รายงานผลวิจัยเรื่องเต็ม

โครงการวิจัย

เทคโนโลยีการผลิต Coffee Starter Culture (CSC) เพื่อการหมักกาแฟคุณภาพ

Production of Coffee Starter Culture (CSC)
for qualitative coffee fermentation

โกเมศ สัตยาวุธ สุกัญญา นิติยนต์ และกนกศักดิ์ ลอยเลิศ

สนับสนุนโดย

เงินรายได้จากการดำเนินงานวิจัยด้านการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

กันยายน 2566

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	III
สารบัญภาพ	IV
สารบัญภาคผนวก	VI
บทคัดย่อ	1
คำนำ	2
วิธีดำเนินการ	6
ขั้นตอนที่ 1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการผลิตกล้าเชื้อผง Coffee Starter Culture โดยวิธีการทำแห้งแบบใช้ตู้อบลมสะอาด (Clean air oven)	6
1.1 การเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ให้มีปริมาณเพียงพอต่อการทำแห้ง	6
1.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารผสมที่เหมาะสมต่อการป้องกันเซลล์ในการทำแห้ง	7
1.3 การพัฒนากำลังการผลิตเชื้อแห้งเพื่อการประยุกต์ใช้ในแปลงทดลอง	8
1.4 การคัดเลือก ทดสอบและพัฒนาบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อแห้ง	8
1.5 การพัฒนาบรรจุภัณฑ์ย่อยสลายได้สำหรับบรรจุหัวเชื้อแห้ง	9
ขั้นตอนที่ 2 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อผง Coffee Starter Culture ที่ผลิตได้จากกระบวนการทำแห้งในการหมักกาแฟ	10
2.1 การทดลองการหมักกาแฟโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ CSC	10
2.2 การทดสอบคุณภาพการหมักกาแฟ	10
2.3 ขยายขนาดการหมักกาแฟโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ CSC ในแปลงทดสอบ	10
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	12
1. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการผลิตกล้าเชื้อผง Coffee Starter Culture โดยวิธีการทำแห้งแบบใช้ตู้อบลมสะอาด (Clean air oven)	12
1.1 ผลการเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ให้มีปริมาณเพียงพอต่อการทำแห้ง	12
1.2 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารผสมที่เหมาะสมต่อการป้องกันเซลล์ในการทำแห้ง	15
1.3 ผลการพัฒนากำลังการผลิตเชื้อแห้งเพื่อการประยุกต์ใช้ในแปลงทดลอง	18
1.4 ผลการคัดเลือก ทดสอบและพัฒนาบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาหัวเชื้อแห้ง	19
1.5 ผลการพัฒนาบรรจุภัณฑ์ย่อยสลายได้สำหรับบรรจุหัวเชื้อแห้ง	25
2. ผลวิเคราะห์ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อผง Coffee Starter Culture	28
2.1 ผลการสำรวจพื้นที่เพื่อการถ่ายทอดเทคโนโลยีโดยการตรวจสอบกระบวนการผลิตกาแฟ	28
2.2 ผลการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ต่อผลของการหมักกาแฟอะราบิกา	30
2.3 การทดสอบการใช้เชื้อจุลินทรีย์แห้งในพื้นที่จังหวัดเชียงรายและจังหวัดเชียงใหม่	32
2.4 การพัฒนาแนวทางการส่งเสริมต่อยอดการขยายผลการผลิตเชื้อแห้ง Coffee Starter Culture	36

สารบัญ

	หน้า
สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ	40
ข้อเสนอแนะและการนำไปใช้ประโยชน์	41
คำขอบคุณ	42
เอกสารอ้างอิง	43
ภาคผนวก	46

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สูตรหัวเชื้อแห้ง	9
2	ปริมาณเซลล์เริ่มต้นและเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการทำแห้งยีสต์สายพันธุ์ PRO-Y15 ที่อุณหภูมิ 45 °C	17
3	ปริมาณเซลล์เริ่มต้นและเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการทำแห้งยีสต์สายพันธุ์ PRO-Y15 ที่อุณหภูมิ 37 °C	17
4	ปริมาณเซลล์เริ่มต้นและเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการทำแห้งยีสต์สายพันธุ์ BAwine ที่อุณหภูมิ 37 °C	17
5	ปริมาณเซลล์เริ่มต้นและเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการทำแห้งยีสต์สายพันธุ์ PRO-Y15 ที่อุณหภูมิ 37 °C	19
6	ปริมาณเซลล์เริ่มต้นและเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการทำแห้งยีสต์สายพันธุ์ BAwine ที่อุณหภูมิ 37 °C	19
7	สมบัติของถุงลามิเนต	20
8	อัตราการรอดชีวิตของหัวเชื้อแห้ง	23
9	สมบัติของพลาสติกชีวภาพพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA)	27
10	ผลการสำรวจพื้นที่เพื่อการถ่ายทอดเทคโนโลยีโดยการตรวจสอบระบบการผลิตกาแฟ	29
11	กระบวนการหมักกาแฟในพื้นที่ทดสอบ ต้นทุนการผลิตและคุณภาพ	29
12	สรุปปัญหาและแนวทางแก้ปัญหาที่พบในการทดสอบเชื้อแห้งในห้องปฏิบัติการและพื้นที่จริง	37
13	ภาพรวมเทคโนโลยีและต้นทุนการผลิต ตามวิธีของเกษตรกรเปรียบเทียบกับเทคโนโลยีของกรมวิชาการเกษตรที่ให้เกษตรกรต้นแบบดำเนินการ	38

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนภาพแสดงการเจริญของเซลล์ (ความขุ่นของเซลล์ที่ OD 660 nm) และจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (CFU/ml) ของ A.) ยีสต์สายพันธุ์ BAwine และ B.) ยีสต์สายพันธุ์ PRO-Y15 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YM และ YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 2 และ 5%	13
2	แผนภาพแสดงการเจริญของเซลล์ (ความขุ่นของเซลล์ที่ OD660 nm) และจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (CFU/ml) ของ A.) ยีสต์สายพันธุ์ BAwine และ B.) ยีสต์สายพันธุ์ PRO-Y15 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YM และ YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 2% (YM+2% Glu, YPD+ 2% Glu) และอาหารเหลว YM สำเร็จรูปที่เติมและไม่เติมน้ำตาลกลูโคส 1% (YM-HM + 1%Glu, YM-HM)	14
3	แสดงลักษณะปรากฏของแป้งสาลีที่ผสมกับหัวเชื้อยีสต์ในสารละลายป้องกันเซลล์ก่อนและหลังอบแห้ง ในอัตราส่วน 10g แป้งสาลี :20 ml ยีสต์ในสารป้องกันเซลล์ หรือ 20g แป้งสาลี :20 ml ยีสต์ในสารป้องกันเซลล์	15
4	แสดงลักษณะปรากฏของแป้งถั่วเหลืองที่ผสมกับหัวเชื้อยีสต์ในสารละลายป้องกันเซลล์ก่อนและหลังอบแห้ง ในอัตราส่วน 10g ถั่วเหลือง :20 ml ยีสต์ในสารป้องกันเซลล์ หรือ 20g แป้งถั่วเหลือง :20 ml ยีสต์ในสารป้องกันเซลล์	16
5	ระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์เพื่อใช้สำหรับการผลิตหัวเชื้อแห้งเพื่อการหมักกาแฟ	18
6	ตัวอย่างถุงลามิเนตแบบถุงขยายข้าง ตั้งได้ (Flat-bottom bag) สำหรับคัดเลือกบรรจุเชื้อแห้ง	20
7	ชนิดของแผ่นกระดาษลูกฟูกสำหรับผลิตกล่องกระดาษลูกฟูกเพื่อการขนส่ง (a) ถุงลามิเนต สำหรับบรรจุหัวเชื้อแห้ง (b) แผ่นกระดาษลูกฟูก 1 ชั้น (Single wall corrugated board) และ (c) กล่องฝาชน (Regular Slotted Container (RSC) และ (d) กล่องโฟม	21
8	การตรวจนับจำนวนเชื้อด้วย Petrifilm	22
9	แผนภาพแสดงเซลล์ที่มีชีวิต (log cfu/ml) ของหัวเชื้อจุลินทรีย์แห้งสายพันธุ์ PRO-Y15 ที่ผลิตโดยใช้กลูโคส (GlU) และทรีฮาโลส (Tre) เป็นสารป้องกันเซลล์ เมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (RT) และ อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส	24
10	แผนภาพแสดงเซลล์ที่มีชีวิต (log cfu/ml) ของหัวเชื้อจุลินทรีย์แห้งสายพันธุ์ BAwine ที่ผลิตโดยใช้กลูโคส (GlU) และทรีฮาโลส (Tre) เป็นสารป้องกันเซลล์ เมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (RT) และ อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส	25
11	พลาสติกชีวภาพพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA)	26

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
12	มุมสัมผัสหยดน้ำ (a) และกราฟพลังงานพื้นผิว (b) ของพลาสติกชีวภาพพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA)	26
13	ทดสอบการละลายน้ำของพลาสติกชีวภาพ PVA ที่บรรจุหัวเชื้อแห้ง	27
14	แผนภาพแสดงการเจริญของเซลล์ (ความขุ่นของเซลล์ที่ OD660 nm) และจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (log CFU/ml) ของ A.) ยีสต์สายพันธุ์ BAwine (สีฟ้า) B.) ยีสต์สายพันธุ์ PRO-Y15 (สีส้ม) และ ชุดควบคุม (สีเทา)ระหว่างการหมักกาแฟต่อความเป็นกรดด่าง	31
15	กราฟแสดงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสในรูปแบบของ cupping hedonic score (บน) หัวเชื้อแห้ง BAwine (ล่าง) หัวเชื้อแห้ง Pro-Y15 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Control -สีเข้ม)	32
16	แผนภาพแสดงการเจริญของหัวเชื้อจุลินทรีย์ (log cfu/ml) , ความขุ่น (Turbidity) และความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ A.) ยีสต์สายพันธุ์ PRO-Y15 และ B.) ยีสต์สายพันธุ์ BAwine ระหว่างการหมักกาแฟ ในพื้นที่จังหวัดเชียงราย *(เส้นสีน้ำเงิน = ชุดควบคุม; เส้นสีเทา = หัวเชื้อแห้งสูตร 10% Glucose ผสมแป้งถั่วเหลือง; เส้นสีฟ้า = หัวเชื้อแห้งสูตร 10% Glucose ผสมแป้งข้าวเจ้า; เส้นสีเหลือง = หัวเชื้อแห้งสูตร 5% Trehalose ผสมแป้งถั่วเหลือง; เส้นสีเขียว = หัวเชื้อแห้งสูตร 5% Trehalose ผสมแป้งข้าวเจ้า; สีส้ม = หัวเชื้อสด)*	34
17	แผนภาพแสดงการเจริญของหัวเชื้อจุลินทรีย์ (log cfu/ml) , ความขุ่น (Turbidity) และความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ A.) ยีสต์สายพันธุ์ PRO-Y15 และ B.) ยีสต์สายพันธุ์ BAwine ระหว่างการหมักกาแฟ ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ *(เส้นสีน้ำเงิน = ชุดควบคุม; เส้นสีเทา = หัวเชื้อแห้งสูตร 10% Glucose ผสมแป้งถั่วเหลือง; เส้นสีฟ้า = หัวเชื้อแห้งสูตร 10% Glucose ผสมแป้งข้าวเจ้า; เส้นสีเหลือง = หัวเชื้อแห้งสูตร 5% Trehalose ผสมแป้งถั่วเหลือง; เส้นสีเขียว = หัวเชื้อแห้งสูตร 5% Trehalose ผสมแป้งข้าวเจ้า; สีส้ม = หัวเชื้อสด)*	35
18	พื้นที่ทดสอบหัวเชื้อแห้งที่ผลิตโดยใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นสารเพิ่มปริมาณและเป็นที่ยึดเกาะของเซลล์จุลินทรีย์โดยใช้พื้นที่ศูนย์วิจัยและแปลงเกษตรกร	39
19	การถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตกาแฟพรีเมี่ยมและการใช้หัวเชื้อ CSC จำนวน 300 ราย ณ กรมวิชาการเกษตร และการขยายผลต่อยอดในการส่งเสริมการรับรองกาแฟเป็นสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์	39
20	การนำเสนอภาคนิทรรศการและการแสดงผลงานในงานประชุมวิชาการกรมวิชาการเกษตร, Research Expo สกสว และงานใต้ร่มพระบารมี ณ สวนสิริกิตต์	40

สารบัญภาคผนวก

ภาคผนวกที่		หน้า
1	อาหารเลี้ยงเชื้อ	46
2	คำแนะนำวิธีการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์แห้ง	47

เทคโนโลยีการผลิต Coffee Starter Culture (CSC) เพื่อการหมักกาแฟคุณภาพ

Production of Coffee Starter Culture (CSC) for qualitative coffee fermentation

โกเมศ สัตยาวุธ สุกัญญา นิติยนต์ กนกศักดิ์ ลอยเลิศ
กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

.....

บทคัดย่อ

เชื้อจุลินทรีย์แห้งเพื่อการหมักกาแฟคุณภาพ หรือ Coffee Starter Culture (CSC) ได้รับการพัฒนาจากเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* strain BAwine และ *Pichia kluyveri* strain PRO-Y15 ที่คัดเลือกโดยกรมวิชาการเกษตร ได้ทำการเพาะเลี้ยงและขยายกำลังการผลิตเซลล์ยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Yeast Malt ที่มีน้ำตาลกลูโคส 2% ใช้เวลาเพาะเลี้ยง 18-24 ชั่วโมงเพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต 1.65 x10^8 CFU/ml สำหรับยีสต์สายพันธุ์ BAwine และปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต 5.40 x 10^8 CFU/ml สำหรับยีสต์สายพันธุ์ PRO-Y15 ก่อนนำไปทำแห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสโดยใช้แป้งข้าวเจ้าอัตราส่วน 20 กรัมต่อเชื้อยีสต์ 10 ml ร่วมกับสารปกป้องเซลล์ 10% น้ำตาลกลูโคส และ 10% Skim milk ในสภาวะการทำแห้งดังกล่าวเซลล์ยีสต์มีการรอดชีวิตมากกว่า 10^8 CFU/g ของหัวเชื้อแห้ง และเมื่อทำการเก็บรักษาหัวเชื้อแห้ง CSC ในถุงลามิเนต OPP/VMPET/PE หัวเชื้อแห้งมีอายุการเก็บรักษาได้นาน 30 – 60 วันที่อุณหภูมิห้อง และเก็บรักษาได้ 60 – 180 วัน เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังได้ทำการพัฒนาบรรจุภัณฑ์หัวเชื้อแห้งแบบละลายน้ำได้รูปแบบพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) เพื่อให้สะดวกต่อการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักกาแฟอีกด้วย เมื่อนำหัวเชื้อแห้งไปทดสอบในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่และเชียงรายพบว่าหัวเชื้อแห้งเจริญเติบโตและหมักกาแฟแข่งขันกับเชื้อตามธรรมชาติจนได้ปริมาณเซลล์ที่ 6.95 logCFU/ml ในชั่วโมงที่ 18 ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เมือกหลุดลอกจากเมล็ดกาแฟและถือเป็นการสิ้นสุดกระบวนการหมัก ซึ่งผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสตามวิธีของ SCAA พบกาแฟที่หมักโดยเชื้อแห้งนั้นจะมีคะแนนระหว่าง 84 – 86 คะแนนจาก 100 คะแนน ซึ่งมีลักษณะโดดเด่นกว่ากาแฟที่หมักโดยวิธีเดิมในทุกด้าน การใช้เชื้อแห้ง CSC สามารถลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกรได้จริงกว่า 35% ตั้งแต่เวลาการผลิต ทรัพยากรน้ำ แรงงานรวมทั้งลดมลพิษและปัญหาสิ่งแวดล้อมจากการผลิตกาแฟ โดยต้นทุนการผลิตต่อไร่เพียง 5,000 บาทต่อไร่ ซึ่งถือเป็นนวัตกรรมลดต้นทุนการผลิตกาแฟ เพื่อเพิ่มรายได้ให้เกษตรกรสู่การผลิตกาแฟคุณภาพอย่างยั่งยืนตามหลักเศรษฐกิจหมุนเวียน

คำสำคัญ : เชื้อจุลินทรีย์แห้ง พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pichia kluyveri*

รหัสโครงการ 642519

คำนำ

กาแฟ เป็นเครื่องดื่มที่มีความนิยมอย่างสูงของผู้บริโภคทั่วโลก ซึ่งหลังจากการเก็บเกี่ยวกาแฟจะมีการลอกเชอร์รี่ออก จากนั้นในกระบวนการผลิตกาแฟอะราบิกาคุณภาพจะใช้กระบวนการแปรรูปแบบเปียก เป็นการนำเมล็ดกาแฟที่ผ่านการลอกเปลือกนอกออก แล้วนำมาหมักลงในถังหมัก โดยจุลินทรีย์ธรรมชาติที่มากับเมล็ดกาแฟจะทำการหมักเพื่อย่อยเมือกหุ้มเมล็ดกาแฟ (Silva *et al*., 2013; Rujikan *et al*., 2014) ซึ่งเป็นส่วนของเพคติน น้ำตาล เฮมิเซลลูโลส และส่วนที่ไม่ละลายน้ำ จึงต้องอาศัยกิจกรรมจุลินทรีย์และเอนไซม์ในการย่อยสลาย จุลินทรีย์ที่พบส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียและยีสต์ (Avallone *et. al*., 2001; 2002; Masoud and Jespersen, 2006) จากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการหมักเมล็ดกาแฟอะราบิกายังมีไม่มากในประเทศไทย ทั้งนี้ในปัจจุบันเกษตรกรได้ละเลยกระบวนการหมักดังกล่าวไปมาก โดยเลือกที่จะใช้กระบวนการแปรรูปแบบแห้ง เนื่องมาจากข้อจำกัดด้านเวลา สถานที่ แรงงานและค่าใช้จ่าย จึงส่งผลให้คุณภาพกาแฟอะราบิกาลดลง ทำให้ผู้บริโภคไม่ยอมรับ เกิดสารพิษได้แก่ ออคราทอกซิน เอ และสารให้กลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ในกาแฟตามท้องตลาด การทดลองการหมักกาแฟอะราบิกาโดยจุลินทรีย์จึงเป็นงานวิจัยที่จะพัฒนาเทคโนโลยีหมักกาแฟอะราบิกาได้

โดยกรมวิชาการเกษตรได้ดำเนินการพัฒนาการหมักกาแฟตั้งแต่ปีงบประมาณ 2559 ถึงปัจจุบันภายใต้โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการหมักกาแฟอะราบิกาเพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก และการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยเมือกหุ้มเมล็ดกาแฟ ลดระยะเวลาการหมักกาแฟ (โกเมศ และคณะ, 2561a; 2561b; สุกัญญา และคณะ 2562) โดยปัจจุบันได้เทคโนโลยีการหมักกาแฟโดยใช้จุลินทรีย์ที่เหมาะสม จำนวน 2 เทคโนโลยี ได้แก่ การเร่งการหมักโดยเทคนิคเอเอเอฟ (AAF techniques) (Satayawut and Nitiyon, 2019) และการเร่งกระบวนการหมักกาแฟโดยใช้จุลินทรีย์ในระบบปิด ซึ่งทั้ง 2 เทคโนโลยีนี้ใช้หัวเชื้อยีสต์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการย่อยเมือกกาแฟ ลดระยะเวลาในการหมักและเพิ่มคุณภาพของเมล็ดกาแฟได้อย่างดี เหมาะสำหรับนำไปใช้เป็นแนวทางในการควบคุมสภาวะการหมักที่มีผลต่อคุณภาพ ลดต้นทุนแรงงานและเวลาการผลิตกาแฟ รวมทั้งยังสามารถเพิ่มมูลค่าของเมล็ดกาแฟสู่มาตรฐานกาแฟพรีเมี่ยม (เป็นเทคโนโลยีที่กำลังนำไปใช้ต่อยอดในโครงการขับเคลื่อนงานวิจัยสู่การนำไปใช้ประโยชน์ ระหว่างปีงบประมาณ 2563 – 2565 แต่อย่างไรก็ตามการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการหมักกาแฟยังไม่สามารถผลิตได้ในปริมาณที่เพียงพอที่จะแจกจ่ายเชื้อจุลินทรีย์ให้กับเกษตรกร จึงส่งผลให้ถ่ายทอดเทคโนโลยีการหมักกาแฟไม่สามารถทำได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ เนื่องจากต้นทุนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตมีราคาสูงและยังขาดเทคโนโลยีในการทำแห้งที่เหมาะสมไม่สามารถเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ไว้ได้นาน โครงการนี้จึงได้ทำการพัฒนาเทคโนโลยีการขยายเชื้อและการทำแห้งเพื่อการผลิตหัวเชื้อสำหรับสนับสนุนการถ่ายทอดเทคโนโลยีการหมักกาแฟแก่เกษตรกรต่อไป

การพัฒนาหัวเชื้อพร้อมใช้เริ่มมีการศึกษาและพัฒนาสำหรับการผลิตอาหารหมักบางชนิดแล้ว โดย Mantzourani et al. (2019) ได้ทำการศึกษาการเตรียมหัวเชื้อพร้อมใช้สำหรับการผลิตขนมปัง sourdough โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus paracasei* K5 และ *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842 ในรูปแบบเดี่ยว

และแบบผสม ตรึงบนรำข้าวสาลีและทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยไม่เติมสารป้องกันเซลล์ พบว่าหัวเชื้อสำหรับรูปสามารถผลิตกรดในขนมปังได้ดี และสร้างสารเพิ่มกลิ่นรสในขนมปังได้มากขึ้น Chutrtong (2015) ได้ทำแห้งโยเกริต์โดยวิธีแช่เยือกแข็งเพื่อเก็บรักษาและใช้เป็นหัวเชื้อพร้อมใช้ในการผลิตโยเกริต์ โดยได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส และตรวจสอบการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ พบว่าหัวเชื้อที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้นาน 3 เดือน ในขณะหัวเชื้อที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้น้อยกว่า 1 เดือน Maneesri et al. (2011) ทำการพัฒนาหัวเชื้อพร้อมใช้สำหรับการผลิตน้ำส้มสายชู โดยการอบแห้งเชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR102 ด้วยความร้อนอุณหภูมิต่ำ โดยการเคลือบเซลล์แบคทีเรียปริมาตร 4 มิลลิลิตร ด้วยแมนนิทอล 20% (w / v) และใช้รำข้าว 10 กรัม เป็นตัวตรึงเซลล์หลังจากนั้นอบให้แห้งที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าการทำแห้งด้วยความร้อนต่ำทำให้เซลล์มีชีวิตรอดสูงกว่าการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยหัวเชื้อพร้อมใช้สามารถเก็บในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ภายใต้สุญญากาศได้นานเป็นเวลา 1 เดือนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

อย่างไรก็ตามการเตรียมหัวเชื้อพร้อมใช้สำหรับการแปรรูปกาแฟยังมีการศึกษาไม่มาก โดยเทคโนโลยีที่เหมาะสำหรับการทำแห้งยีสต์สำหรับใช้เป็นหัวเชื้อพร้อมใช้ที่เก็บรักษาได้เป็นเวลานาน ได้แก่ การทำแห้งแบบระเหิดแห้ง (Freeze-drying) และการทำแห้งโดยใช้ลม (Air-blast drying) ภายใต้ตู้อบลมสะอาด (Clean air oven) โดยต้นทุนในการผลิตหัวเชื้อแห้งโดยใช้ลมต่ำกว่าการทำแห้งแบบระเหิดแห้งถึง 5 เท่า Lee et al. (2016) ได้ศึกษาการทำแห้งยีสต์ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* D8, *Hanseniaspora uvarum* S6 และ *Issatchenkia orientalis* KMBL5774 โดยใช้ลม (Air-blast drying) ทดแทนการทำแห้งแบบระเหิดแห้ง พบว่า 10% Skim milk สามารถใช้เป็นสารป้องกันเซลล์ยีสต์ทั้ง 3 ชนิดได้ เมื่อเปรียบเทียบการใช้สารเพิ่มปริมาณ (excipient) 4 ชนิด ได้แก่ wheat flour, nuruk, artichoke powder และ lactomil พบว่า การใช้ lactomil 7 กรัม เป็นสารเพิ่มปริมาณให้ผลดีที่สุด โดยใช้เวลาในการทำแห้งน้อยและเซลล์ยีสต์มีอัตราการรอดชีวิตสูง เมื่อเปรียบเทียบชนิดของน้ำตาลที่ส่งเสริมอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์ พบว่า 10% trehalose, 10% sucrose, และ 10% glucose ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของ *S. cerevisiae* D8, *H. uvarum* S6 และ *I. orientalis* KMBL5774 เท่ากับ 97.54, 92.59 และ 79.49% ตามลำดับ เมื่อทำการเก็บรักษาหัวเชื้อแห้งนาน 3 เดือนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* D8 และ H*. uvarum* S6 มีอัตราการรอดชีวิตสูงเหมาะสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อในการหมัก กิจกรรมของเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ทำแห้ง แสดงให้เห็นว่าการทำแห้งโดยใช้ลม (Air-blast drying) สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อยีสต์แห้งได้

การเลือกใช้บรรจุภัณฑ์ที่ถูกต้องและเหมาะตามประเภทการใช้งาน ได้แก่ บรรจุภัณฑ์ปฐมภูมิ (primary packaging) เป็นบรรจุภัณฑ์ที่สัมผัสโดยตรงกับผลิตภัณฑ์ มีความสำคัญยิ่งในการป้องกันการซึมผ่าน เช่น กระป๋องโลหะ กล่องกระดาษ ขวดแก้ว ถุงตั้งได้ สำหรับบรรจุภัณฑ์ทุติยภูมิ (secondary packaging) เป็นบรรจุภัณฑ์ที่รวมหน่วยบรรจุบรรจุภัณฑ์ปฐมภูมิ เช่น กรณีกล่องกระดาษลูกฟูก คำนึงถึงลักษณะทางกายภาพ การขนส่ง การกระจายสินค้ามีความสำคัญสำหรับสินค้าที่บรรจุอยู่ภายใน จึงต้องมีการออกแบบให้

เหมาะสมเพื่อการขนส่งสินค้าได้อย่างปลอดภัย บรรจุภัณฑ์ตติยภูมิ (tertiary packaging) เป็นบรรจุภัณฑ์ที่รวมหน่วยบรรจุบรรจุภัณฑ์ทุติยภูมิ เช่น กรณีกล่องกระดาษลูกฟูกใช้ฟิล์มพลาสติกยืดพันรอบเพื่อห่อหุ้มอีกชั้นเพื่อการส่งที่สะดวก และปลอดภัย ส่วนบรรจุภัณฑ์จตุตถภูมิ (quaternary packaging) นิยมใช้บรรจุเพื่อการขนย้ายบรรจุภัณฑ์ตติยภูมิ เช่น กล่องลังที่มีหูหิ้วสามารถยกหรือถือได้ นอกจากนี้ยังรวมถึงสภาพแวดล้อมของการบรรจุขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญ 3 ประการ คือ 1. ลักษณะทางกายภาพของบรรจุภัณฑ์ เป็นสภาพแวดล้อมที่อาจเกิดความเสียหายทางกายภาพต่อผลิตภัณฑ์ที่บรรจุ ความเสียหายที่เกิดขึ้นนี้รวมถึงการตกกระแทก การสั่นสะเทือนในระหว่างการขนส่ง และการเรียงซ้อนกันของบรรจุภัณฑ์ในระหว่างการขนส่ง 2. สภาพแวดล้อมรอบข้าง ก่อให้เกิดความเสียหายแก่ผลิตภัณฑ์ เช่น การสัมผัสกับแก๊สออกซิเจน น้ำ ไอน้ำ แสงอัลตราไวโอเลต รวมถึงผลของความร้อนและความเย็น 3. ผู้ที่ใช้งานบรรจุภัณฑ์ (Gordon, 2010)

บรรจุภัณฑ์แบบยืดหยุ่น (flexible packaging) ที่วางจำหน่ายทั่วๆ ไป เช่น ถุงหิ้ว (bag) ถุงแบบขยายข้าง (pouch) เป็นต้น โดยวัสดุบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในการผลิตบรรจุภัณฑ์แบบยืดหยุ่น ได้แก่ ฟิล์มพลาสติก ฟอยล์ กระดาษ สิ่งทอ และวัสดุหลายชั้น (multilayer materials) สำหรับการเลือกใช้วัสดุบรรจุภัณฑ์แบบอ่อนตัว (soft packaging) สามารถใช้พอลิเมอร์พลาสติกที่มีความสามารถยืดหยุ่น เช่น พอลิเอทิลีนความหนาแน่นต่ำ (LDPE) พอลิพรอพิลีน (polypropylene) พอลิเอทิลีนเทเรฟแทเลต (PET) เป็นต้น (Nikolay, 2014) สำหรับบรรจุภัณฑ์หลายชั้น (multilayer packaging) เป็นส่วนหนึ่งของบรรจุภัณฑ์แบบยืดหยุ่น โดยใช้เทคนิคที่ผสานหน้าที่เฉพาะของพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ เข้าด้วยกัน เพื่อเสริมสมบัติของบรรจุภัณฑ์ให้สามารถใช้งาน การปกป้องผลิตภัณฑ์จากความชื้น ไอน้ำ แสง กลิ่น รส ได้ดียิ่งขึ้น โดยทั่วไปบรรจุภัณฑ์หลายชั้นมีจำนวนชั้น (layer) ตั้งแต่ 3-12 ชั้น โดยการใช้บรรจุภัณฑ์หลายชั้นวัสดุที่ใช้จะมีหลากหลายประเภท ได้แก่ พลาสติก โลหะ และกระดาษ โดยวัสดุเหล่านี้มีสมบัติและหน้าที่ที่แตกต่างกันออกไป เมื่อผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์หลายชั้นแต่ละชั้นของวัสดุต้องมีตัวเชื่อม/ประสานให้วัสดุยึดติดกันได้ ส่งผลให้บรรจุภัณฑ์หลายชั้นมีความแข็งแรง คงทนต่อสภาพแวดล้อมภายนอกได้ รวมถึงปกป้องผลิตภัณฑ์ภายในได้เป็นอย่างดี สำหรับเทคนิคการขึ้นรูปบรรจุภัณฑ์หลายชั้นมีหลากหลายเทคนิค เทคนิคหนึ่งที่ได้รับความนิยมในการผลิตบรรจุภัณฑ์หลายชั้น คือ เทคนิคการลามิเนต (lamination technique) สามารถผลิตได้หลากหลายวิธี เช่น การลามิเนตแบบอัดรีด (extrusion lamination) การลามิเนตด้วยสารยึดติด (adhesive lamination) การลามิเนตด้วยแว๊กซ์ (wax lamination) และการลามิเนตด้วยความร้อน (hot melt lamination) ส่วนการนำไปใช้งานสามารถใช้ได้ตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ เช่น บรรจุอาหารแห้ง สด ปกป้องการปนเปื้อนจากเชื้อก่อโรคจากภายนอกสู่ภายในบรรจุภัณฑ์ เป็นต้น (Anukiruthika, 2020) แม้กระนั้นก็ไม่มีวัสดุบรรจุภัณฑ์ชนิดใดที่มีสมบัติดีเลิศ แต่สามารถเสริมสมบัติของบรรจุภัณฑ์ได้ด้วยการใช้วัสดุบรรจุภัณฑ์แบบหลายชั้น โดยปกติการใช้วัสดุบรรจุภัณฑ์หลายชั้นที่ต้องการสมบัติเหมาะสำหรับผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดจำเป็นต้องเลือกใช้วัสดุที่มีการทดสอบมาแล้วเป็นเบื้องต้นทั้งทางกายภาพ เชิงกล โดยสมบัติของวัสดุชั้นนอกใช้เพื่อปกป้องกันกระแทก ขัดสี หรือการพิมพ์ วัสดุชั้นกลางใช้เพื่อป้องกันการซึมผ่านของแก๊สและไอน้ำ วัสดุชั้นในซึ่งสัมผัสกับผลิตภัณฑ์ต้องปลอดภัยกับผลิตภัณฑ์ และมีความสามารถปิดผนึกด้วยความร้อนได้ดี (Byungrok and Dong, 2015)

บรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับการบรรจุหัวเชื้อแห้ง วัสดุบรรจุภัณฑ์ในการผลิตต้องสามารถจำกัดปริมาณการแพร่ผ่านแก๊สออกซิเจน ไอน้ำ และความชื้นได้ ป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จากภายนอกสู่ภายในบรรจุภัณฑ์ รวมถึงต้องมีสมบัติเชิงกลและกายภาพที่ดี เช่น การต้านแรงดึงขาดสูง ความแข็งแรงในการปิดผนึกสูง เป็นต้น (Catherine, 2002) แต่บรรจุภัณฑ์ส่วนใหญ่ไม่สามารถย่อยสลายได้ โดยเฉพาะขยะพลาสติก เนื่องจากในแต่ละปีมีปริมาณขยะพลาสติกประมาณ 25.8 พันล้านตัน โดยทุกๆปีผลิตภัณฑ์พลาสติกทั่วโลกประมาณ 1.5 – 4% ถูกพบในมหาสมุทร เฉพาะอุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์พบขยะพลาสติกถึง 59% ด้วยเหตุนี้ สหภาพยุโรปจึงดำเนินการห้ามพลาสติกแบบใช้ครั้งเดียวทิ้ง (single-use plastic) ภายในปี 2564 นอกจากนี้ยังมีความต้องการลดการใช้พลาสติกจากปิโตรเคมีในอนาคต ส่งเสริมและให้ความสำคัญกับบรรจุภัณฑ์ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมอย่างมากสำหรับอุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์ ได้แก่ บรรจุภัณฑ์ที่สามารถย่อยสลายได้ (Gustav, 2021) ซึ่งสามารถนำมาใช้กับบรรจุภัณฑ์สำหรับบรรจุหัวเชื้อแห้งได้ เพื่อลดปริมาณขยะที่เกิดขึ้นหลังจากการใช้งานบรรจุภัณฑ์แล้ว

โครงการวิจัย Coffee Starter Culture (CSC) เพื่อการหมักกาแฟคุณภาพมุ่งพัฒนากระบวนการทำแห้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักกาแฟเพื่อเป็นเชื้อแห้ง การพัฒนาการห่อหุ้มเชื้อก่อนทำแห้ง การทำแห้งโดยวิธีอบลมร้อน บรรจุภัณฑ์เพื่อเก็บรักษาเชื้อแห้งและง่ายต่อการใช้งาน รวมทั้งการนำเทคโนโลยีไปทดสอบในพื้นที่เป้าหมายการผลิตกาแฟให้ได้คุณภาพ ต้นทุนต่ำ และสามารถต่อยอดสู่ผู้ประกอบการ เกษตรกรและนักวิจัยในการนำไปพัฒนาเป็นต้นแบบเทคโนโลยีการผลิตเชื้อแห้ง และขยายผลสู่การส่งต่อเชื้อแห้งเพื่อควบคุมคุณภาพการผลิตของเกษตรกรผู้ผลิตกาแฟในประเทศไทยอย่างยั่งยืน

วิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์

1. วัสดุเกษตรและจุลินทรีย์ ได้แก่ กาแฟสายพันธุ์แนะนำกรมวิชาการเกษตร กาแฟอะราบิกา พันธุ์เชียงใหม่ 80 และยีสต์ที่คัดเลือกโดยกรมวิชาการเกษตร ได้แก่ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* strain BAwine ยีสต์ *Pichia kluyveri* strain PRO-Y15

2. สารเคมีในกระบวนการหมัก ได้แก่ Trehalose, Glucose, Skim milk, แป้งสาลี, แป้งถั่วเหลือง, แป้งข้าวเจ้า

3. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ YPD และ YM

4. วัสดุบรรจุภัณฑ์ ได้แก่ ถุงลามิเนต PET/AL/LLDPE ถุงลามิเนต OPP/VMPET/PE และพลาสติกชีวภาพพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl Alcohol, PVA) กล่องโฟม กล่องกระดาษลูกฟูก ถุงเจลทำความเย็น

5. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องวัดปริมาณน้ำตาล เครื่องวิเคราะห์โครมาโตกราฟฟีแบบความดันสูง เครื่องวิเคราะห์กลิ่น เครื่องตรวจสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี เครื่องวัดสี ตู้เขี่ยเชื้อ ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ตู้อบลมสะอาด (Clean air oven) เครื่องปิดผนึกด้วยความร้อน (Sealing machine)

6. เครื่องมือแปรรูป ได้แก่ ถังหมัก เครื่องสีกาแฟ โต๊ะตากกาแฟและผ้าคลุม อุปกรณ์ทดสอบชิม

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการผลิตกล้าเชื้อผง Coffee Starter Culture โดยวิธีการทำแห้งแบบใช้ตู้อบลมสะอาด (Clean air oven)

1.1 การเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ให้มีปริมาณเพียงพอต่อการทำแห้ง

1.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

นำ *Saccharomyces cerevisiae* strain BAwine และ *Pichia kluyveri* strain PRO-Y15 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงจากการคัดเลือกและทดลองในโครงการพัฒนากระบวนการหมักกาแฟอะราบิกาคุณภาพมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Yeast malt agar (YM agar) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อลงในอาหารเหลว Yeast malt broth (YM broth) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.1.2 ทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์

ทำการทดสอบชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อและปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์คือ BAwine และ PRO-Y15 โดยเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารเหลว 2 ชนิด ได้แก่ 1.) อาหาร YM (ประกอบด้วย 0.3% Yeast extract, 0.3% Malt extract, 0.5% Peptone, Glucose) และ 2.) อาหาร YPD (ประกอบด้วย 1% Yeast extract, 2% Peptone, Glucose) ที่มีการเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคสเป็น 2 และ 5% บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่จากนั้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นเติมกล้าเชื้อยีสต์จากข้อ 1.1.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงไป บ่มที่

25 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 0, 24 และ 30 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญโดยวัดค่าความขุ่น (optical density, OD) ที่ 600 นาโนเมตร และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

1.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารผสมที่เหมาะสมต่อการป้องกันเซลล์ในการทำแห้ง

1.2.1 เตรียมสารที่ใช้สำหรับป้องกันเซลล์ โดย

แผนการทดลอง ออกแบบการทดลองแบบ Factorial in CRD จำนวน 2 ซ้ำ

ปัจจัยที่ 1 ชนิดของน้ำตาล ได้แก่ Trehalose และ Glucose

ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นน้ำตาล ได้แก่ 5% และ10% w/v

ปัจจัยที่ 3 ชนิดของสารเพิ่มปริมาณ (excipient) ได้แก่ Soybean flour และ Wheat flour

ปัจจัยที่ 4 ความเข้มข้นสารเพิ่มปริมาณ ได้แก่ 5% และ 10% w/v

เติม 10% w/v Skim milk ลงไปในสารละลายข้างต้น จากนั้นนำเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* strain BAwine และ *Pichia kluyveri* strain PRO-Y15 เติมลงในสารละลายตามโดยทดสอบหาสัดส่วนของของแข็ง (สารเพิ่มปริมาณ ได้แก่ แป้งสาลีและแป้งถั่วเหลือง) ต่อของเหลว (หัวเชื้อยีสต์ในสารละลายป้องกันเซลล์ปริมาณของสารละลายป้องกันเซลล์) ที่เหมาะสมต่อการทำหัวเชื้อแห้งและการละลาย

1.2.2 การทำแห้ง

นำสารผสมเซลล์ยีสต์ที่ได้เกลี่ยลงบนถาดอะลูมิเนียม ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร ทำการอบแห้งโดยใช้ตู้อบ Clean air oven ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส จนกระทั่งความชื้นของหัวเชื้อน้อยกว่า 10%

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของหัวเชื้อ โดยใช้หัวเชื้อผง 1 กรัมผสมกับ peptone water 0.1 %w/v ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ได้ตัวอย่างหัวเชื้อผงที่มีความเจือจางในระดับ 10^{-1} และทำการเจือจางเป็นลำดับ จนได้ระดับความเจือจางในระดับ 10^{-6} ปิเปตตัวอย่างจากแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารแข็ง YM agar เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยใช้เทคนิค Spread Plate ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

$$\text{Survival (\%)} = (100 \times N/N0)$$

N = จำนวนเชื้อจุลินทรีย์/มิลลิลิตร (CFU/ml) หลังผ่าน Process

N0 = จำนวนเชื้อจุลินทรีย์/มิลลิลิตร (CFU/ml) ก่อนผ่าน Process

1.3 การพัฒนากำลังการผลิตเชื้อแห้งเพื่อการประยุกต์ใช้ในแปลงทดลอง

เพาะเชื้อยีสต์ BAwine และ PRO-Y15 อาหารที่คัดเลือกจากข้อ 1.1.2 ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 5 ลิตร ที่มีการต่ออุปกรณ์สำหรับเติมและกรองอากาศที่เข้าและออกจากขวดเลี้ยงเชื้อ **(ภาพที่ 5)** ทำการเลี้ยงเชื้อนาน 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ วิเคราะห์การเจริญโดยวัดค่าความขุ่น (optical density, OD) ที่ 660 นาโนเมตร และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

1.4 การคัดเลือก ทดสอบและพัฒนาบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อแห้ง

1.4.1 การคัดเลือกบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับรักษาหัวเชื้อแห้ง

คัดเลือกถุงลามิเนตสำหรับบรรจุหัวเชื้อแห้งทางการค้าจำนวน 2 ชนิด คือ ถุงลามิเนต PET/AL/LLDPE และถุงลามิเนต OPP/VMPET/PE เป็นแบบถุงขยายข้าง ตั้งได้ (Flat-bottom bag) ขนาดบรรจุ 250 กรัม จากนั้นทดสอบสมบัติของถุงลามิเนต ได้แก่ ความต้านแรงดึงขาด (ตามมาตรฐาน ASTM D 882-18) การยืดตัวของฟิล์มพลาสติก (ตามมาตรฐาน ASTM D 882-18) ความแข็งแรงของรอยเชื่อม (ตามมาตรฐาน ASTM F 88/F88m-15) ความต้านแรงกระแทกของฟิล์มพลาสติก (ตามมาตรฐาน ASTM D 1709-16a) และความต้านแรงทะลุของฟิล์มพลาสติก (ตามมาตรฐาน ASTM F 1306-16) คัดเลือกถุงลามิเนต 1 ชนิดที่ให้สมบัติต่างๆ ดีที่สุดสำหรับนำไปบรรจุเชื้อแห้ง

1.4.2 การคัดเลือกบรรจุภัณฑ์และการพัฒนา

คัดเลือกบรรจุภัณฑ์ปฐมภูมิ (บรรจุภัณฑ์ที่บรรจุผลิตภัณฑ์) (ถุงลามิเนตที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.4.1) และบรรจุภัณฑ์ทุติยภูมิ (บรรจุภัณฑ์ชั้นที่สองสำหรับการรวมหน่วยบรรจุ/เพื่อการขนส่ง) สำหรับการบรรจุและการขนส่งหัวเชื้อแห้ง ได้แก่ กล่องกระดาษลูกฟูกขนาดมิติ (กว้างxยาวxสูง) เท่ากับ 21x18x17 เซนติเมตร และกล่องโฟมร่วมกับถุงเจลทำความเย็น (กล่องโฟมขนาดมิติ (กว้างxยาวxสูง) เท่ากับ 21x18x17 เซนติเมตร ถุงเจลทำความเย็น ขนาดบรรจุ 400 กรัม จำนวน 6 ถุง วางถุงเจลทำความเย็นภายในกล่องโฟมด้านละ 1 ถุง) สำหรับการขนส่ง

1.4.3 การทดสอบอัตราการรอดชีวิตของหัวเชื้อแห้งหลังจากการขนส่ง

ศึกษารูปแบบการขนส่งที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของหัวเชื้อแห้งในการขนส่งจริง โดยทำการขนส่งจากจุดเริ่มต้น คือ กรุงเทพมหานครถึงศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย จังหวัดเชียงราย (ปลายทาง) จำนวน 3 รูปแบบ ได้แก่ การขนส่งโดยรถตู้คณะเดินทางทำงานวิจัยบรรจุด้วยกล่องโฟม การขนส่งโดยรถตู้คณะเดินทางทำงานวิจัยบรรจุด้วยกล่องกระดาษลูกฟูก และการขนส่งด้วยขนส่งเอกชนบรรจุด้วยกล่องกระดาษลูกฟูก จากนั้นหาอัตราการรอดชีวิตของหัวเชื้อแห้งเริ่มต้นก่อนการขนส่งทุกรูปแบบ นำถุงลามิเนตที่คัดเลือกได้มาบรรจุหัวเชื้อแห้งทั้งหมดจำนวน 8 สูตร ปิดผนึกถุงลามิเนต โดยบรรจุลงกล่องกระดาษลูกฟูกและกล่องโฟม เมื่อถึงศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย จังหวัดเชียงราย หาอัตราการรอดชีวิตของหัวเชื้อแห้งปลายทาง ดัง**ตารางที่ 1**

ตารางที่ 1 สูตรหัวเชื้อแห้ง

สูตรหัวเชื้อแห้ง	เชื้อจุลินทรีย์	สารละลายป้องกันเซลล์	สารเพิ่มปริมาณ
1	BAwine	10% Glucose + 10% Skim milk	แป้งถั่วเหลือง
2	BAwine	5% Trehalose + 10% Skim milk	แป้งถั่วเหลือง
3	BAwine	10% Glucose + 10% Skim milk	แป้งข้าวเจ้า
4	BAwine	5% Trehalose + 10% Skim milk	แป้งข้าวเจ้า
5	PRO-Y15	10% Glucose + 10% Skim milk	แป้งถั่วเหลือง
6	PRO-Y15	5% Trehalose + 10% Skim milk	แป้งถั่วเหลือง
7	PRO-Y15	10% Glucose + 10% Skim milk	แป้งข้าวเจ้า
8	PRO-Y15	5% Trehalose + 10% Skim milk	แป้งข้าวเจ้า

1.4.4 การทดสอบอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อแห้ง

คัดเลือกหัวเชื้อแห้งสำหรับทดสอบอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อแห้งในห้องปฏิบัติการเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษา โดยบรรจุหัวเชื้อแห้งในถุงลามิเนตที่คัดเลือกไว้ในข้อ 1.4.1) เก็บรักษาหัวเชื้อแห้ง 2 สภาวะ คือ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 10 องศาเซลเซียส ทดสอบหาการรอดชีวิตทุกๆ 30 วัน จนครบ 180 วัน

1.5 การพัฒนาบรรจุภัณฑ์ย่อยสลายได้สำหรับบรรจุหัวเชื้อแห้ง

คัดเลือกพลาสติกชีวภาพที่มีสมบัติละลายน้ำได้ดี และศึกษาสมบัติต่างๆ ของพลาสติกชีวภาพก่อนการใช้งานจริง ได้แก่ ความต้านแรงดึงขาด (ตามมาตรฐาน ASTM D 882-10) การยืดตัวของฟิล์มพลาสติก (ตามมาตรฐาน ASTM D 882-10) ความแข็งแรงของรอยเชื่อม (ตามมาตรฐาน ASTM F 88-00) อัตราการซึมผ่านของแก๊สออกซิเจน (ตามมาตรฐาน ASTM D 3985-17) อัตราการซึมผ่านของไอน้ำ (ตามมาตรฐาน ASTM D 398-20) ความหนาแน่นของฟิล์มพลาสติก (ตามมาตรฐาน ASTM D 792-00) มุมสัมผัสหยดน้ำและพลังงานพื้นผิว (ตามมาตรฐาน ASTM D 5946-04) จากนั้น ขึ้นรูปถุงด้วยการปิดผนึกด้วยความร้อนด้วยเครื่องปิดผนึกด้วยความร้อน (sealing machine) จากนั้นบรรจุหัวเชื้อแห้ง จำนวน 20 กรัมต่อถุง (ขนาด 10x10 เซนติเมตร) ทดสอบความสามารถการละลายน้ำของพลาสติกชีวภาพ โดยการจุ่มถุงพลาสติกชีวภาพลงในน้ำ จับเวลารอจนกว่าถุงพลาสติกชีวภาพละลายน้ำหมด

ขั้นตอนที่ 2 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อผง Coffee Starter Culture ที่ผลิตได้จากกระบวนการทำแห้งในการหมักกาแฟ

2.1 การทดลองการหมักกาแฟโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ CSC

ทดลองนำผลกาแฟสุกมาแช่น้ำ ทำการลอกส่วนเปลือกนอก คัดเลือกเมล็ดเสียและเมล็ดที่ลอยน้ำออก ล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด บรรจุเมล็ดกาแฟลงในถังหมัก จำนวนไม่น้อยกว่า 10 กิโลกรัม ทำการหมัก 3 วิธีคือ หมักโดยเติม Coffee Starter Culture (CSC) ทั้ง 2 ชนิด และไม่เติมหัวเชื้อเป็นตัวควบคุมหรือการหมักตามธรรมชาติ

แผนการทดลอง ออกแบบการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 กรรมวิธี 5 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม ไม่เติมหัวเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 ใส่ CSC BAwine 2%

กรรมวิธีที่ 3 ใส่ CSC PRO-Y15 2%

เติมน้ำปริมาตร 5 ลิตร เพื่อเริ่มทำการหมัก ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมงจนถึงเวลา 84 ชั่วโมง เพื่อนำมาทำการวิเคราะห์ผล ลักษณะเมือกหุ้มผิวเมล็ดที่ลดลงโดยวัดปริมาณค่าความขุ่น (turbidity), ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Acids), ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และ การเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์

2.2 การทดสอบคุณภาพการหมักกาแฟ

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

2.3 ขยายขนาดการหมักกาแฟโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ CSC ในแปลงทดสอบ

2.3.1 ทดลองนำผลมากาแฟสุกมาแช่น้ำ ทำการลอกส่วนเปลือกนอก คัดเลือกเมล็ดเสียและเมล็ดที่ลอยน้ำออก ล้างเมล็ดกาแฟด้วยน้ำสะอาด บรรจุเมล็ดกาแฟลงในถังหมัก จำนวนไม่น้อยกว่า 100 กิโลกรัม ทำการหมัก 3 วิธีคือ หมักโดยเติม Coffee Starter Culture (CSC) ทั้ง 2 ชนิด และ ไม่เติมหัวเชื้อเป็นตัวควบคุมหรือการหมักตามธรรมชาติ

แผนการทดลอง ออกแบบการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 กรรมวิธี 5 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม ไม่เติมหัวเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 ใส่ CSC BAwine 2%

กรรมวิธีที่ 3 ใส่ CSC PRO-Y15 2%

เติมน้ำปริมาตร 5 ลิตร เพื่อเริ่มทำการหมัก ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทุกที่ 8 , 24 และ 32 ชั่วโมง เพื่อนำมาทำการวิเคราะห์ผล ลักษณะเมือกหุ้มผิวเมล็ดที่ลดลงโดยวัดปริมาณค่าความขุ่น (turbidity), ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Acids), ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และ การเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์

2.3.2 การทดสอบคุณภาพการหมักกาแฟ ตามวิธีการในข้อ 2.2

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

1. ลักษณะเมือกหุ้มผิวเมล็ดที่ลดลงโดยวัดปริมาณค่าความขุ่น (turbidity), ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Acids), ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และ การเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์

2. การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยการเก็บตัวอย่างน้ำหมัก 25 มิลลิลิตรผสมกับ peptone water 0.1 %w/v ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ได้ตัวอย่างหัวเชื้อผงที่มีความเจือจางในระดับ 10^{-1} และทำการเจือจางเป็นลำดับ จนได้ระดับความเจือจางในระดับ 10^{-6} ปิเปตตัวอย่างจากแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารแข็ง YM agar เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยใช้เทคนิค Spread Plate ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

$$\text{Survival (\%)} = (100 \times N/N0)$$

N = จำนวนเชื้อจุลินทรีย์/มิลลิลิตร (CFU/ml) หลังผ่าน Process

N0 = จำนวนเชื้อจุลินทรีย์/มิลลิลิตร (CFU/ml) ก่อนผ่าน Process

เวลาและสถานที่ 1 ปี 6 เดือน (เริ่มต้น เดือนพฤษภาคม 2564 สิ้นสุด เดือนตุลาคม 2565)

ขยายเวลา 6 เดือน สิ้นสุด เดือนเมษายน 2566

- กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
- ศูนย์วิจัยกาแฟ ได้แก่ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่/ศูนย์วิจัยเกษตรที่สูงเชียงราย/ศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบูรณ์/ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรตาก/ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร/ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสตูล/ศูนย์วิจัยพืชสวนยะลา
- แปลงเกษตรกร จำนวนพื้นที่อย่างน้อย 1 ไร่ต่อแปลงรวมผลผลิตไม่น้อยกว่า 300 กิโลกรัม ได้แก่ บริษัทดอยช้าง จังหวัดเชียงราย, บริษัท Hillkoff จังหวัดเชียงใหม่
- โครงการพระราชดำริและโครงการหลวง

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการผลิตกล้าเชื้อผง Coffee Starter Culture โดยวิธีการทำแห้งแบบใช้ตู้อบลมสะอาด (Clean air oven)

1.1 ผลการเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ให้มีปริมาณเพียงพอต่อการทำแห้ง

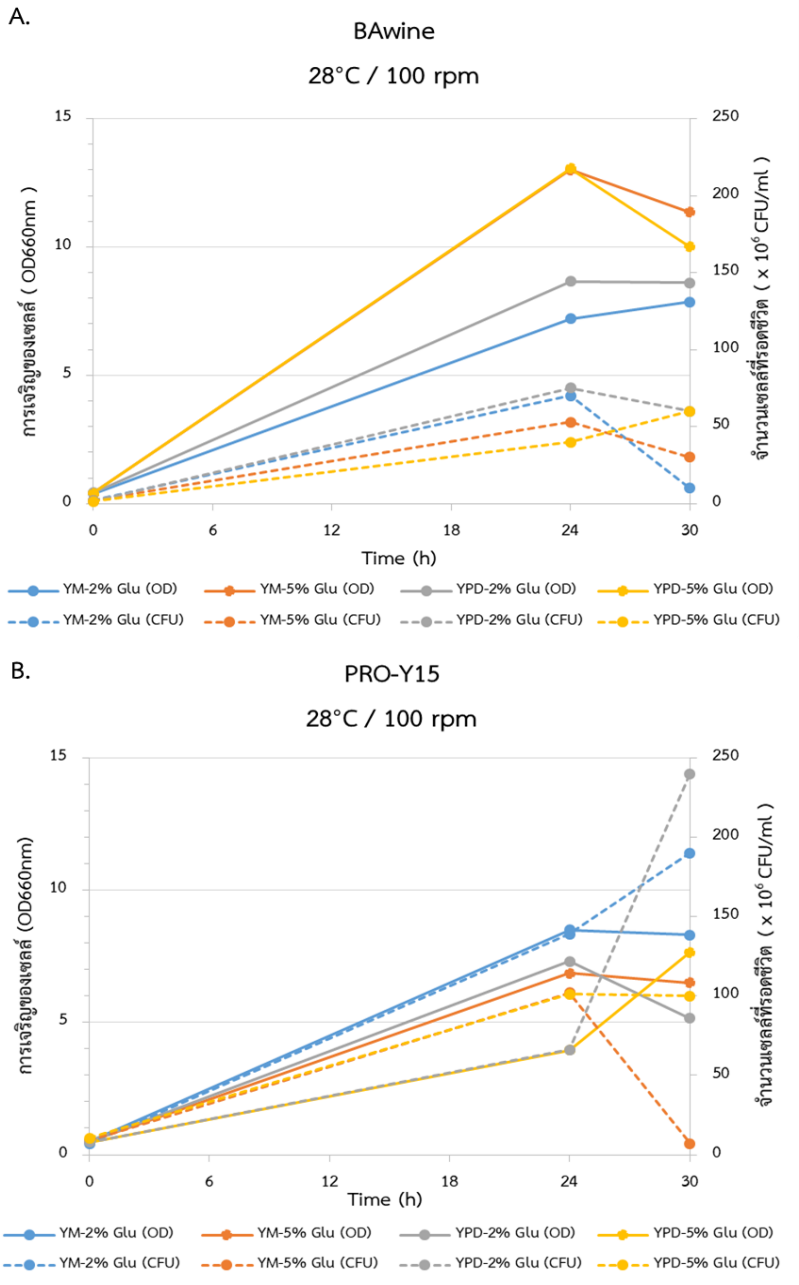
1.1.1 จากการทดสอบการเจริญเติบโตของยีสต์ 2 สายพันธุ์ที่ใช้สำหรับการหมักกาแฟ คือ BAwine และ PRO-Y15 ในอาหารเหลว YM และ YPD ที่มีการเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคสเป็น 2% และ 5% **(ภาพที่ 1)** พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ BAwine เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM (ประกอบด้วย 0.3% Yeast extract, 0.3% Malt extract, 0.5% Peptone, Glucose) และ YPD (ประกอบด้วย 1% Yeast extract, 2% Peptone, Glucose) มีความแตกต่างของการเจริญของเซลล์เพียงเล็กน้อยเมื่อวัดที่ OD 660 นาโนเมตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง แต่เมื่อเปรียบเทียบในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสต่างกัน พบว่า การเจริญของ BAwine ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 5% สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 2% แต่ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต (CFU) มีปริมาณน้อยกว่า แสดงในเห็นว่าในอาหารที่มีปริมาณกลูโคส 5% เซลล์มีการเจริญเร็วกว่าที่ 24 ชั่วโมง และเริ่มมีการตายของเซลล์เกิดขึ้นที่ 24 และ 30 ชั่วโมง **(ภาพที่ 1A)**

ยีสต์สายพันธุ์ PRO-Y15 เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM และ YPD ทีมีน้ำตาล 2% และ 5% มีความแตกต่างของการเจริญของเซลล์เพียงเล็กน้อยเมื่อวัดที่ OD 660 นาโนเมตร ที่เวลา 30 ชั่วโมง แต่เมื่อเปรียบเทียบในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสต่างกันพบว่าปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต (CFU) ในอาหาร YM และ YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 2% มีปริมาณสูงกว่าอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 5% แสดงในเห็นว่าในอาหารที่มีปริมาณกลูโคส 5% เซลล์มีการเจริญที่เร็วกว่าและเริ่มมีการตายของเซลล์เกิดขึ้น 30 ชั่วโมง **(ภาพที่ 1B)** จากการทดสอบชนิดของอาหารและปริมาณน้ำตาลดังกล่าวจึงเลือกใช้อาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 2% สำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ BAwine และ PRO-Y15 และทำการเพาะเลี้ยงนานไม่เกิน 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตสูง 7 $x10^6$ cfu/ml ในยีสต์สายพันธุ์ BAwine และปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต 1.39 x 10^8 cfu/ml ในยีสต์สายพันธุ์ PRO-Y15

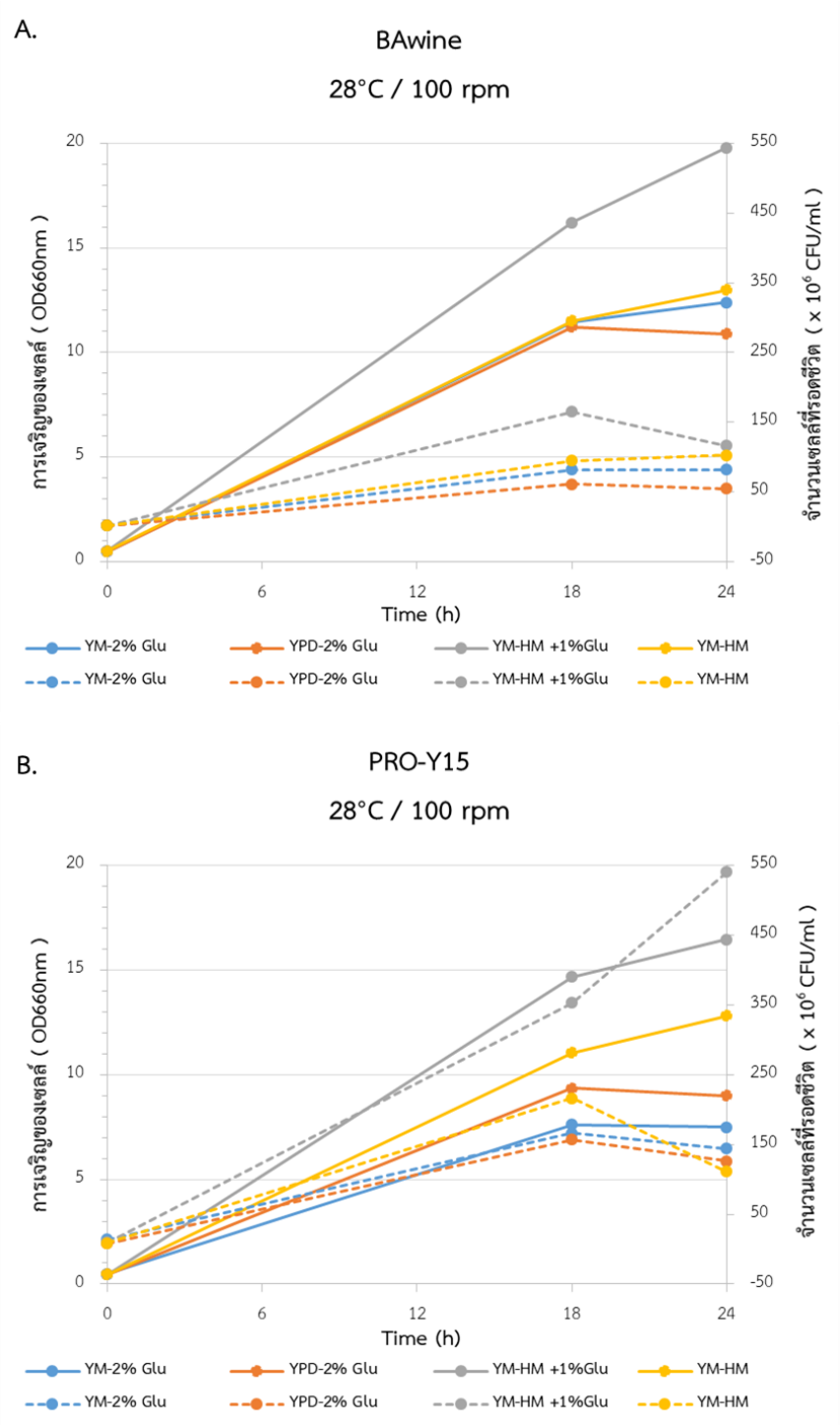
1.1.2 จากการทดสอบการเจริญของยีสต์ BAwine และ PRO-Y15 ในอาหาร YM และ YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 2% เปรียบเทียบกับอาหาร YM สำเร็จรูปที่เติมและไม่เติมน้ำตาลกลูโคสเพิ่ม 1% **(ภาพที่ 2)** พบว่า

ยีสต์สายพันธุ์ BAwine เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM สำเร็จรูป (YM-HM) ที่เติมน้ำตาลกลูโคสเพิ่ม 1% มีการเจริญสูงที่สุดที่ OD 660 นาโนเมตร เท่ากับ 19.8 เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง แต่มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตสูงที่สุด เท่ากับ 1.65 x 10^8 cfu/ml เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 18 ชั่วโมง และลดลงเหลือ 1.16 x 10^8 cfu/ml เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง **(ภาพที่ 2A)**

ยีสต์สายพันธุ์ PRO-Y15 เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM สำเร็จรูป (YM-HM) ที่เติมน้ำตาลกลูโคสเพิ่ม 1% มีการเจริญสูงที่สุดที่ OD 660 นาโนเมตร เท่ากับ 16.45 เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง และมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตสูงที่สุด เท่ากับ 5.40×10^8 cfu/ml เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง **(ภาพที่ 2B)** จากผลการทดสอบดังกล่าวจึงเลือกใช้อาหาร YM สำเร็จรูป (YM-HM) ที่เติมน้ำตาลกลูโคสเพิ่ม 1% ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ BAwine และ PRO-Y15 เพื่อใช้ในการทำแห้งต่อไป



ภาพที่ 1 แผนภาพแสดงการเจริญของเซลล์ (ความขุ่นของเซลล์ที่ OD 660 นาโนเมตร) และจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (CFU/ml) ของ A.) ยีสต์สายพันธุ์ BAwine และ B.) ยีสต์สายพันธุ์ PRO-Y15 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YM และ YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 2 และ 5%



ภาพที่ 2 แผนภาพแสดงการเจริญของเซลล์ (ความขุ่นของเซลล์ที่ OD 660 นาโนเมตร) และจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (CFU/ml) ของ A.) ยีสต์สายพันธุ์ BAwine และ B.) ยีสต์สายพันธุ์ PRO-Y15 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YM และ YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 2% (YM+2% Glu, YPD+ 2% Glu) และอาหารเหลว YM สำเร็จรูปที่เติมและไม่เติมน้ำตาลกลูโคส 1% (YM-HM + 1%Glu, YM-HM)

1.2 ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารผสมที่เหมาะสมต่อการป้องกันเซลล์ในการทำแห้ง

1.2.1 ทำการศึกษาสัดส่วนของของแข็ง (สารเพิ่มปริมาณ ได้แก่ แป้งสาลีและแป้งถั่วเหลือง) ต่อของเหลว (หัวเชื้อยีสต์ในสารละลายป้องกันเซลล์ปริมาณของสารละลายป้องกันเซลล์) ที่เหมาะสมต่อการทำหัวเชื้อแห้ง เพื่อให้ได้หัวเชื้อแห้งที่เหมาะสมต่อการละลายและการปลดปล่อยเซลล์ยีสต์เมื่อนำไปใช้ในการหมักกาแฟ สัดส่วนของแข็งต่อของเหลวเมื่อใช้แป้งสาลีเป็นสารเพิ่มปริมาณ คือ 10g แป้งสาลี : 20 ml ยีสต์ในสารป้องกันเซลล์ **(ภาพที่ 3)** และสัดส่วนของแข็งต่อของเหลวเมื่อใช้แป้งถั่วเหลืองเป็นสารเพิ่มปริมาณ คือ 20g แป้งถั่วเหลือง : 20 ml ยีสต์ในสารป้องกันเซลล์ **(ภาพที่ 4)** เนื่องจากหลังอบแห้งแล้วมีลักษณะเป็นเป็นเม็ดหรือแผ่นขนาดเล็กสามารถละลายน้ำได้ง่าย

ภาพที่ 3 แสดงลักษณะปรากฏของแป้งสาลีที่ผสมกับหัวเชื้อยีสต์ในสารละลายป้องกันเซลล์ก่อนและหลังอบแห้ง ในอัตราส่วน 10g แป้งสาลี :20 ml ยีสต์ในสารป้องกันเซลล์ หรือ 20g แป้งสาลี :20 ml ยีสต์ในสารป้องกันเซลล์

ภาพที่ 4 แสดงลักษณะปรากฏของแป้งถั่วเหลืองที่ผสมกับหัวเชื้อยีสต์ในสารละลายป้องกันเซลล์ก่อนและหลังอบแห้ง ในอัตราส่วน 10g ถั่วเหลือง :20 ml ยีสต์ในสารป้องกันเซลล์ หรือ 20g แป้งถั่วเหลือง :20 ml ยีสต์ในสารป้องกันเซลล์

1.2.2 ทำแห้งหัวเชื้อยีสต์โดยใช้ตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และใช้น้ำตาล Glucose หรือ Trehalose ที่ความเข้มข้น 5 และ 10% ร่วมกับ Skim milk เป็นสารป้องกันเซลล์ ในอัตราส่วน 10g แป้งสาลี :20 ml ยีสต์ในสารป้องกันเซลล์ และ 20g แป้งถั่วเหลือง :20 ml ยีสต์ในสารป้องกันเซลล์ ซึ่งเป็นสัดส่วนที่เลือกจากการทดสอบ 2.1 จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า เมื่อใช้แป้งถั่วเหลืองร่วมกับสารป้องกันเซลล์ที่มีน้ำตาล Trehalose หรือ Glucose เป็นองค์ประกอบ มีลักษณะของการจับตัวเป็นก้อนที่ละเอียดเหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นสารเพิ่มปริมาณในการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์แห้ง และมีแนวโน้มในการป้องกันเซลล์จากความร้อนในการทำแห้งได้ดีกว่าการใช้แป้งสาลี โดยมีอัตราการรอดชีวิตของยีสต์ประมาณ 1x 10^6 CFU/g เซลล์แห้ง **(ตารางที่ 2)** ซึ่งปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตในระดับดังกล่าวยังไม่เพียงพอต่อการใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักกาแฟ

เมื่อลดอุณหภูมิในการทำแห้งลง โดยใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และใช้น้ำตาล Glucose หรือ Trehalose ที่ความเข้มข้น 5 และ 10% ร่วมกับ Skim milk เป็นสารป้องกันเซลล์ ในอัตราส่วน 20g ถั่วเหลือง :10 ml ยีสต์ในสารป้องกันเซลล์ อัตราการรอดชีวิตของหัวเชื้อแห้งของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์สูงขึ้น (ประมาณ 10^7 - 10^8 CFU/g หัวเชื้อแห้ง) และพบว่าการทำแห้งโดยใช้สารป้องกันเซลล์ที่ประกอบด้วย 10% Glucose + 10% Skim milk ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์สูงที่สุดทั้งในยีสต์ PRO-Y15 (6.88%) และ BAwine (55.17%) **(ตารางที่ 3-4)**

ตารางที่ 2 ปริมาณเซลล์เริ่มต้นและเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการทำแห้งยีสต์สายพันธุ์ PRO-Y15 ที่อุณหภูมิ 45 °C

สารละลายป้องกันเซลล์	เซลล์เริ่มต้น (CFU/ml)	เซลล์ที่รอดชีวิตหลังการทำแห้ง (CFU/g)			
		10g แป้งสาลี	% survival	20 g แป้งถั่วเหลือง	% survival
5% Glucose + 10% Skim milk	5.2×10^9	4×10^4	0.08%	1.41×10^6	2.71%
10% Glucose + 10% Skim milk	5.8×10^9	1×10^4	0.02%	1.42×10^6	2.44%
5% Trehalose + 10% Skim milk	9.1×10^9	4.1×10^5	0.45%	6.5×10^5	0.71%
10 Trehalose + 10% Skim milk	9.1×10^9	1.24×10^6	1.36%	1.8×10^6	1.98%

ตารางที่ 3 ปริมาณเซลล์เริ่มต้นและเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการทำแห้งยีสต์สายพันธุ์ PRO-Y15 ที่อุณหภูมิ 37 °C

สารละลายป้องกันเซลล์	เซลล์เริ่มต้น (CFU/ml)	เซลล์ที่รอดชีวิตหลังการทำแห้ง (CFU/g)	
		แป้งถั่วเหลือง	% survival
5% Glucose + 10% Skim milk	1.61×10^9	3.35×10^7	2.08%
10% Glucose + 10% Skim milk	1.62×10^9	1.12×10^8	6.88%
5% Trehalose + 10% Skim milk	2.61×10^9	1.14×10^8	4.36%
10% Trehalose + 10% Skim milk	2.07×10^9	8.4×10^7	4.05%

ตารางที่ 4 ปริมาณเซลล์เริ่มต้นและเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการทำแห้งยีสต์สายพันธุ์ BAwine ที่อุณหภูมิ 37 °C

สารละลายป้องกันเซลล์	เซลล์เริ่มต้น (CFU/ml)	เซลล์ที่รอดชีวิตหลังการทำแห้ง (CFU/g)	
		แป้งถั่วเหลือง	% survival
5% Glucose + 10% Skim milk	1.46×10^9	1.0×10^8	2.08%
10% Glucose + 10% Skim milk	0.58×10^9	3.2×10^8	55.17%
5% Trehalose + 10% Skim milk	1.11×10^9	3.5×10^8	31.53%
10% Trehalose + 10% Skim milk	1.49×10^9	3.7×10^8	24.83%

1.3 ผลการพัฒนากำลังการผลิตเชื้อแห้งเพื่อการประยุกต์ใช้ในแปลงทดลอง

เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ BAwine และ PRO-Y15 ในอาหาร YM สำเร็จรูป (YM-HM) ที่เติมน้ำตาลกลูโคสเพิ่ม 1% ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 5 ลิตร ที่มีการต่ออุปกรณ์สำหรับกรองอากาศที่เข้าและออกจากขวดเลี้ยงเชื้อ **(ภาพที่ 5)** ทำการเลี้ยงเชื้อนาน 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ จากการทดสอบพบว่าการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารปริมาตร 30 ลิตร สามารถผลิตเป็นหัวเชื้อแห้งได้ประมาณ 1 กิโลกรัม ในการเพิ่มกำลังการผลิตหัวเชื้อแห้งได้เลือกสูตรของสารป้องกันเซลล์ 2 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 ประกอบด้วย 10% Glucose + 10% Skim milk และ สูตรที่ 2 ประกอบด้วย 5% Trehalose + 10% Skim milk และทำแห้งโดยใช้ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เนื่องจากสามารถป้องกันเซลล์จากความร้อนได้ดี มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตเหมาะสม และเพื่อลดต้นทุนในการผลิตหัวเชื้อแห้งได้ทำการศึกษาการใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นสารเพิ่มปริมาณเปรียบเทียบกับการใช้แป้งถั่วเหลือง เนื่องจากแป้งข้าวเจ้า (กิโลกรัมละ 30 บาท) มีข้อได้เปรียบคือราคาถูกกว่าแป้งถั่วเหลือง (กิโลกรัมละ 100 บาท) ทำให้ต้นทุนในการผลิตลดลง 3 เท่า รวมถึงแป้งข้าวเจ้าไม่มีการปนเปื้อนของกลิ่นถั่วซึ่งอาจส่งผลต่อกาแฟในระหว่างการหมักได้

จากการทดสอบพบว่าหัวเชื้อที่ผลิตโดยใช้แป้งข้าวเจ้าในอัตราส่วน 20g แป้งข้าวเจ้า : 10 ml ยีสต์ในสารป้องกันเซลล์ มีอัตราการรอดชีวิตหลังทำแห้งน้อยกว่าแป้งถั่วเหลือง แต่ยังปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ในระดับสูงถึง 10^8 CFU/g หัวเชื้อแห้ง **(ตารางที่ 5-6)** เพียงพอต่อการนำไปใช้ในการทดสอบการหมักกาแฟในแปลงทดสอบได้

ภาพที่ 5 ระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์เพื่อใช้สำหรับการผลิตหัวเชื้อแห้งเพื่อการหมักกาแฟ

ตารางที่ 5 ปริมาณเซลล์เริ่มต้นและเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการทำแห้งยีสต์สายพันธุ์ PRO-Y15 ที่อุณหภูมิ 37 °C

สารละลายป้องกันเซลล์	เซลล์เริ่มต้น	เซลล์ที่รอดชีวิตหลังการทำแห้ง (CFU/g)	
	(CFU/ml)	แป้งข้าวเจ้า	% survival
10% Glucose + 10% Skim milk	4.7×10^9	2.46×10^8	5.24%
5% Trehalose + 10% Skim milk	2.9×10^9	1.24×10^8	4.20%

ตารางที่ 6 ปริมาณเซลล์เริ่มต้นและเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการทำแห้งยีสต์สายพันธุ์ BAwine ที่อุณหภูมิ 37 °C

สารละลายป้องกันเซลล์	เซลล์เริ่มต้น	เซลล์ที่รอดชีวิตหลังการทำแห้ง (CFU/g)	
	(CFU/ml)	แป้งข้าวเจ้า	% survival
10% Glucose + 10% Skim milk	0.82×10^9	0.80×10^8	9.8%
5% Trehalose + 10% Skim milk	0.96×10^9	0.87×10^8	12.8%

1.4 ผลการคัดเลือก ทดสอบและพัฒนาบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาหัวเชื้อแห้ง

1.4.1 การคัดเลือกบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับรักษาหัวเชื้อแห้ง

คัดเลือกถุงลามิเนตสำหรับบรรจุเชื้อแห้งจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ถุงลามิเนต PET/AL/LLDPE และถุงลามิเนต OPP/VMPET/PE เป็นแบบถุงขยายข้าง ตั้งได้ (Flat-bottom bag) **(ภาพที่ 6)** ทำการทดสอบสมบัติของถุงลามิเนตทั้งสองชนิด พบว่า ถุงลามิเนต OPP/VMPET/PE มีสมบัติที่ดีกว่าถุงลามิเนต PET/AL/LLDPE โดยความต้านแรงดึงขาดตามแนวเครื่องจักร (MD) และแนวขวางเครื่องจักร (CD) มีค่า 37.02 และ 46.40 MPa ตามลำดับ รวมถึงการยืดตัวของฟิล์มพลาสติกมีค่าสูงถึง 114.26% ซึ่งบ่งบอกว่าถุงลาเนตชนิดนี้ยืดตัวได้สูงมาก ความต้านแรงกระแทกของฟิล์มพลาสติกสูงถึง 1,274 gf และสามารถต้านแรงทิ่มทะลุได้ 0.1537 J ถึงแม้ความแข็งแรงของรอยเชื่อมของฟิล์มพลาสติกมีค่า 6.543 kgf แต่ก็ไม่เป็นปัญหาแต่อย่างใดในการนำไปบรรจุผลิตภัณฑ์ ซึ่งสมบัติดังกล่าวของถุงลามิเนต OPP/VMPET/PE มีสมบัติที่เหมาะสมในการเป็นส่วนประกอบวัสดุบรรจุ เนื่องจาก Biaxially oriented polypropylene (BOPP or OPP) film เป็นพลาสติกที่มีสมบัติเชิงกลดีเยี่ยม เนื้อฟิล์มใสและแข็งแรง ต้านทานสารเคมี ความเย็น กันการซึมผ่านของไอน้ำได้ดี นิยมนำมาเป็นวัสดุบรรจุ เหมาะสำหรับใช้กับงานลามิเนต (Liping *et al*., 2020) Vacuum metallized PET (VMPET) คือ ฟิล์มพอลิเอสเตอร์เคลือบโลหะอะลูมิเนียม (AL) ที่มีสมบัติในการขวางกั้นแก๊สและไอน้ำได้ดี มีการเชื่อม/ยึดติดระหว่างชั้นโลหะและฟิล์ม PET ที่สูง ฟิล์มที่ได้มีความเหนียว ความแข็งแรงเชิงกลของฟิล์มเพิ่มขึ้น (Sandhya *et al*., 2009) และ Polyethylene (PE) สมบัติของพลาสติกประเภทนี้ มีจุดหลอมเหลวที่ต่ำ ผิวไม่มีขั้วจึงใช้ติดกับกาวและหมึกพิมพ์ได้ยาก ยืดตัวได้มาก ฉีกขาดยาก ต้านทานไขมันได้น้อย ป้องกันการซึมผ่านของความชื้นได้ดีแต่ป้องกันการซึมผ่านของแก๊สและ

กลิ่นได้น้อย ใช้เป็นชั้นหรือตัวกลางปิดผนึก (sealing layer) (Thomas *et al*., 2016) แสดงดัง **ตารางที่ 7**

ถุงลามิเนต PET/AL/LLDPE

ถุงลามิเนต OPP/VMPET/PE

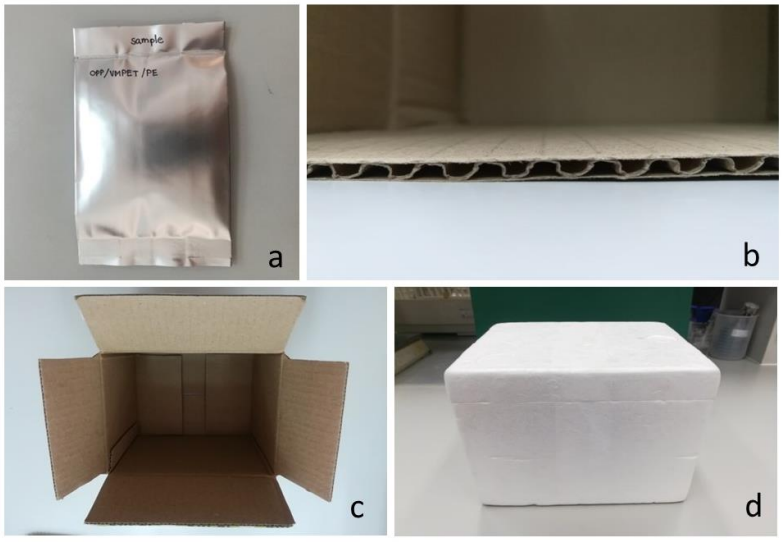
ภาพที่ 6 ตัวอย่างถุงลามิเนตแบบถุงขยายข้าง ตั้งได้ (Flat-bottom bag) สำหรับคัดเลือกบรรจุเชื้อแห้ง

ตารางที่ 7 สมบัติของถุงลามิเนต

การทดสอบ	**ชนิดพลาสติกลามิเนต**	
	ถุงลามิเนต PET/AL/LLDPE	**ถุงลามิเนต OPP/VMPET/PE**
ความต้านแรงดึงขาด (MPa)		
แนวขนานเครื่องจักร (MD)	35.29±0.57	37.02±2.42
แนวขวางเครื่องจักร (CD)	32.45±1.36	46.40±2.71
การยืดตัวของฟิล์มพลาสติก (%)		
แนวขนานเครื่องจักร (MD)	55.65±7.21	114.26±14.63
แนวขวางเครื่องจักร (CD)	42.98±4.51	17.72±2.20
ความแข็งแรงของรอยเชื่อม (kgf)	9.980±0.299	6.543±0.750
ความต้านแรงกระแทกของฟิล์มพลาสติก (gf)	710±0	1,274±0
ความต้านแรงทิ่มทะลุของฟิล์มพลาสติก (J)	0.0645±0.0035	0.1537±0.0053

1.4.2 การคัดเลือกบรรจุภัณฑ์และการพัฒนา

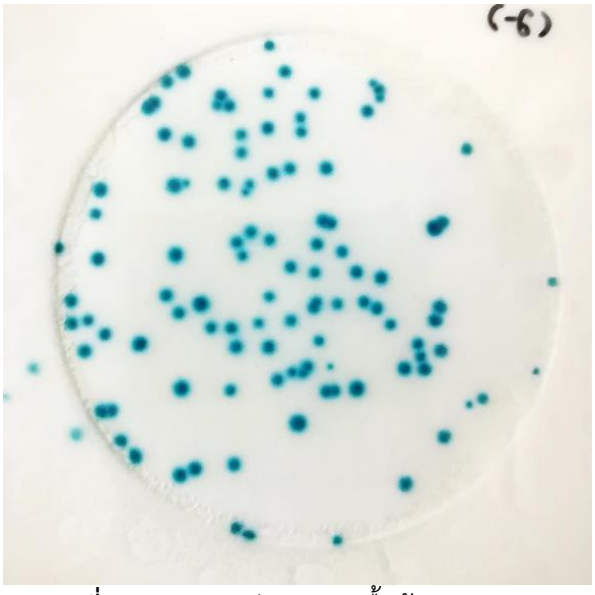
ดำเนินการโดยเตรียมหัวเชื้อแห้งปริมาณ 20 กรัม บรรจุในถุงลามิเนต OPP/VMPET/PE ก่อนการปิดผนึกถุง จากนั้นปิดผนึกถุงด้วยเครื่องปิดผนึกด้วยความร้อน โดยการบรรจุไม่ควรให้ถุงมีอากาศภายในมากจนเกินไป เพื่อประหยัดพื้นที่จัดเก็บและบรรจุได้ในปริมาณมาก **(ภาพที่ 7a)** บรรจุลงในกล่องกระดาษลูกฟูกและกล่องโฟมเพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเชื้อแห้งเมื่อขนส่งถึงปลายทาง ซึ่งกล่องกระดาษลูกฟูกเป็นบรรจุภัณฑ์ชั้นนอกที่ช่วยปกป้องสินค้าภายในเพื่อการขนส่ง สำหรับโครงสร้างของกระดาษลูกฟูกที่ได้คัดเลือกมาเพื่อประยุกต์ใช้งานกับการขนส่งเชื้อแห้งบรรจุถุงลามิเนต คือ แผ่นกระดาษลูกฟูก 1 ชั้น **(ภาพที่ 7b)** โดยแผ่นกระดาษลูกฟูก 1 ชั้น มีความสูงของลอนประเภท B 2.4 มิลลิเมตร (Fadiji *et al*., 2018) เมื่อพิจารณาถึงการใช้งานการขนส่งในระยะทางไกลจำเป็นต้องใช้กล่องกระดาษลูกฟูกที่สามารถรับแรงกระแทกในระหว่างการขนส่งได้ดี ดังนั้นจึงเลือกกล่องกระดาษลูกฟูกสำหรับปกป้องผลิตภัณฑ์ภายใน เนื่องจากการใช้กล่องกระดาษลูกฟูกสามารถเป็นวัสดุรับแรงกระแทกได้ดี สำหรับชนิดของกล่องกระดาษลูกฟูกที่นิยมใช้และสามารถหาได้ตามท้องตลาดทั่วไป รูปแบบไม่ซับซ้อน การผลิตง่าย นำกลับมาใช้ซ้ำได้หลายครั้ง เรียกว่า กล่องฝาชน (Regular Slotted Container (RSC)) **(ภาพที่ 7c)** ซึ่ง Dominic *et al.* (2015) กล่าวว่า การใช้กล่องฝาชนในการขนส่งเป็นรูปแบบที่ง่าย สะดวกใช้กับการบรรจุสำหรับการขนส่งของในปริมาณมาก รวมถึงมีความสามารถรับแรงกดในการซ้อนทับได้ดี การออกแบบที่เหมาะสมของกล่องทั้งมิติ (กว้างxยาวxสูง) พื้นที่การบรรจุ จำนวนผลิตภัณฑ์ที่บรรจุ เพื่อให้การขนส่งสินค้าเกิดประสิทธิภาพสูงสุด สำหรับกล่องโฟมเป็นบรรจุภัณฑ์ที่มีสมบัติพิเศษในการกักเก็บความเย็นไว้ภายในได้ โดยสามารถชะลอการเพิ่มอุณหภูมิภายในกล่องได้ดีเมื่อใช้ร่วมกับถุงเจลทำความเย็น **(ภาพที่ 7d)**



ภาพที่ 7 ชนิดของแผ่นกระดาษลูกฟูกสำหรับผลิตกล่องกระดาษลูกฟูกเพื่อการขนส่ง (a) ถุงลามิเนตสำหรับบรรจุหัวเชื้อแห้ง (b) แผ่นกระดาษลูกฟูก 1 ชั้น (Single wall corrugated board) และ (c) กล่องฝาชน (Regular Slotted Container (RSC)) และ (d) กล่องโฟม

1.4.3 การทดสอบอัตราการรอดชีวิตของหัวเชื้อแห้งหลังจากการขนส่ง

วิธีการตรวจนับจำนวนเชื้อด้วย Petrifilm **(ภาพที่ 8)** ก่อนการขนส่งหัวเชื้อแห้งที่บรรจุในบรรจุภัณฑ์สำหรับขนส่ง (หัวเชื้อแห้งเก็บรักษามาแล้ว 1 เดือน) ทำการหาอัตราการรอดชีวิตของหัวเชื้อแห้งเริ่มต้นอีกครั้งก่อนขนส่ง โดยขนส่งหัวเชื้อแห้ง จำนวน 3 แบบ ได้แก่ การขนส่งโดยเก็บในกล่องโฟม (ขนส่งโดยรถตู้คณะเดินทางทำงานวิจัย) การขนส่งโดยเก็บในกล่องกระดาษลูกฟูก (ขนส่งโดยรถตู้คณะเดินทางทำงานวิจัย) และการขนส่งโดยเก็บในกล่องกระดาษลูกฟูก (ขนส่งเอกชน) จากนั้นศึกษาอัตราการรอดชีวิตของหัวเชื้อแห้ง (เริ่มต้น : นับเชื้อเริ่มต้นก่อนขนส่ง 1 วัน) และอัตราการรอดชีวิตของหัวเชื้อแห้ง (ปลายทาง) **(ตารางที่ 8)** พบว่า สูตรหัวเชื้อแห้งสูตรที่ 2 มีอัตราการรอดชีวิต (เริ่มต้น) สูงสุด 197.00 CFU/ml (10^6) รองลงมาคือสูตรที่ 7 115.00 CFU/ml (10^6) โดยอัตราการรอดชีวิตหัวเชื้อแห้ง (ปลายทาง) มีอัตราการรอดชีวิตของหัวเชื้อแห้งลดลงของการขนส่งทุกแบบ สำหรับการขนส่งด้วยรถตู้คณะเดินทางทำงานวิจัย โดยการขนส่งหัวเชื้อแห้งด้วยกล่องโฟมมีอัตราการรอดชีวิตหัวเชื้อแห้งโดยรวมสูงกว่าขนส่งด้วยกล่องกระดาษลูกฟูก ส่วนการขนส่งเอกชนอัตราการรอดชีวิตของหัวเชื้อแห้งโดยภาพรวมลดลงไม่มาก อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ซึ่งอุณหภูมิสูงเกิน 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานส่งผลโดยตรงต่อการเสื่อมสภาพของสตาร์ชที่ใช้ห่อหุ้มหัวเชื้อแห้งไว้ (Patindol *et al.,* 2005) และระยะเวลาในการขนส่งเป็นปัจจัยที่สำคัญส่งผลต่อการลดลงของอัตราการรอดชีวิตของหัวเชื้อแห้ง ดังนั้น การขนส่งในระยะทางไกลสามารถขนส่งด้วยระบบขนส่งเอกชนได้ ถึงแม้อัตราการรอดชีวิตของหัวเชื้อแห้งลดลงก็ตาม สำหรับปัญหาที่พบในงานวิจัย คือ บรรจุภัณฑ์ที่ใช้บรรจุหัวเชื้อแห้งเป็น ถุงลามิเนตผลิตจากวัสดุที่ย่อยสลายได้ยาก และเกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมในระยะยาวได้ ถ้ามีการรวมหน่วยการบรรจุในหนึ่งถุงใหญ่ ประกอบด้วยถุงขนาดเล็กหลายถุงสามารถที่จะลดปริมาณขยะที่เกิดจากการใช้งานของบรรจุภัณฑ์ได้



ภาพที่ 8 การตรวจนับจำนวนเชื้อด้วย Petrifilm

ตารางที่ 8 อัตราการรอดชีวิตของหัวเชื้อแห้ง

สูตรหัวเชื้อแห้ง	เชื้อจุลินทรีย์	อัตราการรอดชีวิต (เริ่มต้น) CFU/ml (10^6)	อัตราการรอดชีวิต (ปลายทาง) CFU/ml (10^6)		
			ขนส่งโดยรถตู้คณะเดินทางทำงานวิจัย**		ขนส่งเอกชน
			กล่องโฟม	กล่องกระดาษลูกฟูก	กล่องกระดาษลูกฟูก
1	BAwine	89.00	46.00	54.00	88.00
2	BAwine	197.00	170.00	53.00	101.00
3	BAwine	99.00	95.00	44.00	5.00
4	BAwine	77.00	71.00	76.00	74.00
5	PRO-Y15	13.70	8.40	2.30	5.70
6	PRO-Y15	7.80	1.90	0.80	1.00
7	PRO-Y15	115.00	41.00	76.00	78.00
8	PRO-Y15	7.50	7.30	7.00	4.80

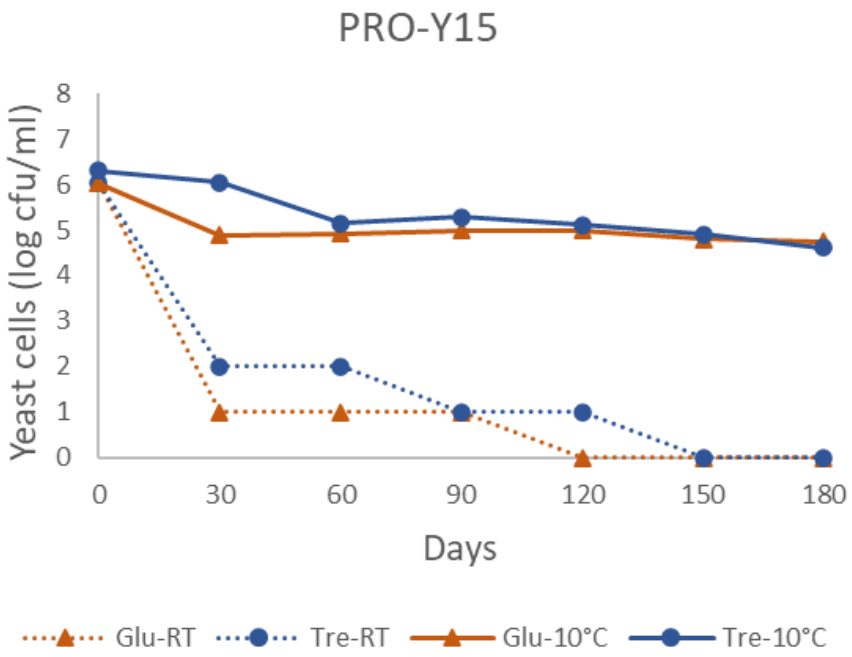
** ขนส่งโดยรถตู้คณะเดินทางทำงานวิจัยของโครงการ CSC จากกรุงเทพ ถึง ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย จังหวัดเชียงราย

1.4.4 การทดสอบอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อแห้ง

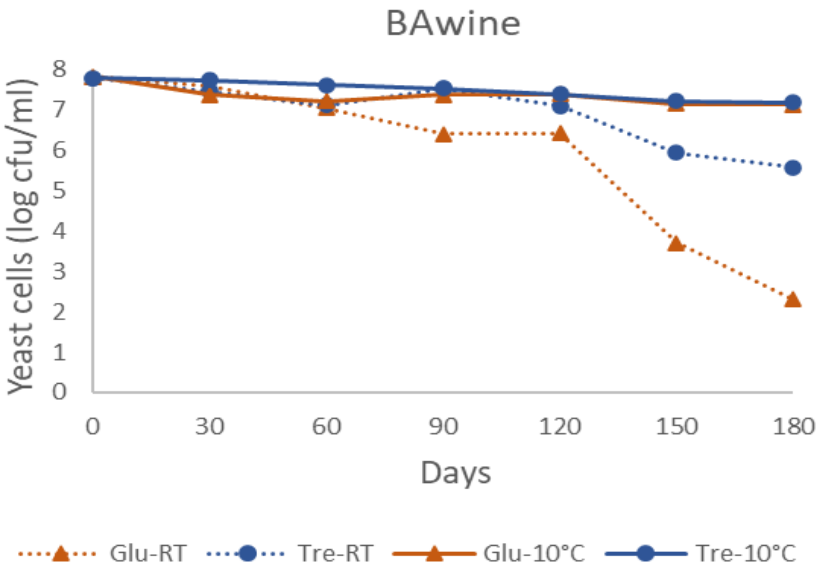
ทำการทดสอบอายุการเก็บรักษาหัวเชื้อจุลินทรีย์แห้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ PRO-Y15 และ BAwine ที่ผลิตโดยใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นสารเพิ่มปริมาณและใช้สารป้องกันเซลล์ 2 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 ประกอบด้วย 10% Glucose + 10% Skim milk และ สูตรที่ 2 ประกอบด้วย 5% Trehalose + 10% Skim milk บรรจุหัวเชื้อแห้งในถุงลามิเนต OPP/VMPET/PE ที่คัดเลือก เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) และเก็บรักษาในตู้เย็น (10 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างมาทดสอบการรอดชีวิตทุกๆ 30 วัน จนครบเวลา 180 วัน ดังแสดงใน**ภาพที่ 9 และ 10**

ผลการทดสอบพบว่าหัวเชื้อแห้ง PRO-Y15 ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 180 วัน มีการลดลงของเซลล์ที่มีชีวิตเล็กน้อย ปริมาณเซลล์อยู่ในระดับ 5-6 log CFU/ml แต่หัวเชื้อที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตลดต่ำกว่า 2 log CFU/ml แสดงให้เห็นว่ายีสต์สายพันธุ์ PRO-Y15 ไม่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ในขณะที่หัวเชื้อแห้งสายพันธุ์ BAwine ที่เก็บรักษานาน 180 วัน ในสภาวะอุณหภูมิห้องและที่ 10 องศาเซลเซียส มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตใกล้เคียงกัน (7-8 log CFU/ml) แสดงให้เห็นว่าหัวเชื้อแห้งของสายพันธุ์ BAwine มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาตั้งแต่ 10-30 องศาเซลเซียส

นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเก็บรักษาหัวเชื้อแห้งของยีสต์สายพันธุ์ BAwine ที่อุณหภูมิห้อง การทำแห้งโดยใช้สารป้องกันเซลล์ที่มี 5% Trehalose มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตสูงกว่าสารป้องกันเซลล์ที่มี 10% Glucose โดยเมื่อเก็บรักษานาน 180 วัน การทำแห้งโดยใช้ 5% Trehalose มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต 6 log CFU/ml ในขณะที่การทำแห้งโดยใช้ 10% Glucose มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตเหลือเพียง 2 log CFU/ml แสดงให้เห็นว่าชนิดของน้ำตาลที่ใช้เป็นสารป้องกันเซลล์มีผลต่อการรอดชีวิตของยีสต์บางสายพันธุ์เมื่อทำการเก็บรักษาในบางสภาวะและในระยะเวลาที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 9 แผนภาพแสดงเซลล์ที่มีชีวิต (log cfu/ml) ของหัวเชื้อจุลินทรีย์แห้งสายพันธุ์ PRO-Y15 ที่ผลิตโดยใช้กลูโคส (GlU) และทรีฮาโลส (Tre) เป็นสารป้องกันเซลล์ เมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (RT) และ อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส



ภาพที่10 แผนภาพแสดงเซลล์ที่มีชีวิต (log cfu/ml) ของหัวเชื้อจุลินทรีย์แห้งสายพันธุ์ BAwine ที่ผลิตโดยใช้กลูโคส (GlU) และทรีฮาโลส (Tre) เป็นสารป้องกันเซลล์ เมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (RT) และ อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

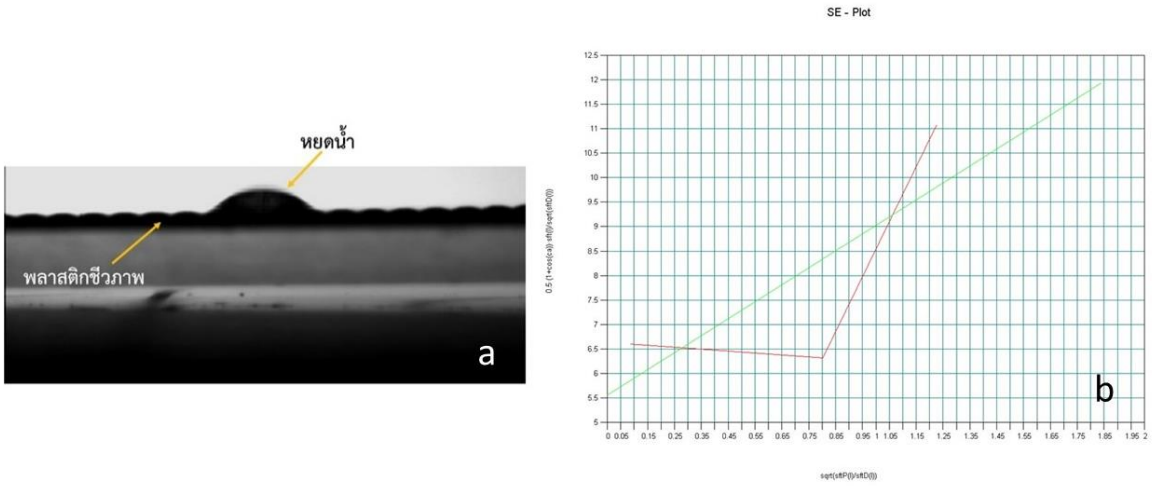
1.5 ผลการพัฒนาบรรจุภัณฑ์ย่อยสลายได้สำหรับบรรจุหัวเชื้อแห้ง

การใช้พลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมโดยตรง ทางออกของปัญหานี้แก้ไขได้ด้วยการใช้พลาสติกชีวภาพที่มีสมบัติย่อยสลายได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกพลาสติกชีวภาพ 1 ชนิดสำหรับบรรจุหัวเชื้อแห้ง คือ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) **(ภาพที่ 11)** เป็นวัสดุที่มีความสามารถในการละลายน้ำและย่อยสลายทางชีวภาพได้ดี PVA เป็นพลาสติกชีวภาพมีสมบัติดีเยี่ยม ทนทานต่อสารเคมี สามารถประยุกต์ใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ได้ อย่างไรก็ตาม PVA เป็นพลาสติกชีวภาพมีสมบัติที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ดูดซับน้ำได้ปริมาณมาก เนื่องจากมีหมู่ไฮดรอกซิล (OH group) หลายตำแหน่งในสายโซ่โมเลกุลพอลิเมอร์ (Abral *et al*., 2020) จากการทดสอบสมบัติของพลาสติก PVA สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นบรรจุภัณฑ์บรรจุหัวเชื้อแห้งได้ **(ตารางที่ 9)** โดยวัดมุมสัมผัสของหยดน้ำได้ 50° ซึ่งมีองศาที่แคบทำให้ดูดซับน้ำได้ดี อีกทั้งพลังงานพื้นผิวที่ได้มีค่าน้อยเกิดจากแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุล (intermolecular force) ที่ต่ำ **(ภาพที่ 12)** ทำการทดสอบการละลายน้ำของพลาสติก PVA พบว่า พลาสติกมีความสามารถในการละลายน้ำได้ภายในเวลา 5 นาที หรือนำพลาสติก PVA จุ่มลงในน้ำ จากนั้นคนให้พลาสติกละลายได้ภายในเวลา 30 วินาที ได้เช่นเดียวกัน **(ภาพที่ 13)** ซึ่งพลาสติก PVA เหมาะสมในการนำไปใช้งานได้จริงในกระบวนการหมักกาแฟสำหรับเกษตรกรผู้ผลิตและแปรรูปเมล็ดกาแฟ

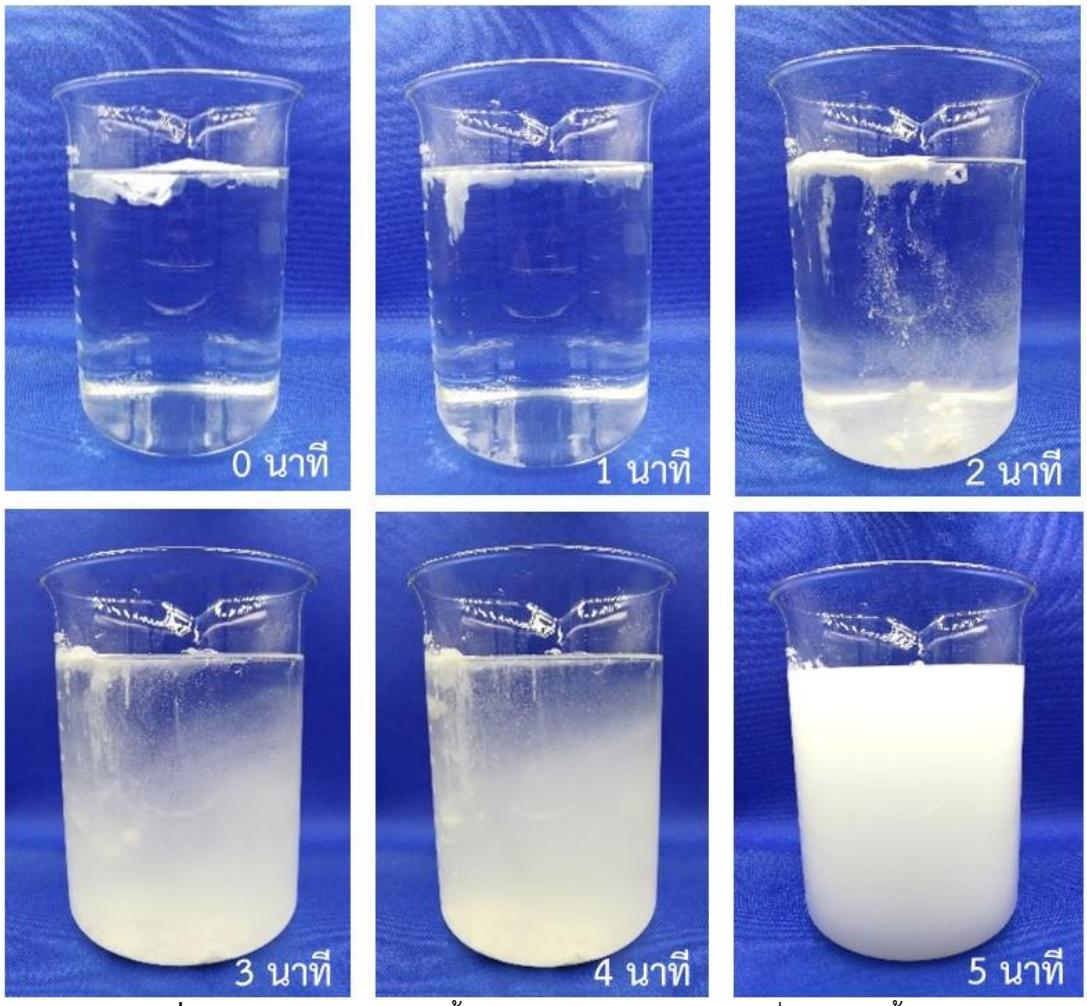
ต้นทุน การผลิตพลาสติกชีวภาพ PVA สำหรับบรรจุหัวเชื้อแห้ง 1 ถุง เท่ากับ 1.05 บาท

ต้นทุน ถุงลามิเนต OPP/VMPET/PE สำหรับบรรจุพลาสติกชีวภาพ PVA 1 ถุง เท่ากับ 3.60 บาท

ภาพที่ 11 พลาสติกชีวภาพพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA)



ภาพที่ 12 มุมสัมผัสหยดน้ำ (a) และกราฟพลังงานพื้นผิว (b) ของพลาสติกชีวภาพพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA)



ภาพที่ 13 ทดสอบการละลายน้ำของพลาสติกชีวภาพ PVA ที่บรรจุหัวเชื้อแห้ง

ตารางที่ 9 สมบัติของพลาสติกชีวภาพพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA)

การทดสอบ	พลาสติก PVA
ความต้านแรงดึงขาด (MPa)	30.42±1.49
การยืดตัวของฟิล์มพลาสติก (%)	99.37±4.40
ความแข็งแรงของรอยเชื่อม (kgf)	243.400±9.551
อัตราการซึมผ่านของแก๊สออกซิเจน ($cm^3/m^2/day$)	0.427±0.001
อัตราการซึมผ่านของไอน้ำ ($g/m^2/day$)	285.0±0.7
ความหนาแน่นของฟิล์มพลาสติก (g/cm^2)	0.006±0.000
มุมสัมผัสหยดน้ำ (°)	50.0±0.4
พลังงานพื้นผิว (mN/m)	42.88±0.00

2. ผลวิเคราะห์ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อผง Coffee Starter Culture

2.1 ผลการสำรวจพื้นที่เพื่อการถ่ายทอดเทคโนโลยีโดยการตรวจสอบกระบวนการผลิตกาแฟ

แปลงกาแฟที่ปฏิบัติงานทดลองนั้นมีทั้งสิ้น 5 แปลงในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย แบ่งเป็นส่วนราชการและภาคเอกชนได้แก่ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ ศูนย์วิจัยเกษตรที่สูงเชียงราย ไร่กาแฟเลซี่แมน จังหวัดเชียงใหม่ ไร่กาแฟสิริยาและบริษัทดอยช้างออริจินัล จำกัด จังหวัดเชียงรายตาม**ตารางที่ 10 -11** ซึ่งเป็นพื้นที่ปลูกกาแฟอะราบิกาเป็นหลักโดยผลกาแฟสุกแก่ระยะเก็บเกี่ยวจะมีค่าความหวานของผลเชอร์รี่ระหว่าง 23 – 36 องศาบริกซ์ ตามร่มเงาและระดับความสูงของแปลงปลูก ซึ่งทุกพื้นที่จะมีบ่อหมักที่ทำจากปูนเพื่อใช้ในการทดสอบเชื้อและเชื้อแห้ง โดยกระบวนการหลังจากการหมักจะมีการควบคุมให้เป็นไปในลักษณะเดียวกันเพื่อการทดสอบคุณภาพกาแฟคั่วจากการหมักที่สามารถควบคุมปัจจัยการผลิตได้ตั้งแต่การใช้ลานตากแสงอาทิตย์ การเก็บรักษาในโรงเก็บควบคุมความชื้นร่วมกับถุง HDPE การคั่วกาแฟโดยการใช้ Sample roaster และมีการตรวจคัดเกรดตลอดระยะเวลาการผลิตกาแฟ โดยการประเมินศักยภาพของแปลงผลิตกาแฟนั้นมีการประเมินต้นทุนการผลิตกาแฟในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่และเชียงรายระหว่าง 90,000 – 120,000 บาทต่อไร่ตามผลการติดตามการผลิตกาแฟพรีเมียมในโครงการขยายผลของกรมวิชาการเกษตร โดยมีผลผลิตคาดการณ์ระหว่าง 90 – 150 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งคุณภาพกาแฟของเกษตรกรที่ใช้กระบวนการหมักกาแฟแบบเปียกปัจจุบันนั้นมีคะแนนประเมินทางประสาทสัมผัสโดยวิธี SCAA ตั้งแต่ 76 – 82 คะแนนจาก 100 คะแนน โดยมีปริมาณสาร OTA น้อยกว่า 0.5 ไมโครกรัมซึ่งตรงตามมาตรฐานเมล็ดกาแฟไทย และมีค่าสาร PAH ต่ำกว่า 0.01 ไมโครกรัม (โกเมศ และคณะ, 2556a; 2556b) ทั้งนี้ในกระบวนการหมักกาแฟนั้นจะมีการใช้ทรัพยากรในการผลิตได้แก่ (1.) ปริมาณการใช้น้ำในการหมักกาแฟไม่น้อยกว่า 200 ลิตรต่อการผลิตกาแฟเชอร์รี่ 1 กิโลกรัม (2.) อัตราค่าแรงงานในการหมักกาแฟในพื้นที่เก็บเกี่ยวกาแฟคิดเป็น 300 บาทต่อวัน (10 ชั่วโมง) (3.) เวลาที่ใช้ในการหมักกาแฟจะใช้เวลาการหมักจนเสร็จสิ้นไม่น้อยกว่า 72 – 120 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีปัจจัยส่งเสริมการหมักได้แก่ หัวเชื้อนำเข้าจากต่างประเทศราคา 3,000 บาทต่อ 500 กรัม อุปกรณ์ที่ใช้ในการหมัก เป็นต้น ทั้งนี้จากผลการทดลองการใช้หลักเศรษฐกิจหมุนเวียนมาใช้ในการหมักกาแฟนั้นทำให้ลดการใช้น้ำลงเหลือไม่น้อยกว่า 1 ลิตรต่อกาแฟ 1 กิโลกรัมและเวลาการหมักไม่เกิน 18 ชั่วโมงนอกจากนี้ยังลดการใช้ทรัพยากรทั้งแรงงานที่ลดภาระงานลงรวมทั้งอุปกรณ์ที่ใช้หมักที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้รวดเร็วขึ้น โดยการหมักกาแฟตามหลักเศรษฐกิจหมุนเวียนนี้จำเป็นต้องเริ่มจากการใช้จุลินทรีย์ หรือ หัวเชื้อที่ได้พัฒนาขึ้นในโครงการนี้เพื่อการนำไปสู่การต่อยอดนวัตกรรมการหมักกาแฟที่ลดการใช้ทรัพยากร ซึ่งผลพลอยได้ที่สำคัญนั้นคือการนำมาสู่การพัฒนากลิ่นรสกาแฟสู่การพัฒนากาแฟพิเศษ ลดการนำเข้าหัวเชื้อจากต่างประเทศ สร้างอัตลักษณ์กาแฟจากความหลากหลายของจุลินทรีย์เฉพาะถิ่น รวมทั้งเพิ่มมูลค่าสินค้ากาแฟด้วยคุณภาพของพืชกาแฟสู่การยอมรับระดับสากล

ตารางที่ 10 ผลการสำรวจพื้นที่เพื่อการถ่ายทอดเทคโนโลยีโดยการตรวจสอบระบบการผลิตกาแฟ

หน่วยงาน	แปลงต้นแบบกาแฟ	การใช้ดัชนีเก็บเกี่ยว	บ่อหมักกาแฟ	ลานตากกาแฟ	การเก็บรักษาสารกาแฟ	การคั่วกาแฟ	การคัดเกรดและตรวจประเมิน
ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่	/ (อะราบิกา)	/ (23 Brix)	/ (4 บ่อ)	โรงตากกาแฟแสงอาทิตย์	โรงเก็บควบคุมความชื้น + ถุง HDPE	เครื่องคั่วกาแฟ 10 กิโลกรัม และ sampling roaster	/
ศูนย์วิจัยเกษตรที่สูงเชียงราย	/ (อะราบิกา)	/ (25 Brix)	/ (5 บ่อ)	ลานกาแฟแสงอาทิตย์และเครื่องอบ	โรงเก็บควบคุมความชื้น + ถุง HDPE	เครื่องคั่วกาแฟ 10 กิโลกรัม และ sampling roaster	/
บริษัท Lazy Man Coffee, 21 หมู่ที่ 4 ตำบลแม่วิน อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่	/ (อะราบิกา)	/ (28 – 30 Brix)	/ (4 บ่อ)	โรงตากกาแฟแสงอาทิตย์	โรงเก็บควบคุมความชื้น + ถุง HDPE	เครื่องคั่วกาแฟ 10 กิโลกรัม และ sampling roaster	/
ไร่กาแฟสิรินยา อำเภอแม่สรวย อำเภอวาวี จังหวัดเชียงราย	/ (อะราบิกา)	/ (28 - 33 Brix)	/ (10 บ่อ และโรงทดสอบ Anaerobic)	โรงตากกาแฟแสงอาทิตย์ โรงบ่มลมร้อน และ ลานกาแฟแสงอาทิตย์	โรงเก็บควบคุมความชื้น + ถุง HDPE	เครื่องคั่วกาแฟ 10 กิโลกรัม และ sampling roaster	/
บริษัทดอยช้างออริจินัล อำเภอแม่สรวย จังหวัดเชียงราย	/ (อะราบิกา)	/ (25 - 36 Brix)	/ (20บ่อ และบ่อบ่มขนาดใหญ่ขนาด 5 ตัน)	โรงตากกาแฟแสงอาทิตย์ โรงบ่มลมร้อน และ ลานกาแฟแสงอาทิตย์	โรงเก็บควบคุมความชื้น + ถุง HDPE	เครื่องคั่วกาแฟ 20 กิโลกรัม และ sampling roaster	/

ตารางที่ 11 กระบวนการหมักกาแฟในพื้นที่ทดสอบ ต้นทุนการผลิตและคุณภาพ

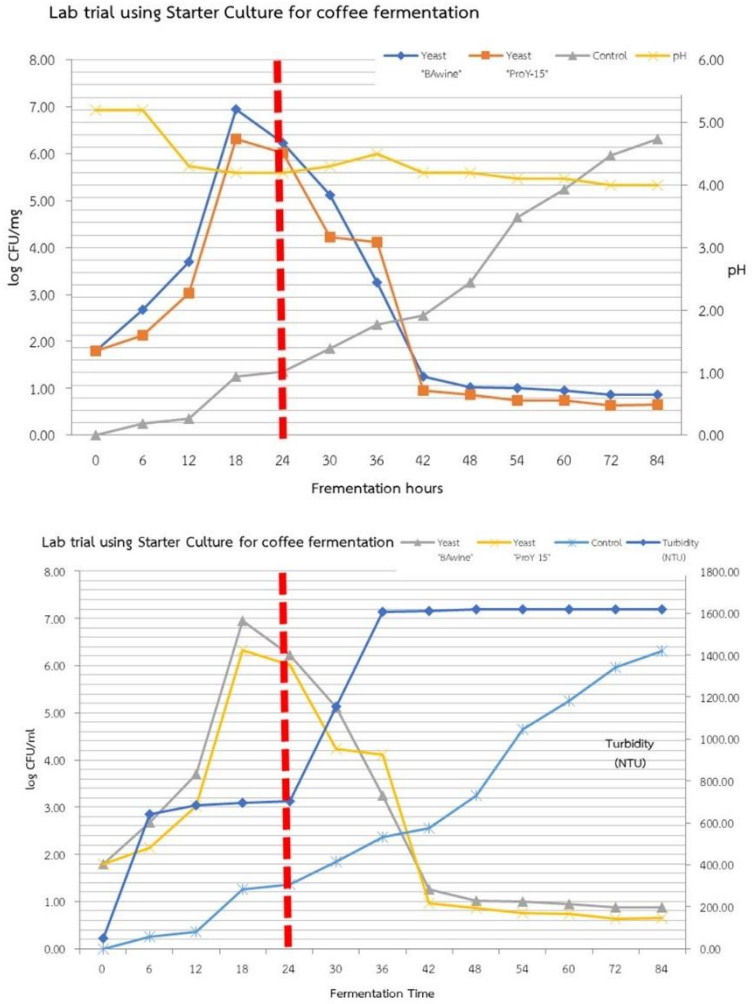
หน่วยงาน	กระบวนการหมัก	หัวเชื้อจุลินทรีย์	ระยะเวลาการหมัก	ต้นทุนการผลิต (บ./ไร่)	ผลผลิต (กก./ไร่)	คุณภาพ**
ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่	การหมักแบบเปียก AAFtechniques Pro-Y techniques	หัวเชื้อสดจาก กวป.	18 – 72 ชั่วโมง	90,000	90 - 100	78 - 80/100 OTA < 0.5 ug/ PAH < 0.01 ug
ศูนย์วิจัยเกษตรที่สูงเชียงราย	การหมักแบบเปียก การหมักแบบกึ่งแห้ง AAFtechniques Pro-Y techniques	หัวเชื้อสดจาก กวป.	18 – 48 ชั่วโมง	92,000	80 - 150	80 - 82/100 OTA < 0.5 ug/ PAH < 0.01 ug
บริษัท Lazy Man Coffee,	การหมักแบบเปียก การหมักแบบกึ่งแห้ง	ไม่มี	24 – 72 ชั่วโมง	92,000	120	80 - 82/100 ไม่พบ OTA/

หน่วยงาน	กระบวนการหมัก	หัวเชื้อจุลินทรีย์	ระยะเวลาการหมัก	ต้นทุนการผลิต (บ./ไร่)	ผลผลิต (กก./ไร่)	คุณภาพ**
21 หมู่ที่ 4 ตำบลแม่วิน อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่	AAFtechniques Pro-Y techniques					PAH>0.01 ug
ไร่กาแฟสิรินยา อำเภอแม่สรวย อำเภอวาวี จังหวัดเชียงราย	การหมักแบบเปียก การหมักแบบกึ่งแห้ง การหมักแบบแห้ง AAFtechniques Pro-Y techniques	หัวเชื้อสดจาก กวป.	24 – 128 ชั่วโมง	155,000	100	80 - 82/100 ไม่พบ OTA/ PAH>0.01 ug
บริษัทดอยช้างออริจินัล อำเภอแม่สรวย จังหวัดเชียงราย	การหมักแบบเปียก การหมักแบบกึ่งแห้ง การหมักแบบแห้ง AAFtechniques Pro-Y techniques	หัวเชื้อสดจาก กวป.	24 – 96 ชั่วโมง	95,000 – 120,000	80 - 150	76 - 80/100 OTA < 0.5 ug/ PAH < 0.01 ug

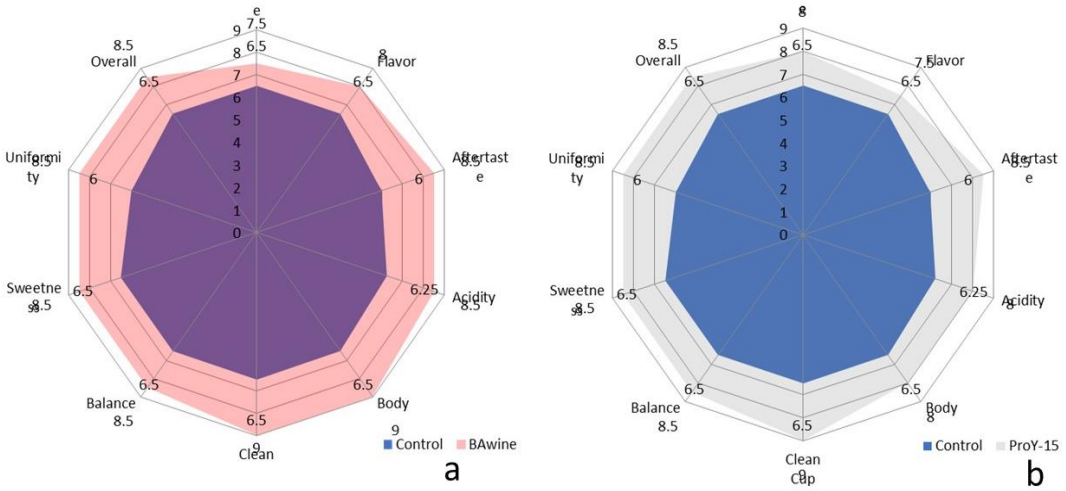
2.2 ผลการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ต่อผลของการหมักกาแฟอะราบิกา

พบว่าเชื้อยีสต์จะมีการเจริญต่อร่วมกับแบคทีเรียอย่างรวดเร็วตั้งแต่ 6 ชั่วโมงแรกของการหมักเป็นต้นไปตาม**ภาพที่ 14 - 15** ยกเว้นชุดควบคุมทั้งนี้ด้วยปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ 1.8 log CFU/ml จะทำให้ปริมาณความเป็นกรดด่าง (pH) ลดลงระหว่าง 4.0 – 3.5 และปริมาณความขุ่นที่เพิ่มขึ้นกว่า 800 – 1,000 NTU ส่งผลต่อการลดลงของปริมาณเมือกอย่างต่อเนื่อง โดยที่ 12 ชั่วโมงเป็นต้นไปมีการลดลงของเมือกอย่างรวดเร็วและหมดลงในระยะเวลาหมักครบ 18 - 20 ชั่วโมงในชุดการทดลองที่ใช้เชื้อผงและที่ 72 – 84 ชั่วโมงในชุดควบคุม แสดงให้เห็นสัมพันธ์กับค่าความเป็นกรดด่างที่มีการลดลงเมื่อมีการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์เพิ่มขึ้น โดยเป็นผลมาจากยีสต์ที่ส่งผลโดยตรงกับแบคทีเรียในกลุ่มที่สร้างกรดทำให้น้ำหมักมีปริมาณกรดเพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงจนมีค่าเท่ากับคือ 3.64 ในขณะที่การเจริญของเชื้อแบคทีเรียจะคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และลดลงในช่วงท้ายของการหมักโดยมีจำนวนเซลล์ 6.95 log CFU/ml และการเจริญของเชื้อยีสต์จะมีปริมาณลดลงในชั่วโมงที่ 18 และจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 จนถึงในช่วงท้ายของการหมัก จำนวนเซลล์จะลดลงเหลือ 5.20 log CFU/ml ดังแสดงในภาพที่ 14 และพบว่าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* strain BAwine และ *Pichia kluyveri* Strain PRO-Y15 มีผลต่อการหลุดของเมือกและจากเจริญเติบโตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 โดยแบคทีเรียที่ส่งผลต่อการหลุดของเมือกนั้นเมื่อทำการทดสอบนั้นคือแบคทีเรียชนิด *Erwinia dissolvens* โดยเป็นกลุ่มเดียวกับ Enterobactor ที่ได้ทำการตรวจสอบทำให้ทราบถึงเชื้อจุลินทรีย์เฉพาะที่ช่วยในการหมักกาแฟและสามารถนำไปศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อได้

โดยมีค่าความขุ่นขณะหมักที่ 1,500 NTU และค่าความเป็นกรดด่างอยู่ที่ pH 4.5 โดยผลทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าคะแนนจากเมล็ดกาแฟคั่วที่ผ่านการหมักด้วยยีสต์ BAwine และ PRO-Y 15 มีคะแนนคุณภาพลักษณะทางประสาทสัมผัสความชอบโดยรวมสูงที่สุดคือ 3.2±0.45 จากคะแนนเต็ม 5 (hedonic score) และคะแนน Cupping score โดยวิธีการทดสอบของ SCA พบว่าการใช้เชื้อแห้งมีคะแนนทดสอบทางประสาทสัมผัสสูงกว่าชุดควบคุมทุกหัวข้อโดยเฉพาะ Fragrance, Aroma/Flavor, Aftertaste จาก 6.0 ± 0.5 เป็น 7.5 ± 0.5 ทั้งนี้ผลทดสอบชิมมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในหัวข้อ Acidity, Body, Clean Cup และ Balance จาก 6.0 ± 0.5 เป็น 8.5 ± 0.5 โดยผลทดสอบความสม่ำเสมอของรสชาติ Uniformity พบความสม่ำเสมอถึง 8.0 ± 0.75 ซึ่งทำให้ผลคะแนนรวม 83 ± 1.25 ทั้งนี้มีผลการทดสอบการใช้เชื้อแห้งในกาแฟโรบัสตา (โกเมศ, 2566) ซึ่งพบค่า Saltiness/Acid ที่สูงกว่า 8.0 ± 0.5 ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อเมื่อการทดสอบใช้จริง ทั้งนี้จำเป็นต้องมีการทดสอบซ้ำในพื้นที่จริง



ภาพที่ 14 แผนภาพแสดงการเจริญของเซลล์ (ความขุ่นของเซลล์ที่ OD 660 นาโนเมตร) และจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (log CFU/ml) ของ A.) ยีสต์สายพันธุ์ BAwine (สีฟ้า) B.) ยีสต์สายพันธุ์ PRO-Y15 (สีส้ม) และ ชุดควบคุม (สีเทา)ระหว่างการหมักกาแฟต่อความเป็นกรดด่าง



ภาพที่ 15 กราฟแสดงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสในรูปแบบของ cupping hedonic score (a) หัวเชื้อแห้ง BAwine (b) หัวเชื้อแห้ง PRO-Y15 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Control -สีเข้ม)

2.3 ผลการทดสอบการใช้เชื้อจุลินทรีย์แห้งในพื้นที่จังหวัดเชียงรายและจังหวัดเชียงใหม่

ผลการทดสอบการหมักกาแฟโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์แห้งในพื้นที่จังหวัดเชียงรายและจังหวัดเชียงใหม่ **(ภาพที่ 16-17)** โดยใช้อัตราส่วนหัวเชื้อจุลินทรีย์ 1 กรัม ต่อกาแฟ 1 กิโลกรัม ต่อน้ำปริมาตร 2.5 ลิตร พบว่า ในระบบการหมักหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมโดยใช้แป้งข้าวเจ้า (เส้นกราฟสีฟ้าและสีเขียว) และหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมโดยใช้แป้งถั่วเหลือง (เส้นกราฟสีเทาและเหลือง) มีปริมาณเซลล์เริ่มต้น 4-5 log CFU/ml (กราฟแสดงจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นหัวเชื้อสายพันธุ์ PRO-Y15 และ BAwine เท่านั้น) เมื่อทำการหมักกาแฟเป็นเวลา 8 ชั่วโมง หัวเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตและมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าสภาวะที่ใช้ในการทำแห้งเพื่อผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์มีความเหมาะสมโดยจุลินทรีย์ยังชีวิตรอดและสามารถเพิ่มจำนวนได้เช่นเดียวกับการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์สด (เส้นกราฟสีส้ม) การเจริญของจุลินทรีย์และการหลุดของเมือกกาแฟสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงค่าความขุ่น (Turbidity) ในน้ำหมักกาแฟ การหลุดของเมือกกาแฟโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์แห้งและเชื้อจุลินทรีย์สดมีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน เมือกถูกย่อยและหลุดจากเมล็ดกาแฟในเวลา 18-24 ชั่วโมง โดยสังเกตจากค่าความขุนที่มีค่าสูงกว่า 1000 NTU และเมื่อทำการสัมผัสเมล็ดพบว่าเมือกหุ้มเมล็ดเปื่อยยุ่ยหลุดออกโดยง่าย จากการทดสอบดังกล่าวพบว่าในระบบการหมัก 24 ชั่วโมงแรก หัวเชื้อที่ผลิตโดยใช้แป้งถั่วเหลืองและแป้งข้าวเจ้ามีการเจริญของจุลินทรีย์และการย่อยเมือกในระดับที่ใกล้เคียงกัน โดยมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่ 4-5 log CFU/ml ซึ่งต่ำกว่าปริมาณเซลล์ที่ชีวิตของการหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์สด ซึ่งมีปริมาณเซลล์อยู่ที่ 5-6 log CFU/ml แต่ยังสามารถทำให้เกิดการหลุดของเมือกกาแฟในระยะเวลา 18-24 ชั่วโมงได้ แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของจุลินทรีย์ดังกล่าวเพียงพอต่อการหมักกาแฟ สามารถใช้ในการแปรรูปกาแฟในพื้นที่จังหวัดเชียงรายและเชียงใหม่ในช่วงฤดูการเก็บเกี่ยวกาแฟซึ่งมีอุณหภูมิต่ำ และสามารถเจริญแข่งขันกับ

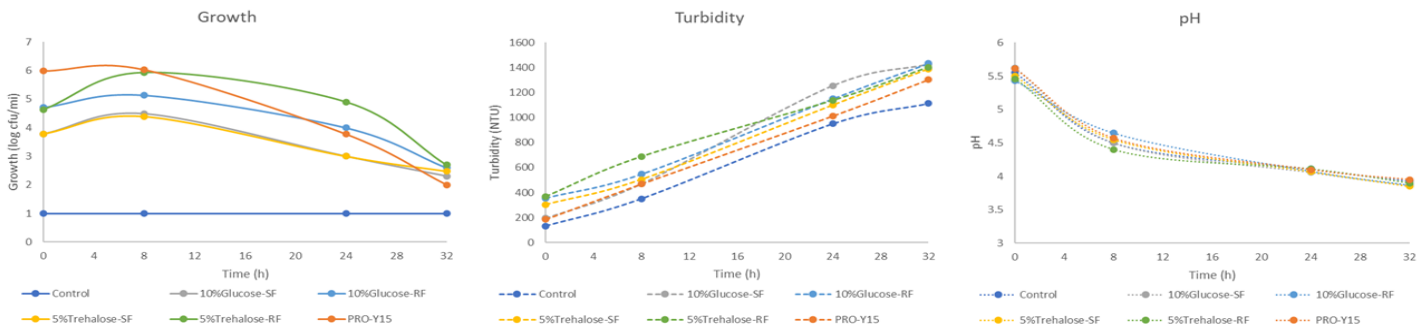
จุลินทรีย์ตามธรรมชาติได้ ทั้งนี้เมื่อวิเคราะห์ผลการทดสอบการหมักและการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการเปรียบเทียบค่าความขุ่น (turbidity) พบว่า เชื้อจุลินทรีย์แห้งนั้นมีการตอบสนองต่อการเจริญเติบโตที่สูงโดยมีการเจริญเติบโตถึงระดับที่เหมาะต่อการหมักในชั่วโมงที่ 8 โดยเฉพาะในกลุ่มที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารป้องกันเซลล์ ซึ่งดีกว่าชุดที่ใช้น้ำตาลทรีฮาโลสเป็นสารป้องกันเซลล์ แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาเชื้อโดยใช้น้ำตาลกลุ่มกลูโคสจะมีคุณภาพที่เอื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อดีกว่าและใกล้เคียงกันในกลุ่มเชื้อแห้งทั้ง PRO-Y15 และ BAwine ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตกับชุดควบคุมนั้นพบว่าต้องใช้เวลากว่า 24 ชั่วโมงเพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตได้เต็มที่ก่อนที่จะเริ่มทำการหมักและเชื้อที่เจริญเติบโตนั้นจะเกิดการแข่งขันตามธรรมชาติทำให้ไม่สามารถควบคุมได้และความสม่ำเสมอระหว่างการหมักนั้นไม่มีความต่อเนื่องในการควบคุมการหมักและกลิ่นรส ในระหว่างชุดการทดสอบ โดยผลการทดสอบในปีแรกนี้ยืนยันถึงความสำคัญในการใช้เชื้อแห้งในการจัดการหมักที่เหมาะสมและทำให้เกิดข้อดีในการหมักทำให้เกษตรกรสามารถควบคุมการหมัก ลดเวลาการจัดการในแปลงและรักษาคุณภาพกาแฟให้สม่ำเสมอ

การตอบรับของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดเชียงรายนั้นแบ่งออกเป็นสองกลุ่มได้แก่ กลุ่มผู้ประกอบการขนาดใหญ่ได้แก่ บริษัทดอยช้างออริจินัล กลุ่มสหกรณ์ผู้ผลิตกาแฟดอยวาวีและปางขอน มีการทดสอบการใช้เชื้อจุลินทรีย์พร้อมใช้ในการทดสอบระดับ microlot และพบการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นรสอย่างมีนัยสำคัญโดยเฉพาะการสร้างความหลากหลายของกลิ่นผลไม้และการพัฒนารสเปรี้ยวของกาแฟหากแต่กำลังการผลิตเพื่อตอบสนองการผลิตขนาดใหญ่นั้นยังไม่สามารถตอบสนองความต้องการของเชื้อแห้งได้ด้วยศักยภาพการผลิตเชื้อแห้งปัจจุบัน ณ ห้องปฏิบัติการกรมวิชาการเกษตร ไม่มีอุปกรณ์ที่เหมาะสมและบุคลากรที่สามารถดำเนินการผลิตได้ต่อเนื่อง สำหรับในส่วนเกษตรกรรายย่อย ได้แก่ ไร่กาแฟสิริยา ไร่กาแฟพิชิต และไร่กาแฟเฮโรโมนนั้น จะประยุกต์ใช้หัวเชื้อหมักในการหมักขนาดเล็กเป็นหลักหรือไม่เกิด 100 กิโลกรัมต่อการหมักและมีการประยุกต์ใช้ควบคู่กับเทคนิคที่ไร่กาแฟได้พัฒนาร่วมอันได้แก่ การลดอากาศเพื่อบ่มกลิ่นรสให้เชอร์รี่กาแฟ การตากเชอร์รี่กาแฟ หรือการหมักกาแฟแบบกึ่งแห้ง โดยมีการนำหัวเชื้อจุลินทรีย์มาใช้ในการสร้างรสชาติเฉพาะที่ยังขาดจากการแปรรูปแบบดั่งเดิมในแปลง และการลดการใช้น้ำให้เกิดการใช้น้ำซ้ำจาก การหมัก ทำให้ไร่กาแฟขนาดเล็กนั้นสามารถบริหารทรัพยากรได้อย่างเหมาะสมและเพิ่มคุณภาพกาแฟก่อให้เกิดรายได้ และชื่อเสียงการการพัฒนากาแฟพิเศษของเกษตรกรในพื้นที่

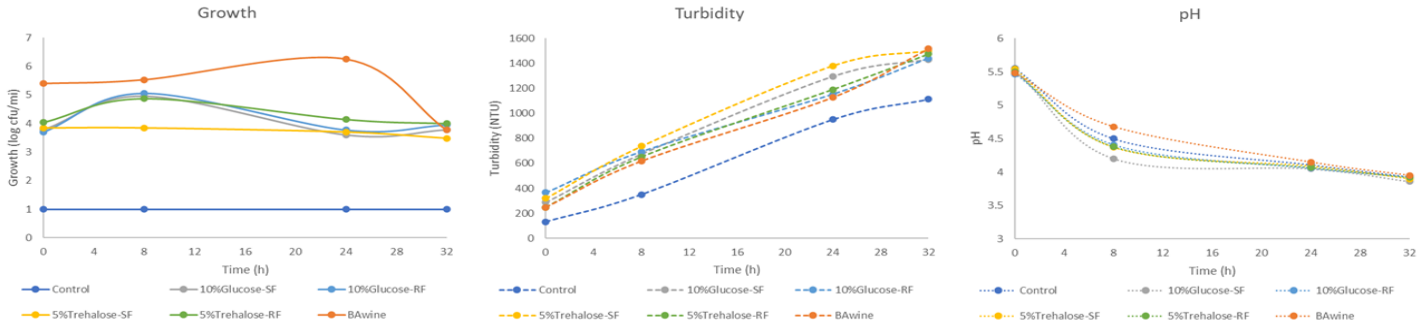
การตอบรับของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ จะเป็นเกษตรกรรายย่อยได้แก่ ไร่กาแฟเลซี่แมน ไร่กาแฟ First Valley และสหกรณ์ดอยสะเก็ดพัฒนา ซึ่งจะนำหัวเชื้อพร้อมใช้ไปใช้ร่วมกับเทคนิคการหมักเดิมของไร่กาแฟเพื่ออำนวยความสะดวกในการหมักให้เกิดความรวดเร็ว เกษตรกรจึงสามารถคาดการณ์เวลากระบวนการผลิตได้อย่างแม่นยำ และต้นทุนการหมักกาแฟที่ลดลงจากการใช้เวลาการหมักที่น้อยลง ทั้งนี้พื้นที่จังหวัดเชียงใหม่มีปัญหาการขาดแคลนน้ำ การใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้มีการใช้น้ำหมักซ้ำสามารถลดการใช้น้ำ เพิ่มคุณภาพกาแฟและก่อให้เกิดรายได้แก่เกษตรกรรายย่อยดังกล่าวจากการยอมรับของภาคสังคมและการท่องเที่ยวในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่

เชียงราย

A.) PRO-Y15

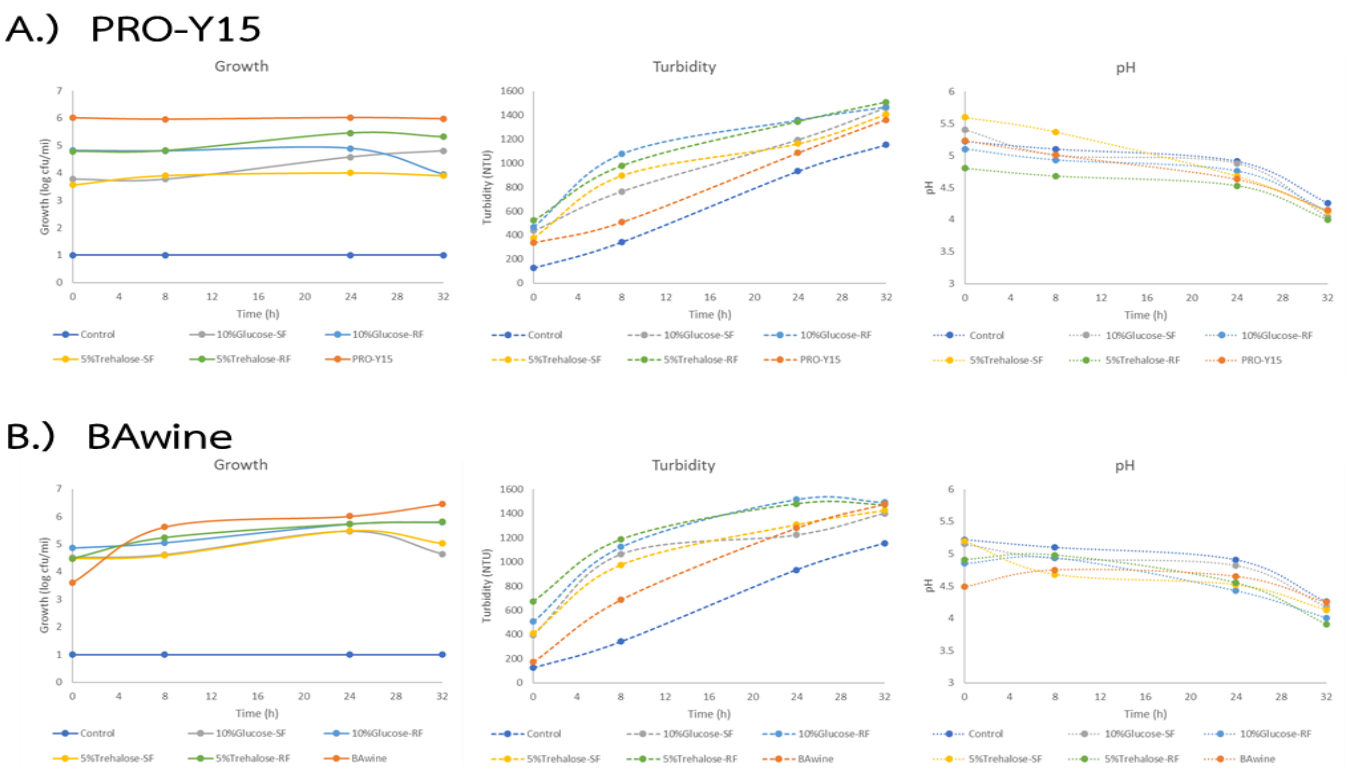


B.) BAwine



ภาพที่ 16 แผนภาพแสดงการเจริญของหัวเชื้อจุลินทรีย์ (log cfu/ml) , ความขุ่น (Turbidity) และ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ A.) ยีสต์สายพันธุ์ PRO-Y15 และ B.) ยีสต์สายพันธุ์ BAwine ระหว่างการหมักกาแฟ ในพื้นที่จังหวัดเชียงราย *(เส้นสีน้ำเงิน = ชุดควบคุม; เส้นสีเทา = หัวเชื้อแห้งสูตร 10% Glucose ผสมแป้งถั่วเหลือง; เส้นสีฟ้า = หัวเชื้อแห้งสูตร 10% Glucose ผสมแป้งข้าวเจ้า; เส้นสีเหลือง = หัวเชื้อแห้งสูตร 5% Trehalose ผสมแป้งถั่วเหลือง; เส้นสีเขียว = หัวเชื้อแห้งสูตร 5% Trehalose ผสมแป้งข้าวเจ้า; สีส้ม = หัวเชื้อสด)*

เชียงใหม่



ภาพที่ 17 แผนภาพแสดงการเจริญของหัวเชื้อจุลินทรีย์ (log cfu/ml) , ความขุ่น (Turbidity) และ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ A.) ยีสต์สายพันธุ์ PRO-Y15 และ B.) ยีสต์สายพันธุ์ BAwine ระหว่างการหมักกาแฟ ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ *(เส้นสีน้ำเงิน = ชุดควบคุม; เส้นสีเทา = หัวเชื้อแห้งสูตร 10% Glucose ผสมแป้งถั่วเหลือง; เส้นสีฟ้า = หัวเชื้อแห้งสูตร 10% Glucose ผสมแป้งข้าวเจ้า; เส้นสีเหลือง = หัวเชื้อแห้งสูตร 5% Trehalose ผสมแป้งถั่วเหลือง; เส้นสีเขียว = หัวเชื้อแห้งสูตร 5% Trehalose ผสมแป้งข้าวเจ้า; สีส้ม = หัวเชื้อสด)*

2.4 การพัฒนาแนวทางการส่งเสริมต่อยอดการขยายผลการผลิตเชื้อแห้ง Coffee Starter Culture

ผลการขยายผลการประยุกต์ใช้เชื้อแห้งในพื้นที่ทดสอบจังหวัดเชียงใหม่และเชียงรายนั้นสามารถสรุปปัญหาและแนวทางในการแก้ปัญหาของการใช้เชื้อแห้งใน 6 หัวข้อพร้อมแนวทางการแก้ปัญหาได้ตาม**ตารางที่ 12** ซึ่งพบว่าการควบคุมการผลิตเชื้อแห้งนั้นหากมีการขยายกำลังการผลิตไปสู่เกษตรกรสามารถขยายกำลังการผลิตได้โดยการต่อเชื้อจากบ่อหมักโดยตรงเพราะคำแนะนำการใช้อยู่ที่ เชื้อแห้ง 15 กรัมต่อกาแฟ 30 กิโลกรัม อย่างไรก็ตามกำลังในการผลิตเชื้อยังน้อยมากโดยสามารถผลิตได้เพียงไม่เกิน 1 กิโลกรัมต่อวันซึ่งไม่พอกับความต้องการของเกษตรกรซึ่งมีความจำเป็นต้องขยายกำลังการผลิต นอกจากนี้การทดสอบหมักในพื้นที่เกษตรกรในเชื้อที่บรรจุถุงละ 100 กรัมสามารถนำไปใช้หมักได้ปริมาณกาแฟไม่เกิน 1,000 กิโลกรัมและเกษตรกรมีการทดสอบการใช้น้ำหมักซ้ำซึ่งพบว่าเชื้อยังมีศักยภาพในการใช้งานซ้ำได้ไม่เกิน 3 รอบการผลิต อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการทดสอบเพิ่มเติมในการควบคุมการหมักซ้ำทั้งนี้เพื่อลดการใช้เชื้อแห้งเพิ่มและต้นทุนการผลิตในอนาคต สำหรับการขนส่งและการเก็บรักษาเชื้อแห้งนั้น ผู้วิจัยได้พัฒนาบรรจุภัณฑ์ที่สามารถรองรับการขนส่งได้ไม่น้อยกว่า 128 ชั่วโมงในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสหรือหากสามารถใช้ระบบควบคุมความเย็นร่วมจะสามารถเก็บรักษาได้ยาวนานกว่า 6 เดือนทำให้ผลิตภัณฑ์เชื้อแห้งเป็นการเพิ่มศักยภาพของเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การอบรมการผลิตเชื้อแห้งและการใช้เชื้อแห้งนั้นยังจำเป็นต้องใช้ทักษะทางจุลชีววิทยาร่วมทั้งนี้เพื่อการควบคุมการจำแนกและควบคุมชนิดของเชื้อให้คงที่ และไม่เกิดผลการเปลี่ยนแปลงทางสายพันธุ์ของเชื้อระหว่างการทำแห้งโดย กระบวนการทำเชื้อแห้งโดยวิธีที่ได้ดำเนินการในโครงการนี้สามารถลดต้นทุนการผลิตจากไม่น้อยกว่า 120,000 บาทต่อไร่(เดิม) เป็น 83,200 บาทต่อไร่ เวลาการผลิตจากไม่น้อยกว่า 120 วันเป็น 18 ชั่วโมง ทรัพยากรน้ำจากกระบวนการหมักเดิมไม่น้อยกว่า 200 ลิตรต่อกิโลกรัมเชอร์รี่กาแฟเป็น 20 ลิตรต่อกิโลกรัมเชอร์รี่กาแฟและแรงงานได้อย่างมากถือเป็นอัตราส่วน 1 : 200 จากทรัพยากรการผลิตเดิมอีกทั้ง วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและมีการปลดปล่อยมลพิษที่ลดลง โดยการประเมินภาพรวมเทคโนโลยีการผลิตและต้นทุนการใช้เชื้อแห้งตาม**ตารางที่ 13** นั้นต่อแปลงเกษตรกรแม้พบว่าต้นทุนลดจากเดิมเพียง 1,800 บาทแต่เมื่อเปรียบเทียบราคาขายต่อคุณภาพของกาแฟที่เพิ่มขึ้นนั้นจากเดิมน้อยกว่า 150 บาทต่อกิโลกรัม เป็นไม่น้อยกว่า 350 บาทต่อกิโลกรัม มีการเพิ่มขึ้นของกระบวนการผลิตกว่า 234%

ตารางที่ 12 สรุปปัญหาและแนวทางแก้ปัญหาที่พบในการทดสอบเชื้อแห้งในห้องปฏิบัติการและพื้นที่จริง

ประเด็น	ระดับห้องปฏิบัติการ	ระดับพื้นที่เกษตรกร	แนวทางแก้ปัญหา
การผลิตเชื้อแห้ง	✚สามารถควบคุมคุณภาพและไม่เกิดการปนเปื้อนของเชื้อ ✕สามารถผลิตได้ปริมาณน้อย ไม่เกิน 1 กิโลกรัมต่อวัน	✚ สามารถขยายกำลังการผลิตได้ระดับ 50 – 100 ลิตรโดยใช้หัวเชื้อละลายน้ำในบ่อหมัก ✕ควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อยากและอายุการใช้งานสั้น	จำเป็นต้องมีจุดผลิตและกระจายเชื้อแห้งในพื้นที่เป้าหมาย
การขนส่งเชื้อ	ไม่จำเป็นต้องผ่านการขนส่ง	ระบบขนส่งไม่ส่งผลต่อคุณภาพเชื้อแห้งโดยมีระยะเวลาไม่เกิน 72– 128 ชั่วโมง	เลือกระบบขนส่งที่มีระบบควบคุมความเย็น
การทดสอบหมัก	✚ สามารถควบคุมการหมักได้อย่างดี ✕สามารถใช้การหมักได้ในปริมาณน้อย 1 – 50 กิโลกรัมกาแฟต่อวัน	✚ สามารถควบคุมเชื้อในการหมักได้โดยใช้อัตรา 20 – 50 ppm ต่อรอบการหมักในปริมาณมาก 100 – 1,000 กิโลกรัมต่อวัน ✕ต้องมีการทดสอบคุณภาพเชื้อในกรณีใช้ซ้ำ	ส่งเสริมความรู้การใช้เชื้อแห้งให้มีการตรวจสอบประสิทธิภาพเชื้อและลดการใช้น้ำหมักซ้ำเกิน 3 ครั้ง
การเก็บรักษาเชื้อ	สามารถเก็บรักษาเชื้อง่ายโดยใช้ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส	เก็บรักษาได้ในช่องแช่แข็งของตู้เย็นที่มีระบบทำความเย็นต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส	ระบุการเก็บรักษาในข้อบ่งใช้ให้ชัดเจน
การต่อยอดและส่งเสริม	ต้องมีผู้ควบคุมการผลิตเป็นนักจุลชีววิทยาตรวจสอบ	ผู้ใช้จำเป็นต้องมีการควบคุมการใช้เชื้อแห้งและไม่ใช้เชื้อที่หมดอายุการใช้งาน	อบรมให้ความรู้ประชาสัมพันธ์ต่อเนื่อง
ทรัพยากรและต้นทุนการผลิต	เทคโนโลยีการผลิตมีข้อจำกัดในการขยายระดับการผลิตและเวลาการเก็บรักษา	สามารถลดต้นทุนการผลิต เวลาการผลิต ทรัพยากรน้ำ แรงงานได้ในอัตราส่วน 1 : 200	ต้องมีการพัฒนาเทคโนโลยีการยืดอายุและความหลากหลายของเชื้อเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 13 ภาพรวมเทคโนโลยีและต้นทุนการผลิต ตามวิธีของเกษตรกรเปรียบเทียบกับเทคโนโลยีของกรมวิชาการเกษตรที่ให้เกษตรกรต้นแบบดำเนินการ

การผลิตพืชตามเทคโนโลยีในแปลงต้นแบบ			**แปลงตามวิธีปฏิบัติของเกษตรกร**		
เทคโนโลยี*	ผลผลิต (ค่าเฉลี่ย)	ต้นทุน (บาท/ไร่)	เทคโนโลยี*	ผลผลิต (ค่าเฉลี่ย)	ต้นทุน (บาท/ไร่)
(1.) **แปลงการปลูกกาแฟพรีเมี่ยมต้นแบบ** : เป็นการพัฒนาแปลงขยายผลการผลิตกาแฟพรีเมี่ยมแบ่งออกเป็น 1.แปลงต้นแบบในศูนย์วิจัย 2.แปลงขยายผลในแปลงเกษตรกร (2.) **โรงงานต้นแบบการผลิตเทคโนโลยีกาแฟพรีเมี่ยม** : เป็นต้นแบบโรงงานการแปรรูปกาแฟพรีเมี่ยมในศูนย์วิจัย ที่ใช้เทคโนโลยีกรมวิชาการเกษตร ต่อไปนี้ 1.เทคโนโลยีการหมักกาแฟโดยใช้เชื้อแห้ง 2.เทคโนโลยีการลดสารพิษกลุ่ม PAHs และ OTA 3.เทคโนโลยีการเก็บรักษาสารกาแฟ 4.เทคโนโลยีการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้ 5.เกณฑ์การคัดเกรดเมล็ดกาแฟ 6.เทคโนโลยีการคั่วกาแฟ 7.เทคโนโลยีการประเมินคุณภาพกาแฟ	170 กก./ไร่	38,200 10,000 5,000 5,000 10,000 5,000 5,000 5,000	1. แปลงกาแฟ :ไม่มีการดูแล-ตัดแต่ง-จัดการแมลง 2.โรงงานต้นแบบ :ไม่มีการควบคุมกระบวนการแปรรูป, สารพิษ,แมลง รวมทั้งการประเมินคุณภาพกาแฟและการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้	107 กก./ไร่	35,000 55,000
รวม		**83,200**			**85,000**

นอกจากนี้ยังมีการต่อยอดการขยายผลการผลิตเชื้อแห้งตลอดระยะเวลาการดำเนินโครงการร่วมกับโครงการการผลิตกาแฟพรีเมี่ยมของกรมวิชาการเกษตรในพื้นที่ 10 จังหวัดได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน ตาก เพชรบูรณ์ พิษณุโลก ขอนแก่น ชุมพร สตูล สงขลา โดยมีการจัดทำค่ายอบรมการผลิตกาแฟพรีเมี่ยมและให้ความรู้การใช้เชื้อแห้งเพื่อการผลิตกาแฟพรีเมี่ยมพร้อมส่งต่อเทคโนโลยีการผลิตกาแฟพรีเมี่ยมแก่เกษตรกรจำนวน 100 ราย **(ภาพที่ 18-20)** โดยการดำเนินโครงการนี้จะสนับสนุนเกษตรกรต่อเนื่องให้ขยายต่อยอดในพื้นที่เป้าหมายและเพิ่มความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเพิ่มในอนาคตซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนากาแฟต่อไป

ศูนย์เรียนรู้โรงงานการแปรรูปกาแฟพรีเมี่ยมในศูนย์วิจัย แปลง-โรงงานต้นแบบการผลิตกาแฟพรีเมี่ยม

ภาพที่ 18 พื้นที่ทดสอบหัวเชื้อแห้งที่ผลิตโดยใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นสารเพิ่มปริมาณและเป็นที่ยึดเกาะของเซลล์จุลินทรีย์โดยใช้พื้นที่ศูนย์วิจัยและแปลงเกษตรกร

ภาพที่ 19 การถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตกาแฟพรีเมี่ยมและการใช้หัวเชื้อ CSC จำนวน 300 ราย ณ กรมวิชาการเกษตร และการขยายผลต่อยอดในการส่งเสริมการรับรองกาแฟเป็นสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์

ภาพที่ 20 การนำเสนอภาคนิทรรศการและการแสดงผลงานในงานประชุมวิชาการกรมวิชาการเกษตร, Research Expo สกสว และงานใต้ร่มพระบารมี ณ สวนสิริกิตต์

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการพัฒนาเทคโนโลยีการทำแห้งเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการหมักกาแฟ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* strain BAwine และ *Pichia kluyveri* strain PRO-Y15 คือ การเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Yeast Malt Broth (YM) ที่มีน้ำตาลกลูโคส 2% เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) ซึ่งสภาวะดังกล่าวจะสามารถผลิตเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตประมาณ 10^8 -10^9CFU/ml เพื่อนำไปใช้สำหรับการทำแห้งในตู้อบรมร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยส่วนประกอบที่เหมาะสมต่อการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์แห้ง ได้แก่ แป้งข้าวเจ้าอัตราส่วน 20g แป้งข้าวเจ้า : 10 ml ยีสต์ในสารป้องกันเซลล์ ที่ประกอบด้วย 10% Glucose และ 10% Skim milk บรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อแห้ง คือ ถุงลามิเนต OPP/VMPET/PE โดยสามารถเก็บรักษาเชื้อ BAwine ที่อุณหภูมิห้องได้เวลา 60 วัน และ PRO-Y15 เวลา 30 วัน ซึ่งหากเก็บในตู้เย็นต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียสจะเก็บได้นานขึ้นกว่า 180 วัน ทั้งนี้เพื่อง่ายแก่การนำไปใช้ประโยชน์คณะวิจัยได้พัฒนา บรรจุภัณฑ์หัวเชื้อแห้งแบบละลายน้ำได้รูปแบบพอลิไวนิลแอลกอฮอล์(PVA) ซึ่งสามารถละลายน้ำหมักกาแฟได้ทันทีโดยไม่ต้องตวงอัตราส่วน ทำให้เกษตรกรใช้ง่ายและไม่เกิดขยะในการผลิตกาแฟ ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบจริงในพื้นที่ผลิตกาแฟอะราบิกาจังหวัดเชียงใหม่และเชียงรายจำนวน 5 พื้นที่ทดสอบ พบว่าเชื้อแห้งนั้นจะมีการเจริญเติบโตร่วมกับเชื้อแบคทีเรียตามธรรมชาติในแปลงทดสอบใน 6 ชั่วโมงแรก จนมีความเป็นกรดด่าง (pH) อยู่ระหว่าง 4.0 – 3.5 และความขุ่นเพิ่มขึ้นที่ 800 – 1,000 NU โดยเชื้อแห้งที่ใช้ในการหมักนี้จะเติบโตแข่งขันกับเชื้อตามธรรมชาติจนได้เซลล์ 6.95 logCFU/ml ในชั่วโมงที่ 18 ที่เมือกจะหลุดลอกและถือเป็นการสิ้นสุดกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อแห้ง ซึ่ง

ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสที่ 7.5 โดยการทดสอบ hedonic score (/9) หรือค่าการทดสอบ 84 – 86 คะแนนจาก 100 คะแนนโดยวิธี SCAA พบว่าค่า Fragrance, Aroma/Flavor และ Aftertaste มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุมนอกจากนี้ Acidity, Body, Clean Cup และ Balance มีปริมาณเพิ่มขึ้นกว่า 30% นอกจากนี้ค่า Uniformity มีความเสถียรกว่ากาแฟที่ไม่ใช้เชื้อแห้งกว่า 5% และค่า Saltiness/ Acid เพิ่มขึ้นมากในกาแฟโรบัสตา (โกเมศ, 2566) เมื่อทำการต่อยอดการทดสอบในพื้นที่

ข้อเสนอแนะและการนำไปใช้ประโยชน์

1. การใช้เชื้อจุลินทรีย์แห้งเพื่อการหมักกาแฟนั้น แนะนำให้ใช้ในอัตรา 20 พีพีเอ็ม ต่อการหมักกาแฟสีแล้ว 100 กิโลกรัม ใช้น้ำในอัตรา 1 ลิตร : 1 กิโลกรัมกาแฟ โดยหัวเชื้อแบ่งออกเป็นสองชนิด ถือเป็นสองแนวทางการพัฒนาคุณภาพ โดยแนวทางแรกใช้หัวเชื้อ “BAwine” เพื่อพัฒนากลิ่นผลไม้โดยใช้การหมักแบบพื้นฐานหรือการเติมน้ำและหัวเชื้อ หรือการพัฒนา AAF techniques โดยกรมวิชาการเกษตร แนวทางที่สองใช้หัวเชื้อ “Pro-Y” เพื่อพัฒนากลิ่นชอคโกแลตที่มีความโดดเด่นในการหมักแบบอากาศน้อยหรือ Pro-Y techniques ซึ่งเกษตรกรที่ได้ร่วมพัฒนาการใช้หัวเชื้อพร้อมใช้นี้สามารถต่อยอดในการพัฒนาคุณภาพกาแฟได้จริงอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามการพัฒนาในพื้นที่จริงนั้นยังพบข้อสังเกตในการใช้เชื้อแห้งตั้งแต่ปริมาณการผลิตที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการ การทดสอบที่เกษตรกรต้องการใช้น้ำหมักซ้ำ การเก็บรักษาเชื้อที่ไม่ได้ใช้ ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อเนื่อง

2. เชื้อจุลินทรีย์แห้ง Coffee Starter Culture สามารถลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกรได้จริงกว่า 35% ตั้งแต่เวลาการผลิต ทรัพยากรน้ำ แรงงานรวมทั้งลดมลพิษและปัญหาสิ่งแวดล้อมจากการผลิตกาแฟ โดยต้นทุนการผลิตต่อไร่เพียง 5,000 บาทต่อไร่จึงมีการต่อยอดในแปลงทดสอบและได้รับผลการตอบรับจากเกษตรกรในการยอมรับเทคโนโลยีที่สามารถส่งต่อถึงคุณภาพการผลิตกาแฟที่ควบคุมได้จากการใช้เชื้อแห้ง อีกทั้งสามารถส่งต่อการผลิตสู่การรับรองสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ในพื้นที่ การผลิตเชื้อแห้งเพื่อการผลิตกาแฟคุณภาพจึงถือเป็นนวัตกรรมลดต้นทุนการผลิต เพื่อเพิ่มรายได้ให้เกษตรกรสู่กาแฟผลิตกาแฟคุณภาพอย่างยั่งยืนตามหลักเศรษฐกิจหมุนเวียน

3. เทคโนโลยีการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์แห้งได้ยื่นขอจดทะเบียนอนุสิทธิบัตร จำนวน 1 รายการ คือ คำขอรับอนุสิทธิบัตร ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์ “กรรมวิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์แห้งในบรรจุภัณฑ์เพื่อการขนส่ง” เลขที่คำขอ 2203003086

4. การขยายผลการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์แห้งในการหมักกาแฟ ควรถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตหัวเชื้อไปสู่กลุ่มพันธมิตร เช่น สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง โครงการหลวง สหกรณ์การเกษตร หรือภาคเอกชน เป็นต้น เพื่อให้การผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์แห้งให้ได้ตามเป้าหมายเพียงพอต่อการแจกจ่ายแก่เกษตรผู้ปลูกและแปรรูปกาแฟตลอดฤดูกาลผลิต

5. เทคโนโลยีการผลิตหัวเชื้อจุลินทรีย์แห้งที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการแปรรูปรูปพืชอุตสาหกรรมอื่น ๆ เช่น การหมักกาแฟโรบัสตาและโกโก้ เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้มีคุณภาพที่ดีและกลิ่นรสที่เป็นเอกลักษณ์ เป็นต้น

คำขอบคุณ

คณะผู้ดำเนินงานขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตร ในการสนับสนุนเงินรายได้จากการดำเนินงานวิจัยด้านการเกษตรเพื่อมาดำเนินงานในโครงการวิจัยเทคโนโลยีการผลิต Coffee Starter Culture (CSC) เพื่อการหมักกาแฟคุณภาพ สำหรับนำไปใช้ต่อยอดการวิจัยและพัฒนาการหมักกาแฟคุณภาพและการขยายผลโครงการผลิตกาแฟพรีเมียมจากเกษตรกรพื้นที่ 13 จังหวัด และขอขอบคุณเกษตรกรกาแฟพรีเมียม กรมวิชาการเกษตร 30 ราย บริษัทดอยช้างออริจินัล ไร่กาแฟ First Valley กรมส่งเสริมสหกรณ์ และวิสาหกิจชุมชนกาแฟที่ร่วมโครงการ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ ศูนย์วิจัยเกษตรที่สูงเชียงราย ในการให้ความอนุเคราะห์สถานที่ทำการทดลอง การทดสอบหัวเชื้อจุลินทรีย์แห้ง และการประเมินผลทางประสาทสัมผัสของกาแฟจากการหมัก ขอขอบคุณคณะกรรมการบริหารการดำเนินงานวิจัยด้านการเกษตร และนางปิยนุช นาคะนายประเสริฐ อนุพันธ์ และนางสุรภี กีรติยะอังกูร ที่ปรึกษาคณะทำงานติดตามและประเมินผลโครงการวิจัยด้านการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ที่ได้ให้คำปรึกษาแนะนำตลอดระยะเวลาการดำเนินโครงการวิจัย และสนับสนุนโครงการนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

โกเมศ สัตยาวุธ, 2555. ปริมาณความขมต่อปริมาณสารไพรีนในกาแฟคั่วบด, งานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2556a, กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร จำนวน 15 หน้า

โกเมศ สัตยาวุธ, วิมลวรรณ วัฒนวิจิตร, ปิยนุช นาคะ, มาโนช หาญเทวี, สรัญญา อุปรักขิตานนท์. 2556b การผลิตกาแฟที่มีสารกลุ่ม Polycyclic Aromatic Hydrocarbon ต่ำ; รายงานการประชุมวิชาการสำนักวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร โรงแรมชะอำบีสรีสอร์ท จังหวัดเพชรบุรี จำนวน 15 หน้า

โกเมศ สัตยาวุธ, สุกัญญา นิติยนต์, ฉัตรนภา ข่มอาวุธ, สุภัทรา เลิศวัฒนาเกียรติ. 2561a. การพัฒนากระบวนการหมักกาแฟอะราบิกาด้วยจุลินทรีย์, รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2561, กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร จำนวน 15 หน้า

โกเมศ สัตยาวุธ, สุกัญญา นิติยนต์, ฉัตรนภา ข่มอาวุธ, สุภัทรา เลิศวัฒนาเกียรติ. 2561b. การวิจัยและพัฒนาการหมักกาแฟอะราบิกาโดยจุลินทรีย์, รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2561, กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร จำนวน 15 หน้า

โกเมศ สัตยาวุธ, สุกัญญา นิติยนต์, ฉัตรนภา ข่มอาวุธ, สุภัทรา เลิศวัฒนาเกียรติ. 2566. การวิจัยและพัฒนาการหมักกาแฟโดยเทคนิค Semi-wet process, รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2566, กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร จำนวน 15 หน้า

สุกัญญา นิติยนต์, โกเมศ สัตยาวุธ, ฉัตรนภา ข่มอาวุธ, สุภัทรา เลิศวัฒนาเกียรติ. 2562. การศึกษาการหมักกาแฟด้วยจุลินทรีย์ในระบบแอนแอโรบิก (ไม่ใช้ออกซิเจน), รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2562, กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร จำนวน 15 หน้า

Abral, H., Arief, A., Melbi, M., Fadli, H., Kadriadi, Dian, H., S.M. Sapuan and R.A. Ilyas. 2020. Effect of ultrasonication duration of polyvinyl alcohol (PVA) gel on characterizations of PVA film. Journal of Materials Research and Technology 9(2): 2477–2486.

Anukiruthika, T., Priyanka, S., Anila, W., Kiran, K., Jeyan, A. M. and Chinnaswamy, A. 2020. Multilayer packaging: Advances in preparation techniques and emerging food applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety: 1-30.

Avallone, S., Brillouet, J.M., Guyot, B., Olguin, E. & Guiraud, J.P. 2001. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. Current Microbiology, 42, 252-256.

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

Byungrok, M. and Dong, U. A. 2015. Packaging and Storage, pp. 273-280. *In* Fidel, T., Hui, Y. H.., Iciar, A., Joseph, G. S. and Règine, T. Handbook of Fermented Meat and Poultry. John Wiley & Sons, UK.

Catherine, N. C. 2002. Microbial Control by Packaging: A Review: Critical Reviews in Food Science and Nutrition 42(2): 151-161.

Chutrtong J. 2015. Survival of Probiotic Bacteria in Freeze - Dry Yogurt Starter Cultures Storage at 4 and 30 Degree Celsius, Procedia - Social and Behavioral Sciences, 191:2219-2225

Dominic, C.A.S., Östlund, S., Buffington, J. and Masoud, M. M. 2015. Towards a Conceptual Sustainable Packaging Development Model: A Corrugated Box Case Study. Packaging Technology and Science 28: 397–413.

Fadiji, T., Tarl, M. B., Corne, J. C. and Umezuruike, L. O. 2018. Mechanical design and performance testing of corrugated paperboard packaging for the postharvest handling of horticultural produce. Biosystems engineering 171: 220-244.

Gordon, L. R. 2010. Food Packaging and Shelf Life, pp. 1-16. *In* Gordon, L. R. Food Packaging and Shelf Life: A Practical Guide. CRC Press, USA.

Gustav, M. 2021. *On* the relation between paperboard properties and packaging performance**.** Degree of Licentiate of Engineering. KTH Royal Institute of Technology.

Lee S.B, Choi W.S, Jo H.J, Yeo S.H, Park H.D. 2016. Optimization of air-blast drying process for manufacturing *Saccharomyces cerevisiae* and non-Saccharomyces yeast as industrial wine starters. AMB Express. 6(1):105.

Liping, D., Xiaoyong, Z. and Y. Wang. 2020. Study on the Behavior of BOPP Film Treated by Corona Discharge. Coatings 10 (1195): 1-11.

Maneesri J., Masniyom P., Wongsdaluk W. 2011. Production of *Acetobacter aceti* Starter Powder by Low-Temperature Thermal Drying. The 23rd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology "Systems Biotechnology: Quality & Success". 190-192.

Mantzourani I., Terpou A., Alexopoulos A., Bezirtzoglou E., Plessas S. 2019. Assessment of Ready-to-Use Freeze-dried Immobilized Biocatalysts as Innovative Starter Cultures in Sourdough Bread Making. Foods. 8. 40.

Masoud W, Jespersen L. 2006. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. Int J Food Microbiol. 110(3):291-296.

Nikolay, F. E. 2014. Innovations in manufacturing of Flexible packaging. Journal of International Scientific Publications: Materials, Methods, and Technologies 8: 100-107.

Patindol, J., Wang, Y. and Jay-lin, J. 2005. Structure-Functionality Changes in Starch Following Rough Rice Storage. Starch/Stärke 57: 197–207.

Rujikan, N. and Satayawut, K. 2014. Microbial communities during wet fermentation process of *Coffea arabica* var. *chiangmai 80.* Kasetsart University Journal.

Satayawut, K. and Nitiyon, S. 2019. AAF techniques: Novel approach of new coffee flavor profile. Specialty Coffee Expo: Re:Co symposium. Boston, USA 110(O1).

Sandhya, G., Manasvi, D., Kananbala, S. and N.S. Saxena. 2009. Mechanical study of metallized polyethylene terephthalate (PET) films. Surface & Coatings Technology 204: 661–666.

Silva, CF., Vilela, DM., Cordeiro, CLDS., Duarte, WF., Dias, DR., & Schwan, RF. 2013. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. World J Microbiol Biotechnol, 29, 235–247.

Thomas, I. B. and B. A. Morris. 2016. PE-Based Multilayer Film Structures, pp. 281-310. *In John R. and Wagner, Jr.* Multilayer Flexible Packaging. 2nd ed. William Andrew Apply Science Publish., USA.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast extract malt extract (YM) agar

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์	3	กรัม
มอลท์เอ็กซ์แทร็กซ์	3	กรัม
เปปโทน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Yeast extract malt extract (YM) broth

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์	3	กรัม
มอลท์เอ็กซ์แทร็กซ์	3	กรัม
เปปโทน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Yeast extract peptone dextrose (YPD) broth

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์	10	กรัม
เปปโทน	20	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวกที่ 2 คำแนะนำวิธีการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์แห้ง

กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

กรมวิชาการเกษตร