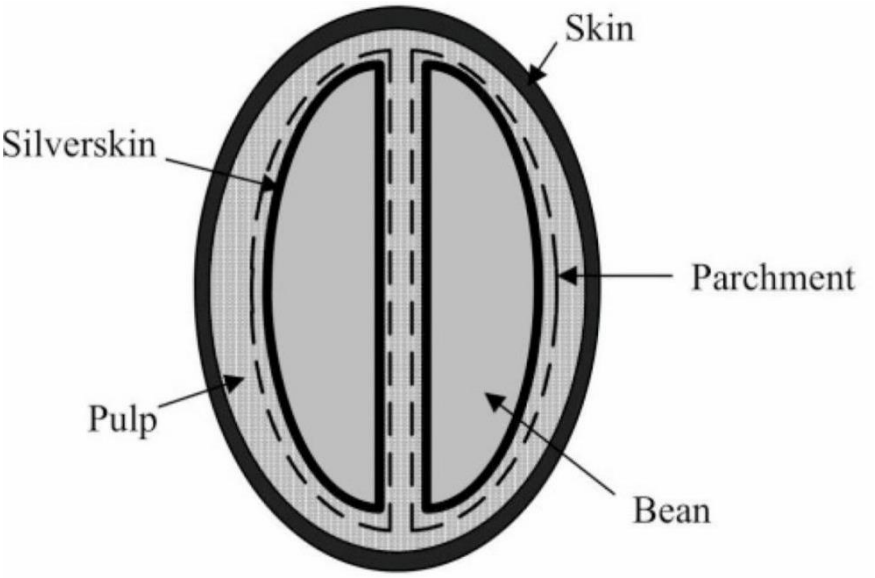
การกำหนดมาตรฐานของเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อะราบิก้าทั้งด้านคุณภาพและความปลอดภัยถูกระบุไว้ในมาตรฐานสินค้าเกษตรโดยมีข้อกำหนดขั้นต่ำ คือ ไม่มี กลิ่นผิดปกติ (off-odour bean) เช่น กลิ่นเหม็นเปรี้ยว กลิ่นหมักบูด กลิ่นรา หรือกลิ่นแปลกปลอม เช่น กลิ่นปุ๋ย กลิ่นสารเคมี และกลิ่นดิน มีสีตรงตามกระบวนการผลิตของเมล็ดกาแฟอะราบิก้า มีความชื้นไม่เกิน 12.5 เปอร์เซ็นโดยมวล ไม่พบร่องรอยการทำลายเมล็ดกาแฟจากด้วงเมล็ดกาแฟ (coffee bean weevil) ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Araecerus fasciculatus* มีข้อกำหนดในการบรรจุหีบห่อ โดยให้มีการติดฉลากและเครื่องหมายแสดงรายละเอียดที่หีบห่ออย่างชัดเจน มีเครื่องหมายรับรองมาตรฐานสินค้าการเกษตร บ่งชี้ที่มาและชนิดของสินค้าอย่างชัดเจน (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ.2562)

2.องค์ประกอบของเมล็ดกาแฟ

ผลกาแฟ หรือ เชอรี่กาแฟของกาแฟแต่ละสายพันธุ์นั้นจะมีลักษณะของผลที่แตกต่างกัน โดยลักษณะที่แตกต่างกันนั้นจะมีความแตกต่างกันในด้านของรูปร่างและสีของเมล็ดกาแฟ โดยส่วนใหญ่แล้วมีองค์ประกอบหลัก แสดงดังภาพประกอบ 1

2.1 ผิว หรือ เปลือก (skin)

โดยสีของผิวจะแตกต่างกันตามชนิดของกาแฟหรือระดับความสุกของกาแฟ ซึ่งเริ่มจากสีเขียวไปจนถึงสีแดงเมื่อผลกาแฟสุกซึ่งถือเป็นเนื้อเยื่อชั้นแรกที่คอยปกป้องเมล็ดกาแฟ มีการรายงานพบว่าบริเวณของผิวหรือเปลือกกาแฟนั้นมักพบคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ในปริมาณมากถึง 580 ถึง 850 กรัมต่อกิโลกรัม นอกจากนี้ยังพบสารประกอบอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น Pectin, Cellulose, Hemicellulose, Fatty, Fiber, Protein และ Caffeine ในบริเวณของผิวและเปลือกกาแฟ [(5)]



ภาพประกอบ 1 องค์ประกอบของผลกาแฟ

ที่ ม า : Hoseini, Marziyeh, et al. "Coffee by-products derived resources. A review." Biomass and Bioenergy 148 (2021): 106009.

นอกจากนี้ในผิวหรือเปลือกของกาแฟยังพบสารประกอบอนินทรีย์มากถึง 5000 ถึง 30000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ประกอบด้วย Nitrogen, Calcium, Phosphorus และ Potassium เป็นต้น [6]

2.2 มิวซีเลจ (mucilage)

Mucilage หรือเมือก เป็นชั้นเนื้อเยื่อที่ห่อหุ้มบริเวณกะลามีลักษณะเป็นเมือกลื่นและมีรสชาติที่หวาน ในบริเวณของ mucilage นั้นเป็นบริเวณที่เชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักนั้นใช้สารประกอบต่างๆ ที่อยู่บริเวณของเมือกในการสร้างสารสาร metabolite ชนิดต่างๆ เนื่องจากบริเวณเมือกนั้นจะมีองค์ประกอบที่ประกอบด้วยน้ำ 85-91% และ Reducing sugar 6.2-7.4% [7] นอกจากนี้ยังพบองค์ประกอบอื่นๆ ในบริเวณของ mucilage ที่เป็นโปรตีนหรือ pectin [8] ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้นั้นมักเป็นสารอาหารสำหรับการสร้างสาร metabolite ชนิดต่างๆ ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักจากเชื้อจุลินทรีย์ และยังช่วยส่งเสริมการสร้างสารตั้งต้นจากเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตสารระเหยในขั้นตอนของกระบวนการคั่วเมล็ดกาแฟ[9] ซึ่งมักส่งผลให้กาแฟในแต่ละแหล่งมีกลิ่น และรสชาติที่แตกต่างกันออกไป

2.3 **พาร์ชเมนต์** (parchment)

พาร์ชเมนต์หรือกะลา เป็นชั้นในสุดของผลกาแฟ ทำหน้าที่ปกป้องเมล็ดกาแฟที่อยู่ด้านบริเวณของกะลานั้นจะมีลักษณะคล้ายกับกระดาษ แห้ง และเปราะ มักพบว่าองค์ประกอบของเมล็ดกาแฟส่วนนี้นั้นมักเป็นของเหลือทิ้งทางการเกษตรหลังจากกระบวนการหมักกาแฟในอุตสาหกรรมกาแฟ และมักถูกนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์หรือปุ๋ย แต่มีการรายงานพบว่าบริเวณของกะลานั้นมีสารประกอบชนิดต่างๆ ได้แก่ Lignin 53%, Hemicellulose 18% และ Cellulose 22% จึงมีการนำส่วนประกอบของเมล็ดกาแฟส่วนนี้นั้นไปใช้ในการผลิต micro fiber[10]

2.4 **ซิลเวอร์สกิน** (silver skin)

ซิลเวอร์สกินเป็นชั้นเนื้อเยื่อบางๆที่ห่อหุ้มติดกับบริเวณเมล็ดกาแฟ ซึ่งชั้นซิลเวอร์สกินนั้นจะสามารถหลุดออกจากเมล็ดกาแฟในขั้นตอนของการนำเมล็ดไปคั่วเท่านั้น ซึ่งจากการศึกษาองค์ประกอบของซิลเวอร์สกินนั้นพบว่าบริเวณนี้นั้นพบองค์ประกอบที่เป็น Cellulose, Hemicellulose และน้ำตาลหลายชนิด ได้แก่ Xylose, Arabinose, Galactose และ Mannose เป็นต้น [2] นอกจากนี้ยังมีการนำองค์ประกอบกาแฟในส่วนนี้ไปใช้ประโยชน์ที่เกี่ยวข้องกับสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย[11]

2.5 **เมล็ดกาแฟ** (bean)

เมล็ดกาแฟหรือกรีนบีน เป็นส่วนประกอบที่อยู่ชั้นด้านในสุดเป็นส่วนที่ใช้สะสมอาหารสำหรับ embryo ซึ่งเป็นส่วนที่สะสมสารอาหารต่างๆ ที่จะถูกนำไปใช้โดย embryo สำหรับการเจริญเติบโตเป็นกาแฟต้นใหม่ และก็ยังเป็นส่วนสำคัญต่อรสชาติของกาแฟ เพราะสารอินทรีย์ที่ถูกผลิตจากการสร้างสาร metabolite จากเชื้อจุลินทรีย์นั้นจะถูกสะสมไว้ในบริเวณเมล็ดกาแฟ และจะถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นรสชาติที่แตกต่างกันของกาแฟในระหว่างกระบวนการคั่ว จากการศึกษาการวิเคราะห์องค์ประกอบของเมล็ดกาแฟจาก 8 แหล่งพบว่าเมล็ดกาแฟจากแต่ละแหล่งนั้นมีองค์ประกอบของโปรตีน กรดอะมิโน และน้ำตาลที่ใช้สำหรับเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสาร metabolite ที่จะทำให้เกิดกลิ่นหอมและรสชาติของกาแฟในขั้นตอนของกระบวนการคั่วที่แตกต่างกัน จึงส่งผลให้กาแฟในแต่ละแหล่งนั้นมีคุณภาพที่แตกต่างกันจึงทำให้มูลค่าของเมล็ดกาแฟในแต่ละแหล่งมีความแตกต่างกันด้วย [12]

3.คุณภาพของกาแฟ

คุณภาพของกาแฟในด้านกลิ่น สี และรสชาตินั้นมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นแหล่งที่ตั้งของพื้นที่ที่ใช้ในการเพาะปลูก ชนิดหรือสายพันธุ์ของเมล็ดกาแฟ รวมถึงกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยวเมล็ดกาแฟ การแปรรูปเมล็ดกาแฟ การทำให้แห้ง และสภาวะการเก็บรักษา ซึ่งคุณภาพของกาแฟนั้นจะมีผลต่อมูลค่าของเมล็ดกาแฟ [13] ในการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดกาแฟนั้นจะจำแนกคุณของเมล็ดกาแฟโดยการชิมจากผู้ชิมทางประสาทสัมผัสโดยจะทำการชิมกาแฟที่ผ่านการคั่วและชงเรียบร้อยแล้วตาม cupping protocol มาตรฐานที่กำหนด จากนั้นผู้ประเมินทำการกรอกคะแนนลงในแบบประเมินคุณภาพกาแฟที่ได้รับการยอมรับทั่วโลก ซึ่งจะทำการจำแนกคุณภาพของกาแฟโดยคำนึงถึง กลิ่น (aroma) รสชาติ (taste) ความเปรี้ยว (acidity) ความหวาน (sweetness) เนื้อสัมผัส (body) ความสมดุล (balance) ความคงค้างของกาแฟหลังจากการดื่ม (aftertaste) และคุณภาพโดยรวม (SCAA,2013) ซึ่งผู้ชิมจะมีการใช้วงล้อกลิ่นและรสชาติกาแฟหรือ Coffee Taster's Flavor Wheel ในการวิเคราะห์กลิ่นและอธิบายกลิ่นและรสชาติของกาแฟ แสดงดังภาพประกอบ 2 การจำแนกรสและกลิ่นนั้นจะแบ่งออกเป็น 9 กลุ่มได้แก่ กลุ่มเปรี้ยวและหมัก กลุ่มผลไม้ กลุ่มเผ็ดร้อน กลุ่มเขียวและพืชผัก กลุ่มความหวาน กลุ่มคั่วปิ้งย่าง กลุ่มดอกไม้ กลุ่มถั่วและโกโก้ และกลุ่มอื่นๆ ซึ่งวิธีการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดกาแฟจากการชิมนั้นถือเป็นวิธีการที่สำคัญที่ใช้ในการแบ่งเกณฑ์และคัดเกรดคุณภาพของเมล็ดกาแฟ [17]

3.1 กลิ่น (aroma)

การทดสอบประสาทสัมผัสทางกลิ่นของกาแฟจะสามารถอธิบายกลิ่นของกาแฟที่เกิดขึ้นออกเป็น 2 ช่วงได้แก่ กาแฟหลังจากการบดใหม่ซึ่งจะสามารถรับกลิ่นได้ในขณะที่ยังแห้งอยู่ไม่มีการเติมน้ำ กลิ่นช่วงแรกเป็นกลิ่นหอมที่ถูกกักเก็บไว้ในตัวเมล็ดกาแฟคั่วสามารถระเหยได้ในระดับอุณหภูมิห้องและกลิ่นของน้ำกาแฟจะสามารถรับกลิ่นได้เมื่อมีการสัมผัสกับน้ำที่มีอุณหภูมิที่สูง โดยจะจำแนกได้กลิ่นของกาแฟเป็นกลิ่นดอกไม้ กลิ่นควัน กลิ่นสมุนไพร และกลิ่นถั่ว จากการรายงานของ Giacalone และคณะพบว่ากลิ่นของกาแฟในแต่ละระดับความคั่วนั้นจะมีความแตกต่างกันโดยมีการศึกษาวิธีการคั่วทั้ง 6 วิธีที่มีความแตกต่างกันในด้านอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการคั่วเมล็ดกาแฟ ได้แก่ คั่วธรรมดา คั่วอ่อน คั่วไหม้ คั่วเข้ม คั่วเบค (baked) และการคั่วแบบ underdeveloped พบว่ากาแฟในแต่ละแบบนั้นจะมีกลิ่นที่แตกต่างกันโดยกาแฟที่มีการคั่วธรรมดา คั่วเบค คั่วเข้ม และคั่วไหม้ นั้นจะมีลักษณะของกลิ่นไหม้ที่ชัดเจน ส่วนการคั่วเมล็ดกาแฟแบบอ่อนนั้นจะให้สัมผัสทางกลิ่นที่มีกลิ่นของผลไม้และสมุนไพรที่ชัดเจนกว่า [14] นอกจากนี้ยัง

พบว่าผลจากการคั่วในแต่ละแบบนั้นไม่เพียงแต่จะส่งผลต่อกลิ่นของกาแฟยังส่งผลต่อรสชาติ ความเปรี้ยว และความหวานของกาแฟ

ภาพประกอบ 2 วงล้อกลิ่นและรสชาติกาแฟ (Coffee Taster's Flavor Wheel)

ที่มา : Coffee And Health. (2003). *Aroma And Flavor Descriptors*. Retrieved July 14, 2021, from https://www.coffeeandhealth.org/all-about-coffee/aroma-and-flavour-descriptors/. (Online).

3.2 รสชาติ (taste)

การทดสอบประสาทสัมผัสทางรสชาติของกาแฟนั้นจะสามารถจำแนกรสชาติของกาแฟได้ดังนี้ รสขม รสหวาน รสเปรี้ยว รสฝาด และรสเค็ม การรับรสชาติของกาแฟภายในปากนั้นโดยรสชาติที่สัมผัสได้นั้นจะอยู่บริเวณลิ้นโดยรสชาติหวานที่ได้รับจะอยู่บริเวณปลายลิ้น รสชาติขมจะอยู่ที่บริเวณโคนลิ้น รสชาติเปรี้ยวที่ได้รับจะอยู่บริเวณข้างลิ้นบริเวณด้านบน และรสชาติเค็มจะสัมผัสได้ที่บริเวณข้างลิ้น รสแรกที่ลิ้นสัมผัสได้เร็วคือรสขม จากนั้นจะสัมผัสได้รสเค็ม รสเปรี้ยว และรสหวานตามลำดับ จากการรายงานของ Frank และคณะพบว่าการสัมผัสรสชาติขมจาก

กาแฟนั้นไม่เพียงแต่เกิดจากสาร caffeine หรือ trigonelline เท่านั้นการรับรสชาติขมของรสชาติกาแฟยังมีผลจาก lactones และ phenylindanes ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของ chlorogenic acid ในระหว่างการคั่วเมล็ดกาแฟ [15] นอกจากนี้ลักษณะสีของเมล็ดกาแฟยังสามารถใช้เป็นดัชนีทางอ้อมที่บ่งบอกถึงระดับการคั่วและรสชาติขมของเมล็ดกาแฟได้ [16] แต่ยังจำเป็นที่จะต้องมีการทดสอบประสาทสัมผัสทางการชิมรสชาติเพื่อประเมินคุณภาพของรสชาติกาแฟ

3.3 **ความหวาน** (sweetness)

ลักษณะความหวานของรสชาติกาแฟนั้นมักมีผลมาจากสายพันธุ์ของกาแฟรวมทั้งวิธีการคั่วเมล็ดกาแฟ ซึ่งภายในเมล็ดกาแฟนั้นจะมีส่วนประกอบที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ซึ่งเมื่อความร้อนหรือการคั่วนั้นจะส่งผลให้น้ำแตกตัวออกเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว จึงให้สามารถสัมผัสความหวานจากการดื่มกาแฟ ซึ่งจากการรายงานพบว่าวิธีการคั่วกาแฟแบบอ่อนนั้นจะสามารถสัมผัสรสชาติความหวานของกาแฟได้มากกว่าการคั่วกาแฟแบบเข้ม[14] โดยระดับการคั่วที่อุณหภูมิสูงและมีระยะเวลาในการคั่วที่นานนั้นจะส่งผลให้รสชาติความหวานแบบคาราเมลและช็อกโกแลตมากขึ้น

3.4 **ความเปรี้ยว** (acidity)

การทดสอบรสชาติของกาแฟสามารถทำให้ทราบถึงรสชาติต่างๆ ของกาแฟได้รวมถึงรสชาติเปรี้ยวซึ่งรสเปรี้ยวของกรดนั้นเป็นรสชาติพื้นฐานของเมล็ดกาแฟโดยมีสารละลายที่เป็นกรดอินทรีย์เป็นส่วนประกอบ กาแฟแต่ละชนิดนั้นจะมีความเปรี้ยวที่แตกต่างกันโดยกาแฟอะราบิกานั้นจะมีความเปรี้ยวมากกาแฟโรบัสต้า (กรมส่งเสริมการเกษตร,2557) นอกจากนี้ระดับความสูงในการเพาะปลูกกาแฟนั้นยังส่งผลต่อระดับความเปรี้ยวของกาแฟซึ่งพบว่ากาแฟที่มีการเพาะปลูกในระดับความสูงที่สูงนั้นจะมีรสชาติความเปรี้ยวของกาแฟมากกว่ากาแฟที่มีการเพาะปลูกในระดับที่ไม่สูง [17] จากการรายงานของ Santos และคณะที่มีการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาในการสร้างกรดระหว่างการคั่วของเมล็ดพบว่าระยะเวลาของการคั่ว สายพันธ์ของกาแฟ รวมถึงอุณหภูมิที่ใช้ในการคั่วนั้น ส่งผลให้กาแฟแต่ละสภาวะนั้นเกิดความเป็นกรดขึ้นแตกต่างกันโดยกาแฟที่มีระยะเวลาในการคั่วที่นานแต่ใช้อุณหภูมิต่ำจะมีปฏิกิริยาในการเกิดกรดในน้อยกว่ากาแฟที่มีระยะเวลาที่ใช้ในการคั่วน้อยแต่มีอุณหภูมิที่สูง ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาในการสร้างกรดและกาแฟนั้นจะมีรสชาติที่เปรี้ยวมากกว่า [17]

3.5 **เนื้อสัมผัส** (body)

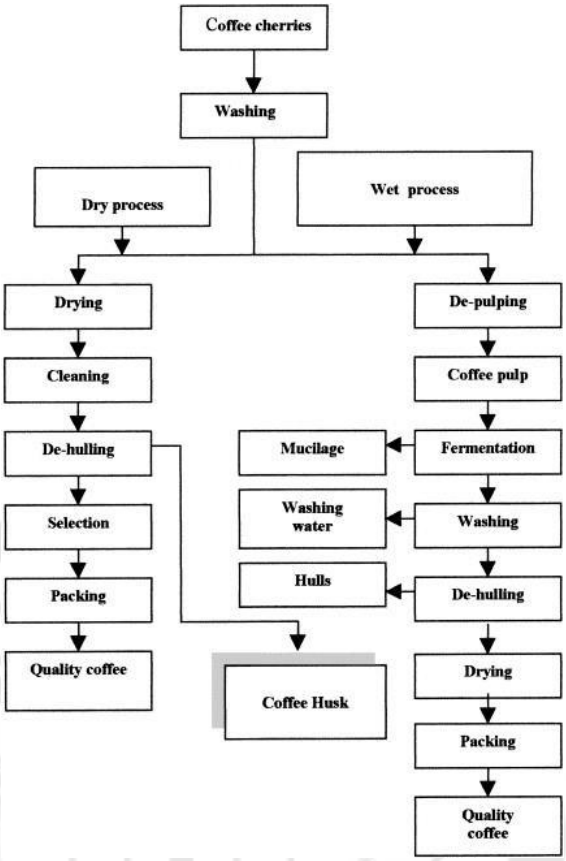
การทดสอบประสาทสัมผัสโดยการทดสอบเนื้อสัมผัสของกาแฟเป็นการทดสอบระดับความหนาของกาแฟและระดับความเข้มข้นของกาแฟซึ่งสามารถแบ่งเนื้อสัมผัสของกาแฟได้เป็นลักษณะของเนื้อสัมผัสกาแฟที่จางเหมือนน้ำ (watery) เบา (Thin) อ่อน (Light) กลาง (Medium) และ หนัก (Full) (กรมส่งเสริมการเกษตร,2557)

3.6 **ความคงค้างของกาแฟหลังจากการดื่ม** (aftertaste)

การทดสอบประสาทสัมผัสความคงค้างของกาแฟเป็นการทดสอบความคงค้างของกาแฟที่ยังคงหลงเหลืออยู่ภายในบริเวณปากหลังจากที่มีการกลืน ซึ่งจะสามารถสัมผัสได้ถึงกลิ่นและรสชาติของกาแฟซึ่งความคงค้างของกาแฟหลังจากการดื่มนั้นอาจเป็นรสเดียวกับรสชาติหลักของกาแฟหรืออาจเปลี่ยนเป็นรสชาติแฝงอื่นได้ซึ่งกาแฟที่มีเนื้อสัมผัสที่หนักนั้นจะสามารถทิ้งความคงค้างของกาแฟหลังจากการดื่มได้ยาวนานกว่ากาแฟที่มีเนื้อสัมผัสที่เบา (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2557)

4.กระบวนการหมักกาแฟ

ในกระบวนการผลิตกาแฟมี 2 กระบวนการหลัก ได้แก่ กระบวนการหมักแบบเปียก และกระบวนการหมักแบบแห้ง [(4)] แสดงดังภาพประกอบ 3 ซึ่งกระบวนการหมักแบบเปียกนั้นจะได้รับความนิยมเป็นอย่างมากเนื่องจากเป็นกระบวนการที่ง่ายและได้กาแฟที่มีคุณภาพ นอกจากนี้ยังมีกระบวนการหมักกาแฟที่เรียกว่ากระบวนการหมักแบบกึ่งแห้งที่สามารถนำมาใช้ในกระบวนการผลิตกาแฟได้



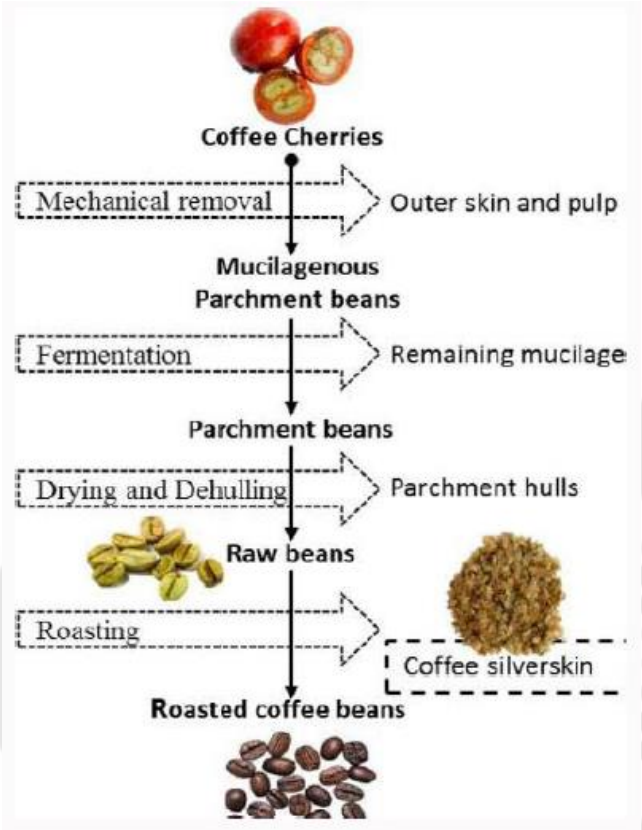
ภาพประกอบ 3 ภาพรวมกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟแบบแห้งและแบบเปียก

ที่ ม า : Pandey, Ashok, et al. "Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses." Biochemical Engineering Journal 6.2 (2000): 153-162.

4.1 กระบวนการหมักกาแฟแบบเปียก (wet process)

กระบวนการหมักกาแฟแบบเปียกจะเริ่มจากการนำเมล็ดกาแฟสุกมาทำการปลอกเปลือกจากนั้นนำเมล็ดกาแฟที่ปอกเปลือกนอกออกแล้วซึ่งจะมีเมือกห่อหุ้มเมล็ดอยู่จึงจะต้องกำจัดออกไป เรียกว่าการกำจัดเมือกโดยวิธีการหมักตามธรรมชาติ (Natural Fermentation) เป็นวิธีการที่ปฏิบัติดั้งเดิมโดยนำเมล็ดกาแฟที่ปอกเปลือกออกแล้วมาแช่ในบ่อซีเมนต์และมีการเติมน้ำลงไปในถังจนท่วเมล็ดกาแฟ ซึ่งวิธีการนี้เป็นกระบวนการเริ่มต้นการหมัก ในขั้นตอนของการหมักกาแฟเป็นการช่วยขจัดเมือกบนตัวเมล็ดกาแฟและยังเกี่ยวข้องกับเรื่องของกลิ่นและรสชาติของกาแฟในขั้นตอนนี้มีจุลินทรีย์เข้ามาเกี่ยวข้องทั้งในเรื่องของการขจัดเมือกและสร้างสารระเหย [18] หลังจากทำการแช่เมล็ดกาแฟจะนำเมล็ดกาแฟที่ผ่านการทำความสะอาดแล้วไปตากแห้งจนมีความชื้นเท่ากับ 10 ถึง 12 เปอร์เซ็นต์ จึงจะนำเมล็ดกาแฟที่ตากแห้งแล้วมาทำการเก็บไว้ที่

อุณหภูมิห้องโดยป้องกันเมล็ดไม่ให้มีความชื้นก่อนนำไปสีกะลาออกเมล็ดเพื่อนำกาแฟไปทำการคั่วและทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดเพื่อกาแฟ [5] แสดงดังภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 ภาพรวมกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟแบบเปียก (wet process)

ที่มา : Iriondo-DeHond, Amaia, et al. "Coffee silverskin: a low-cost substrate for bioproduction of high-value health promoting products." (2017).

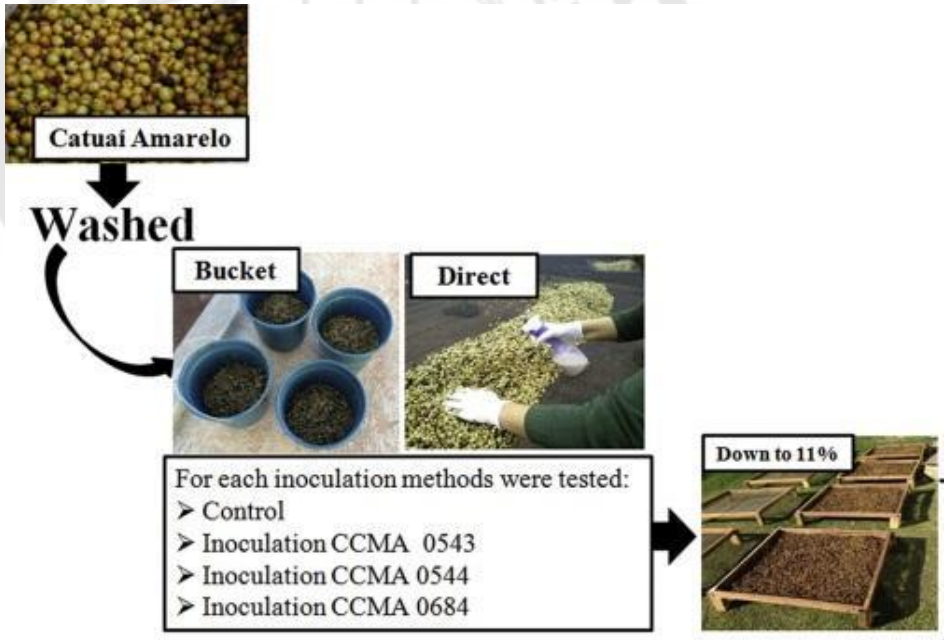
4.2 กระบวนการหมักกาแฟแบบแห้ง (dry process)

กระบวนการหมักแบบแห้งหรือกระบวนการหมักแบบธรรมชาติ (natural process) เป็นกระบวนแปรรูปกาแฟที่มีการใช้มาอย่างยาวนานเป็นวิธีการที่จะนำผลกาแฟสุกที่ไม่ลอยน้ำและไม่ผ่านกระบวนการสีเปลือกนั้นมาทำการตากโดยบริเวณที่ตากจะมีการตากผลกาแฟที่ไม่หนาเกิน 5 เซนติเมตรและมีการเกลี่ยผลกาแฟวันละไม่เกิน 4 ครั้งเพื่อป้องกันการเกิดความชื้นและการเกิดเชื้อราบริเวณผลของกาแฟ ซึ่งจะทำการตากผลกาแฟไม่เกิน 15 วันเนื่องจากความชื้นของผลกาแฟนั้นไม่ควรต่ำกว่า 9 เปอร์เซ็นต์ หลังจากทำการตากผลกาแฟจนได้ความชื้นที่เหมาะสมจะนำ

ผลกาแฟไปทำการสีผลกาแฟแห้งเพื่อนำกาแฟไปทำการคั่วและทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสเพื่อตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดกาแฟ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2557)

4.3 กระบวนการหมักกาแฟแบบกึ่งแห้ง (semi-dry process หรือ honey process)

กระบวนการหมักกาแฟแบบกึ่งแห้งจะเป็นกระบวนการหมักที่มีการผสมระหว่างกระบวนการหมักกาแฟแบบเปียกและกระบวนการหมักกาแฟแบบแห้งโดยจะนำผลกาแฟสุกที่ไม่ลอยน้ำไปทำการสีเปลือกออกจากนั้นจะนำเมล็ดไปทำการตากเพื่อเริ่มต้นกระบวนการหมักโดยไม่มีการเติมน้ำซึ่งความหนาของการตากเมล็ดกาแฟนั้นจะมีความหนาไม่เกิน 5 เซนติเมตรและมีการเกลี่ยเมล็ดกาแฟเพื่อป้องกันการเกิดความชื้นและการเกิดเชื้อราที่บริเวณเมล็ดกาแฟ จะทำการตากเมล็ดกาแฟจนมีความชื้นเท่ากับ 10 ถึง 12 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจะทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยป้องกันเมล็ดไม่ให้มีความชื้นก่อนนำไปสีกะลาออกเมล็ดเพื่อนำกาแฟไปทำการคั่วและทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสเพื่อตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดกาแฟ [19] แสดงดังภาพประกอบ 5



ภาพประกอบ 5 ภาพรวมกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟแบบกึ่งแห้ง (semi-dry process)

ที่มา : Martinez, Silvia Juliana, et al. "Different inoculation methods for semi-dry processed coffee using yeasts as starter cultures." Food Research International 102 (2017): 333-340.

5. จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักกาแฟ

จุลินทรีย์มีอยู่ตามธรรมชาติในระหว่างกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยวหรือกระบวนการหมักกาแฟซึ่งในแต่ละพื้นที่ของการเพาะปลูก สภาพแวดล้อม กระบวนการหมักกาแฟแต่ละชนิดและปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมักกาแฟ เช่น อุณหภูมินั้นพบว่ามีผลต่อความหลากหลายของจุลินทรีย์โดยเชื้อจุลินทรีย์จะใช้สารอาหารจากเมือกที่ติดอยู่บริเวณของเมล็ดกาแฟหรือ mucilage และผลิตสาร metabolite ต่างๆ เช่น กรดอินทรีย์, สารประกอบในกลุ่ม Alcohol, Aldehyde, Ester และ Ketone ในกระบวนการหมักกาแฟที่แตกต่างกันส่งผลให้เกิดความแตกต่างของรสชาติกาแฟในแต่ละแหล่ง [3]

5.1 ความหลากหลายของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก

จากการรายงานในปี 2015 ของ Evangelista และคณะ มีการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักแบบเปียกของเมล็ดกาแฟอะราบิกาที่ประเทศบราซิลพบว่าในระหว่างกระบวนการหมักนั้นพบความหลายของ ยีสต์ แบคทีเรียที่เจริญในที่มีอากาศ และแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งยีสต์ที่มีความโดดเด่นในกระบวนการหมักนั้นประกอบด้วย *Meyerozyma caribbica*, *Hanseniaspora uvarum* และ *Torulaspora delbrueckii* นอกจากนี้กลุ่มแบคทีเรียที่เจริญในที่มีอากาศที่มีความโดดเด่นในกระบวนการหมักนั้นได้แก่ *Staphylococcus warneri, Erwinia persicina, Enterobacter asburiae* และ *Leuconostoc mesenteroides* [24] ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อะราบิกาแบบกึ่งแห้งที่ประเทศบราซิลนั้น Vilela และคณะ ได้มีการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์โดยการใช้เทคนิค PCR-DGGE ในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์พบว่าพบความหลากหลายของจุลินทรีย์หลายชนิด ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียที่มีความโดดเด่นในกระบวนการหมักนั้น*ได้แก่ Bacillus subtilis, Escherichia coli, Enterobacter agglomerans, Bacillus cereus* และ *Klebsiella pneumonia* และยังพบยีสต์ที่มีความโดดเด่นในกระบวนการหมักนั้นประกอบด้วย *Pichia anomala, Torulaspora delbrueckii และ Rhodotorula mucilaginosa* [25] จากการรายงานในปี 2021 มีรายงานเกี่ยวกับความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากเมล็ดกาแฟอะราบิกาของประเทศโคลัมเบียที่ผ่านการหมักโดยการใช้เทคนิค High-throughput sequencing พบว่ามีความหลากหลากของเชื้อแบคทีเรียมากถึง 695 สายพันธุ์และเชื้อรามากถึง 156 สายพันธุ์ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความโดดเด่นในกระบวนการหมักคือ *Leuconostoc* และยีสต์ที่มีความโดดเด่นในกระบวนการหมักคือ *Kazachstania* นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกรดอะซิติกที่มีความโดดเด่นในกระบวนการหมักคือ *Acetobacter* [26] จากการรายงานในปี 2020 ได้มีการศึกษาความหลากของ

จุลินทรีย์จากเมล็ดกาแฟอะราบิกาของประเทศออสเตรเลียพบว่ามีความหลากหลากของเชื้อแบคทีเรียมากถึง 40 สายพันธุ์และเชื้อรา 212 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถจำแนกเชื้อยีสต์ในระหว่างการเริ่มต้นกระบวนการหมักได้ 2 สายพันธุ์ได้แก่ *Hanseniaspora uvarum* และ *Pichia kudriavzevii* กลุ่มแบคทีเรียที่เจริญในที่มีอากาศที่มีความโดดเด่นในกระบวนการหมักคือ *Citrobacter* นอกจากนี้ยังพบกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งสายพันธุ์ที่มีความโดดเด่นได้แก่ *Leuconostoc mesenteroidesv* และ *Lactococcus lactis* [27]

5.2 การใช้จุลินทรีย์เป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักกาแฟ

การใช้จุลินทรีย์เป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟวิธีการต่างๆ เพื่อส่งเสริมการเพิ่มคุณภาพของเมล็ดกาแฟ แสดงดังตารางที่ 1 จากการศึกษาของ Martinez และคณะมีการใช้ยีสต์เป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักแบบกึ่งแห้งซึ่งมีการใช้ *Saccharomyces cerevisiae* CCMA0543, *Candida parapsilosis* CCMA0544 และ *Torulaspora delbrueckii* CCMA0684 พบว่าการใช้ *Saccharomyces cerevisiae* CCMA0543 เป็นหัวเชื้อในการเติมเชื้อลงในถังสามารถช่วยส่งเสริมคุณภาพของเมล็ดกาแฟได้ซึ่งส่งผลให้กาแฟนั้นมีรสชาติที่ดีขึ้นและมีคะแนนมากถึง 81 คะแนน (23) นอกจากนี้จากกระบวนหมักแบบกึ่งแห้งซึ่งเป็นวิธีเดียวกันนั้นมีการใช้ยีสต์เป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักกาแฟโดยมีการใช้หัวเชื้อยีสต์ 4 สายพันธุ์ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* UFLA YCN727, *Saccharomyces cerevisiae* UFLA YCN724, *Candida parapsilosis* UFLA YCN448 และ *Pichia guilliermondii* UFLA YCN731 ในการหมักกาแฟอะราบิกาที่ประเทศบราซิลพบว่ายีสต์สามารถเจริญได้ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟจนกระทั่งสิ้นสุดการหมักโดยกาแฟที่หมักโดยใช้หัวเชื้อยีสต์พบว่ามีคะแนนสูงถึง 79.33 คะแนนและรสชาติที่ดีกว่าการทดลองควบคุมโดยพบกลิ่นคาราเมล สมุนไพร และผลไม้ในกาแฟ (28) ในกระบวนการหมักแบบเปียก Pereira และคณะได้นำยีสต์ *Pichia fermentans* YC5.2 มาใช้สำหรับเป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักพบว่าในระหว่างกระบวนการหมักที่มีการหมักร่วมกันกับหัวเชื้อยีสต์จะช่วยเพิ่มปริมาณของสารระเหยบางชนิดหลังจากนำเมล็ดกาแฟไปคั่วก็ยังคงพบปริมาณของน้ำตาลและกรดอินทรีย์ ในการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่าการหมักกาแฟร่วมกับเชื้อยีสต์ได้รับรสชาติวานิลลาและกลิ่นดอกไม้ในกาแฟ[20] จากการรายงานในปี 2021 พบว่ามีการศึกษาการนำเชื้อยีสต์มาผสมกันใช้สำหรับเป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักแบบแห้งพบว่าการผสมกันระหว่าง *Candida parapsilosis* CCMA0544 และ *Torulaspora delbrueckii* CCMA0684 นั้นช่วยส่งเสริมคุณภาพของเมล็ดกาแฟจากประเทศบราซิล โดยส่งเสริมคุณภาพในด้านความเปรี้ยว

เนื้อสัมผัสของกาแฟ และรสชาติของกาแฟที่มีลักษณะรสของผลไม้ซึ่งมีคะแนนสูงถึง 84 คะแนนจึงจัดเป็นกาแฟที่มีคุณภาพดีพิเศษ [21] ในปี 2020 Wang และคณะได้มีการศึกษาพัฒนาคุณภาพของกาแฟจากประเทศอินโดนีเซียโดยการใช้ยีสต์เป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักแบบกึ่งแห้งร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติก โดยเชื้อที่ใช้ในกระบวนการหมักประกอบด้วยยีสต์ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ MERIT และ *Pichia kluyveri* สายพันธุ์ FROOTZEN และแบคทีเรียกรดแลคติก 1 สายพันธุ์ได้แก่ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* จากการตรวจสอบเมล็ดกาแฟหลังจากการคั่วพบว่าการหมักร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติกมีกลิ่นหอมหมักไวน์และผลไม้นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มรสชาติคาราเมลและความหวานมากขึ้นอีกด้วย [29] ในปีเดียวกันนั้นมีการศึกษาการใช้เชื้อโพรไบโอติกเป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักแบบแห้งโดยเชื้อที่ใช้นั้นประกอบด้วยเชื้อ 4 สายพันธุ์ได้แก่ *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 , *Lactobacillus plantarum* 299v และ *Lactobacillus acidophilus* NCFM พบว่าการเติมน้ำตาลกลูโคสไปในกระบวนการหมักนั้นจะช่วยส่งเสริมการอยู่รอดของเชื้อโพรไบโอติก 2 สายพันธุ์ได้แก่ *Lactobacillus rhamnosus* GG และ *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 ซึ่งผลจากการอยู่รอดของเชื้อทั้ง 2 สายพันธ์จะช่วยส่งเสริมผลคุณภาพของเมล็ดกาแฟ [30]

ตาราง 1 จุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับเป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักกาแฟ

จุลินทรีย์	กระบวนการหมัก	อ้างอิง
Saccharomyces cerevisiae CCMA0543 *Candida parapsilosis* CCMA0544 *Torulaspora delbrueckii* CCMA0684	Semi-dry	Matienz et al., 2017 (Brazil)
Saccharomyces cerevisiae UFLA YCN727 *Saccharomyces cerevisiae* UFLA YCN724 *Candida parapsilosis* UFLA YCN448 *Pichia guilliermondii* UFLA YCN731	Semi-dry	Evangelista et al., 2014 (Brazil)
Pichia fermentans YC5.2	Wet	Pereira et al., 2015 (Brazil)

ตาราง 1 (ต่อ)

จุลินทรีย์	กระบวนการหมัก	อ้างอิง
Candida parapsilosis CCMA0544 *Torulaspora delbrueckii* CCMA0684	Dry	Bressani et al., 2021 (Brazil)
Saccharomyces cerevisiae MERIT *Pichia kluyveri* FROOTZEN *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*	Semi-dry	Wang et al., 2020 (Singapore)
Lactobacillus rhamnosus GG *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 *Lactobacillus plantarum* 299v *Lactobacillus acidophilus* NCFM	Dry	Chan et al., 2020 (Singapore)

6. การเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดกาแฟที่ผ่านกระบวนการหมัก

การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดกาแฟที่ผ่านกระบวนการหมักโดยมีการใช้จุลินทรีย์เป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักจะมีความแตกต่างกับกระบวนการหมักที่ไม่มีการใช้จุลินทรีย์เป็นหัวเชื้อเนื่องจากจุลินทรีย์จะมีการใช้สารอาหารจากองค์ประกอบที่อยู่บริเวณของเมล็ดกาแฟในการผลิตสารเมแทบอไลต์ชนิดต่างๆ เช่น สารอินทรีย์ และสารตั้งต้นสำหรับการผลิตสารระเหยที่จะเกิดในขั้นตอนของกระบวนการคั่วเมล็ดกาแฟ ซึ่งมักจะส่งผลให้เกิดการพัฒนาคุณภาพของเมล็ดกาแฟด้านกลิ่น และรสชาติ และทำให้กาแฟในแต่ละพื้นที่การเพาะปลูก แต่ละกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยวมีความแตกต่างกัน จากการศึกษาของ Pereira และคณะ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดกาแฟก่อนและหลังจากการคั่วเมื่อมีการใช้เชื้อยีสต์ *Pichia fermentans* YC5.2 ในกระบวนการหมักและมีการตรวจสอบการผลิตน้ำตาลและกรดอินทรีย์โดยการใช้เครื่องแยกชนิดสาร หรือ HPLC พบว่าเมล็ดกาแฟที่มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักนั้นหลังจากกระบวนการหมักมีการผลิต Fumaric acid เกิดขึ้นเมื่อเทียบกับเมล็ดกาแฟที่ไม่มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักและมีปริมาณของ Acetic acid และ Succinic

acid สูงกว่า นอกจากนี้การตรวจสอบการเกิด Volatile compound พบว่าเมล็ดกาแฟที่มีการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักนั้นจะพบสาร Isoamyl, Acetate และ 2-Heptanone มีความเข้มข้นสูงมากกว่าเมล็ดกาแฟที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักและมีการตรวจสอบพบ Hexyl acetate และ Isobutyl acetate ในเมล็ดกาแฟที่มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักเท่านั้น จากการทดสอบการผลิตสารระเหยในเมล็ดกาแฟหลังจากการคั่วพบการผลิต 2-Octanol, Ethyl acetate และ 2-Heptanone ในเมล็ดกาแฟที่มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักเท่านั้น [8] ในปี 2020 มีการใช้เชื้อโพรไบโอติกเป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักกาแฟแบบแห้ง พบว่ามีการผลิตกรดอินทรีย์ได้แก่ Lactic acid และ Citric acid ที่มีความเข้มข้นสูงกว่าเมล็ดกาแฟที่ไม่มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก นอกจากนี้ยังมีความเข้มข้นของสารบางชนิดที่สูงกว่าเมล็ดกาแฟที่ไม่มีการใช้เชื้อในกระบวนการหมัก ได้แก่ Alcohol, Ketone และ Volatile phenols [30] จากการศึกษาของ Lee และคณะมีการนำเชื้อยีสต์ *Yarrowia lipolytica* มาเป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟเพื่อศึกษาการผลิต Volatile compound และ Non-volatile compound พบว่าเมล็ดหลังจากกระบวนการนั้นมีความเข้มข้นของน้ำตาลลดลง 1.2 เท่า ความเข้มข้นของ Amino acid และ Phenolic acid ลดลง 1.3 เท่าและมีการเพิ่มขึ้นของ Alkane และ Aldehyde เมื่อเทียบกับเมล็ดกาแฟที่ไม่มีการใช้เชื้อจุลิทรีย์ในกระบวนการหมัก ซึ่งจากผลการทดลองนี้พบว่า จุลินทรีย์ที่ใช้นั้นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นในการผลิต Volatile compounds ในเมล็ดกาแฟ [31] ในปีเดียวกันนั้น Martinez และคณะ ได้มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมีในเมล็ดกาแฟที่มีกระบวนการหมักแบบกึ่งแห้งโดยมีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักพบว่า มีการผลิต Alcohol, Acid, Ester และ Aromatic สูงขึ้นในเมล็ดกาแฟหลังจากกระบวนการหมักเมื่อเทียบกับเมล็ดกาแฟที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก นอกจากนี้หลังจากนำเมล็ดกาแฟที่มีการหมักร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ไปผ่านกระบวนการคั่วพบว่ามีการผลิตสาร Ketone, Pyrazines และ Pyridines สูงกว่าเมล็ดกาแฟที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อ [23] ในปี 2021 มีการศึกษาการใช้ยีสต์ 6 สายพันธุ์เป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมัก ได้แก่ *Hanseniaspora uvarum, Pichia kudriavzevii, Pichia fermentans, Candida railenensis, Candida xylopsoci* และ *Wickerhamomyces anomalus* โดยเปรียบเทียบกับเมล็ดกาแฟก่อนกระบวนการหมักพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมีในเมล็ดกาแฟที่มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักพบว่ามีปริมาณความเข้มข้นของ Ethanol, Isoamyl alcohol, 3-Methyl-2-butanol, 1- Nonanol และ Phenylethyl alcohol หลังจากกระบวนการหมักที่มีการหมักร่วมกับเชื้อ P. fermentans, P. kudriavzevii และ H. uvarum นอกจากนี้หลังจาก

กระบวนหมักร่วมกับหัวเชื้อยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์นั้นยังสามารถเพิ่มการผลิตสารระเหยและสารอินทรีย์ได้หลายชนิดเมื่อเทียบกับเมล็ดกาแฟก่อนกระบวนการหมัก ได้แก่ Acetic acid, Ethanol, Isoamyl alcohol, 2-Butanol, 3-Methyl, 1-Nonanol, Phenylethyl Alcohol, Acetaldehyde, 3-Methylbutanal, 2,2-Dimethyl hexanal, Benzaldehyde, Ethyl acetate, Methyl butanoate, 2-Propanon และ 4-Vinylguaiacol [32]

7. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในกระบวนการหมักกาแฟ

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักนั้นมีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และส่งผลต่อการผลิตสารเมทาบอไลต์ของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์นั้น ได้แก่ องค์ประกอบของสารอาหาร เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งแร่ธาตุ และอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ ปัจจัยทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิในระหว่างกระบวนการหมัก และ ค่าความเป็นกรด-ด่างในระหว่างกระบวนการหมัก

7.1 แหล่งคาร์บอน (Carbon source)

จุลินทรีย์ในกระบวนการหมักต้องการสารที่มีองค์ประกอบเป็นคาร์บอนเป็นหลักเพื่อใช้สำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่นั้นมักจะนำสารอาหารที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบไปใช้ในการสร้างองค์ประกอบของเซลล์ซึ่งในกระบวนการหมักนั้นมักพบจุลินทรีย์ที่มีการย่อยสารประกอบอินทรีย์ เช่น แป้ง หรือน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้สำหรับการผลิตพลังงาน จากการศึกษาของ Mohammadkazemi และคณะ ได้มีการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนทั้ง 5 แหล่ง ได้แก่ Syrup, Glucose, Mannitol, Sucrose และ Food-grade sucrose เพื่อใช้สำหรับการผลิตเซลล์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าการใช้ Mannitol เป็นแหล่งคาร์บอนในองค์ประกอบของสารอาหารนั้นสามารถผลิตเซลล์แบคทีเรียได้สูงสุด (33) จากการศึกษาในปี 2017 มีการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนในการผลิตเซลล์ยีสต์ *Pichia kudriavzevii ITV-S42* เพื่อใช้สำหรับการผลิตเอทานอลโดยมีการศึกษาผลของ Glucose, Fructose, Sucrose, Xylose และ Glycerol พบว่าการใช้ Glucose และ Fructose นั้นเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นจะช่วยส่งเสริมในการผลิตเซลล์ที่สูงสุด [34] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูโคสที่ใช้สำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเชื้อ *Lactobacillus casei* เพื่อใช้ในกระบวนการหมักสำหรับการผลิตกรดแลคติก พบว่าการใช้ Glucose ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 80 กรัมนั้นช่วยส่งการผลิตเซลล์และทำให้สามารถผลิตกรดแลคติกได้ถึง 122.71 มิลลิกรัมต่อลิตร [35]

7.2 แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source)

แหล่งไนโตรเจนถือเป็นองค์ประกอบของสารอาหารอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อที่จะผลิตสารเมทาบอไลต์ชนิดต่างๆ ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่มีในองค์ประกอบของอาหารมีทั้งแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ และอนินทรีย์ ได้แก่ Ammonium sulfate, Ammonium nitrate, Urea, Peptone เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการใช้ของเสียที่เป็นของเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเพื่อนำกลับมาใช้สำหรับเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้สำหรับผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น Corn-steep liquor และ Soybean meal เป็นต้น จากการศึกษาของ Nwokoro และคณะ มีการศึกษาผลแหล่งไนโตรเจนที่เป็นไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่ Ammonium sulfate, Sodium nitrate, Potassium nitrate และ Urea ใช้สำหรับการเจริญและผลิตเซลล์ของยีสต์ Candida utilis พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ 10 วันการใช้ Ammonium sulfate เป็นแหล่งไนโตรเจนจะช่วยทำให้มีการผลิตสารชีวมวล (Cell biomass) สูงที่สุด [36] ในปี 2002 มีการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเซลล์ของเชื้อ *Pantoea agglomerans* CPA-2 โดยศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เป็นอินทรีย์และอนินทรีย์ โดยแหล่งไนโตรเจนที่เป็นอินทรีย์ ได้แก่ Yeast extract, Meat extract, Peptone, Tryptone และ Nutrient broth และแหล่งไนโตรเจนที่เป็นอนินทรีย์ ได้แก่ Ammonium chloride, Ammonium sulfate และ Ammonium nitrate พบว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นอนินทรีย์นั้นจะช่วยทำให้มีการผลิตเซลล์สูงที่สุด [37] นอกจากนี้ Ayad และคณะ ได้มีการศึกษาผลของแหล่งไนโตเจนต่อการผลิตเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติก คือ *Lactobacillus reuteri* โดยแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการศึกษาจะเติมส่วนประกอบลงในอาหาร Lactobacilli MRS ได้แก่ Peptone, Tryptone, Proteose peptone และ Phytone peptone เทียบกับการใช้แหล่งไนโตรเจรที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมนั่นคือ Date palm extract ที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนอื่นเพิ่มเติม พบว่าการใช้สารสกัดจาก Date palm extract นั้นทำให้มีการผลิตเซลล์เท่ากับ 7.03± 0.1 Log CFU/mL เมื่อเทียบกับการใช้ Lactobacilli MRS ร่วมกับ Phytone peptone พบว่ามีการผลิตเซลล์เท่ากับ 7.90± 0.24 Log CFU/mL [38]

7.3 แหล่งแร่ธาตุ (Mineral source)

แหล่งแร่ธาตุเป็นสารอาหารที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการเจริญและผลิตเซลล์ในปริมาณที่น้อยเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน โดยแหล่งแร่ธาตุส่วนใหญ่มักเป็นสารอาหารที่จุลินทรีย์ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวเคมี โดยแหล่งแร่ธาตุนั้นแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แร่ธาตุที่ต้องการปริมาณ (Major element) เช่น Phosphorus, Magnesium, Potassium, Sulfur และ Sodium เป็นต้น และแร่ธาตุที่ต้องการในปริมาณน้อย (Minor หรือ Trace element)

เป็นแหล่งแร่ธาตุที่ต้องการในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้นซึ่งมักจะเป็นส่วนประกอบของสารอาหารชนิดอื่นๆ จากการศึกษาในปี 2018 ของ Gao และคณะ ได้ทำการศึกษาผลของแหล่งแร่ธาตุในกลุ่ม Trace element ที่มีผลต่อการส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus polymyxa* Pp-7250 ซึ่งแหล่งแร่ธาตุที่ใช้ในการศึกษามี 4 ชนิด ได้แก่ Copper, Ferrum, Manganese และ Zink พบว่าการใช้แร่ธาตุทั้ง 4 ชนิดนี้ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *Paenibacillus polymyxa* Pp-7250 แต่แร่ธาตุที่ส่งเสริมการเจริญได้มากที่สุดคือ Zink [39] จากการศึกษาของ Bayer และคณะพบว่าการใช้แหล่งธาตุช่วยในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อยีสต์ Candida intermedia โดยมีการศึกษาผลของแร่ธาตุ 5 ชนิด ได้แก่ Phosphorus, Potassium, Calcium, Magnesium) และ Sodium พบว่าการใช้การใช้ Phosphorus เป็นแหล่งแร่ธาตุในการส่งเสริมการเจริญนั้นทำให้มีการผลิตเซลล์ได้สูงสุด [40]

บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ

ตาราง 2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ	บริษัท	ประเทศ
ขวดแก้วเล็ก (Vial)	KIMA	China
เข็มฉีดยาปลอดเชื้อ	Nipro	Japan
เครื่องกวนสารชนิดให้ความร้อน (Hot plate stirrer)	Daihan Biomedical	Korea
เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator)	Buchi	Switzerland
เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ	Labwit	USA
เครื่องเขย่าแบบไม่ควบคุมอุณหภูมิ	Genlab	China
เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer)	Scientific Industries	USA
เครื่องชั่งสาร	Sartorius	Germany
เครื่องดูดความชื้น (Dessicator)	Kartell	Italy
เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation)	Bio-Red	USA
เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)	Tomy	Japan
เครื่องวัดความหวาน (Hand refractometer)	ATAGO	Japan
เครื่องวัดความหวานแบบดิจิตอล (Digital refractometer)	ATAGO	Japan
เครื่องวัดคุณภาพน้ำ (TDS meter)	Ponpe	Thailand
เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโน (Nanodrop)	Thermo Scientific	USA
เครื่องวัดพีเอช	Hanna	Romania

ตาราง 2 (ต่อ)

อุปกรณ์และเครื่องมือ	บริษัท	ประเทศ
เครื่องวัดระดับความร้อน (Thermometer)	SK Sato	Japan
เครื่องสำหรับแยกสาร (High performance chromatography)	Shimadzu	Japan
เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis)	TOYOBO	Japan
ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	Shel Lab	USA
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)	Biobase	China
ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air sterilizing oven)	Memmert	Germany
โถบ่มไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar)	Thermo Fisher Scientific	UK
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)	Tomy	Japan
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	Memmert	Germany

อาหารและสารเคมี

ตาราง 3 อาหารและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

อาหารและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
3,5-Dinitro-2-hydroxybenzoesaure,98%	Aldrich	USA
3,5-Dinitrosalicylic acid, 98%	Sigma	USA
Acetonitrile 99.9% HPLC Gradient	Loba	India
Agar	Himedia	India
Agarose	Invitrogen	USA
Ammonium sulfate	Merck	Germany
Beef extract	Himedia	India
Dextrose anhydrous (D-Glucose)	SRL	Japan

ตาราง 3 (ต่อ)

อาหารและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
D(+)-Glucose anhydrous	Kemaus	Australia
Ethyl acetate	Zen point	Thailand
Fructose	SRL	Japan
Galactose	DIFCO	USA
Glycerol	Kemaus	Australia
Hydrochloric acid fuming 37%	Merck	Germany
Lactobacillus MRS Broth	Himedia	India
Lactose	Merck	Germany
Maltose	SRL	Japan
Molasses	M Molasses	Thailand
Peptone, Granulated for bacteriology	SRL	Japan
Sodium chloride	Ajax Finechem	Australia
Sodium hydroxide	Ajax Finechem	Australia
Sodium potassium tartrate tetrahydrate	SRL	Japan
Sodium sulfate anhydrous	Merck	Germany
Sucrose	Ajax Finechem	Australia
Urea	Ajax Finechem	Australia
Xylose	Loba	India
Yeast extract	Himedia	India

วิธีดำเนินการวิจัย

1.การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในกระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้า

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการคัดแยกและคัดเลือกได้จากกระบวนการหมักกาแฟที่ดอยผาตั้ง จังหวัดเชียงรายในปี 2561 แสดงดังตาราง 4 ประกอบด้วยยีสต์ทั้งหมด 6 ไอโซเลท แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 5 ไอโซเลท และแบคทีเรียชนิดอื่นๆอีก 2 ไอโซเลท

ตาราง 4 จุลินทรีย์ทั้งหมดที่คัดแยกคัดเลือกได้จากกระบวนการหมักกาแฟที่ดอยผาตั้ง จังหวัดเชียงรายในปี 2561

ลำดับ	ชนิดจุลินทรีย์	สายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์
1	Yeast	*Wickerhamomyces anomalus* YWP1-3
2	Yeast	*Candida quercitrusa* YWP1-4
3	Yeast	*Pichia kluyveri* YWP1-5
4	Yeast	*Pichia kluyveri* YWP1-7
5	Yeast	*Pichia kluyveri* YMP1-1
6	Yeast	*Pichia kluyveri* YML1-1
7	Lactic acid bacteria	*Weissella cibaria* LML1-1
8	Lactic acid bacteria	*Leuconostoc pseudomesenteroides* LWP2-1
9	Lactic acid bacteria	*Lactococcus lactis* LWS1-4
10	Lactic acid bacteria	*Leuconostoc citreum* LWSS2-1
11	Lactic acid bacteria	*Lactococcus lactis* LWSS2-2
12	Bacteria	*Exiguobacterium acetylicum* BWS1-1
13	Bacteria	*Kosakonia* sp B1STW1-2

1.1 การเตรียมหัวเชื้อ

การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ทำได้โดยยีสต์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วมาถ่ายเชื้อลงในอาหาร Yeast malt ager (ภาคผนวก) โดยวิธีการ Streak plate บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังการบ่มถ่ายเชื้อลงในอาหาร Yeast extract broth เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทำได้โดยนำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือก มาถ่ายเชื้อลงในอาหาร Lactobacillus MRS agar โดยวิธีการ Streak plate บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศหลังจากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ โดยการนำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว มาถ่ายเชื้อลงในอาหาร Nutrient agar โดยวิธีการ Streak plate บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังการบ่มถ่ายเชื้อลงในอาหาร Nutrient broth เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที โดยที่ทำการเตรียมหัวเชื้อด้วยการวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่า OD เท่ากับ 1.0 ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งแต่ละสภาวะนั้นจะมีอัตราส่วนของหัวเชื้อ ได้แก่ เชื้อสายพันธุ์เดี่ยว (SS; 280 มิลลิลิตร), ยีสต์ : แบคทีเรียกรดแลคติก : แบคทีเรีย (YLB; 140: 70: 70 มิลลิลิตร), ยีสต์ : แบคทีเรียกรดแลคติก (YL; 140 : 140 มิลลิลิตร), ยีสต์ : แบคทีเรียกรดแลคติก : แบคทีเรียกรดแลคติก (YLL; 140 : 70 :70 ml), ยีสต์ : ยีสต์ (140 : 140 มิลลิลิตร), ยีสต์ : ยีสต์ : ยีสต์ : ยีสต์ (Y4; 70 : 70 : 70 : 70 ml) ซึ่งอัตราส่วนของหัวเชื้อในแต่ละสภาวะนั้นจะใช้สำหรับกาแฟ 7 กิโลกรัม

1.2 การเตรียมเมล็ดกาแฟอะราบิก้า

ผลเชอรี่ที่ใช้ในการทดลองได้ทำการขนส่งโดยใช้รถยนต์ที่มีตู้เก็บความเย็นจากไร่กาแฟ จังหวัด เชียงใหม่ เข้ามาสู่กระบวนการหมักที่ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา อาคาร 19 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ การเตรียมเมล็ดกาแฟอะราบิก้าทำได้โดยนำผลเชอรี่หรือผลกาแฟที่ได้จากต้นกาแฟมาทำการล้างจนสะอาด คัดแยกเมล็ดที่ลอยน้ำออก จากนั้นนำมาทำการสีเปลือกออกและล้างจนกว่านำที่ใช้ล้างเมล็ดนั้นจะใส และนำเมล็ดกาแฟอะราบิก้าที่มีเมือกติดอยู่บริเวณของเมล็ดมาใช้ในกระบวนการหมักต่อไป

1.3 การออกแบบสภาวะการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟอะราบิก้าแบบเปียก

นำหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้มาทำการหมักเมล็ดกาแฟ โดยมีการออกแบบสภาวะในการหมักเมล็ดกาแฟอะราบิก้าดังตาราง 5

ตาราง 5 การออกแบบสภาวะในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟอะราบิก้าโดยการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์

ชื่อสภาวะ	จุลินทรีย์ที่ใช้	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)
CT	-	19	14
SS01	*Pichia kluyveri* strain YWP1-5	19	14
YLB01	*Candida quercitrusa* strain YWP1-4 *Leuconostoc citreum* strain LWSS2-1 *Exiguobacterium acetylicum* strain BWS1-1	19	14
YL01	*Pichia kluyveri* strain YMP1-1 *Lactococcus lactis* strain LWSS2-2	19	14
YLL01	*Pichia kluyveri* strain YML1-1 *Weissella cibaria* strain LML1-1 *Lactococcus lactis* strain LWS1-4	19	14
YLB02	*Pichia kluyveri* strain YWP1-7 *Leuconostoc pseudomesenteroides* strain LWP2-1 *Kosakonia* sp. strain B1STW1-2	19	14
YL02	*Pichia kluyveri* strain YWP1-5 *Lactococcus lactis* strain LWSS2-2	19	14
YL04	*Pichia kluyveri strain YMP1-1* *Weissella cibaria strain LML1-1*	19	14
YY01	*Pichia kluyveri strain YWP1-5* *Pichia kluyveri strain YML1-1*	19	14
SS02	*Wickerhamomyces anomalus strain YWP1-3*	19	14

ตาราง 5 (ต่อ)

ชื่อสภาวะ	จุลินทรีย์ที่ใช้	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)
Y4	*Pichia kluyveri* strain YWP1-5	19	14
	Pichia kluyveri strain YMP1-1		
	Pichia kluyveri strain YML1-1		
	Wickerhamomyces anomalus strain YWP1-3		
YL02-01	*Pichia kluyveri* strain YMP1-1	19	18
	Lactococcus lactis strain LWSS2-2		
YL02-02	*Pichia kluyveri* strain YMP1-1	25	18
	Lactococcus lactis strain LWSS2-2		
YL02-03	*Pichia kluyveri* strain YMP1-1	19	10
	Lactococcus lactis strain LWSS2-2		
YL02-04	*Pichia kluyveri* strain YMP1-1	25	10
	Lactococcus lactis strain LWSS2-2		
Y4-01	*Pichia kluyveri* strain YWP1-5	19	18
	Pichia kluyveri strain YMP1-1		
	Pichia kluyveri strain YML1-1		
	Wickerhamomyces anomalus strain YWP1-3		
Y4-03	*Pichia kluyveri* strain YWP1-5	19	10
	Pichia kluyveri strain YMP1-1		
	Pichia kluyveri strain YML1-1		
	Wickerhamomyces anomalus strain YWP1-3		
Y4-04	*Pichia kluyveri* strain YWP1-5	25	10
	Pichia kluyveri strain YMP1-1		
	Pichia kluyveri strain YML1-1		
	Wickerhamomyces anomalus strain YWP1-3		

ตาราง 5 (ต่อ)

ชื่อสภาวะ	จุลินทรีย์ที่ใช้	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)
YL02-05	*Pichia kluyveri* strain YMP1-1 *Lactococcus lactis* strain LWSS2-2	10	14
Y4-05	*Pichia kluyveri* strain YWP1-5 *Pichia kluyveri* strain YMP1-1 *Pichia kluyveri* strain YML1-1 *Wickerhamomyces anomalus* strain YWP1-3	10	14
YL02-06	*Pichia kluyveri* strain YMP1-1 *Lactococcus lactis* strain LWSS2-2	10	18
Y4-06	*Pichia kluyveri* strain YWP1-5 *Pichia kluyveri* strain YMP1-1 *Pichia kluyveri* strain YML1-1 *Wickerhamomyces anomalus* strain YWP1-3	10	18

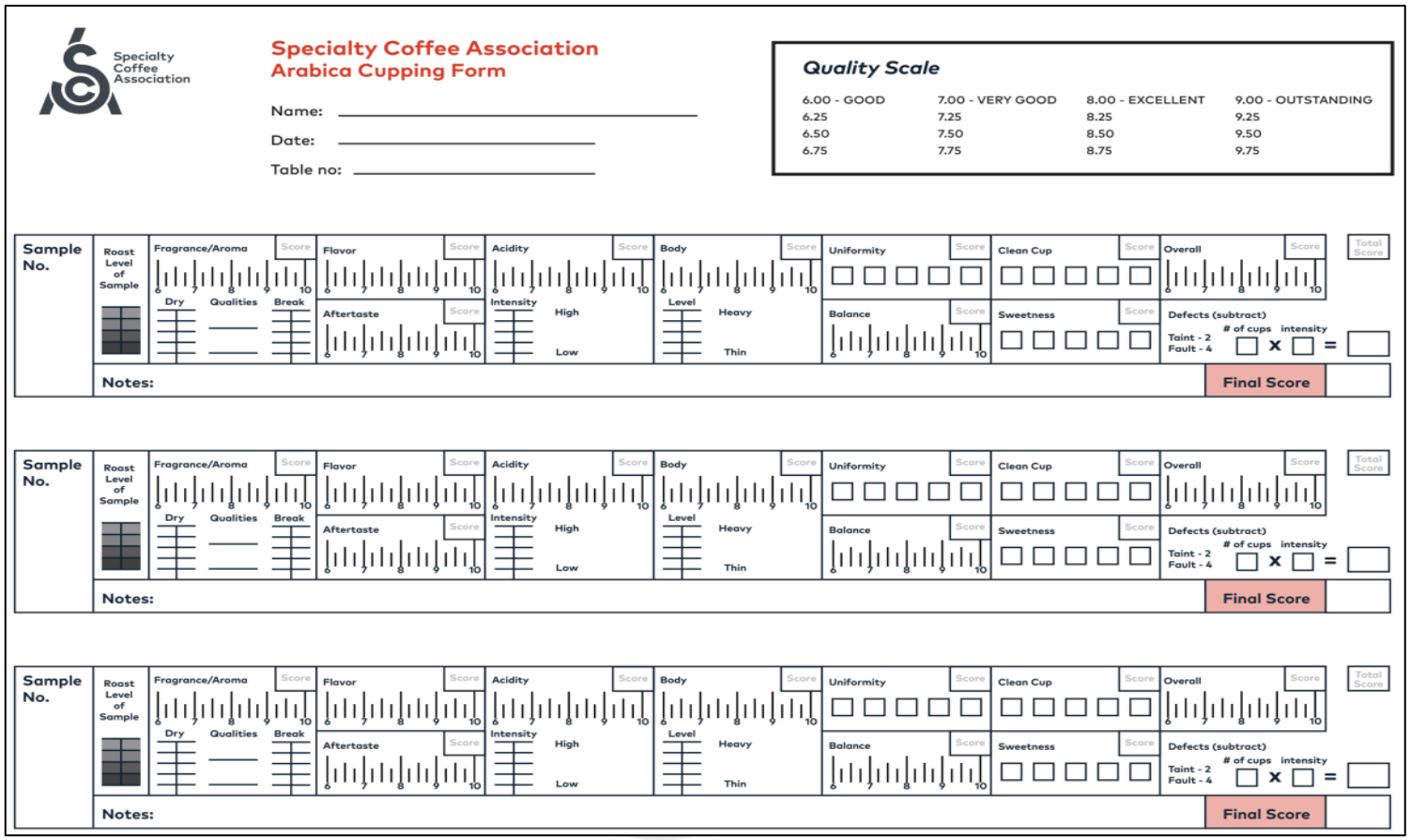
จำนวนการทดสอบการใช้หัวเชื้อในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟแบบเปียกแบ่งออกเป็น 24 สภาวะรวมทั้งสภาวะที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก โดยสภาวะที่มีการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ 1 ชนิด แทนด้วย SS สภาวะที่หมักร่วมกันระหว่างยีสต์ และแบคทีเรียกรดแลคติก แทนด้วย YL และ YLL และการหมักด้วยเชื้อยีสต์แทนด้วย Y และ YY แต่ละสภาวะทำการทดลอง 2 ซ้ำ โดยทำการถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ตามการออกแบบการทดลองที่ความเข้มข้น 10% v/w ลงในถังพลาสติกขนาด 40 ลิตรที่มีการเติมเมล็ดกาแฟอะราบิก้าที่ปอกเปลือกแล้วจำนวน 7 กิโลกรัม เติมน้ำ 6 ลิตร ให้ท่วมเมล็ดกาแฟ กวนผสมให้หัวเชื้อ น้ำ และเมล็ดกาแฟผสมกันอย่างทั่วถึง ตั้งไว้ที่ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา อาคาร 19 คณะวิทยาศาสตร์ ชั้น 12 ห้อง 1215 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒซึ่งเป็น coffee education center @ swu

1.4 การเก็บเกี่ยวกาแฟอะราบิก้าหลังจากกระบวนการหมัก

หลังจากกระบวนการหมักผ่านไปตามระยะเวลาที่ได้ทำการออกแบบการทดลองนั้น นำน้ำหมักออกจากถังที่ทำการหมักกาแฟ จากนั้นล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำประปาจนเมือกที่ติดอยู่ที่บริเวณเมล็ดกาแฟนั้นได้ออกจนหมด แล้วนำเมล็ดกาแฟไปตากจนมีความชื้นลดลงถึง 10-12% เมล็ดกาแฟที่ผ่านการตากแห้งแล้วจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ถุงกันความชื้น (grainpro) ภายใต้สภาวะแห้งเป็นระยะเวลา 3-5 เดือน เมล็ดกาแฟที่แห้งแล้วจะนำไปทำการกะเทาะกะลาออกจากนั้นจะนำไปทำการคั่วและตรวจสอบคุณภาพโดยการชิมและใช้วิธีการทางเคมีต่อไป

1.5 การตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดกาแฟโดยการชิม (Sensory analysis)

หลังจากกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟด้วยหัวเชื้อจุลินทรีย์ นำกาแฟมาตากแห้ง ให้มีความชื้นประมาณ 10-12% ทำการกะเทาะกะลากาแฟ แล้วจึงนำไปคั่วที่อุณหภูมิ 240 องศาฟาเรนไฮต์ ประมาณ 9-10 นาทีตามวิธีการมาตรฐานของ SCAA cupping protocol ในการประเมินรสชาติกาแฟ ซึ่งมีการวัดระดับสีกาแฟคั่วอยู่ประมาณ 55-65 Agtron เริ่มทำการประเมินรสชาติของกาแฟโดยการชิมภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากการคั่ว นำกาแฟมาแช่น้ำที่อุณหภูมิ 92-94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที โดย Q- Arabica Grader จำนวน 3 ท่านที่ได้รับใบรับรองจากสถาบัน coffee quality institute (CQI) เพื่อประเมินรสชาติของกาแฟแต่ละชนิดที่ทำการทดลอง โดยใช้แบบฟอร์มประเมินคุณภาพของกาแฟตามวิธีการมาตรฐานของ SCAA cupping protocol (ภาพประกอบ 6) โดยคะแนนการประเมินเต็ม 100 คะแนน ทำการประเมินในด้านความหวาน ความเปรี้ยว ความสะอาด ความสมดุล ความคงค้างของกาแฟหลังจากการดื่ม เนื้อสัมผัส ความเหมือนกันของรสชาติในแต่ละถ้วยตัวอย่างซึ่งจะทำการทดสอบตัวอย่างละ 2 ซ้ำ



ภาพประกอบ 6 แบบฟอร์มประเมินคุณภาพของกาแฟตามวิธีการมาตรฐานของ SCAA cupping protocol

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักกาแฟสายพันธุ์อะราบิก้าในกระบวนการหมักแบบเปียก

2.1 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้าแบบเปียก

นำสภาวะที่คัดเลือกได้จากการทดสอบคุณภาพของเมล็ดกาแฟโดยการชิม จากการทดลองที่ 1 ได้แก่ YL03 และ YL4-04 มาทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักกาแฟ โดยทำการออกแบบสภาวะในการหมักเมล็ดกาแฟแสดงดังตาราง 6

ตาราง 6 การออกแบบระยะเวลาที่เหมาะสม ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟอะราบิก้าโดยการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

ชื่อสภาวะ	**จุลินทรีย์ที่ใช้**	**เวลา (ชั่วโมง)**
CT	-	72
YL03-12	*Pichia kluyveri YWP1-5* *Weissella cibaria LML1-1*	12
YL03-24	*Pichia kluyveri* YWP1-5 *Weissella cibaria* LML1-1	24
YL03-48	*Pichia kluyveri* YWP1-5 *Weissella cibaria* LML1-1	48
YL03-72	*Pichia kluyveri* YWP1-5 *Weissella cibaria* LML1-1	72
Y4-0412	*Pichia kluyveri* YWP1-5 *Pichia kluyveri* YMP1-1 *Pichia kluyveri* YML1-1 *Wickerhamomyces anomalus* YWP1-3	12

ตาราง 6 (ต่อ)

ชื่อสภาวะ	จุลินทรีย์ที่ใช้	เวลา (ชั่วโมง)
Y4-0424	*Pichia kluyveri* YWP1-5	24
	Pichia kluyveri YMP1-1	
	Pichia kluyveri YML1-1	
	Wickerhamomyces anomalus YWP1-3	
Y4-0448	*Pichia kluyveri* YWP1-5	48
	Pichia kluyveri YMP1-1	
	Pichia kluyveri YML1-1	
	Wickerhamomyces anomalus YWP1-3	
Y4-0472	*Pichia kluyveri* YWP1-5	72
	Pichia kluyveri YMP1-1	
	Pichia kluyveri YML1-1	
	Wickerhamomyces anomalus YWP1-3	

การทดสอบการหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักแบบเปียก แบ่งออกเป็น 9 สภาวะรวมทั้งสภาวะที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก แต่ละสภาวะทำการทดลอง 2 ซ้ำ โดยทำการถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ตามการออกแบบการทดลอง ที่ความเข้มข้น 10% v/w ลงในถังพลาสติกขนาด 40 ลิตรที่มีการเติมเมล็ดกาแฟอะราบิก้าที่ปอกเปลือกแล้วจำนวน 7 กิโลกรัม เติมน้ำ 6 ลิตร ให้ท่วมเมล็ดกาแฟ กวนผสมให้หัวเชื้อ น้ำ และเมล็ดกาแฟผสมกันอย่างทั่วถึง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ที่วิสาหกิจชุมชม บ้านแม่ตอนหลวง อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ เป็นเวลา 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวกาแฟสายพันธุ์อะราบิก้าหลังจากกระบวนการหมัก (แสดงดังขั้นตอน 1.4) และตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดกาแฟโดยการชิม (แสดงดังขั้นตอน 1.5)

3. การขยายขนาดการหมักเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อะราบิก้า

ในการขยายขนาดการหมักเมล็ดกาแฟทำได้โดยนำสภาวะที่ผ่านการคัดเลือกในขั้นตอนที่ 1 และ 2 แล้ว ได้แก่ สภาวะ YL-03 และ Y4-04 ซึ่งเป็นสภาวะที่ทำให้เมล็ดกาแฟมีคุณภาพที่ดี โดยพิจารณาการทดสอบคุณภาพของเมล็ดกาแฟโดยการชิม นำมาขยายขนาดของการหมักในไร่กาแฟของเกษตรกร 2 พื้นที่ ได้แก่ ไร่กาแฟ อ.ห้วยน้ำดัง จ.แม่ฮ่องสอน และ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ โดยนำผลเชอรี่กาแฟล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นสีเปลือกของเชอรี่ออก ล้างเมล็ดกาแฟอีกครั้งจนสะอาด นำเมล็ดกาแฟที่สะอาดแล้วจำนวน 70 กิโลกรัมมาทำการหมักร่วมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ในถัง เติมน้ำให้ท่วมเมล็ดกาแฟ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ที่ อ.ห้วยน้ำดัง จ.แม่ฮ่องสอน ประมาณ 10-15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 14 และ 18 ชั่วโมง และ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 44 ชั่วโมง ล้างเมล็ดกาแฟให้สะอาด และนำไปตากให้แห้งและมีความชื้นอยู่ในช่วง 10-12 เปอร์เซ็นต์ (แสดงดังขั้นตอน 1.3) และตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดกาแฟโดยการชิม (แสดงดังขั้นตอน 1.4) นอกจากนี้ในระหว่างกระบวนการหมักกาแฟ ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักกาแฟก่อนและหลังกระบวนการหมักเพื่อทำการวิเคราะห์ จำนวนประชากรจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมัก และทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสาร Metabolite โดยการใช้วิธีทางเคมี (รายละเอียดในหัวข้อ 4)

4.การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในระหว่างกระบวนการหมักกาแฟอะราบิกาในกระบวนการหมักแบบเปียกโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์

4.1 การวิเคราะห์ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลในตัวอย่างน้ำหมักก่อน-หลังกระบวนการหมัก โดยใช้เทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC)

4.1.1 การเตรียมตัวอย่าง

ทำการเตรียมตัวอย่างโดยนำตัวอย่างน้ำก่อน-หลังกระบวนการหมักมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 g เพื่อทำการแยกตะกอนออกจากตัวอย่างน้ำหมัก จากนั้นนำมาทำการกรองผ่านจุกกรองที่มีเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอนลงในขวดแก้วเล็ก เพื่อนำตัวอย่างน้ำหมักไปใช้สำหรับการวิเคราะห์ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาล

4.1.2 การวิเคราะห์

การวิเคราะห์หาชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลโดยเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) โดยนำตัวอย่างน้ำหมักมาทำการวัดหาปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดในแต่ละการทดลองที่ออกแบบไว้ โดยใช้เครื่อง HPLC (ยี่ห้อ

SHIMAZU, รุ่น 10 A, Japan) โดยใช้คอลัมน์ waters high performance carbohydrate columns ซึ่งเป็นคอลัมน์ชนิด reversed-phase chromatography โดยมีการใช้ mobile phase เป็น Acetonitrile ต่อ น้ำ ในอัตราส่วน 75 ต่อ 25 อัตราการไหลเท่ากับ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ใช้ความยาวคลื่นเท่ากับ 195 นาโนเมตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส มีการใช้น้ำตาลมาตรฐาน 5 ชนิด ได้แก่ fructose, dextrose, sucrose, maltose และ lactose ซึ่งมี retention time เท่ากับ 2, 4, 5, 7, 11 และ 10 นาทีตามลำดับนำพื้นที่ใต้กราฟของน้ำตาลมาตรฐานเทียบกับตัวอย่างน้ำหลังกระบวนการหมักเพื่อคำนวณเป็นค่าความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดที่ได้จากตัวอย่างน้ำหลังกระบวนการหมัก

4.2 การวิเคราะห์สาร Metabolite ในเมล็ดกาแฟคั่วโดยใช้ Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

4.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างเมล็ดกาแฟหลังจากการคั่วมาบดให้เป็นผง ชั่งน้ำหนัก 0.4071 กรัม ใช้ 1% ของสารละลาย Sodium 3-(trimethylsilyl) propionate เป็นตัวทำละลายในการสกัดสาร โดยใช้อุณหภูมิสำหรับการสกัดเท่ากับ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำส่วนสารละลายไปทำการแยกสารโดยวิธีการ sonicate เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายมากรองและเก็บตัวอย่างเพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์

4.2.2 การวิเคราะห์

การวิเคราะห์สาร Metabolite ในน้ำหนักโดยเครื่อง NMR (Nuclear Magnetic Resonance) นำตัวอย่างน้ำหมักก่อนและหลังกระบวนการหมักมาทำใช้สำหรับการวิเคราะห์โดย NMR (Bruker Avance NEO 500 MHZ) กำหนดพารามิเตอร์ในโปรแกรม TOPSPIN 4.1.1 software (Bruker Biospin) ซึ่งมีการกำหนดค่าดังนี้ ความกว้างของสเปกตรัม (spectral width) เท่ากับ 29.4040 ppm จำนวนชุดข้อมูล (Number of data point) เท่ากับ 64 k จำนวนที่สแกน (number of scan) เท่ากับ 256 และ จำนวนของ dummy เท่ากับ 4 ใช้สเปกตรัมในกระบวนการวิเคราะห์เท่ากับ 0.3 เฮิร์ทซ์

4.3 การวิเคราะห์สารเมทาบอไลต์ในเมล็ดกาแฟคั่วโดยใช้ Gas Chromatography -Mass Spectrometer (GC-MS)

4.3.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่วมาทำให้เป็นผงและเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องบด (CryoMill) โดยการทำความเย็นด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำผงกาแฟ 1 กรัม ใส่ลงในขวดที่มีฝาปิดสนิท (headspace vial)

4.3.2 การวิเคราะห์

การวิเคราะห์สาร Metabolite ที่เป็นสารระเหย (Volatile compound) โดยเครื่อง GC-MS (Gas chromatography–Mass spectrometry) โดยนำตัวอย่างที่เตรียมไว้มาทำการวิเคราะห์ชนิดของสาร โดยใช้เครื่อง GC-MS (Agilent 7890A GC-7000 Mass Triple Quad) โดยใช้คอลัมน์ capillary column (DB-WAX, 60 m × 0.25 mm × 0.25 μm, J&W Scientific, Folsom, CA) ซึ่งมีอัตราการไหลของหัวฉีดเท่ากับ 5:1 และมีอัตรการฉีดแก๊สฮีเลียมเท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิเริ่มต้นเท่ากับ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเพิ่มขึ้นเป็นอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเพิ่มอุณหภูมิที่ 160 และ 230 องศาเซลเซียสตามลำดับ ซึ่งการวิเคราะห์นั้นจะใช้ระบบ electron ionization โดยมีการตั้งค่าแหล่งกำเนิดของไอออน ที่ 230 องศาเซลเซียส และมีค่าพลังงานเท่ากับ 70 อิเล็กตรอนโวลต์ ใช้โหมดสแกนในช่วง 25 ถึง 400 มวลต่อประจุ ใช้โปรแกรม Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.04.00 software สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลและทำการเปรียบข้อมูล ทำการระบุชนิดสารระเหยโดยเทียบข้อมูลที่อยู่ในคลังข้อมูลของ สถาบันมาตรฐานแห่งชาติ หรือ NIST

5. การศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้าแบบเปียก

ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักที่มีการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์คัดเลือกในกระบวนการหมักและไม่มีการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์คัดเลือกในกระบวนการหมักในด้านจำนวนและชนิดของประชากรจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะมีผลต่อการเกิดสาร Metabolite ในกระบวนการหมัก ส่งผลให้มีความแตกต่างของ กลิ่น และรสชาติของกาแฟในแต่ละสภาวะของกระบวนการหมัก

5.1 การศึกษาจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Microbial plating count)

การนับจำนวนประชากรเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำหลังกระบวนการหมักนั้นจะนำตัวอย่างน้ำหลังกระบวนการหมักมาทำการนับจำนวนปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ 3 ประเภทได้แก่ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ยีสต์ทั้งหมด และ แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด นำตัวอย่างน้ำหลังกระบวนการหมักมาทำการเจือจางในสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% (w/v) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร และแยกเชื้อด้วยวิธีเกลี่ยเชื้อ (Spread plate) การนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดบนอาหาร Nutrient agar (ภาคผนวก) บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากบ่มทำการนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อคำนวณปริมาณของแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด การนับจำนวนยีสต์ทั้งหมดนั้นจะทำการเกลี่ยเชื้อบนอาหาร Yeast malt ager (ภาคผนวก) บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากบ่มทำการนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อคำนวณปริมาณของยีสต์ที่มีชีวิตทั้งหมด การนับจำนวนแลคติคแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดนั้นจะทำการเกลี่ยเชื้อบนอาหาร Lactobacillus MRS agar (ภาคผนวก) บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศโดยจะนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มในโถบ่มไร้ออกซิเจน หลังจากบ่มจะนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อคำนวณปริมาณของแลคติคแอซิดแบคทีเรียที่มีชีวิต จากนั้นคำนวณผลในรูป colony forming unit ต่อ มิลลิลิตร (CFU/ml)

6. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์คัดเลือกที่ใช้เป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้า

ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ทั้งในระดับฟลาสก์ และขยายขนาดเป็นถังหมักขนาดต่างๆ เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์และนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการหมักกาแฟ มีรายละเอียดการศึกษาดังต่อไปนี้

6.1 การศึกษาผลขององค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการศึกษาได้แก่ *Pichia kluyveri* สายพันธุ์ YWP1-5, *Pichia kluyveri* สายพันธุ์ YMP1-1, *Pichia kluyveri* สายพันธุ์ YML1-1, *Wickerhamomyces anomalus* สายพันธุ์ YWP1-3

6.1.1 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

ในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ใช้อาหาร Yeast extract broth ในการผลิตหัวเชื้อส่วนประกอบของอาหารมีการใช้ Glucose เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการเจริญ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เพื่อหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ให้มีคุณภาพและลดต้นทุนในการผลิตหัวเชื้อ โดยแหล่งคาร์บอนที่ทำการศึกษาได้แก่ Glucose, Sucrose, Glycerol, Sugar, Coconut sugar, Molasses และ Cascara ทดแทนการใช้ Glucose ทำการเขี่ยเชื้อบนอาหาร Yeast malt agar บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังการบ่มถ่ายเชื้อลงในอาหาร YE broth ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บผลการทดลองทุกๆ 4 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรทำการวิเคราะห์ผลค่าน้ำหนักเซลล์ (Cell mass)

6.1.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

ทำการทดสอบความเข้มของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมโดยมีการศึกษาความข้นที่เหมาะสมได้แก่ 30, 60, 90, 120, 180 และ 240 กรัมต่อลิตร นำหัวเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบเชื้อมาขีดเชื้อให้บริสุทธิ์ (Streak plate) บนอาหาร Yeast malt agar บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังการบ่มถ่ายเชื้อลงในอาหาร Yeast extract broth ที่มีศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนปริมาตรต่างๆ เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บผลการทดลองทุกๆ 4 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรทำการวิเคราะห์ผลค่าน้ำหนักเซลล์ (Cell mass)

6.1.3 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

ในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ใช้อาหาร Yeast extract broth ในการผลิตหัวเชื้อส่วนประกอบของอาหารมีการใช้ Yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนให้กับเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการเจริญ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ เพื่อหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ในการส่งเสริมของจุลินทรีย์ให้มีคุณภาพและลดต้นทุนในการผลิตหัวเชื้อโดยแหล่งไนโตรเจนที่ทำการศึกษาได้แก่ Yeast extract, Malt extract, Beef extract, Peptone, Corn steep liquor, Ammonium sulfate, Sodium sulfate และ Urea ทดแทนการใช้ Yeast extract โดยนำหัวเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบมาขีดเชื้อให้บริสุทธิ์ (Streak plate) บนอาหาร Yeast malt agar

บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังการบ่มถ่ายเชื้อลงในอาหาร YE broth ที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บผลการทดลองทุกๆ 4 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรทำการวิเคราะห์ผลค่าน้ำหนักเซลล์ (Cell mass)

6.1.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

ทำการทดสอบความเข้มของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยมีการศึกษาความข้นที่เหมาะสมได้แก่ 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 กรัมต่อลิตร นำหัวเชื้อจุลินทรีย์มาขีดเชื้อให้บริสุทธิ์ (Streak plate) บนอาหาร Yeast malt agar บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังการบ่มถ่ายเชื้อลงในอาหาร Yeast extract broth ที่มีศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนปริมาตรต่างๆ เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บผลการทดลองทุกๆ 4 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรทำการวิเคราะห์ผลค่าน้ำหนักเซลล์ (Cell mass)

6.2 การศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

6.2.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

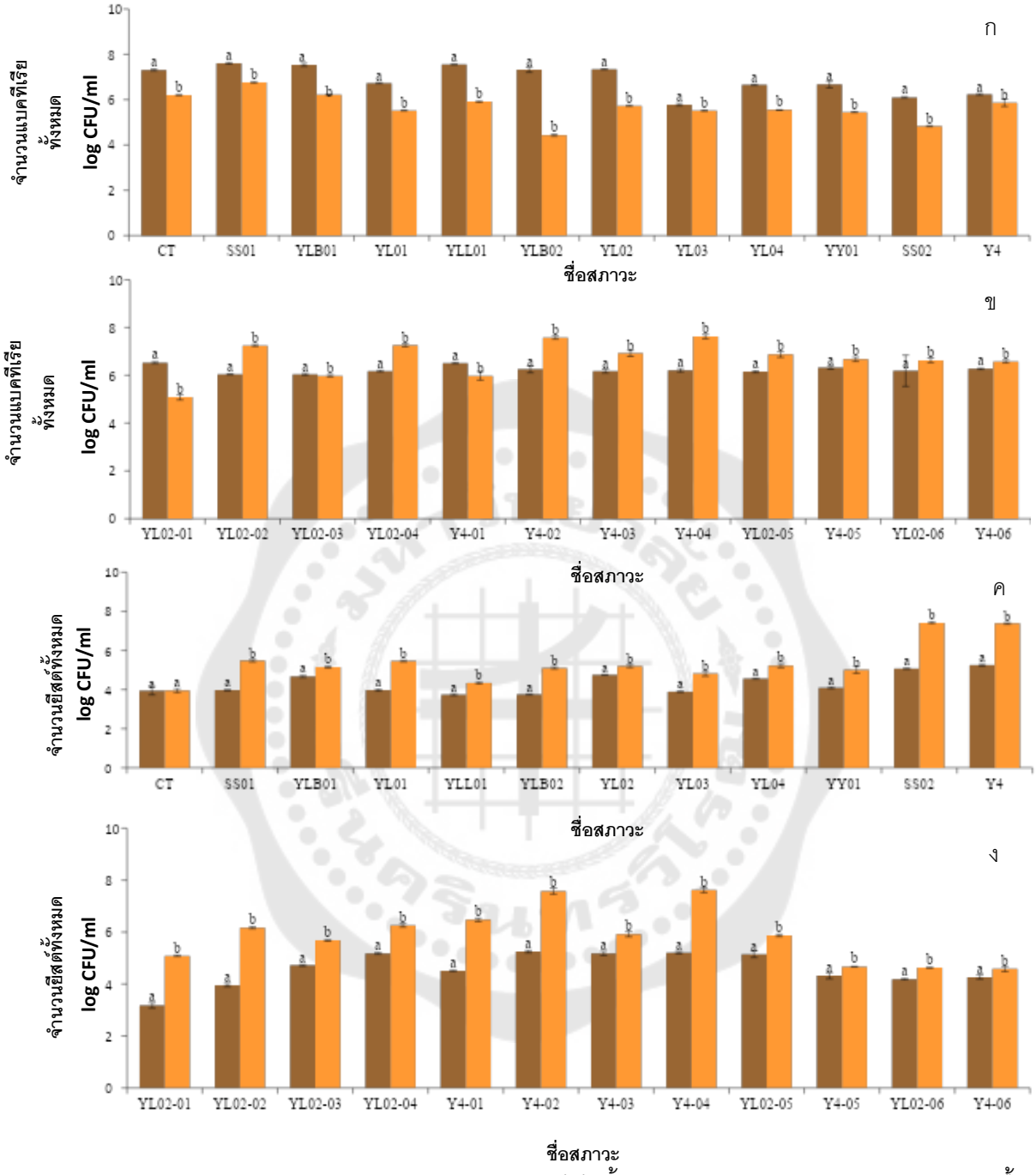
ทำการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ โดยมีการศึกษาอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อที่แตกต่างกันได้แก่ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส นำหัวเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบมาขีดเชื้อให้บริสุทธิ์ (Streak plate) บนอาหาร Yeast malt agar บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังการบ่มถ่ายเชื้อลงในอาหาร Yeast extract broth ที่มีศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนละแหล่งไนโตรเจนแล้ว เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันที่ได้ทำการศึกษา เก็บผลการทดลองทุกๆ 4 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทำการวิเคราะห์ผลค่าน้ำหนักเซลล์ (Cell mass)

บทที่ 4
ผลการทดลอง

1.การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในกระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้า

จากผลการทดลองประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในกระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้า โดยมีการออกแบบสภาวะการทดลองกระบวนการหมักกาแฟแบบเปียกทั้งหมด 24 สภาวะ โดยเป็นการทดลองที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว (SS) และหลายชนิดร่วมกัน ได้แก่ ยีสต์ร่วมกับแบคทีเรียแลคติก 1 ชนิด (YL) ยีสต์ร่วมกับแบคทีเรียแลคติก 2 ชนิด (YLL) และ ยีสต์หลายชนิดร่วมกัน (YY) เทียบกับการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก (CT) โดยควบคุมกระบวนการหมักในสภาวะเดียวกันได้แก่ การใช้ปริมาณหัวเชื้อ ปริมาณน้ำหนักของเมล็ดกาแฟ ปริมาณของน้ำที่ใช้ในกระบวนการหมัก โดยศึกษาปัจจัยที่แตกต่างกันได้แก่อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการหมักได้แก่ 10 19 และ 24 องศาเซลเซียส และระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมักได้แก่ 10 14 และ 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการศึกษาจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Microbial plating count) ได้แก่ แบคทีเรีย และยีสต์ ทั้งหมด (แสดงดังภาพประกอบ 7) ค่าความเป็นกรด-เบส (ตาราง 7) ผลการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดกาแฟโดยการชิม (แสดงดังภาพประกอบ 8) และคุณลักษณะทางด้านกลิ่นรส (Cupping note) ของกาแฟที่ใช้ในกระบวนการหมักแต่ละสภาวะ (ตาราง 8)

จากผลการทดลองพบว่าจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมดของทุกสภาวะก่อนเริ่มต้นกระบวนการหมักที่ 0 ชั่วโมงมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมากกว่า 3.53 log CFU/ml หรืออยู่ในช่วง 3.0-7.0 log CFU/ml และหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมัก พบว่าสภาวะมีจำนวน 9 สภาวะที่มีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียทั้งสูงกว่าก่อนเริ่มต้นกระบวนการหมักได้แก่ YL02-02, YL04-04, Y4-02, Y4-03, Y4-04, YL02-05, Y4-05, YL02-06 และ Y4-06 (ภาพประกอบ 7ก) นอกจากนี้ปริมาณของยีสต์ในกระบวนการหมักพบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังกระบวนการหมักในทุกๆสภาวะที่มีการเติมหัวเชื้อลงในกระบวนการหมัก โดยเฉพาะสภาวะ SS02 และ Y4 พบปริมาณของยีสต์สูงขึ้นมากที่สุดหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ 24 ชั่วโมง โดยที่สภาวะ SS02 มีค่า 7.42 log CFU/ml และสภาวะ Y4 มีค่า 7.38 log CFU/ml ตามลำดับ ตรงข้ามกับผลการทดลองของสภาวะควบคุมไม่พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณยีสต์ภายหลังจากกระบวนการหมัก (ภาพประกอบ 7ข)



ภาพประกอบ 7 แสดงปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมด (ก,ข) และ จำนวนประชากรของเชื้อยีสต์ (ค,ง) ในหน่วย log CFU/ml ที่พบในกระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้าก่อนและหลังกระบวนการหมัก (24 ชั่วโมง) ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแทนปริมาณจุลินทรีย์ที่เปรียบเทียบกันระหว่างก่อนและหลังกระบวนการหมักของแต่ละสภาวะ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05)

เมื่อทำการศึกษาค่าความเป็นกรด-เบสก่อนและหลังกระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้า พบว่าหลังจากกระบวนการหมักค่าความเป็นกรด-เบสของทุกสภาวะมีค่าลดลงหลังจากการหมักผ่านไป 24 ชั่วโมง ซึ่งค่าความเป็นกรด-เบสในช่วงเริ่มต้นนั้นมีค่าอยู่ในช่วง 5.62-7.39 และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักมีค่าความเป็นกรด-เบสอยู่ในช่วง 4.28-6.25 (ตาราง 7) เช่นเดียวกับสภาวะที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักหรือสภาวะควบคุมที่มีค่าความเป็นกรด-เบสลดลงจาก 5.99 เป็น 4.61 หลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมัก

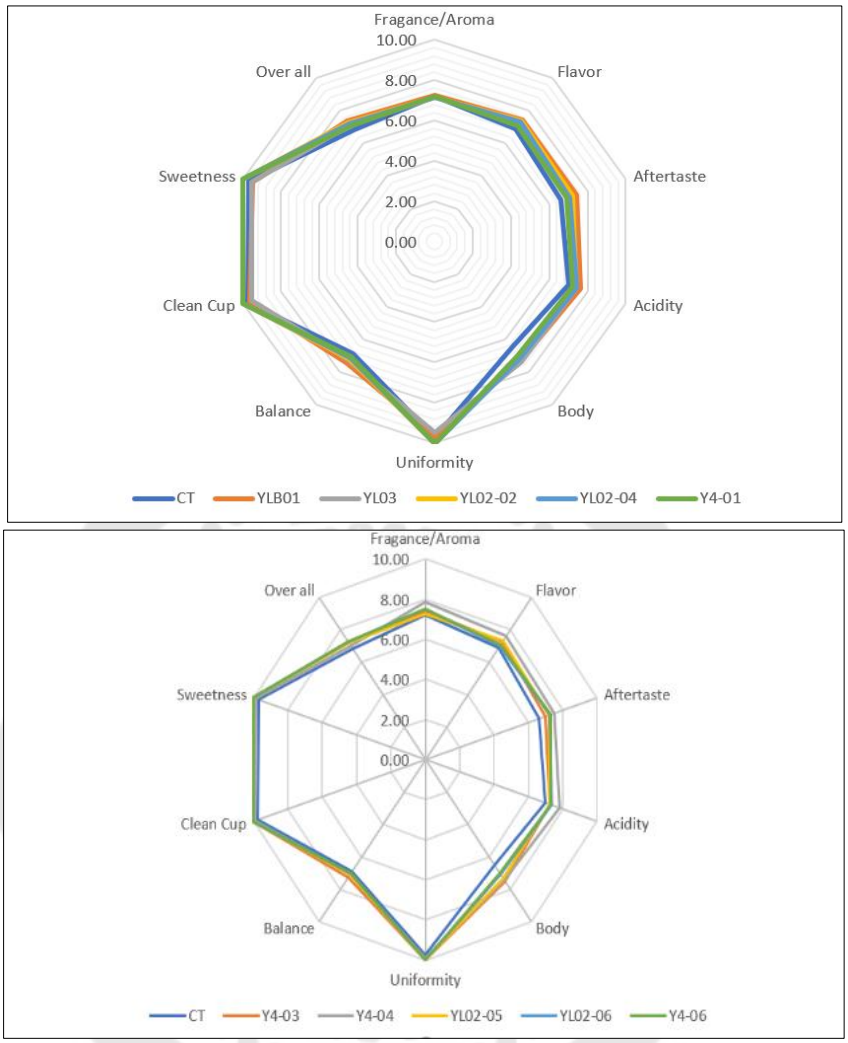
ตาราง 7 ค่าความเป็นกรด-เบสในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟ ก่อน-หลังจากกระบวนการหมัก

ชื่อสภาวะ	ค่าความเป็นกรด-เบส		ชื่อสภาวะ	ค่าความเป็นกรด-เบส	
	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง		0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
Control	5.99±0.00	4.61±0.60	YL02-01	6.26±0.10	5.19±0.40
SS01	6.87±1.80	4.37±0.40	YL02-02	6.62±0.60	5.16±0.10
YLB01	6.16±0.10	4.36±0.01	YL05-03	6.21±0.60	5.01±0.10
YL01	6.93±0.70	4.48±0.30	YL02-04	5.71±0.60	4.52±0.10
YLL01	5.93±0.20	4.64±0.60	Y4-01	6.36±0.04	4.77±0.40
YLB02	5.62±0.20	4.28±0.03	Y4-02	6.30±0.10	4.96±0.03
YL02	6.74±0.08	4.34±0.05	Y4-03	6.23±0.20	5.28±0.70
YL03	5.99±0.10	5.04±0.10	Y4-04	6.28±0.20	5.59±0.30
YL04	6.07±0.20	5.10±0.30	YL02-05	6.51±0.00	5.65±0.00
YY01	6.21±0.04	5.40±0.13	Y4-05	7.39±0.00	6.05±0.00
SS02	5.92±0.30	4.77±0.60	YL02-06	7.28±0.00	5.33±0.00
Y4	6.11±0.01	4.29±0.06	Y4-06	6.65±0.00	5.05±0.00

จากการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดกาแฟโดยการชิมจากผู้ชิมทางประสาทสัมผัสโดยทำการชิมกาแฟที่ผ่านการคั่วและชงเรียบร้อยแล้วตาม cupping protocol มาตรฐานที่กำหนดแสดงดังภาพประกอบ 8 และตาราง 8 ซึ่งทำการประเมินประสาทสัมผัสทางด้านความหวาน ความเปรี้ยว ความสะอาด ความสมดุล ความคงค้างของกาแฟหลังจากการดื่ม และเนื้อสัมผัส พบว่าเมล็ดกาแฟหลังจากการคั่วซึ่งผ่านกระบวนการหมักโดยการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ เทียบกับเมล็ด

กาแฟที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ มีแนวโน้มไปในทางเดียวกันทั้งในเมล็ดกาแฟที่มีการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ และไม่มีการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก โดยมีลักษณะเด่นของกาแฟนั้นมีความโดดเด่นใกล้เคียงกันทางด้าน ความหวาน และความสะอาดของเมล็ดกาแฟซึ่งส่งผลให้รสชาติที่สัมผัสได้นั้นปราศจากความฝาดหรือ กลิ่นเขียว ที่ไม่พึงประสงค์จากเมล็ดกาแฟ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเมล็ดกาแฟที่มีการเติมหัวเชื้อมีคะแนนการชิมโดยรวมสูงกว่าสภาวะควบคุมโดยเฉพาะอย่างยิ่ง สภาวะ YL03 และ Y4-04 มีคะแนนการชิมแตกต่างจากสภาวะควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือมีค่า 80.4 และ 82.4 ตามลำดับและพบว่ามีคุณลักษณะของกาแฟที่โดดเด่น

จากผลการอธิบายคุณลักษณะของกาแฟ (Cupping note) พบว่าเมล็ดกาแฟที่มีความโดดเด่นทางด้านกลิ่นรส ได้แก่ YL03 ซึ่งเป็นเมล็ดกาแฟที่มีการหมักร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ *Pichia kluyveri* YWP1-5 และ *Weissella cibaria* LML1-1 ที่อุณหภูมิ 19 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง ซึ่งมีคะแนนสูงถึง 80.4 คะแนน โดยมีความโดดเด่นของกลิ่นรสได้แก่ Floral, Spicy, Curry, Tamarind, Bergamot, Pepper, Black tea, Lemon, Roasted nut, Orange, Peach, Tomato, Cocoa, Milk chocolate และ Chocolate เช่นเดียวกับสภาวะ Y4 ซึ่งเป็นเมล็ดกาแฟที่มีกระบวนการหมักร่วมกับเชื้อยีสต์ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pichia kluyveri* YWP1-5, *Pichia kluyveri* YMP1-1, *Pichia kluyveri* YML1-1 และ *Wickerhamomyces anomalus* YWP1-3 ที่อุณหภูมิ 19 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง ซึ่งมีคะแนนสูงถึง 78.6 คะแนน โดยมีความโดดเด่นทางด้านกลิ่น รส ได้แก่ Stone fruit, Sugarcane, Banana, Ripe fruit, Orange, Apple, Red grape, Brown sugar, Tomato, Berry, Honey, Citrus และ Lemon นอกจากนี้เมื่อเทียบกับสภาวะอื่นๆพบว่าทั้ง 2 สภาวะนี้ไม่พบกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์เช่น กลิ่นหญ้าเขียว หรือกลิ่นยาง และพบว่าการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ในกระบวนการหมักที่อุณหภูมิและระยะเวลาแตกต่างกันยังคงคุณภาพขอเมล็ดกาแฟ และความโดดเด่นของรสชาติไว้ได้ ดังเห็นได้จากคะแนนของการทดสอบคุณภาพของเมล็ดกาแฟ ได้แก่ อุณหภูมิ 19 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (Y4-01), อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (Y4-02), อุณหภูมิ 19 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง (Y4-03), อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง (Y4-04), อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง (Y4-05) และอุณหภูมิ10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (Y4-06) นั้นมีคะแนนมากถึง 80.3, 79.7, 81.2, 82.4, 77.9 และ 80.5 ตามลำดับ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงคัดเลือก 2 สภาวะนี้ได้แก่ YL03 และ Y4 ทำการทดลองถัดไป เนื่องจากที่ให้กลิ่นและรสชาติที่ดีที่สุด อีกทั้งยังคงความโดดเด่นของกลิ่นและรสชาติเมื่อมีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิและระยะเวลาการหมัก



ภาพประกอบ 8 ผลความแตกต่างทางประสาทสัมผัสของเมล็ดกาแฟที่ผ่านกระบวนการหมักแบบเปียกด้วยการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ เทียบกับเมล็ดกาแฟที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (Control) จากการทดสอบโดย Q-graders

ตาราง 8 คุณลักษณะทางด้านกลิ่นรสและคะแนนของเมล็ดกาแฟที่ผ่านกระบวนการหมัก โดยการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์และเมล็ดกาแฟที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (Control)

สภาวะ (รหัส)	คุณลักษณะทางด้านกลิ่นรส	คะแนน
Control	Ginseng, Dried straw, Ferment, White pepper, Boiled beans, Brown sugar, Lemon, Roasted rice, Dried grass, Peanuts, Green peas	75.6[c]
SS01	Peanuts, Caramel, Brown sugar, Milk chocolate, Dark chocolate, Smoke, Spices, Roasted, Orange, Lemon, Green apple, Soup, Green peas	78.6[b]
YLB01	Dried straw, Peanuts, Boiled beans, Cocoa, Dark chocolate, Orange, Lemon, Roasted tamarind, Caramel, Floral, Whisky, Bergamot	80.8[a]
YL01	Bell pepper, Vegetable, Caesar salad, Pepper, Roasted, Nut, Spice, Dried fruit, Cotton candy, Orange	79.3[b]
YLL01	Dark chocolate, Nut, Bread, Butter, Boiled beans, Vinegar, Lime, Cane sugar, Star fruit, Spice, Berry	77.2[b]
YLB02	Spicy, Flora, Nutty, Mango, Green apple, Grapefruit, Green grapes, Chocolate, Star fruit, Lime, Cocoa, Straw, Orange	78.7[b]
YL02	Floral, Milky, Yogurt, Vanilla, Coffee peel, Lemon peel, Spring onions, Peanut, White floral, Coconut milk, Orange, Caramel, Citrus, Plum, Cherry, Tomato, Bean	79.5[a]
YL03	Floral, Spicy, Curry, Tamarind, Bergamot, Pepper, Black tea, Lemon, Roasted nut, Orange, Peach, Tomato, Cocoa, Milk chocolate, Chocolate	80.4[a]
YL04	Nutty, Roasted tamarind, Black tea, Red tea, Green tea, Seaweed, Berry, Green apple, Butter, Wet straw, Boiled beans, Star fruit, Green grapes, Smoke	79[b]

ตาราง 8 (ต่อ)

สภาวะ (รหัส)	คุณลักษณะทางด้านกลิ่นรส	คะแนน
YY01	Floral, Spicy, Nutty, Black tea, Orange, Lemon, Dried strawberry, Honey, Pineapple, Caramel, Candy, Chocolate, Cocoa, Milk chocolate, Straw, Garden pea	78.6[b]
SS02	Pepper, Nutty, Spicy, Perfume, Rose, Floral, Caramel, Bell pepper, Long beans, Roast, Orange, Green apple	79.7[a]
Y4	Red floral, Black pepper, Bergamot skin, Lemon, Plum, Cardamom, Brown sugar, Whole grain, Wet straw, Peanut	78.6[b]
YL02-01	Pepper, Toasted coconut, Bell pepper, Dark chocolate, Spice, Brown sugar, Caramel, Orange, Honey, Milky, Roasted tamarind, Lemon, Roasted rice	79.6[a]
YL02-02	Spice, Straw, Black tea, Vanilla, Dry fruit, Garden pea, Peanut, Caramel, Honey, Lime, Syrup. Milk chocolate, Orange, Green apple, Bergamot	80.8[a]
YL02-03	Vanilla, Cocoa, Dark chocolate, Stone fruit, Spice, Cinnamon, Roast, Lime peel, Brown sugar, Dry wood, Tamarind, Pepper, Herb	78.6[b]
YL02-04	Floral, Vanilla, Caramel, Stone fruit, Honey, Butter, Garden pea, Soup, Lime, Seaweed, Lemongrass, Fragrant wood	80.5[a]
Y4-01	Toasted coconut, Pepper, Orange, Lemon, Dry grass, Floral, Milky, Vanilla, Black tea, Spice, Butter, Peanut, Coconut	80.3[a]
Y4-02	Pepper, Dry wood, Grapefruit, Orange, Green apple, Pineapple, Dry grass, Straw, Pink floral, Chocolate, Walnut, Green tea, Honey, Garden pea, Spice	79.7[a]
Y4-03	Dark chocolate, Roasted peanut, Roasted rice, Black tea, Vanilla, Caramel, Spice, Pepper, Toast, Cocoa, Orange, Honey, Brown sugar	81.2[a]

ตาราง 8 (ต่อ)

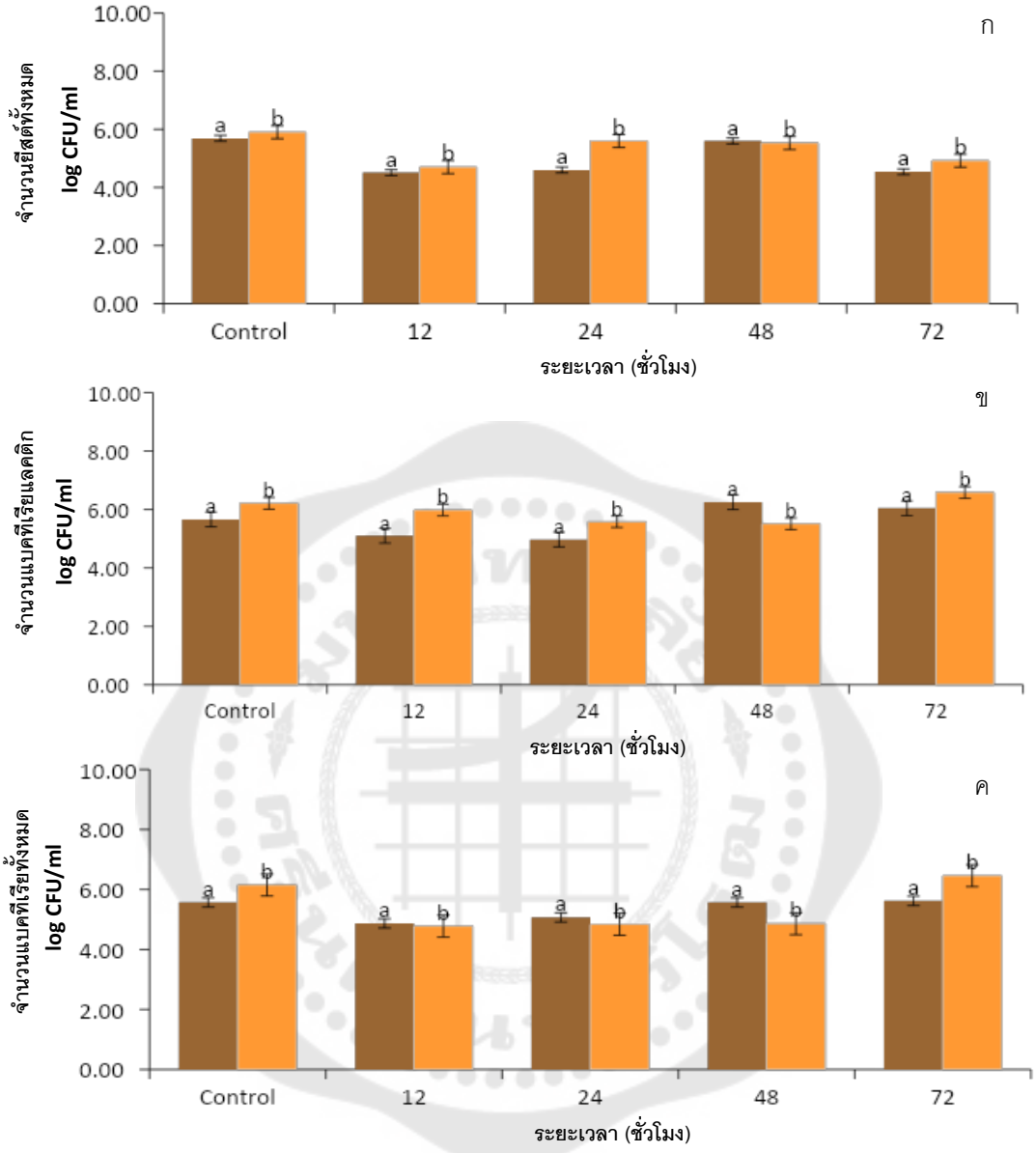
สภาวะ (รหัส)	คุณลักษณะทางด้านกลิ่นรส	คะแนน
Y4-04	Stone fruit, Sugarcane, Banana, Ripe fruit, Orange, Apple, Red grape, Brown sugar, Tomato, Berry, Honey, Citrus, Lemon	82.4[a]
YL02-05	Apple, Herb, Pear, Garden pea, Roasted peanut, Spice, Caramel, Straw, Lemon, Orange, Peanut, Nutty, Sweet	81.1[a]
Y4-05	Red floral, Brown sugar, Nutty, Tropical fruit, Grapefruit, Orange, Lemon, Black tea, Peanut, Caramel, Garden pea, Seaweed	77.9[b]
YL02-06	Almond, Caramel, Milk chocolate, Black tea, Garden pea, Orange, Lemon, Honey, Vanilla, Syrup, Roasted peanut, Spice	80.1[a]
Y4-06	Floral, Lemon, Straw, gooseberry, Mango, Roast, Peanut, Red apple, Peach, Citrus, Orange, Honey	80.5[a]

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้าแบบเปียก

จากการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อจุลินทรีย์คัดเลือกในกระบวนการหมักกาแฟ พบว่ามี 2 สภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักกาแฟได้แก่ YL03 และ Y4-04 ซึ่งเป็นสภาวะที่พบว่าให้คุณภาพด้านกลิ่นรสสูงที่สุด และได้รับการยืนยันและการรับรองจากผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัสแล้วว่าเป็นสภาวะการหมักที่ทำให้กาแฟมีคุณลักษณะทางด้านกลิ่นรสที่พิเศษ จึงนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้าต่อไป โดยทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมัก ซึ่งทำการศึกษาผลของระยะเวลาในกระบวนการหมักได้แก่ 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยตลอดระยะเวลาของกระบวนการหมัก ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อทำการศึกษาผลของปริมาณ แบคทีเรีย ยีสต์ และแบคทีเรียกรดแลคติก ของสภาวะ YL03 และ Y4-04 ทำการศึกษาค่าความเป็นกรด-เบสก่อนและหลังกระบวนการหมัก ศึกษาปริมาณน้ำตาลและการสร้างกรด ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ และทำการสุ่มเมล็ดกาแฟที่ศึกษากระบวนการหมักที่ 48 ชั่วโมงเพื่อศึกษาคุณลักษณะทางด้านกลิ่นรส (Cupping note) ของกาแฟ

จากการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมักของสภาวะ YL03 ซึ่งใช้หัวเชื้อประกอบด้วย *Pichia kluyveri* YWP1-5 และ *Weissella cibaria* LML1-1 พบว่าปริมาณของแบคทีเรีย (ภาพประกอบ 9ก) ในทุกช่วงเวลาได้แก่ 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงมีปริมาณของแบคทีเรียน้อยกว่าสภาวะควบคุมหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมัก โดยมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

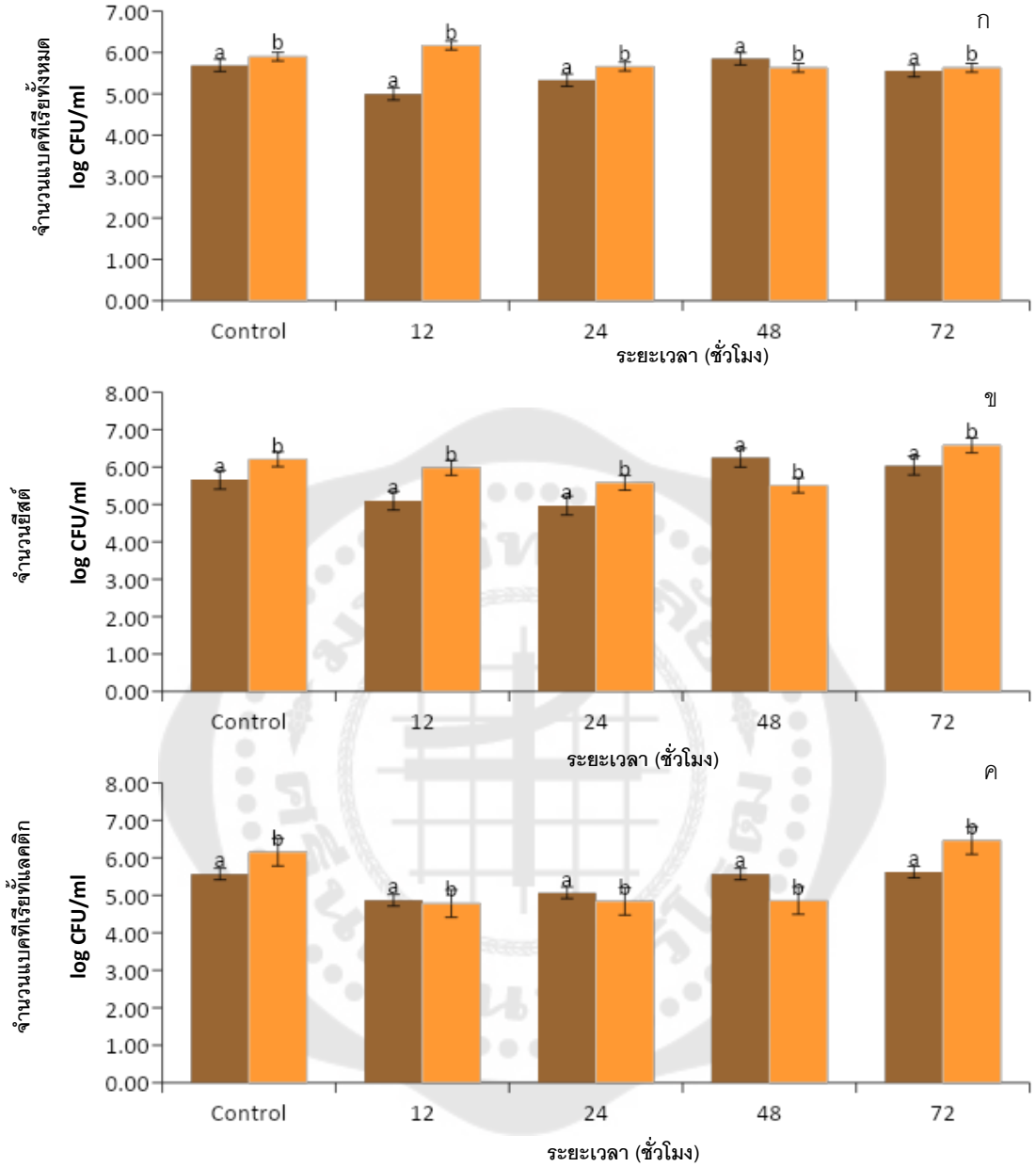
เริ่มต้นเท่ากับ 4.51, 4.60, 5.60 และ 4.54 log CFU/ml ตามลำดับ และมีปริมาณของแบคทีเรียหลังสิ้นสุดจากกระบวนการหมักลงเท่ากับ 4.97, 5,60, 5.53 และ 4.92 ตามลำดับ จากการศึกษาปริมาณของยีสต์ในกระบวนการหมักกาแฟอะราบิกา (ภาพประกอบ 9ข) พบว่าทุกช่วงเวลาของกระบวนการหมักมีปริมาณของยีสต์เพิ่มขึ้น จากนั้นมีแนวโน้มคงที่และลดลงเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไปจนถึง 72 ชั่วโมง ในขณะที่ปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติก (ภาพประกอบ 9ค) พบว่าปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติกของเกือบทุกสภาวะมีปริมาณลดลงหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมัก ยกเว้นสภาวะการทดลองควบคุมและกระบวนการหมักที่ 72 ชั่วโมง ซึ่งทั้งสองสภาวะนี้มีปริมาณของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5.57 และ 5.62 log CFU/ml และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักนั้นมีปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติกเท่ากับ 6.15 และ 6.46 log CFU/ml ตามลำดับ หลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมัก



ภาพประกอบ 9 ปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมด (ก) จำนวนประชากรของยีสต์ (ข) และแบคทีเรียกรดแลคติก (ค) ในหน่วย CFU/ml ที่ก่อนและหลังจากกระบวนการหมักในแต่ละช่วงเวลาของสภาวะ YL03 โดย ■ แทนปริมาณจุลินทรีย์ก่อนหมัก และ ■ แทนปริมาณจุลินทรีย์หลังหมักข้อมูลจากกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแทนปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เปรียบเทียบกันระหว่างก่อนและหลังกระบวนการหมักของแต่ละช่วงเวลาซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05)

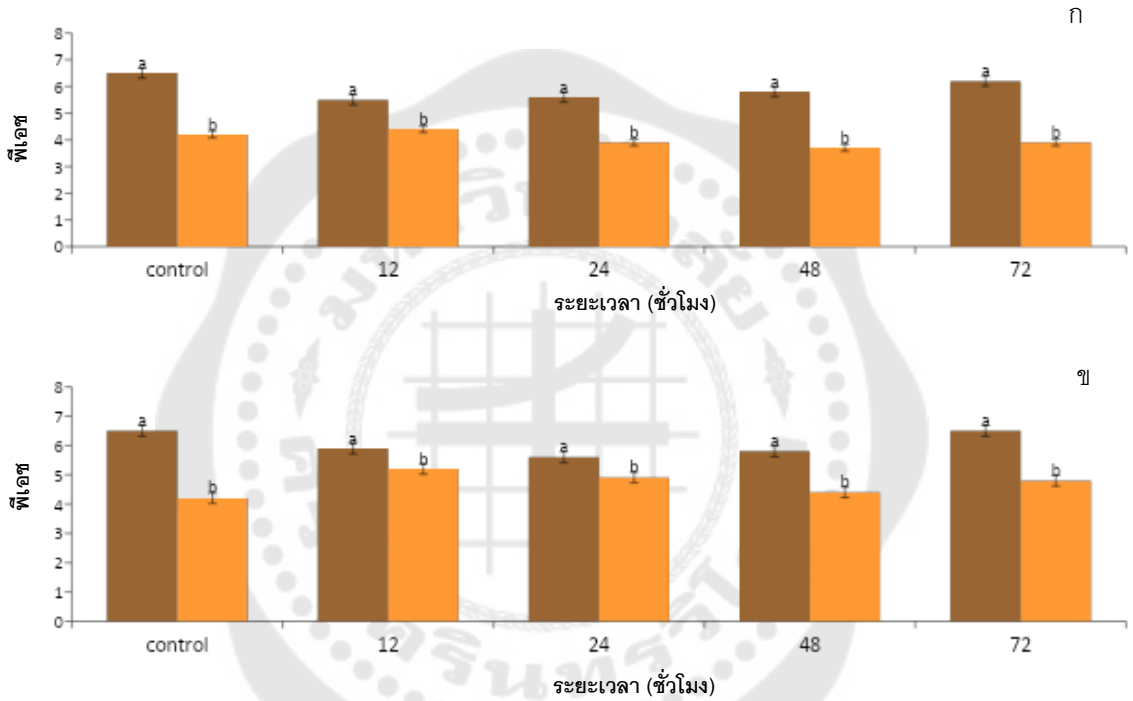
จากการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมักด้วยสภาวะ Y4-04 ซึ่งเป็นกระบวนการหมักที่ใช้ยีสต์ 4 สายพันธุ์ได้แก่ *Pichia kluyveri* YWP1-5, *Pichia kluyveri* YMP1-1, *Pichia*

kluyveri YML1-1 และ *Wickerhamomyces anomalus* YWP1-3 พบว่า ประมาณของแบคทีเรีย (ภาพประกอบ 10ก) ระยะเวลาการหมักที่ 12 ชั่วโมงมีปริมาณของแบคทีเรียสูงกว่าการหมักควบคุมและสภาวะของเวลาการหมักอื่นๆ โดยทุกสภาวะของการหมักที่ 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีปริมาณของแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 5.00, 5.33, 5.85 และ 5.56 log CFU/ml ตามลำดับ และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักพบว่าแต่ละสภาวะมีปริมาณของแบคทีเรียเท่ากับ 6.17, 5.66, 5.63 และ 5.63 log CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งสภาวะการทดลองควบคุมมีปริมาณของแบคทีเรียก่อนและหลังกระบวนการหมักเท่ากับ 5.69 และ 5.90 log CFU/ml และจากการศึกษาปริมาณของยีสต์ (ภาพประกอบ 10ข) ในกระบวนการหมักพบว่าปริมาณของยีสต์ของทุกสภาวะน้อยกว่าการทดลองควบคุมยกเว้นกระบวนการหมักที่ 72 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณของยีสต์ก่อนและหลังกระบวนการหมักเท่ากับ 6.04 และ 6.58 log CFU/ml และปริมาณของยีสต์ในสภาวะการทดลองควบคุมที่ 12, 24 และ 48 ชั่วโมง มีปริมาณของยีสต์หลังจากกระบวนการหมักเท่ากับ 6.21, 5.98, 5.58 และ 5.51 log CFU/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติก (ภาพประกอบ 10ค) ลดลงเมื่อเทียบกับสภาวะการทดลองควบคุมยกเว้นสภาวะการหมักที่ 72 ชั่วโมง โดยทุกสภาวะได้แก่ สภาวะการทดลองควบคุม, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงมีปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติกเท่ากับ 6.15, 4.78, 4.84, 4.86 และ 6.46 log CFU/ml ตามลำดับ



ภาพประกอบ 10 ปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมด (ก), จำนวนประชากรของยีสต์ (ข) และแบคทีเรียกรดแลคติก (ค) ในหน่วย CFU/ml ที่ก่อนและหลังจากกระบวนการหมักในแต่ละช่วงเวลาของสภาวะ Y4-04 โดย ■ แทนปริมาณจุลินทรีย์ก่อนหมัก และ ■ แทนปริมาณจุลินทรีย์หลังหมักข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแทนปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เปรียบเทียบกันระหว่างก่อนและหลังกระบวนการหมักของแต่ละช่วงเวลา ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05)

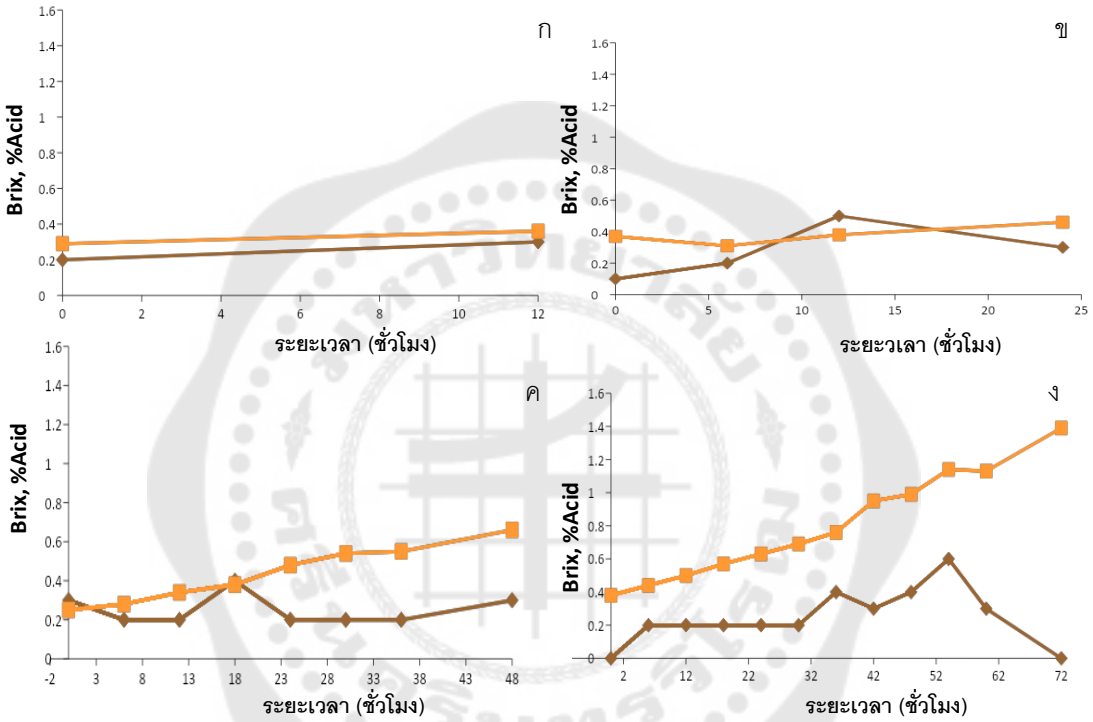
จากนั้นทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-เบส ก่อนและหลังจากกระบวนการหมัก (ภาพประกอบ 11) พบว่าค่าความเป็นกรด-เบสของทุกสภาวะมีค่าลดลงหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมัก โดยสภาวะ YL03 มีค่าความเป็นกรด-เบสหลังการหมักต่ำสุดที่ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 3.9 (ภาพประกอบ 11ก) ในขณะที่สภาวะ Y4-04 (ภาพประกอบ 11ข) มีค่าความเป็นกรด-เบสลดลงเช่นกันตามลำดับของแต่ละช่วงเวลา ซึ่งที่ระยะเวลาการหมัก 48-72 ชั่วโมงมีค่าความเป็นกรด-เบสต่ำที่สุด เท่ากับ 4.4



ภาพประกอบ 11 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-เบส ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟอะราบิก้า ก่อน-หลังจากกระบวนการหมักโดย (ก) สภาวะ YL03 และ (B) สภาวะ Y4-04 โดย ■ แทนค่าความเป็นกรด-เบสก่อนหมัก และ ■ แทนค่าความเป็นกรด-เบสหลังหมักข้อมูลในกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแทนปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เปรียบเทียบกันระหว่างก่อนและหลังกระบวนการหมักของแต่ละช่วงเวลา ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05)

จากผลการทดลองการศึกษาระยะเวลาที่มีผลต่อกระบวนการหมัก โดยทำการศึกษาผลของค่าปริมาณน้ำตาลซึ่งแสดงในรูปแบบ °Brix และปริมาณกรดในกระบวนการหมักโดยสภาวะ YL03 ที่ทำการหมักที่ 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ของกระบวนการหมัก พบว่าปริมาณน้ำตาลมี

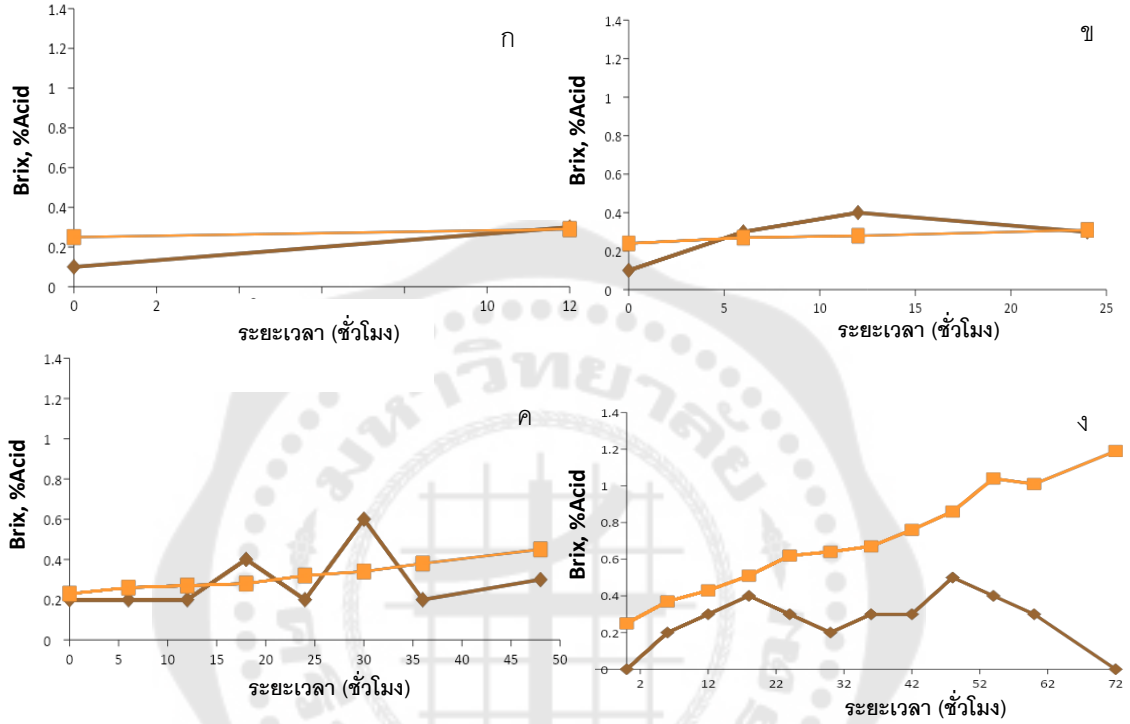
ปริมาณเพิ่มขึ้นหลังจากกระบวนการหมักผ่านไป 12-24 ชั่วโมง สอดคล้องกับค่าความเป็นกรด-เบส ที่มีการผลิตกรดมากเพิ่มขึ้นขณะช่วงเวลาเดียวกัน และเมื่อเวลาผ่านหลังจาก 24 ชั่วโมง พบว่าค่า °Brix ยังคงเพิ่มขึ้นตามระยะเวลา เช่นเดียวกันกับค่าความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน จนสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ 72 ชั่วโมง แต่ในขณะเดียวกันนั้นหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมักพบว่าค่า°Brix มีค่าเท่ากับ 0 หลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ 72 ชั่วโมง (ภาพประกอบที่ 12)



ภาพประกอบ 12 ค่า °Brix ◆ และปริมาณความเป็นกรด ■ ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟอะราบิกาของสภาวะ YL03 แต่ละช่วงเวลา (ก) 12 ชั่วโมง (ข) 24 ชั่วโมง (ค) 48 ชั่วโมง (ง) 72 ชั่วโมง ของสภาวะ YL03

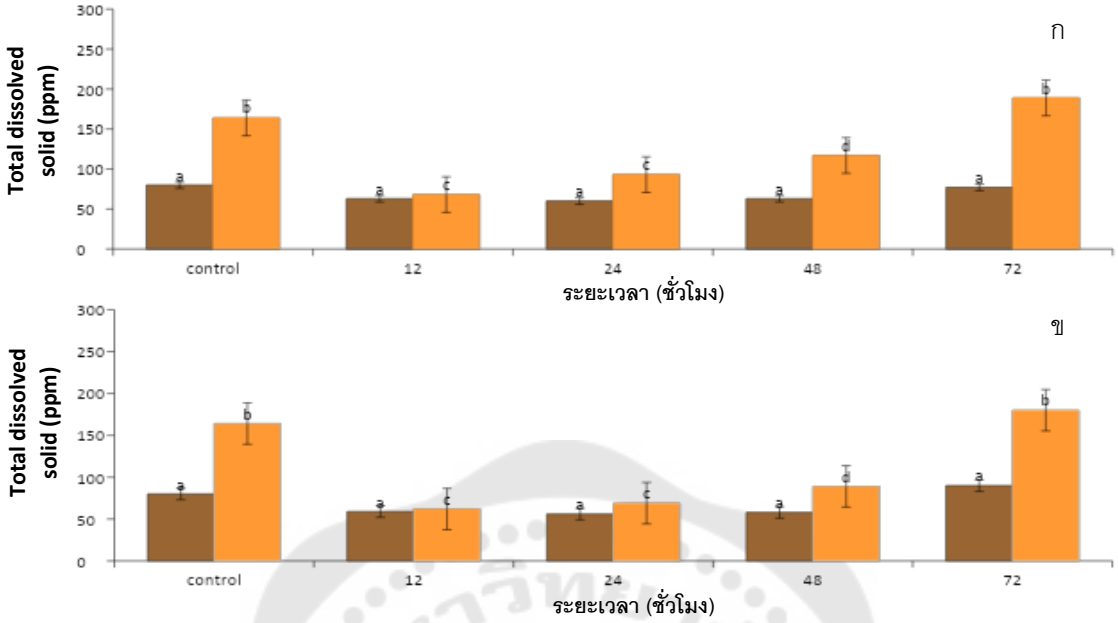
จากผลการทดลองการศึกษาระยะเวลาที่มีผลต่อกระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้า โดยทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาล (°Brix) และปริมาณกรดในกระบวนการหมักภายใต้สภาวะ Y4-04 ที่ระยะเวลา 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าปริมาณของน้ำตาลเพิ่มขึ้นจากเริ่มต้นกระบวนการหมักที่ 0 ชั่วโมงจนถึง 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นเริ่มลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลตลอดระยะเวลาการหมัก และพบว่าปริมาณของน้ำตาลหมดลงเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ 72 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 13ง) นอกจากนี้ยัง

พบว่าค่าความเป็นกรดเริ่มมีค่าที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่กระบวนการหมักผ่านไป 6 ชั่วโมง จนสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ 72 ชั่วโมง



ภาพประกอบ 13 ค่า °Brix ◆ และปริมาณความเป็นกรด ■ ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟอะราบิกาของสภาวะ Y4-04 แต่ละช่วงเวลา (ก) 12 ชั่วโมง (ข) 24 ชั่วโมง (ค) 48 ชั่วโมง (ง) 72 ชั่วโมง ของสภาวะ Y4-04

จากผลการทดลองการหาปริมาณของของแข็งที่ละลายในกระบวนการหมักนั้นพบว่าทุกสภาวะของกระบวนการหมักจะมีค่าปริมาณของของแข็งที่ละลายสูงขึ้นหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมักทั้งสภาวะการหมัก YL03 และ Y4-04 โดยหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมักของสภาวะ YL03 (ภาพประกอบ 14ก) ที่ 12,24,48 และ 72 ชั่วโมงนั้นมีค่าการละลายเท่ากับ 62, 69, 89 และ 180 ppm ตามลำดับ และสภาวะการหมัก Y4-04 (ภาพประกอบ 14ข) ที่ 12,24,48 และ 72 ชั่วโมงนั้นมีค่าการละลายเท่ากับ 62, 93, 117 และ 189 ppm ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระยะเวลามีผลต่อปริมาณของของแข็งที่ละลายได้ซึ่งอาจจะส่งผลให้เกิดการผลิตสารประกอบอินทรีย์หรือ อนินทรีย์ชนิดต่างๆ ในปริมาณที่แตกต่างกันซึ่งส่งผลให้คุณภาพของเมล็ดกาแฟแตกต่างกัน



ภาพประกอบ 14 ปริมาณของแข็งที่ละลายในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟอะราบิก้าของสภาวะ (ก) YL03 (ข) Y4-04 ในแต่ละช่วงเวลาโดย ■ แทนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำก่อนหมัก และ ■ แทนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำหลังหมัก ข้อมูลที่แสดงดังกราฟเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแทนปริมาณของแข็งที่ละลายที่เปรียบเทียบกันระหว่างก่อนและหลังกระบวนการหมักของแต่ละช่วงเวลา ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05)

จากผลการทดลองการทดสอบคุณภาพของเมล็ดกาแฟโดยการชิม ซึ่งทำการสุ่มเมล็ดกาแฟที่ทำกระบวนการหมักที่ 48 ชั่วโมงของสภาวะ YL03 และ Y4-04 มาทดสอบ พบว่าคุณภาพของเมล็ดกาแฟมีคะแนนเท่ากับ 76.25 และ 76.00 คะแนน ซึ่งมีคะแนนที่มากกว่ากระบวนการหมักควบคุมที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ลงในกระบวนการหมัก และพบว่าลักษณะของกลิ่นรสของเมล็ดกาแฟที่หมักด้วยสภาวะ YL03 ที่ 48 ชั่วโมงมีความแตกต่างจากกาแฟในสภาวะการหมักควบคุมโดยพบลักษณะด้านกลิ่นรสดังนี้ เลมอน น้ำผึ้ง และเครื่องเทศ ในขณะที่สภาวะการหมัก Y4-04 ที่ 48 ชั่วโมง พบลักษณะด้านกลิ่นรสได้แก่ น้ำผึ้ง ชาดำ ดอกไม้ และคาราเมล ซึ่งจากผลการทดลองนั้นแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีผลต่อกระบวนการหมักเมื่อเทียบกับการทดลองที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ แต่จากภาพรวมของคะแนนที่ได้พบว่าชุดการทดลองมีคะแนนการทดลองต่ำกว่าการทดลองก่อนหน้านี้ที่มีการทดลองภายในห้องปฏิบัติการ

ตาราง 9 คำอธิบายคุณลักษณะทางด้านกลิ่นรสและคะแนนของเมล็ดกาแฟที่ผ่านกระบวนการหมัก โดยการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์และเมล็ดกาแฟที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (Control)

ชื่อสภาวะ	คุณลักษณะทางด้านกลิ่นรส	คะแนน
การทดลองควบคุม	Natty, Green, Roasts, Hay, Light lime, Sweet, Lime peel	73.25[a]
YL03-48	Lemon, Honey, Nutty, Roasted, Spice, Hay	76.25[b]
Y4-04-48	Honey, Black tea, Roasts, Forests, Green, Lemon peel, Sweet, Caramel	76.00[b]

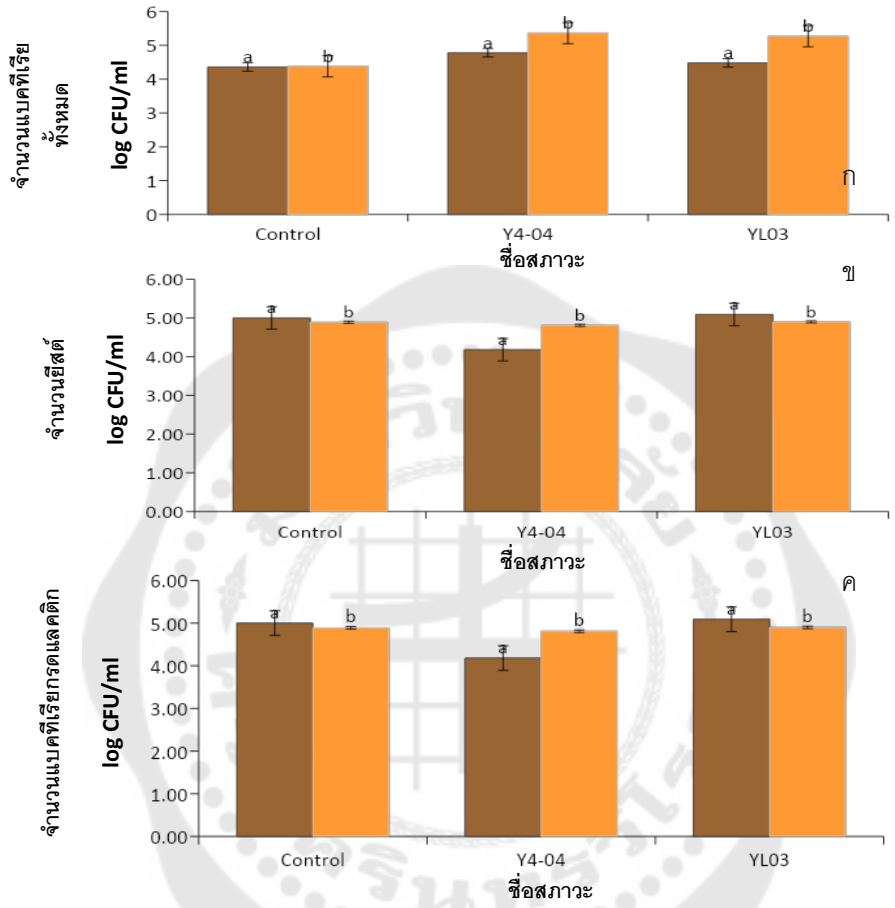
3.การขยายขนาดการหมักเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อะราบิก้า

การขยายขนาดกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อะราบิก้า ได้ทำการวิจัยที่ไร่กาแฟ อ.ห้วยน้ำดัง จ.แม่ฮ่องสอน และ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ โดยทำการหมักกาแฟปริมาณ 70 กิโลกรัม และศึกษาปัจจัยต่างๆในระหว่างกระบวนการหมัก ได้แก่ ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ยีสต์ และแบคทีเรียกรดแลคติก ศึกษาค่าความเป็นกรด-เบสก่อนและหลังกระบวนการหมัก ศึกษาค่า °Brix ศึกษาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ก่อนและหลังกระบวนการหมัก ศึกษาคุณลักษณะทางด้านกลิ่นรส (Cupping note) ของกาแฟภายหลังกระบวนการหมัก

3.1 การขยายขนาดการหมักกาแฟอะราบิก้าที่ไร่กาแฟ อ.ห้วยน้ำดัง จ.แม่ฮ่องสอน

จากผลการทดลองปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดในกระบวนการหมักที่ อ.ห้วยน้ำดัง จ.แม่ฮ่องสอน (ภาพประกอบ 15ก) พบว่ากระบวนการหมักสภาวะ YL03 และ Y4-04 มีปริมาณสูงกว่าการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์โดยมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด เท่ากับ 5.36 และ 5.27 log CFU/ml ตามลำดับ และปริมาณของยีสต์ (ภาพประกอบที่ 15ข) พบว่าหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมัก สภาวะที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อ มีปริมาณของเชื้อยีสต์เท่ากับ 5.10 log CFU/ml ในขณะที่ สภาวะ YL03 และ Y4-04 พบยีสต์เท่ากับ 5.23 และ 4.33 log CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งพบว่าปริมาณของยีสต์ทั้ง 3 สภาวะนั้นไม่แตกต่างกันหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมัก นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติก (ภาพประกอบที่ 15ค) มีปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติกแตกต่างกันเมื่อเทียบกับก่อนเริ่มต้นกระบวนการหมักและหลังเริ่มต้น

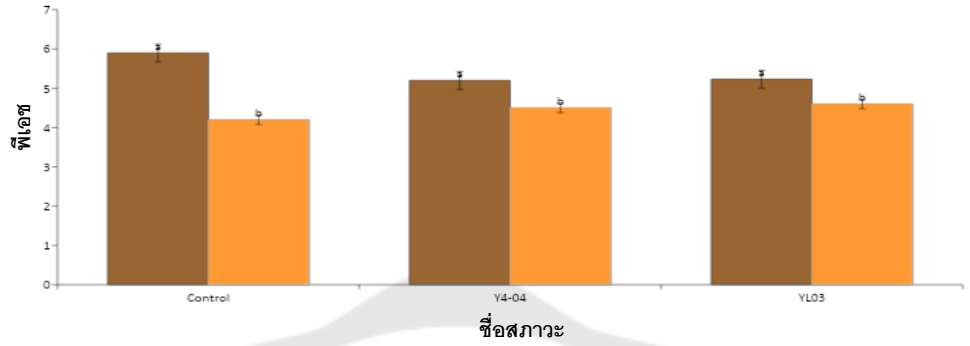
กระบวนการหมักโดยก่อนเริ่มต้นกระบวนการหมักมีปริมาณเท่ากับ 5.00, 4.18 และ 5.09 log CFU/ml และหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมักมีปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติกเท่ากับ 4.89, 4.81 และ 4.90 log CFU/ml ตามลำดับ



ภาพประกอบ 15 ปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมด (ก) จำนวนประชากรของยีสต์ (ข) และแบคทีเรียกรดแลคติก (ค) ก่อนและหลังจากกระบวนการหมักที่ไร่กาแฟ อ.ห้วยน้ำดัง จ. แม่ฮ่องสอนโดยใช้ปริมาณกาแฟ 70 กิโลกรัม หมักด้วยจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะต่างๆ โดย ■ แทนปริมาณจุลินทรีย์ก่อนหมัก และ ■ แทนปริมาณจุลินทรีย์หลังหมัก ข้อมูลดังกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแทนปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เปรียบเทียบกันระหว่างก่อนและหลังกระบวนการหมัก ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05)

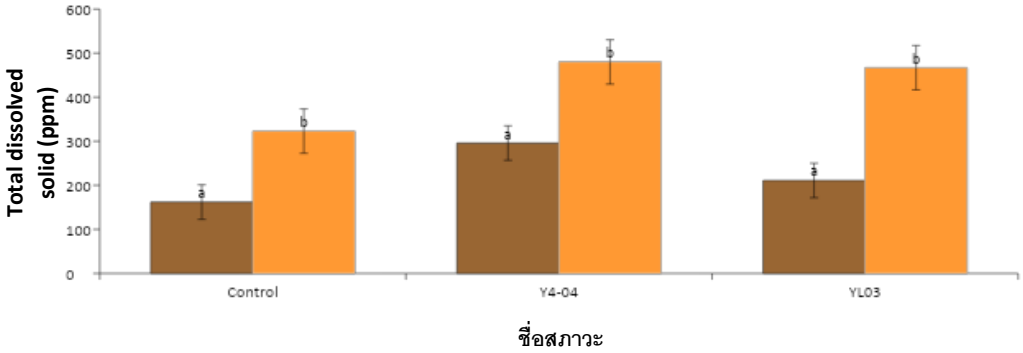
จากผลการทดลองการศึกษาค่าความเป็นกรด-เบสของกระบวนการหมักที่ อ.ห้วยน้ำดัง จ.แม่ฮ่องสอน พบว่าหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมักมีค่าความเป็นกรด-เบสลดลง โดยพบว่าทุกสภาวะของกระบวนการหมักนั้นมีความแตกต่างกันของทั้งก่อนและหลังกระบวนการหมัก ซึ่ง

ก่อนเริ่มต้นกระบวนการหมักสภาวะการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ Y4-04 และ YL03 มีค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5.90, 5.20 และ 5.23 และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักนั้น พบว่ามีค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 4.20, 4.50 และ 4.60 ตามลำดับ



ภาพประกอบ 16 ค่าความเป็นกรด-เบส ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟ ก่อน-หลังจากกระบวนการหมักที่ อ.ห้วยน้ำดัง จ.แม่ฮ่องสอนโดยใช้กาแฟเชอรี่ 70 กิโลกรัม โดย ■ แทนค่าความเป็นกรด-เบส ก่อนหมัก และ ■ แทนค่าความเป็นกรด-เบสหลังหมัก ข้อมูลจากกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแทนการเปรียบเทียบกันระหว่างก่อนและหลังกระบวนการหมัก ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05)

จากการวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในกระบวนการหมักกาแฟพบว่าทุกสภาวะของกระบวนการหมักมีปริมาณของของแข็งที่ละลายได้เพิ่มขึ้นหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมัก โดยมีปริมาณของของแข็งที่ละลายเท่าได้กับ 323, 480 และ 467 ppm ในสภาวะควบคุม Y4-04 และ YL03 ตามลำดับ และปริมาณของของแข็งก่อนเริ่มต้นกระบวนการหมักของทั้ง 3 สภาวะมีค่าเท่ากับ 162, 296 และ 211 ppm ตามลำดับ (ภาพประกอบ 17)



ภาพประกอบ 17ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟ ก่อน-หลังจากกระบวนการหมักที่ อ.ห้วยน้ำดัง จ.แม่ฮ่องสอนโดยใช้กาแฟเชอรี่ 70 กิโลกรัมโดย ■ แทนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำก่อนหมัก และ ■ แทนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำหลังหมัก ข้อมูลจากกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแทนปริมาณของแข็งที่ละลายที่เปรียบเทียบกันระหว่างก่อนและหลังกระบวนการหมัก ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05)

จากผลการทดลองการทดสอบคุณภาพของเมล็ดกาแฟโดยการชิมกาแฟที่ได้จากกระบวนการขยายขนาดกระบวนการหมักที่ อ.ห้วยน้ำดัง จ.แม่ฮ่องสอน พบว่าคุณภาพของเมล็ดกาแฟนั้นมีคะแนนเท่ากับ 65.00, 65.00 และ 70.00 คะแนน ซึ่งสภาวะของ Y4-04 มีคะแนนสูงกว่ากระบวนการหมักควบคุมที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ และพบว่าลักษณะของกลิ่นรสของเมล็ดกาแฟที่หมักด้วยสภาวะ YL03 ไม่แตกต่างกับเมล็ดการหมักควบคุม ซึ่งคุณลักษณะด้านกลิ่นรสของเมล็ดกาแฟสภาวะ Y4-04 พบ Dark cocoa, Orange และ Lemon ส่วนสภาวะ YL03 มีลักษณะของกลิ่นรสได้แก่ Bright, Tea, Lemon และ Cocoa ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะ Y4-04 ที่สามารถเพิ่มคุณภาพด้านกลิ่นรสของกาแฟได้เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ในการขยายขนาดการผลิต แต่จากการขยายขนาดการผลิตดังกล่าวพบว่าคุณภาพด้านกลิ่นรส และคะแนนที่ได้ต่ำกว่าระดับห้องปฏิบัติการ

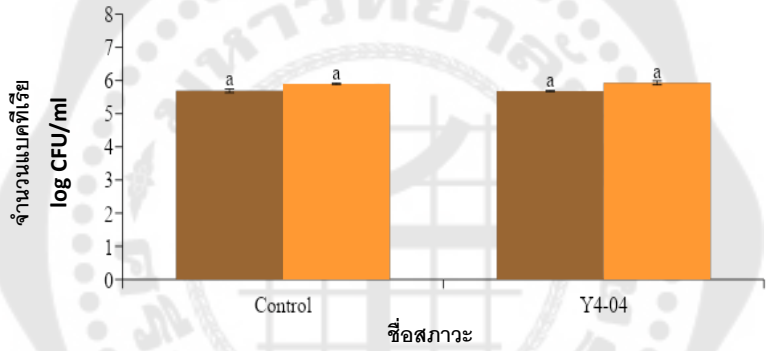
ตาราง 10 คำอธิบายคุณลักษณะทางด้านกลิ่นรสและคะแนนของเมล็ดกาแฟที่ผ่านกระบวนการหมัก โดยการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์และเมล็ดกาแฟที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ ณ ไร่กาแฟ อ.ห้วยน้ำดัง จ.แม่ฮ่องสอน โดยใช้กาแฟเชอรี่ 70 กิโลกรัม

สภาวะ (รหัส)	คุณลักษณะทางด้านกลิ่นรส	คะแนน
Control	Chocolate, Smoke, Roast	65.00[a]
YL03	Bright, Tea, Lemon, Cocoa	65.00[a]
Y4-04	Dark cocoa, Orange, Lemon	70.00[b]

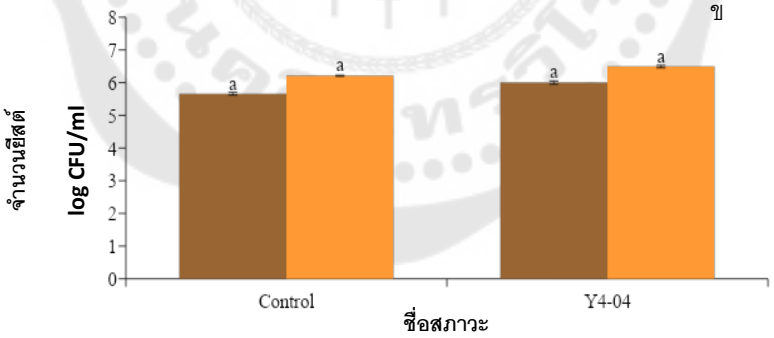
3.2 การขยายขนาดการหมักกาแฟอะราบิก้าที่ไร่กาแฟ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่

จากผลการทดลองการขยายขนาดการผลิตกาแฟอะราบิก้าที่ไร่กาแฟ อ.ห้วยน้ำดัง จ.แม่ฮ่องสอน พบว่าสภาวะ Y4-04 ได้คุณภาพด้านกลิ่นรสของกาแฟดีที่สุด ดังนั้นในปีต่อมาผู้วิจัยจึงคัดเลือกสภาวะนี้ในการขยายขนาดการหมัก ที่ไร่กาแฟ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ ซึ่งจากผลการทดลองปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดในกระบวนการหมักที่ไร่กาแฟ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (ภาพประกอบ 18ก) พบว่าปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดของกระบวนการหมักทุกสภาวะก่อนการหมักไม่แตกต่างจากหลังกระบวนการหมักอย่างมีนัยสำคัญ ลักษณะเดียวกันกับปริมาณของยีสต์ (ภาพประกอบ 18ข) และปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติก (ภาพประกอบ 18ค) ซึ่งหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมักของสภาวะ Y4-04 มีปริมาณของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด เท่ากับ 6.49 และ 5.98 log CFU/ml ตามลำดับ

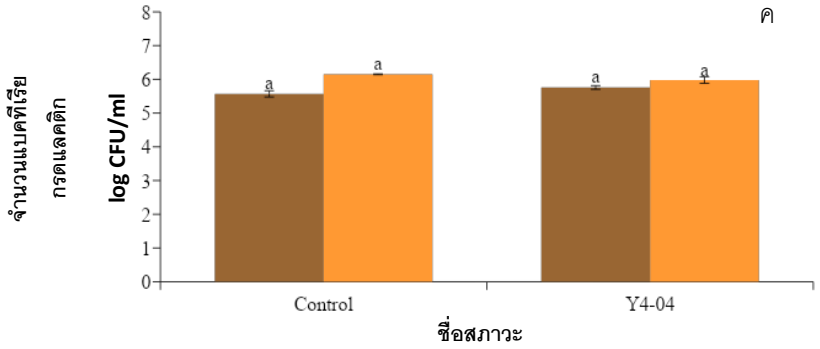
ก



ข

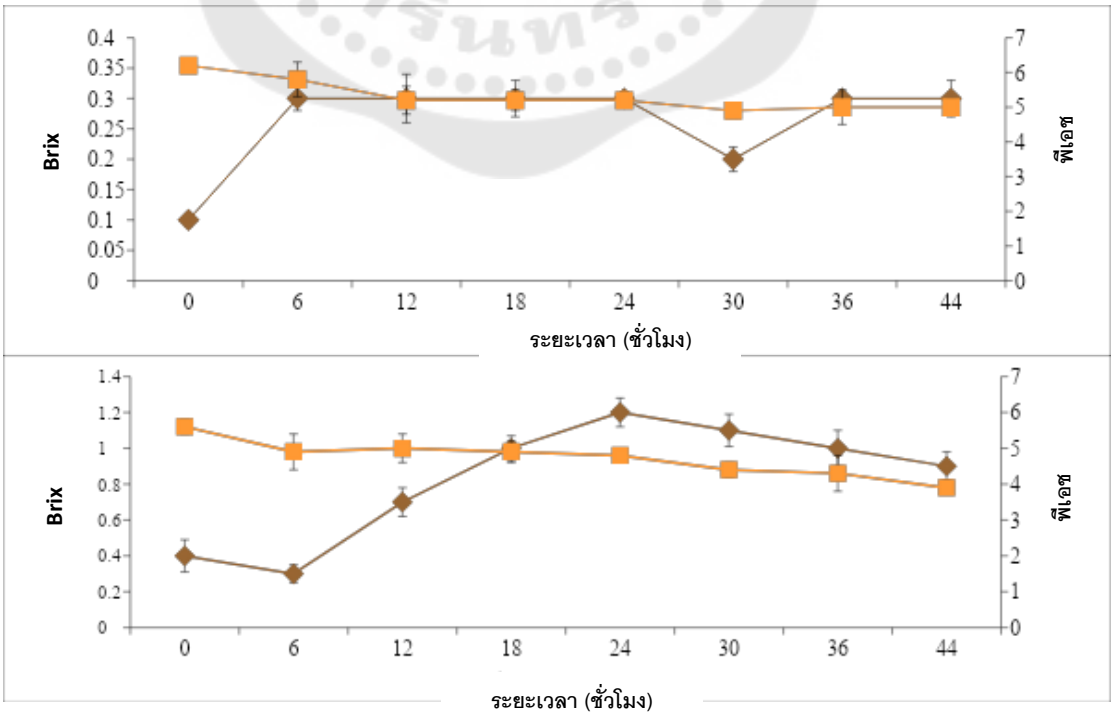


ค



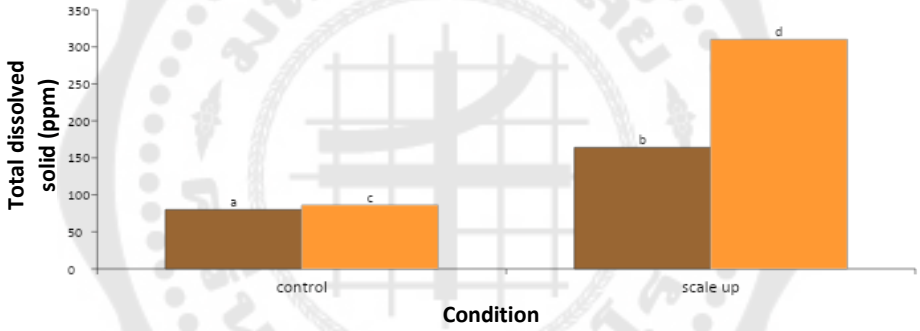
ภาพประกอบ 18 ปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมด (ก) จำนวนประชากรของเชื้อยีสต์ (ข) และจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก (ค) ก่อนและหลังจากกระบวนการหมักที่ไร่กาแฟ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ โดยใช้กาแฟปริมาณ 70 กิโลกรัม โดย ■ แทนปริมาณจุลินทรีย์ก่อนหมัก และ ■ แทนปริมาณจุลินทรีย์หลังหมัก ข้อมูลจากกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแทนปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เปรียบเทียบกันระหว่างก่อนและหลังกระบวนการหมัก ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05

จากการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลในกระบวนการหมักกาแฟอะราบิก้า พบว่าค่า °Brix ในกระบวนการหมักควบคุมและกระบวนการหมักที่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์สภาวะ Y4-04 มีค่า °Brix แตกต่างกันโดยค่า°Brix ของการทดลองควบคุมเท่ากับ 0.1 และค่า °Brix ของกระบวนการหมักที่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์เท่ากับ 0.4 และพบว่าระหว่างกระบวนการหมักมีค่า °Brix ที่สูงขึ้นในชั่วโมงที่ 12 และคงที่จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก เช่นเดียวกันกับการทดลองควบคุมที่มีการเพิ่มขึ้นของค่า °Brix เมื่อกระบวนการหมักผ่านไป 6 ชั่วโมงและคงที่จนสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ 44 ชั่วโมง ในทางตรงกันข้ามค่าความเป็น กรด-เบส ของทั้ง 2 สภาวะมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับหลังสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ 44 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าความเป็นกรดเบสก่อนเริ่มต้นกระบวนการหมักของทั้ง 2 มีค่าเท่ากับ 5.60 และ 5.00 และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักทั้ง 2 สภาวะมีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 3.90 และ 4.00 ตามลำดับ



ภาพประกอบ 19 ค่า °Brix ◆ และปริมาณความเป็นกรด ■ ของ (ก) การทดลองควบคุม และ (ข) การขยายกระบวนการหมักโดยการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ สภาวะ Y4-04 ที่ระยะเวลาต่างๆ

จากผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในกระบวนการหมักพบว่าก่อนเริ่มต้นกระบวนการหมักของการทดลองควบคุมและสภาวะการขยายขนาดการหมักที่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์สภาวะ Y4-04 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญโดยปริมาณของแข็งที่ละลายได้ที่ 0 ชั่วโมงของกระบวนการหมักทั้ง 2 สภาวะนั้นมีค่าเท่ากับ 80 และ 86 ppm ตามลำดับ และหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมักพบว่าของแข็งที่ละลายได้ของสภาวะ Y4-04สูงถึง 310 ppm



ภาพประกอบ 20 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟ ก่อน-หลังจากกระบวนการหมักที่ไร่กาแฟ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ โดยใช้กาแฟปริมาณ 70 กิโลกรัม โดย ■ แทนปริมาณของแข็งที่ละลายได้ก่อนหมัก และ ■ แทนปริมาณของแข็งที่ละลายได้หลังหมัก ข้อมูลจากกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กแทนปริมาณของแข็งที่ละลายที่เปรียบเทียบกันทุกสภาวะ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05)

จากผลการทดลองการทดสอบคุณภาพของเมล็ดกาแฟโดยการชิมกาแฟที่ได้จากกระบวนการขยายขนาดกระบวนการหมักที่ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ พบว่าคุณภาพของเมล็ดกาแฟมีคะแนนเท่ากับ 73.25 และ 76.75 คะแนน ซึ่งสภาวะของ Y4-04 นั้นมีคะแนนที่มากกว่ากระบวนการหมักควบคุมที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ลงในกระบวนการหมัก ซึ่งลักษณะของเมล็ดกาแฟสภาวะ Y4-04 มีลักษณะของกลิ่นรสได้แก่ Black tea, Nutty, Honey, Lemon และ

Acidity ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะ Y4-04 นั้นมีผลต่อกระบวนการหมักกาแฟเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ในการขยายขนาดกระบวนหมัก แสดงดังตารางที่ 11

ตาราง 11 คุณลักษณะทางด้านกลิ่นรสและคะแนนของเมล็ดกาแฟที่ผ่านกระบวนการหมัก โดยการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์สภาวะ Y4-04 และเมล็ดกาแฟที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (Control) จากไร่กาแฟ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่

สภาวะ (รหัส)	คุณลักษณะทางด้านกลิ่นรส	คะแนน
Control	Nutty, Green, Roasts, Hay, Light lime, Sweet, Lime peel	73.25[a]
Y4-04	Black tea, Nutty, Honey, Lemon, Acidity	76.75[b]

3.3 การวิเคราะห์ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลในตัวอย่างน้ำหมักก่อน-หลังกระบวนการหมัก

การวิเคราะห์ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลในตัวอย่างน้ำหมักของกระบวนการหมักกาแฟที่ขยายขนาดกระบวนการหมักที่ไร่กาแฟ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ ซึ่งทำการเปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลระหว่างสภาวะควบคุม และสภาวะ Y4-04 แสดงดังตาราง 12

จากผลการวิเคราะห์ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลพบว่าชนิดของน้ำตาลที่มีความโดดเดนในกระบวนการหมักของทั้ง 2 สภาวะ ได้แก่ fructose และ dextrose ซึ่งจะสามารถตรวจเจอตลอดระยะเวลาของกระบวนการหมัก โดยพบว่าในกระบวนการหมักควบคุมมีความแตกต่างกันของน้ำตาลทั้ง 2 อย่างมีนัยสำคัญหลังจากกระบวนการหมักผ่านไป 6 ชั่วโมง ซึ่งความเข้มข้นของ fructose ที่ 0 และ 6 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 4.83 และ 6.17 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของน้ำตาล dextrose มีค่าเท่ากับ 5.72 และ 6.34 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในกระบวนการทดลองควบคุมพบชนิดของน้ำตาลทั้ง 5 ที่ระยะเวลา 30 ชั่วโมงได้แก่ fructose, dextrose, sucrose, maltose และ lactose ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 4.19, 5.11, 0.47, 0.36 และ 0.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลในสภาวะการหมักที่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ของสภาวะ Y4-04 พบว่าความเข้มข้นของ fructose มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ 0 และ 6 ชั่วโมง แต่เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมงมีความเข้มข้นของ fructose ที่เพิ่มขึ้น

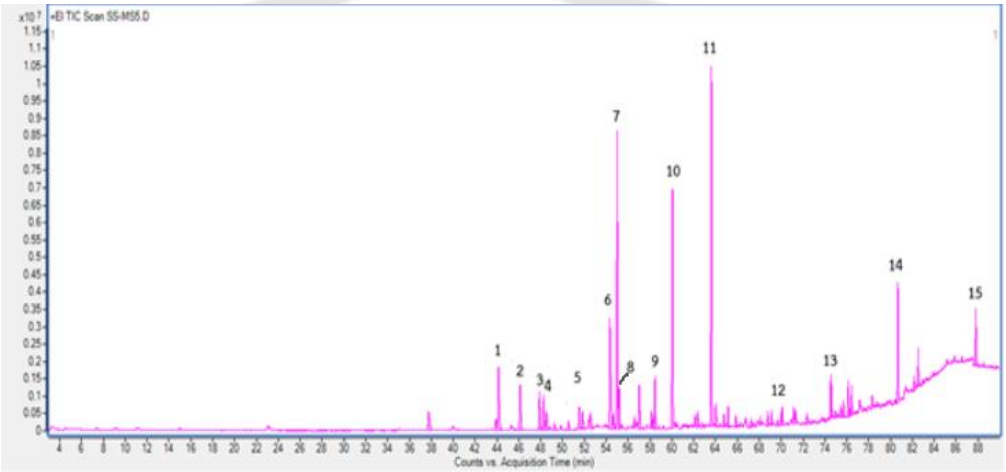
จนถึงสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ 44 ชั่วโมง และ dextrose พบว่าที่ 6 และ 12 ชั่วโมงมีความเข้มข้นที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยความเข้มข้นที่สูงสุดนั้นพบที่ 24 ชั่วโมงซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดเท่ากับ 6.93 และ 6.85 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ตาราง 12 ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลในตัวอย่างน้ำหมักของกระบวนการหมักกาแฟที่ขยายขนาดกระบวนการหมักที่ไร่กาแฟ อ.ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่ ที่ระยะเวลาต่างๆ

สภาวะ (รหัส)	ชนิดของน้ำตาล	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)							
		0 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	18 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	30 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง	44 ชั่วโมง
Control	Fructose	4.83[a]	6.17[b]	6.03[b]	6.05[b]	6.18[b]	4.19[a]	5.96[b]	5.66[b]
	Dextrose	5.72[a]	6.34[b]	6.17[b]	5.98[a]	6.31[b]	5.11[a]	6.20[b]	6.53[b]
	Sucrose	-	-	-	-	0.43[a]	0.47[a]	-	-
	Maltose	-	-	-	0.47[a]	0.39[a]	0.36[a]	-	0.33[a]
	Lactose	-	-	-	0.19[a]	-	0.04[a]	-	-
Y4-04	Fructose	4.96[a]	5.82[b]	6.25[c]	6.33[c]	6.93[c]	6.72[c]	6.75[c]	6.40[c]
	Dextrose	5.68[a]	5.47[a]	5.89[b]	6.03[b]	6.85[b]	6.69[b]	6.50[b]	6.38[b]
	Sucrose	-	-	-	0.18[a]	-	0.76[a]	-	-
	Maltose	-	0.25[a]	-	0.31[a]	0. 25[a]	-	-	0.18[a]
	Lactose	-	-	-	-	0.06[a]	0.03[a]	-	-

3. 4 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารละลายในเมล็ดกาแฟคั่ว

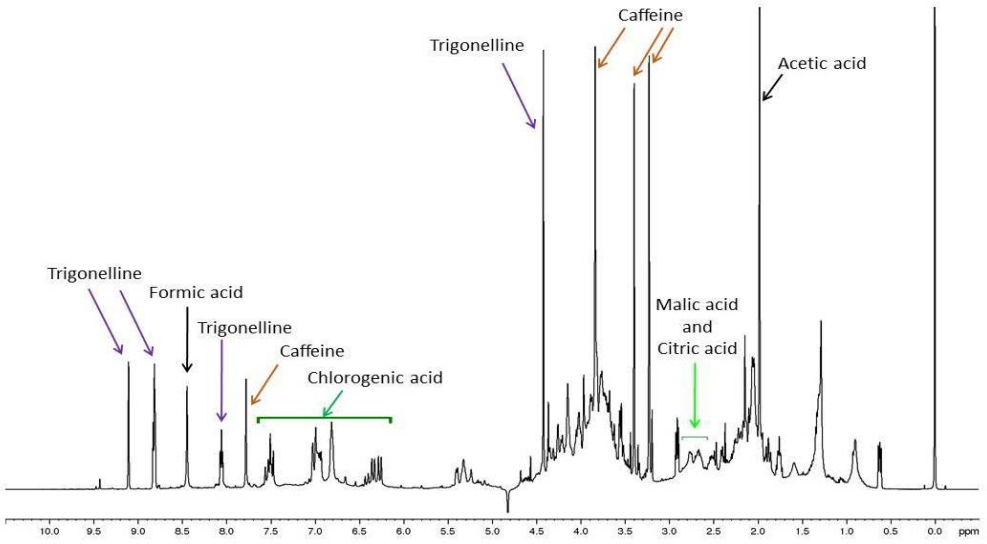
จากผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารระเหยในเมล็ดกาแฟคั่วที่ได้จากสภาวะ Y4-04 ของกระบวนการหมักการขยายขนาดที่ไร่กาแฟ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ ที่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ *(P. kluyveri* YWP1-5, *P. kluyveri* YML1-1, *P. kluyveri* YMP1-1 และ *W. anomalus* YWP1-3) โดยใช้เทคนิค gas– chromatography mass spectrometry (GC-MS) พบปริมาณของสารระเหยหลายกลุ่ม เช่น Furan (45.9%), Pyrazine (13.6%), Carboxylic acid (9.2%), Ketone (7.6%), Pyrol (4.8%), Phenol (4.6%), Pyranol (3.1%), Pyridine (2.7%), Pulanol (2.3%), Ester (1.0%), Pyrimidine (0.9%), Alcohol (0.6%) และ Xantine (0.6%).



ภาพประกอบ 21 สารประกอบอินทรีย์ระเหยในเมล็ดกาแฟคั่วจากการวิเคราะห์โดย GC-MS chromatogram :(1) methyl pyrazine, (2) 1-hydroxy-2-propanone, (3) 2,5-dimethyl pyrazine, (4) 2,6-dimethyl pyrazine, (5) 2-ethyl-6-methyl pyrazine, (6) acetic acid, (7) furfural, (8) 1-acetyloxy-2-propanone, (9) furfuryl acetate, (10) 5-methyl-2-furancarboxaldehyde, (11) 2-furanmethanol, (12) 3-methyl-1,2-cyclopentanedione, (13) maltol, (14) 2-methoxy-4-vinylphenol, (15) 5-hydroxymethylfurfural

จากผลการทดลองเพื่อศึกษาสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับรสชาติของกาแฟ ที่สามารถละลายน้ำได้จากการสกัดเมล็ดกาแฟคั่วด้วยน้ำร้อน และวิธีการทางเคมี โดยการใช้เทคนิค ^{1}H NMR พบว่า พบชนิดของสารที่มีความโดดเด่นได้แก่ Trigonelline , Caffeine และ Acetic acid นอกจากนี้ยังพบสารประกอบชนิดต่างๆได้แก่ Formic acid, Chlrogenic acid, Malic acid และ

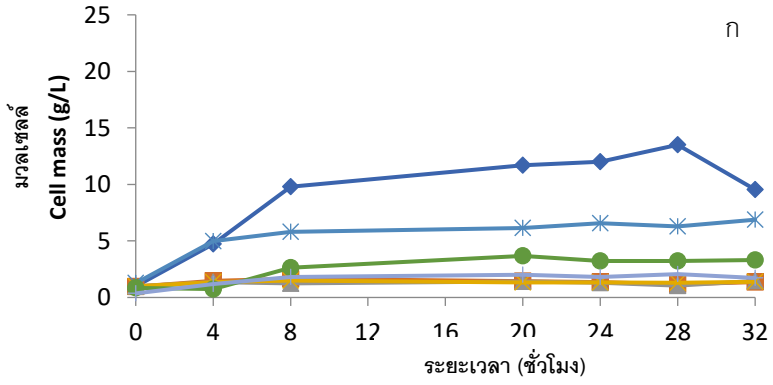
Citric acid ที่เป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้ในเมล็ดกาแฟคั่วที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์

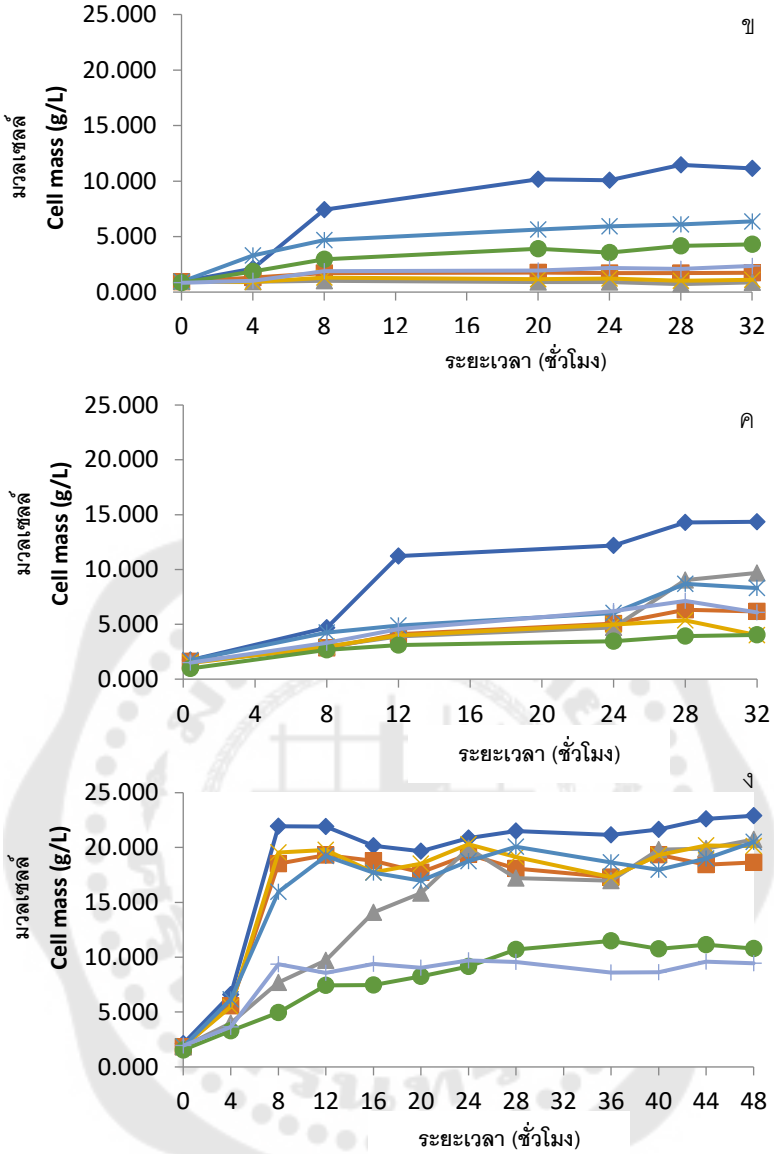


ภาพประกอบ 22 การทดสอลทางเคมีโดยวิธีการ ^{1}H NMR spectrum ของเมล็ดกาแฟคั่วที่สกัดด้วย D_2O

4.การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์คัดเลือกที่ใช้ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อะราบิกา

จากการศึกษากระบวนการหมักกาแฟอะราบิกาพบว่าหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการเพิ่มคุณภาพของเมล็ดได้แก่สภาวะ Y4-04 ซึ่งประกอบด้วยเชื้อ *P. kluyveri* YWP1-5, *P. kluyveri* YML1-1, *P. kluyveri* YMP1-1 และ *W. anomalus* YWP1-3 ในหัวข้อนี้จึงทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อให้สามาถผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ได้ในปริมาณที่มากขึ้นและต้นทุนต่ำ โดยทำการศึกษาผลขององค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และผลของปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการผลิตหัวเชื้อ ได้แก่ อุณหภูมิ

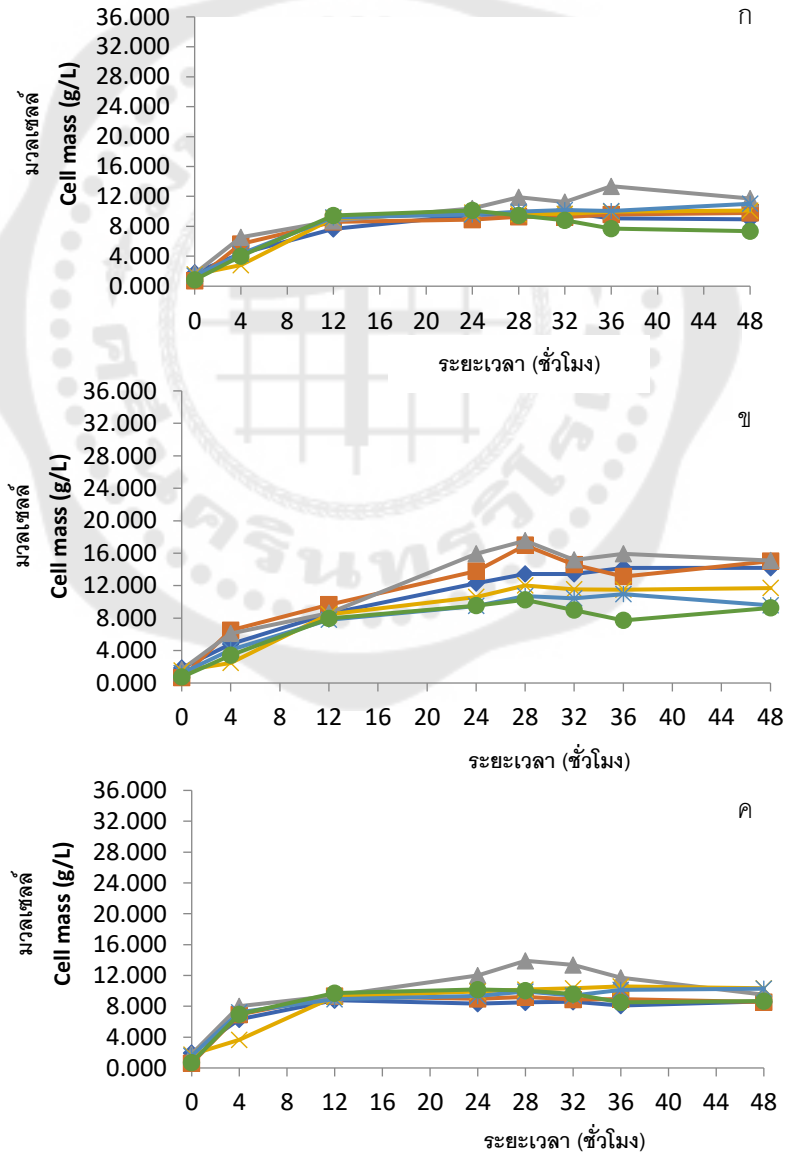


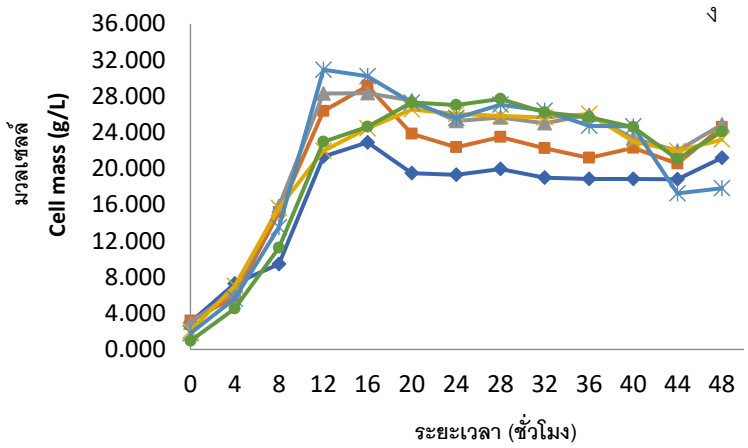


ภาพประกอบ 23 ผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ (ก) YMP1-1, (ข) YML1-1, (ค) YWP1-5 และ (ง) YWP1-3 เพื่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ ในอาหาร YE ปริมาณ 50 ml เขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 32 ชั่วโมง โดย ◆ แทนน้ำตาลกลูโคส ■ แทนน้ำตาลซูโครส ▲ แทนกลีเซอรอล ✕ แทนน้ำตาลทราย ✱ แทนน้ำตาลปี๊ป ● แทนโมลาส และ + ข้อมูลจากกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05)

จากผลการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนได้แก่ น้ำตาลปี๊บให้ปริมาณของมวลเซลล์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการใช้

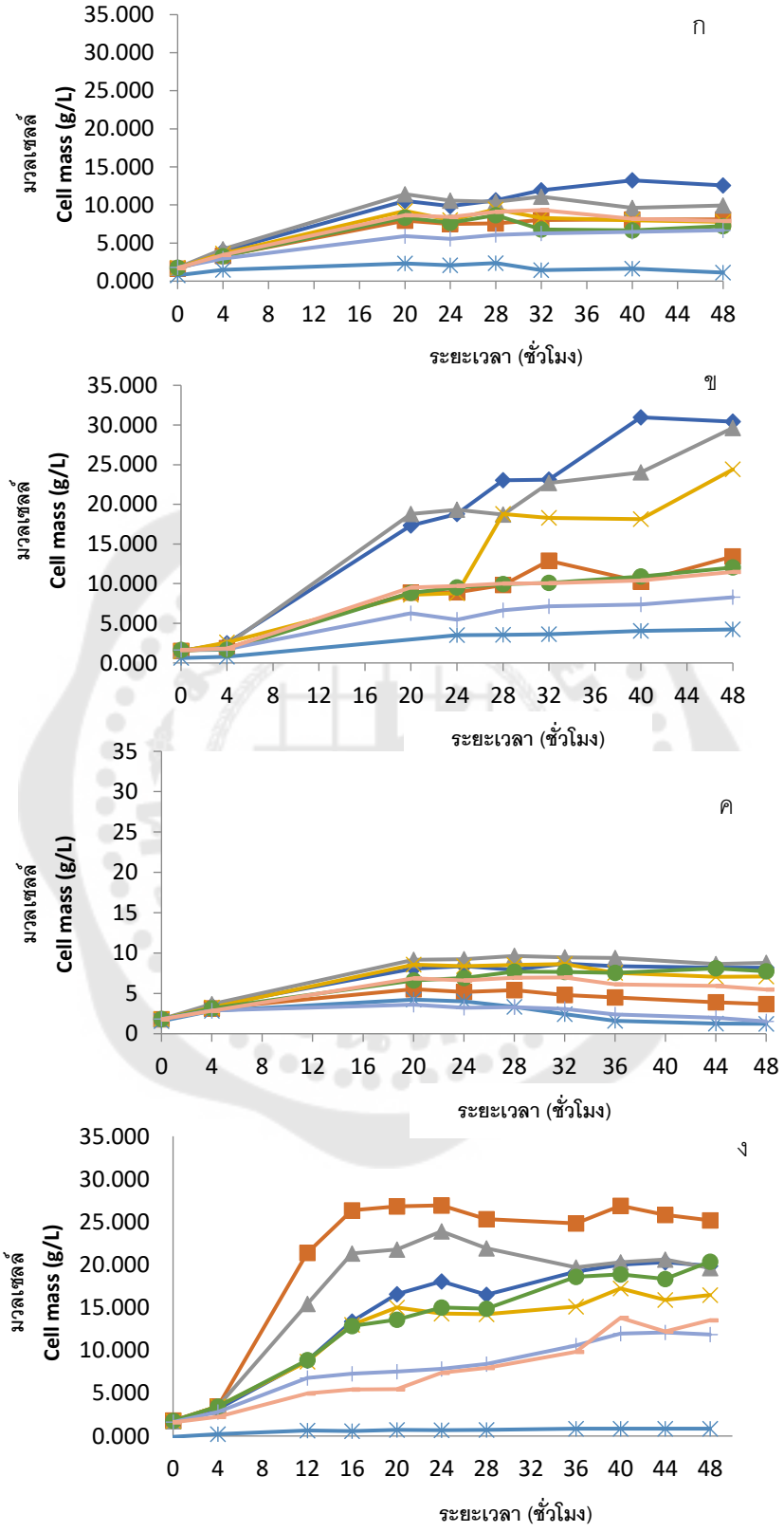
กลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนเดิมของสูตรอาหาร YE ที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์ได้แก่ YMP1-1, YML1-1, และ YWP1-5 มีปริมาณของมวลเซลล์เท่ากับ 6.88, 6.36 และ 8.00 และ 17.96 กรัม/ลิตร และยีสต์สายพันธุ์ YWP1-3 พบว่าสามารถใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้น้ำตาลกลูโคสโดยมีปริมาณของมวลเซลล์เท่ากับ 17.96 กรัม/ลิตร จากผลการทดลองพบว่าสามารถใช้น้ำตาลปี๊บและน้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้น้ำตาลกลูโคสได้ เนื่องจากส่งผลให้ปริมาณของมวลเซลล์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95% จึงทำการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลปี๊บและน้ำตาลทรายที่เหมาะสมในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป





ภาพประกอบ 24 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ (ก) YMP1-1, (ข) YML1-1, (ค) YWP1-5 และ (ง) YWP1-3 เพื่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ ในอาหาร YE ปริมาณ 50 ml เขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดย ◆ แทน 30 กรัมต่อลิตร ■ แทน 60 กรัมต่อลิตร ▲ แทน 90 กรัมต่อลิตร ✕ แทน 120 กรัมต่อลิตร ✳ แทน 180 กรัมต่อลิตร และ ● แทน 240 กรัมต่อลิตร ข้อมูลจากกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05

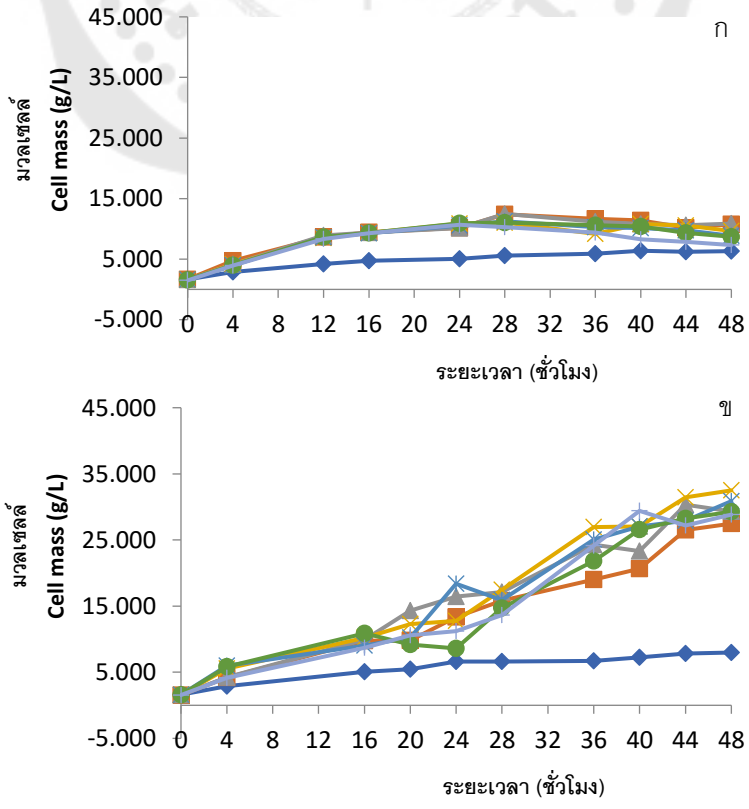
จากการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนพบว่าน้ำตาลปี๊บและน้ำตาลทรายสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนการใช้น้ำตาลกลูโคส และจากการศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลปี๊บ พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตหัวเชื้อของสายพันธุ์ YMP1-1, YML1-1 และ YWP1-5 ได้แก่ 90, 60 และ 90 กรัม/ลิตร และความเข้มข้นของน้ำตาลทรายที่เหมาะสมต่อการผลิตหัวเชื้อของยีสต์สายพันธุ์ YWP1-3 ได้แก่ 120 กรัม/ลิตร โดยมีปริมาณของมวลเซลล์ของยีสต์สายพันธุ์ YMP1-1, YML1-1, YWP1-5 และ YWP1-3 สูงสุดเท่ากับ 11.72, 17.63, 9.50 และ 23,20 กรัม/ลิตร จากการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์พบว่าแหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตยีสต์ YMP1-1, YML1-1 และ YWP1-5 ได้แก่ น้ำตาลปี๊บ ที่ความเข้มข้น 90, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำตาลปี๊ปของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ส่งผลต่อมวลเซลล์ของยีสต์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95% ของความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงขึ้น จึงเป็นความข้นที่เหมาะสมและช่วยลดในการผลิตหัวเชื้อยีสต์ และนอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์สายพันธุ์ YWP1-3 มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมได้แก่ น้ำตาลทราย 120 กรัม/ลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของน้ำตาลทรายที่สูงขึ้นจะแสดงให้เห็นว่ามวลเซลล์ของยีสต์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95%

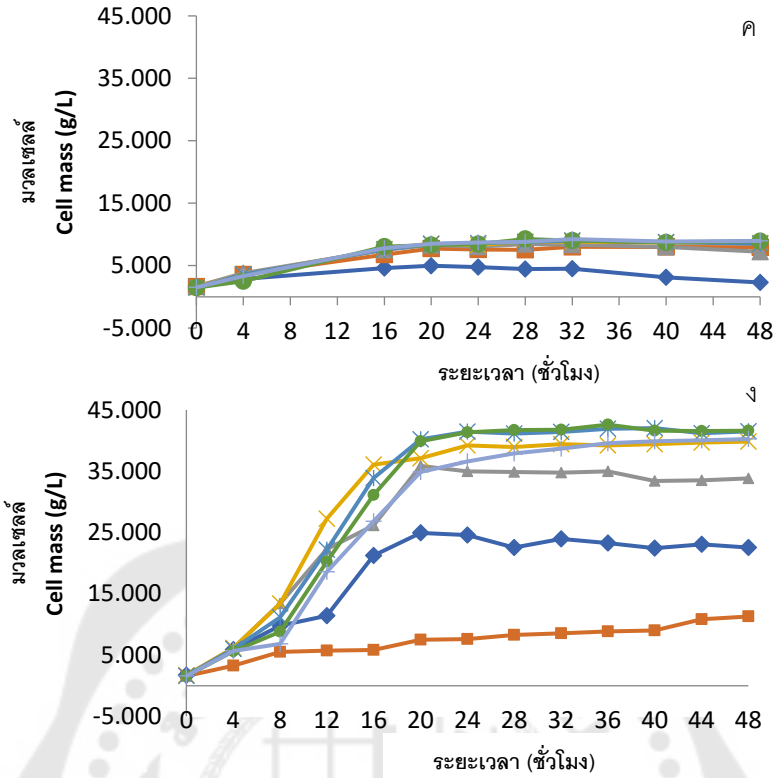


ภาพประกอบ 25 ผลของแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ (ก) YMP1-1, (ข) YML1-1, (ค) YWP1-5 และ (ง) YWP1-3 เพื่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ ในอาหาร YE ปริมาณ 50

ml เขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดย ◆ แทน Yeast exteact ■ แทน Malt extract ▲ แทน Beef extract ✕ แทน Peptone ✱ แทน Corn steep ● แทน Ammonium sulfate + แทน Sodium sulfate และ – แทน Urea ข้อมูลจากกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05

จากผลการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนได้แก่ สารสกัดยีสต์ (Yeast extract) ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนเดิมจากสูตรที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อนั้นได้ให้ปริมาณของมวลเซลล์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95% จากการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น ซึ่งแต่ละสายพันธุ์ได้แก่ YMP1-1, YML1-1, YWP1-5 และ YWP1-3 นั้นมีปริมาณของมวลเซลล์เท่ากับ 12.56, 23.09, 8.69 และ 25.20 กรัม/ลิตร ซึ่งจากผลการทดลองจะพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็น Ammonium sulfate และ Malt extract จะสามารถให้มวลเซลล์ของยีสต์สายพันธุ์ YWP1-3 สูงกว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์แต่เมื่อนำไปทดสอบผลทางสถิติพบว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์ได้ให้ปริมาณของมวลเซลล์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95% และยังเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีต้นทุนที่ถูกกว่าจึงมีความเหมาะสมที่สุด จากผลการทดลองจึงทำการศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดยีสต์เพื่อเหมาะสมในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

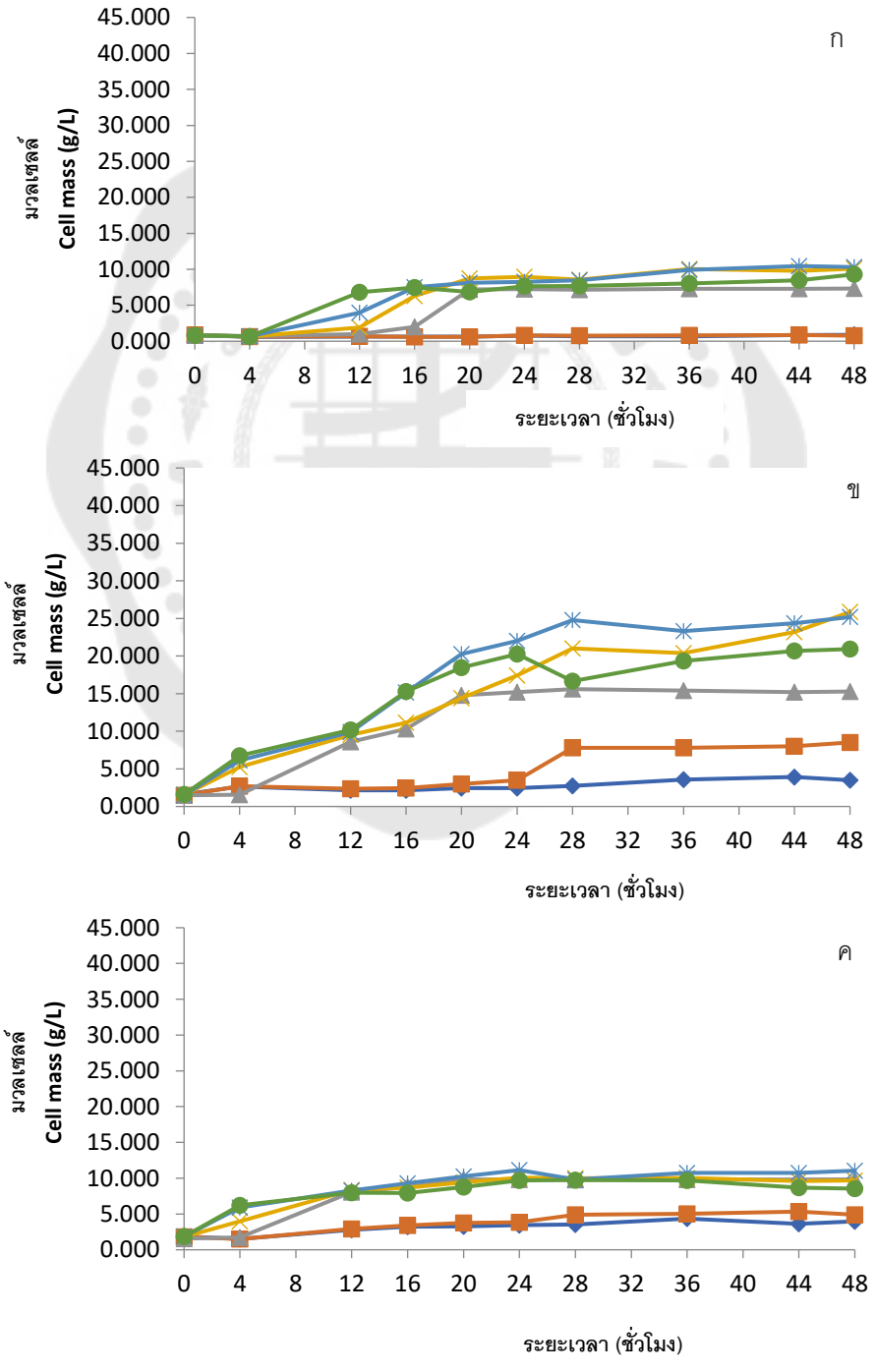


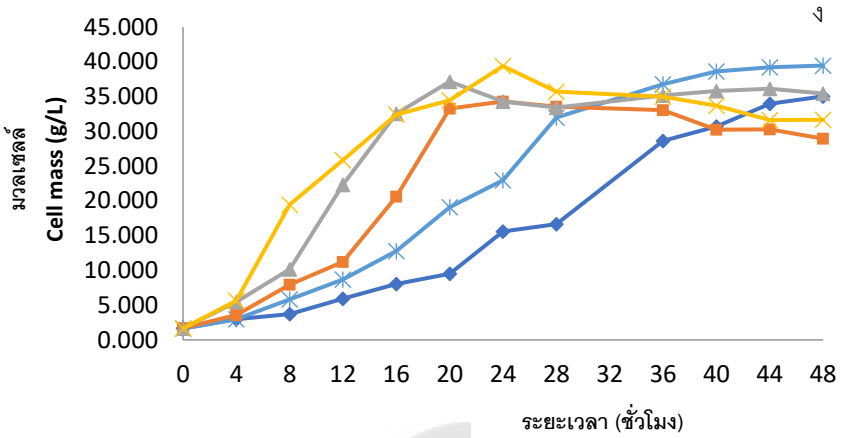


ภาพประกอบ 26 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ (ก) YMP1-1, (ข) YML1-1, (ค) YWP1-5 และ (ง) YWP1-3 เพื่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ ในอาหาร YE ปริมาณ 50 ml เขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดย ◆ แทน 0 กรัมต่อลิตร ■ แทน 5 กรัมต่อลิตร ▲ แทน 10 กรัมต่อลิตร ✕ แทน 15 กรัมต่อลิตร ✳ แทน 20 กรัมต่อลิตร ● แทน 25 กรัมต่อลิตร และ + แทน 30 กรัมต่อลิตร ข้อมูลจากกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05

จากการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนพบว่าการใช้สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้นมีความเหมาะสมต่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ และจากการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารสกัดยีสต์พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตหัวเชื้อของยีสต์สายพันธุ์ YMP1-1, YML1-1, YWP1-5 และ YWP1-3 ได้แก่ 5, 15, 5 และ 20 กรัม/ลิตร โดยมีปริมาณของมวลเซลล์ของยีสต์สายพันธุ์ YMP1-1, YML1-1, YWP1-5 และ YWP1-3 เท่ากับ 10.76, 32.50, 7.92 และ 41.50 กรัม/ลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้จากผลการลองยังแสดงให้เห็นว่าการไม่เติมแหล่งไนโตรเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นส่งผลให้มวลเซลล์ของยีสต์ทุกสายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95% เมื่อเปรียบเทียบกับการเติมแหล่งไนโตรเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจากผลการทดลองจะแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนของยีสต์สายพันธุ์ YML1-1 ที่มีปริมาณของมวล

เซลล์ลดลงอย่างชัดเจน และถึงแม้ว่าความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ 5 กรัมต่อลิตรนั้นไม่ได้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของมวลเซลล์แต่เมื่อทำการทดสอบทางสถิตินั้นพบว่าความเข้มข้นที่ 5 กรัมต่อลิตร และ 15 กรัมต่อลิตรนั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95% จึงทำให้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ YML1-1 เท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร





ภาพประกอบ 27 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ (ก) YMP1-1, (ข) YML1-1, (ค) YWP1-5 และ (ง) YWP1-3 เพื่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ ในอาหาร YE ปริมาณ 50 ml เขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดย ◆ แทน 5 องศาเซลเซียส ■ แทน 10 องศาเซลเซียส ▲ แทน 15 องศาเซลเซียส ✕ แทน 20 องศาเซลเซียส ✳ แทน 25 องศาเซลเซียส และ ● แทน 30 องศาเซลเซียส ข้อมูลจากกราฟแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ t-Test โดยกำหนดนัยสำคัญที่ 0.05

หลังจากทำการศึกษาผลขององค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ในการทดลองก่อนหน้า จากนั้นจึงได้ทำการศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ได้แก่ YMP1-1, YML1-1, YWP1-5 และ YWP1-3 พบว่าอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ 25, 20, 25 และ 25 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณของมวลเซลล์ของยีสต์สายพันธุ์ YMP1-1, YML1-1, YWP1-5 และ YWP1-3 เท่ากับ 10.30, 25.85, 11.04 และ 35.43 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งอุณหภูมิดังกล่าวเป็นสภาวะที่ส่งผลให้มวลเซลล์ของยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์นั้นสูงที่สุด แต่เมื่อทำการทดสอบทางสถิติว่าเชื้อยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์นั้นสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิเท่ากับ 15-35 องศาเซลเซียส เพราะสภาวะทั้งหมดนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95%

บทที่ 5
สรุป และอภิปรายผลการทดลอง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในกระบวนการหมักกาแฟอะราบิกาที่ดอยผาตั้ง จ.เชียงราย ได้นำเชื้อที่สามารถคัดแยกและคัดเลือกเชื้อได้ทั้งหมด 13 ไอโซเลต โดยแบ่งออกเป็นยีสต์จำนวน 6 ไอโซเลต แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 5 ไอโซเลต และแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลต โดยนำมาออกแบบกระบวนการหมักได้ทั้งสิ้น 24 สภาวะการทดลอง พบว่ามี 2 สภาวะที่ช่วยเพิ่มคุณภาพของเมล็ดกาแฟได้แก่ YL03 ซึ่งเป็นสภาวะที่มีการหมักร่วมกันของยีสต์ *Pichia kluyveri* YWP1-5 และ แบคทีเรียกรดแลคติก *Weissella cibaria* LML1-1 ซึ่งกระบวนการหมักด้วยสภาวะนี้ส่งผลให้เมล็ดกาแฟมีคะแนนสูงถึง 80.4 คะแนนและมีรสชาติ กลิ่นที่ดียิ่งขึ้นเมื่อเทียบกับการทดลองที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ และอีกหนึ่งสภาวะที่ช่วยส่งเสริมคุณภาพของเมล็ดกาแฟ ได้แก่ Y4-04 ซึ่งเป็นสภาวะที่มีการหมักร่วมกันของยีสต์ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pichia kluyveri* YMP1-1, *Pichia kluyveri* YML1-1, *Pichia kluyveri* YWP1-5 และ *Wickerhamomyces anomalus* YWP1-3 ซึ่งสภาวะนี้ส่งผลให้เมล็ดกาแฟมีคะแนนสูงถึง 82.4 คะแนนและมีลักษณะกลิ่นรสที่ดีขึ้นจากกระบวนการหมักที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ Stone fruit, Sugarcane, Banana, Ripe fruit, Orange, Apple, Red grape, Brown sugar, Tomato, Berry, Honey, Citrus และ Lemon จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่มีการนำหัวเชื้อยีสต์ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* CCMA054 มาใช้ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟซึ่งส่งผลให้เมล็ดกาแฟนั้นมีรสชาติที่ดียิ่งขึ้นและมีคะแนนมากถึง 81 คะแนน[23] นอกจากนี้ยังมีการรายงานของ Pereira และคณะได้มีการใช้เชื้อผสมกันระหว่าง *Candida parapsilosis* CCMA0544 และ *Torulaspora delbrueckii* CCMA0684 ช่วยส่งเสริมคุณภาพของเมล็ดกาแฟด้านความเปรี้ยว และเนื้อสัมผัสของเนื้อกาแฟเมื่อเทียบกับการทดลองที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์[20]และในปี 2020 ได้มีการหมักเมล็ดกาแฟร่วมกันระหว่างเชื้อยีสต์ และแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าคุณภาพของเมล็ดกาแฟมีกลิ่นหอมหมักไวน์และผลไม้ และมีความหวานมากเพิ่มขึ้นอีกด้วย[29] เช่นเดียวกันกับกระบวนการหมักของ Avallone และคณะพบว่าในระหว่างกระบวนการหมักเชื้อจุลินทรีย์จะมีการใช้น้ำตาลเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารประกอบสารอินทรีย์ หรือสารอนินทรีย์เช่น กรดชนิดต่างๆ และส่งผลให้ในกระบวนการหมักนั้นมีค่าความเป็นกรด-เบสที่ลดลง[5] ซึ่งจากการรายงานในปี 2016 พบว่าบริเวณของมิวซีเลจ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของเมล็ดกาแฟนั้นมีส่วนประกอบเป็นน้ำตาลมากถึง 6.2-7.4% ซึ่งมักเป็นสารอาหารสำหรับการสร้างสารเมแทบอไลต์ชนิดต่างๆได้อีกด้วย[10,11]

จากการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักของเชื้อทั้ง 2 สภาวะได้แก่ YL03 และ Y4-04 นั้นได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาที่มีผลต่อกระบวนการหมักซึ่งพบว่าหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมักสภาวะ YL03 และ Y4-04 มีคะแนนเท่ากับ 76.25 และ 76.00 เมื่อเทียบกับกระบวนการหมักที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ 48 ชั่วโมง โดยพบว่าเมื่อกระบวนการหมักนั้นมีระยะเวลาของกระบวนการหมักที่มากขึ้นมักส่งผลต่อปัจจัยชนิดต่างๆให้มีการเปลี่ยนแปลงไปซึ่งพบว่า ในขณะที่ความเป็นกรด-เบสลดลง หรือมีความเป็นกรดเพิ่มมากขึ้นนั้น ปริมาณของการละลายของน้ำตาลมักสูงขึ้น จากการรายงาน Elhalis และคณะได้มีการรายงานในปี 2021 ว่าเมื่อกระบวนการหมักผ่านไป 36 ชั่วโมงนั้นพบว่าค่าความเป็นกรด-เบสลดลงจาก 5.6 ถึง 3.8 หลังจากกระบวนการหมักด้วย *H. uvarum, P. kudriavzevii, P. fermentans, C. railenensis, C. xylopsoci* และ *W. anomalus* [41] นอกจากนี้ยังพบว่าปัจจัยที่มีผลในการเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการหมักคือการละลายของของแข็ง พบว่าเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักจะมีปริมาณที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกันกับสารต้านอนุมูลอิสระของเมล็ดกาแฟอีกด้วย[42]

และงานวิจัยในปี 2014 ยังมีการใช้ค่าการละลายของของแข็งในการควบคุมกระบวนการหมักเพื่อเปรียบระหว่างกระบวนการหมักที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์กับกระบวนการหมักที่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ [28] กระบวนการหมักเริ่มต้น ซึ่งจากการวิจัยของ Varady ได้ศึกษาผลของการละลายของปริมาณของแข็งในกระบวนการหมักกาแฟ พบว่าการละลายของของแข็งนอกจากจะเป็นส่วนสำคัญในการตรวจสอบกระบวนการหมักของกาแฟแล้วการละลายของของแข็งนั้นยังเป็นส่วนช่วยในการส่งเสริมการผลิต

ในการขยายการหมักเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อะราบิกาได้ทำการศึกษาที่ไร่กาแฟ 2 บริเวณได้แก่ อ.ห้วยน้ำดัง จ.แม่ฮ่องสอน และ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ พบว่าการขยายการหมักเมล็ดกาแฟที่ อ.ห้วยน้ำดัง จ.แม่ฮ่องสอน คุณภาพของเมล็ดกาแฟในกระบวนการหมักด้วยสภาวะ YL03 และ Y4-04 นั้นมีค่าเท่ากับ 65.00 และ 70.00 คะแนนตามลำดับ ซึ่งพบว่ากระบวนการหมักเมล็ดกาแฟด้วยสภาวะ Y4-04 มีคะแนนสูงกว่ากระบวนการหมักควบคุมที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์และมีลักษณะกลิ่นรสของกาแฟ ได้แก่ โกโก้ ส้ม และ เลมอน แต่เมื่อเปรียบเทียบคะแนนการชิมจากกระบวนการหมักก่อนหน้านี้พบว่าสภาวะดังกล่าวมีคะแนนที่ลดลง สาเหตุจากขั้นตอนของกระบวนการหมักที่ อ.ห้วยน้ำดัง จ.แม่ฮ่องสอน ไม่สามารถควบคุมกระบวนการหมักได้เหมือนการทดลองก่อนหน้า เช่นการทำความสะอาดเมล็ดกาแฟก่อนเริ่มกระบวนการหมัก และการควบคุมสภาพแวดล้อมของบริเวณการตากเมล็ดกาแฟจึงส่งผลให้มีคะแนนของการชิมลดลง แต่ได้นำสภาวะการหมัก Y4-04 ทำการขยายขนาดการหมักที่ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ ซึ่งพบว่ามีคะแนน

การชิมเท่ากับ 76.75 คะแนนเมื่อเทียบกับการทดลองควบคุมที่มีคะแนนเพียง 73.25 คะแนน แต่ยังคงมีคุณภาพด้านกลิ่นรส และการชิมต่ำกว่าการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ เนื่องจากมีสาเหตุเกี่ยวข้องกับเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่ส่งผลต่อกระบวนหมัก ในงานวิจัยของ Orrego ในปี 2018 ได้ทำการทดลองทดสอบขยายกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟจำนวน 45 ตันโดยการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อยีสต์ทางการค้าสำหรับผลิตไวน์ผลิตไวน์ในถังหมักชนิด Stirred tank bioreactor พบว่าสามารถช่วยส่งเสริมคุณภาพของเมล็ดกาแฟนั้นให้เป็นกาแฟชนิดพิเศษได้[45]

จากงานวิจัยของ Lee ที่มีการนำเชื้อยีสต์ มาใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนหมัก พบว่า เมล็ดของกาแฟที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์นั้น มีสารประกอบในกลุ่ม Alkane และ Aldehyde ที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับเมล็ดกาแฟที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ และการทดลองของ Martinez นั้นพบว่าเมล็ดกาแฟที่มีการหมักร่วมกันกับเชื้อจุลินทรีย์นั้นมีการผลิต Alcohol, Acid, Ester และ Aromatic ที่สูงขึ้นหลังจากกระบวนการหมัก[23,31] ซึ่งจากการวิจัยของ Elhalis ได้มีการอธิบายถึงการเกิดสารประกอบอินทรีย์ อนินทรีย์ รวมถึงสารระเหยที่มีผลต่อกลิ่นและรสชาติของกาแฟ อาทิเช่นการตรวจพบสารในกลุ่ม Furan นั้นจะมีผลต่อกลิ่นรสของกาแฟโดยจะทำให้เมล็ดกาแฟนั้นมีลักษณะ Smoke-roast การตรวจพบสารในกลุ่ม Pyrazines นั้นมักส่งผลต่อกลิ่นรสของกาแฟโดยจะทำให้เมล็ดของกาแฟนั้นมีกลิ่นถั่ว พีนัท เนย โกโก้ และช็อคโกแลต การตรวจพบสารในกลุ่ม Ketones นั้นส่งผลให้เมล็ดกาแฟมีกลิ่น ผลไม้ น้ำผึ้ง รวมถึงความหวานที่เพิ่มขึ้นในเมล็ดกาแฟ การตรวจพบสารในกลุ่ม Phenol นั้นจะส่งผลให้เมล็ดกาแฟมีลักษณะที่เผ็ดร้อนมากขึ้น การพบสารในกลุ่ม Pyridine นั้นจะส่งผลให้เมล็ดกาแฟมีลักษณะกลิ่นรสคล้ายกับไม้โอ๊ค และยาสูบ การพบสารในกลุ่ม Aldehyde นั้นมักจะส่งผลให้เมล็ดกาแฟมีกลิ่นลักษณะคล้ายหญ้า การพบสารในกลุ่ม Furanone นั้นมักส่งผลให้ลักษณะของเมล็ดกาแฟนั้นมีความหวานมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้การพบกรดชนิดต่างๆนั้น มักจะส่งผลต่อความเปรี้ยมของเมล็ดกาแฟอีกด้วย[46]

เช่นเดียวกับการศึกษาของงานวิจัยในปี 2021 มีรายงานเกี่ยวกับความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์โดยการใช้เทคนิค High-throughput sequencing พบว่ามีความหลากหลากของเชื้อแบคทีเรียมากถึง 695 สายพันธุ์และเชื้อรามากถึง 156 สายพันธุ์ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความโดดเด่นในกระบวนการหมักคือ *Leuconostoc* และยีสต์ที่มีความโดดเด่นในกระบวนการหมักคือ *Kazachstania* นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกรดอะซิติกที่มีความโดดเด่นในกระบวนการหมักคือ *Acetobacter* [26] จากการรายงานในปี 2020 ได้มีการศึกษาความหลากของจุลินทรีย์จากเมล็ดกาแฟอะราบิกาพบว่ามีความหลากหลากของเชื้อแบคทีเรียมากถึง 40 สายพันธุ์และเชื้อรา 212 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถจำแนกเชื้อยีสต์ในระหว่างการเริ่มต้นกระบวนการหมักได้ 2 สายพันธุ์ได้แก่

Hanseniaspora uvarum และ *Pichia kudriavzevii* กลุ่มแบคทีเรียที่เจริญในที่มีอากาศที่มีความโดดเด่นในกระบวนการหมักคือ Citrobacter นอกจากนี้ยังพบกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งสายพันธุ์ที่มีความโดดเด่นได้แก่ *Leuconostoc mesenteroidesv* และ *Lactococcus lactis* [27] ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นนั้นมักส่งผลให้คุณภาพของเมล็ดกาแฟในแต่ละพื้นที่มีลักษณะของเมล็ดกาแฟทางด้านกลิ่น และรสชาติต่างกัน ซึ่งพบว่าเชื้อจุลินทรีย์นั้นมักใช้สารอาหารจากเมล็ดกาแฟในการเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตสารชนิดต่างๆที่มีผลต่อกลิ่นและรสชาติของเมล็ดกาแฟ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มักส่งผลต่อปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักกาแฟที่แตกต่างกัน อาทิเช่นเชื้อ *S.cerevisiae, P.fermentans* และ *T.delbrueckii* นั้นมีลักษณะของเชื้อที่สามารถผลิตสารระเหย และมีกิจกรรมของเอนไซม์เพคติโนไลติกที่ดี ส่งผลให้สามารถเพิ่มคุณภาพและกลิ่นรสของเมล็ดกาแฟได้ [43] เชื้อ *Hansinospora uvarum* และ *Pichia kudriavzvii* มีศักยาภาพในการผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆ และยังช่วยส่งเสริมกระบวนการหมักซึ่งจะทำให้สามารถเพิ่มคุณภาพของเมล็ดกาแฟได้อีกด้วย(41)นอกจากนี้ยังมีเชื้อที่ศักยภาพในการเพิ่มปริมาณของ Alcohol และ Penols ในเมล็ดกาแฟจากการมีกิจกรรมการผลิตเอนไซม์ Proteolytic และ Lipolytic ที่ดีคือเชื้อ *Yarrowia lipolytica* [31] นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกนั้นยังสามารถช่วยป้องกันการเจริญของเชื้อรา และช่วยยับยั้งการสร้างสารพิษ Mycotoxins ในเมล็ดของกาแฟได้นั้นคือเชื้อ *Lactobacillus* spp. *Enterococcus* และ *Leuconostoc*[44]

หลังจากกระบวนการหมักได้นำเมล็ดกาแฟที่ผ่านการคั่วทำการศึกษาการวิเคราะห์สารเมแทบอไลต์โดยใช้ Nuclear Magnetic Resonance และ Gas Chromatography Mass Spectrometer พบว่าการวิเคราะห์สารแมทาบอไลต์โดยใช้ Nuclear Magnetic Resonance นั้นพบ ไตรโกเนลลีน , คาเฟอีน และกรดอะซิติก ในเมล็ดกาแฟที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ และการวิเคราะห์โดยการใช้ Gas Chromatography Mass Spectrometer นั้นมักพบสารในกลุ่มฟูแลน, ไพราซีน, กรดคาร์บอกซิลิก, คีโตน, ไพลอล, ฟีนอล, ไพรานอล, ไพรีดีน , ฟูลลานอล , เอสเตอร์, ไพริมีดีน, แอลกอฮอล์ และ แซนทีน

และผลการทดลองจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการพัฒนาคุณภาพของเมล็ดกาแฟพบว่าสภาวะ Y4-04 ช่วงส่งเสริมคุณภาพของกระบวนการหมักให้เมล็ดกาแฟมีคุณภาพที่ดียิ่งขึ้น โดยเชื้อจุลินทรีย์ของสภาวะ Y4-04 นั้นประกอบด้วยเชื้อยีสต์ 4 สายพันธุ์ได้แก่ *P. kluyveri* YWP1-5, *P. kluyveri* YML1-1, *P. kluyveri* YMP1-1 และ *W. anomalus* YWP1-3 จึงทำการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยทำการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า น้ำตาลปี๊บช่วย

ส่งเสริมการเจริญของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้แก่ *P. kluyveri* YWP1-5, P. *kluyveri* YML1-1 และ *P. kluyveri* YMP1-1 และน้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอนที่ช่วยส่งเสริมให้เชื้อ *W. anomalus* YWP1-3 มีการผลิตมวลเซลล์ที่มากยิ่งขึ้น และจากการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนนั้นพบว่ายีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์มีความเหมาะสมต่อการผลิตมวลเซลล์จากการใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยง ซึ่งจากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตมวลเซลล์ของเชื้อยีสต์นั้นพบว่า การเปลี่ยนแปลงของแหล่งคาร์บอนที่ใช้สำหรับในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์นั้นจะช่วยลดต้นทุนในกระบวนการผลิตลง และยังช่วยให้มวลเซลล์ที่ต้องการใช้ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟนั้นสามารถผลิตขึ้นมาได้ตามปริมาณและคุณภาพที่ต้องการ

จากงานวิจัยในปี 2012 ในการศึกษาเพื่อผลิตมวลเซลล์ของยีสต์ให้เพิ่มขึ้นจากการใช้ Glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีปริมาณของมวลเซลล์มากถึง 25.7 กรัม/ลิตร [47] และจากการศึกษาในปี 2017 ในการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนในการผลิตเซลล์ยีสต์ *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 พบว่าการใช้ Glucose และ Fructose เป็นแหล่งคาร์บอนจะช่วยส่งเสริมผลิตเซลล์ที่สูงสุด(34) จากงานวิจัยในปี 2002 มีการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเซลล์ของ *Pantoea agglomerans* CPA-2 โดยศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ โดยแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ช่วยทำให้มีการผลิตเซลล์สูงที่สุด [37]

จากการศึกษาทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพนั้นสามารถนำมาเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟ เพื่อช่วยส่งเสริมคุณภาพของเมล็ดของกาแฟในแต่ละท้องถิ่นบริเวณให้ดียิ่งขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ อีกทั้งยังช่วยเพิ่มคุณภาพ และมูลค่าให้กับเมล็ดกาแฟได้อีกด้วย ดังนั้นการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์เข้าช่วยในกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟนั้นจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยส่งเสริมคุณภาพของเมล็ดกาแฟได้

บรรณานุกรม

1. Correa E, Jiménez-Ariza T, Díaz-Barcos V, Barreiro P, Diezma B, Oteros R, et al. Advanced characterisation of a coffee fermenting tank by multi-distributed wireless sensors: Spatial interpolation and phase space graphs. Food and Bioprocess Technology. 2014;7(11):3166-74.
2. Mussatto SI, Machado EM, Martins S, Teixeira JA. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. Food and Bioprocess Technology. 2011;4(5):661-72.
3. Silva CF, Vilela DM, de Souza Cordeiro C, Duarte WF, Dias DR, Schwan RF. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2013;29(2):235-47.
4. Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Brand D, Mohan R, Roussos S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. Biochemical Engineering Journal. 2000;6(2):153-62.
5. Avallone S, Brillouet JM, Guyot B, Olguin E, Guiraud JP. Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation. International journal of food science & technology. 2002;37(2):191-8.
6. da Silva MC, Naozuka J, da Luz JMR, de Assunção LS, Oliveira PV, Vanetti MC, et al. Enrichment of pleurotus ostreatus mushrooms with selenium in coffee husks. Food chemistry. 2012;131(2):558-63.
7. Neu A-K, Pleissner D, Mehlmann K, Schneider R, Puerta-Quintero GI, Venus J. Fermentative utilization of coffee mucilage using bacillus coagulans and investigation of down-stream processing of fermentation broth for optically pure l (+)-lactic acid production. Bioresource technology. 2016;211:398-405.
8. Clifford M. Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. Coffee. Springer; 1985. 305-74.
9. 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.

10. Reis RS, Tienne LG, de HS Souza D, Maria de Fátima VM, Monteiro SN. Characterization of coffee parchment and innovative steam explosion treatment to obtain microfibrillated cellulose as potential composite reinforcement. Journal of Materials Research and Technology. 2020;9(4):9412-21.
11. Borrelli RC, Esposito F, Napolitano A, Ritieni A, Fogliano V. Characterization of a new potential functional ingredient: Coffee silverskin. Journal of agricultural and food chemistry. 2004;52(5):1338-43.
12. Zhu M, Long Y, Ma Y, Chen Y, Yu Q, Xie J, et al. Comparison of chemical and fatty acid composition of green coffee bean (coffea arabica l.) from different geographical origins. LWT. 2021;140:110802.
13. Vinícius de Melo Pereira G, Soccol VT, Brar SK, Neto E, Soccol CR. Microbial ecology and starter culture technology in coffee processing. Critical reviews in food science and nutrition. 2017;57(13):2775-88.
14. Giacalone D, Degn TK, Yang N, Liu C, Fisk I, Münchow M. Common roasting defects in coffee: Aroma composition, sensory characterization and consumer perception. Food quality and preference. 2019;71:463-74.
15. Frank O, Zehentbauer G, Hofmann T. Screening and identification of bitter compounds in roasted coffee brew by taste dilution analysis. Developments in food science. 43. Elsevier; 2006. 165-8.
16. Bicho NC, Leitão AE, Ramalho JC, Lidon FC. Use of colour parameters for roasted coffee assessment. Food Science and Technology. 2012;32(3):436-42.
17. Santos JR, Lopo M, Rangel AO, Lopes JA. Exploiting near infrared spectroscopy as an analytical tool for on-line monitoring of acidity during coffee roasting. Food Control. 2016;60:408-15.
18. Masoud W, Jespersen L. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of coffea arabica in east africa. International journal of food microbiology. 2006;110(3):291-6.
19. Martinez SJ, Bressani APP, Miguel MGdCP, Dias DR, Schwan RF. Different inoculation

methods for semi-dry processed coffee using yeasts as starter cultures. Food Research International. 2017;102:333-40.

20. de Melo Pereira GV, Neto E, Soccol VT, Medeiros ABP, Woiciechowski AL, Soccol CR. Conducting starter culture-controlled fermentations of coffee beans during on-farm wet processing: Growth, metabolic analyses and sensorial effects. Food Research International. 2015;75:348-56.
21. 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.
22. Masoud W, Jespersen L. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of coffea arabica in east africa. International journal of food microbiology. 2006;110(3):291-6.
23. Martinez SJ, Bressani APP, Miguel MGdCP, Dias DR, Schwan RF. Different inoculation methods for semi-dry processed coffee using yeasts as starter cultures. Food Research International. 2017;102:333-40.
24. Evangelista SR, Miguel MGdCP, Silva CF, Pinheiro ACM, Schwan RF. Microbiological diversity associated with the spontaneous wet method of coffee fermentation. International Journal of Food Microbiology. 2015;210:102-12.
25. Vilela DM, Pereira GVdM, Silva CF, Batista LR, Schwan RF. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (coffea arabica l.). Food Microbiology. 2010;27(8):1128-35.
26. Cruz-O'Byrne R, Piraneque-Gambasica N, Aguirre-Forero S. Microbial diversity associated with spontaneous coffee bean fermentation process and specialty coffee production in northern colombia. International Journal of Food Microbiology. 2021:109282.
27. Elhalis H, Cox J, Zhao J. Ecological diversity, evolution and metabolism of microbial communities in the wet fermentation of australian coffee beans. International journal of food microbiology. 2020;321:108544.
28. Evangelista SR, Miguel MGdCP, de Souza Cordeiro C, Silva CF, Pinheiro ACM,

Schwan RF. Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (coffea arabica) fermentation process. Food Microbiology. 2014;44:87-95.

29. 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.
30. Chan MZA, Toh M, Liu S-Q. Growth, survival, and metabolic activities of probiotic lactobacillus spp. In fermented coffee brews supplemented with glucose and inactivated yeast derivatives. Food Research International. 2020;137:109746.
31. Lee LW, Tay GY, Cheong MW, Curran P, Yu B, Liu SQ. Modulation of the volatile and non-volatile profiles of coffee fermented with yarrowia lipolytica: I. Green coffee. LWT. 2017;77:225-32.
32. 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.
33. Mohammadkazemi F, Azin M, Ashori A. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. Carbohydrate polymers. 2015;117:518-23.
34. Díaz-Nava L, Montes-Garcia N, Domínguez J, Aguilar-Uscanga M. Effect of carbon sources on the growth and ethanol production of native yeast pichia kudriavzevii itv-s42 isolated from sweet sorghum juice. Bioprocess and biosystems engineering. 2017;40(7):1069-77.
35. . Effects of different carbon sources for high level lactic acid production by lactobacillus casei. Applied Mechanics and Materials; 2015: Trans Tech Publ.
36. Nwokoro O, Ogbonna J, Okpala G, Ubani C, Anya F. Effects of various inorganic nitrogen sources on the growth and biomass production by candida utilis isolated from fermenting cassava tubers. Bio-Research. 2010;8(2).
37. Costa E, Teixidó N, Usall J, Atarés E, Viñas I. The effect of nitrogen and carbon sources on growth of the biocontrol agent pantoea agglomerans strain cpa-2. Letters in applied microbiology. 2002;35(2):117-20.

38. Ayad AA, Gad El-Rab DA, Ibrahim SA, Williams LL. Nitrogen sources effect on lactobacillus reuteri growth and performance cultivated in date palm (phoenix dactylifera l.) by-products. Fermentation. 2020;6(3):64.

39. Gao Y, Liang J, Xiao R, Zang P, Zhao Y, Zhang L. Effect of four trace elements on paenibacillus polymyxa pp-7250 proliferation, activity and colonization in ginseng. AMB Express. 2018;8(1):1-17.

40. Bayer K. Trace element supplementation of cheese whey for the production of feed yeast. Journal of Dairy Science. 1983;66(2):214-20.

41. Elhalis H, Cox J, Frank D, Zhao J. Microbiological and chemical characteristics of wet coffee fermentation inoculated with hansinaspora uvarum and pichia kudriavzevii and their impact on coffee sensory quality. Frontiers in Microbiology. 2021;12:713969.

42. Várady M, Tauchen J, Klouček P, Popelka P. Effects of total dissolved solids, extraction yield, grinding, and method of preparation on antioxidant activity in fermented specialty coffee. Fermentation. 2022;8(8):375.

43. Haile M, Kang WH. The role of microbes in coffee fermentation and their impact on coffee quality. Journal of Food Quality. 2019;2019.

44. Ribeiro LS, da Cruz Pedrozo Miguel MG, Martinez SJ, Bressani APP, Evangelista SR, Silva e Batista CF, et al. The use of mesophilic and lactic acid bacteria strains as starter cultures for improvement of coffee beans wet fermentation. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2020;36:1-15.

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

46. Taccari M, Canonico L, Comitini F, Mannazzu I, Ciani M. Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. Bioresource Technology. 2012;110:488-95.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

1. Yeast malt agar (YM)

Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Dextrose	10	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร บรรจุลงภาชนะ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

2. Yeast extract broth (YE)

Yeast extract	5	กรัม
Glucose	30	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร บรรจุลงภาชนะ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

3. Nutrient agar (NA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร บรรจุลงภาชนะ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที (ไม่ต้องใส่ Agar หากต้องการเตรียมอาหารเหลว)

4.Lactobacillus MRS broth (MRS)

Lactobacillus broth	55.15	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร บรรจุลงภาชนะ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

5. Lactobacillus MRS agar (MRS)

Lactobacillus broth	55.15	กรัม
Calcium carbonate	3	กรัม
Agar	15	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร บรรจุลงภาชนะ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

6. สารละลาย Acetonitrile 99.99%

Acetonitrile HPLC Gradient	990	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนเป็นเนื้อเดียวกัน และใช้งานทันที

7. สารละลาย 0.1M Hydrochloric acid

Hydrochloric acid fuming 37%	13.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	986	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร บรรจุลงภาชนะ และใช้งานทันที

8. **สารละลาย** 0.1M Sodium hydroxide

Sodium hydroxide	4	กรัม
น้ำกลั่น	996	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร บรรจุลงภาชนะ และใช้งานทันที

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	รัตติยากร มะหิงษะพันธุ์
วัน เดือน ปี เกิด	1 ธันวาคม 2539
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	
ที่อยู่ปัจจุบัน	5 หมู่ 2 ต.ท่าทราย อ.เมือง จ.นนทบุรี 11000
ผลงานตีพิมพ์	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