การพัฒนาคุณภาพการหมักโกโก้โดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* และ *Lachancea thermotolerans*

สุกัญญา นิติยนต์[1*], กัลยา พูลทรัพย์[1] และโกเมศ สัตยาวุธ[1]

[1]กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร
*sukanyaniti@gmail.com

บทคัดย่อ

การหมักโกโก้เป็นขั้นตอนหลังการเก็บเกี่ยวที่สำคัญและส่งผลต่อคุณภาพเมล็ดโกโก้และช็อกโกแลต เนื่องจากเมล็ดโกโก้ที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักหรือการหมักที่เกิดขึ้นแบบไม่สมบูรณ์จะให้กลิ่นรสไม่ดี งานวิจัยนี้ได้ศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีการหมักโกโก้โดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม ได้ทำการคัดแยกและจัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ ที่มีบทบาทในการสร้างกลิ่น ย่อยสลายเพคตินและสร้างกรดแลคติกจากตัวอย่างเมล็ดโกโก้ที่อยู่ในระหว่างการหมักตามธรรมชาติ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* (DOA-Y58), *Pichia kluyveri* (DOA-Y55) และ *Lachancea thermotolerans* (DOA-Y81) ตามลำดับ จากการทดสอบหมักโกโก้โดยใช้อัตราส่วนของกล้าเชื้อผสม DOA-Y58:DOA-Y55:DOA-Y82 เท่ากับ 1:1:1 พบว่าเมล็ดโกโก้หมักได้สมบูรณ์ ประมาณ 84% ภายใน 144 ชั่วโมง และสามารถควบคุมปริมาณแบคทีเรียที่เกิดตามธรรมชาติและอาจก่อให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์ในระบบการหมักได้ เมื่อทำการทดสอบสารประกอบที่ระเหยได้จากเมล็ดโกโก้แห้งและจากเมล็ดโกโก้คั่วโดยใช้เทคนิค Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) ร่วมกับ Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) พบว่าเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการหมักด้วยหัวเชื้อจุลินทรีย์ให้กลิ่นในกลุ่มผลไม้และดอกไม้ เช่น linalool, phenylethyl alcohol และ phenethyl acetate ในขณะที่การหมักแบบธรรมชาติให้กลิ่นมีความเปรี้ยวมากกว่า แสดงให้เห็นว่าการใช้กล้าเชื้อผสมยีสต์ 3 สายพันธุ์ มีบทบาทในการสร้างกลิ่นรสและสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้เพื่อพัฒนาคุณภาพการหมักโกโก้ได้

คำสำคัญ: โกโก้ การหมัก ยีสต์ หัวเชื้อจุลินทรีย์

Improvement of cocoa fermentation quality using mixed starter cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri*, and *Lachancea thermotolerans*

Sukanya Nitiyon[1*], Kanlaya Poolsub[1] and Komate Satayawut[1]

[1]Postharvest and Processing Research and Development Division, Department of Agriculture
*sukanyaniti@gmail.com

Abstract

Cocoa fermentation is an important post-harvest process that significantly affects the quality of cocoa beans and chocolate. Cocoa beans that have not undergone proper fermentation or incomplete fermentation result in undesirable flavors and aromas. This research studied and developed cocoa fermentation technology using a mixed-yeast starter culture. Three strains of aromatic, pectinolytic, and lactic acid-producing yeasts were isolated from spontaneous cocoa fermentation. They were identified as *Saccharomyces cerevisiae* (DOA-Y58), *Pichia kluyveri* (DOA-Y55), and *Lachancea thermotolerans* (DOA-Y81), respectively. In the cocoa fermentation trial, using a mixed culture starter ratio of DOA-Y58: DOA-Y55: DOA-Y82 at 1:1:1 (% by weight), it was found that cocoa beans were fully fermented, reaching approximately 84% within 144 hours. Additionally, it was possible to control the amount of natural bacteria that might cause undesirable flavors during fermentation. Analysis of volatile compounds of dried and roasted cocoa beans using headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) combined with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) revealed that cocoa beans fermented with microbial starter cultures released fruity and floral aromas such as linalool, phenylethyl alcohol, and phenethyl acetate. Meanwhile, spontaneously fermented cocoa had a more acidic aroma. This demonstrates that using a mixed yeast starter culture of three strains plays a role in producing flavors and can be applied to improve cocoa fermentation quality.

Keywords: Cocoa, Fermentation, Yeast, Starter Culture

1. บทนำ

โกโก้เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของโลก เมล็ดโกโก้ถูกใช้เป็นวัตถุดิบหลักในอุตสาหกรรมช็อกโกแลต อาหาร เครื่องดื่ม และเครื่องสำอาง มีการรายงานเกี่ยวกับคุณค่าทางโภชนาการและการส่งเสริมสุขภาพของโกโก้อย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้ความต้องการบริโภคโกโก้และช็อกโกแลตในตลาดโลกสูงขึ้น ซึ่งพื้นที่ของประเทศไทยมีหลายพื้นที่ที่มีความเหมาะสมในการปลูกโกโก้ ขั้นตอนการแปรรูปโกโก้มีความซับซ้อนเช่นเดียวกับการแปรรูปกาแฟ การหมักโกโก้เป็นขั้นตอนสำคัญที่ส่งผลต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้ โดยหลังการเก็บเกี่ยวผลโกโก้จากต้นแล้วต้องทำการกะเทาะเปลือกและนำเมล็ดโกโก้หมักในลังไม้ ถุงพลาสติก หรือตะกร้าพลาสติกที่มีการรองด้วยใบไม้ ใบตอง ใช้ระยะเวลาประมาณ 5-7 วัน เพื่อกำจัดเมือกที่ติดเมล็ดและเพิ่มกลิ่นรสของโกโก้โดยอาศัยจุลินทรีย์จากธรรมชาติ หลังจากนั้นจึงทำความสะอาดและนำไปตากแห้ง ก่อนที่จะขายเมล็ดโกโก้สู่ตลาด ในระหว่างการหมักนี้จะมีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในระบบหมักสูงถึง 50 องศาเซลเซียส และจุลินทรีย์จะสร้างสารหลัก ได้แก่ เอ

ทานอล กรดอะซิติก และกรดแลคติก เพื่อยับยั้งการเจริญของเมล็ดโกโก้และสร้างสารตั้งต้นของกลิ่นรส การหมักที่นานเกินไปจะส่งผลให้จุลินทรีย์อื่น ๆ เช่น แบคทีเรียกลุ่มบาซิลัส และเชื้อรามีการเจริญ ซึ่งจะสร้างสารที่ทำให้กลิ่นรสเสีย จากการทดสอบเมล็ดโกโก้ที่หมักตามวิธีดั้งเดิม พบว่าเมล็ดโกโก้มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่มีพิษ เช่น *Aspergillus* หลายชนิด ที่ขึ้นได้ดีในประเทศร้อนชื้น เช่น *Aspergillus flavus, A. ochraceus, A. alliaceus, A. ostianus, A. sclerotiorum* ที่ผลิตสารพิษ ochratoxin และ aflatoxin ซึ่งเป็นมีพิษต่อไตและตับทั้งในคนและสัตว์ และยังก่อมะเร็งในอวัยวะอื่น ๆ เช่น ไต ระบบหายใจ ระบบทางเดินอาหาร ระบบประสาท ระบบสืบพันธุ์ และระบบภูมิคุ้มกัน

การพัฒนาเทคโนโลยีการหมักโกโก้นั้นได้มีการศึกษาการใช้หัวเชื้อผสมของจุลินทรีย์ทรีย์ 3 กลุ่ม เลียนแบบการหมักตามธรรมชาติ คือ แบคทีเรียแลคติก แบคทีเรียอะซิติก และยีสต์ และพบว่าการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักส่งผลให้คุณภาพของโกโก้ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตามกลไกการเกิดกลิ่นรสของโกโก้นั้นยังคงต้องมีการศึกษาต่อไป อีกปัจจัยที่สำคัญคือการลดปริมาณเพคตินหรือเมือกที่เกาะรอบเมล็ดของโกโก้นั้น โดยใช้จุลินทีย์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายเพคตินจะช่วยลดเวลาในการหมักโกโก้ และของเหลวที่ได้จากการย่อยเพคตินนี้สามารถนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อื่นเพื่อเพิ่มมูลค่าได้อีกด้วย [1] นอกจากนี้ Batista et al. [2] ได้ทำการศึกษาการใช้หัวเชื้อยีสต์ 3 ชนิด คือ *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA11, *Pichia kluyveri* CCMA0237 และ *Hanseniaspora uvarum* CCMA0236 ในการหมักโกโก้ ที่ส่งผลต่อการเกิดกลิ่นรสและการตรวจสอบการเจริญของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมัก จากผลการศึกษาได้รายงานว่ามีจุลินทรีย์ธรรมชาติอยู่ในระบบการหมักได้แก่ *S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *H. guilliermondii*, *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus* sp. และ *Acetobacter pasteurianus* โดย *S. cerevisiae*, *P. kluyveri*, *Candida sp.*, *Pediococcus* sp และ *A. pasteurianus* เป็นจุลินทรีย์ที่มีการเจริญและมีปริมาณมากในระบบมาก เมื่อทำการทดสอบสารที่ระเหยได้ (volatile compound) จากเมล็ดโกโก้ที่ทำการหมักและจากช็อกโกแลต โดยเครื่อง gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) พบสารมากกว่า 67 ชนิด โดยสารหลักที่พบหลังจากการหมักโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์และการหมักตามธรรมชาติ คือ สารกลุ่มเอสเทอร์ โดยคิดเป็น 41 และ 39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทำการแปรรูปเป็นช็อกโกแลต สารหลักที่พบเป็นจำพวกกรด (73 และ 44 เปอร์เซ็นต์จากการหมักโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์และการหมักตามธรรมชาติ ตามลำดับ) สารที่ให้ความขมพบได้ทั้งในเมล็ดโกโก้และในช็อกโกแลต แต่เมื่อทำการแปรรูปเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการหมักโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์เป็นช็อกโกแลตพบว่ามีกลิ่นในกลุ่มผลไม้ (fruity) ในขณะที่การหมักแบบธรรมชาติมีความฝาด (astringent) มากกว่า Orapin Bhumibhamon et al. [3] ได้ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ได้แก่ ยีสต์และแบคทีเรียจากการหมักโกโก้และศึกษาการปรับปรุงการหมักโกโก้ในห้องปฏิบัติการ พบว่าจุลินทรีย์ที่หมักโกโก้ได้ดีกว่าการหมักแบบธรรมชาติ ได้แก่ *S. cerevisiae* (KU-Y77), *S. chevalieri* (KU-Y150) และ *A. aceti* (KU-A72) โดยเมื่อใช้อัตราส่วนของกล้าเชื้อ KU-Y77:KU-Y150:KU-A72 เท่ากับ 1.5:1.0:1.0 (% โดยน้ำหนัก) ในการหมักเมล็ดโกโก้ 20 กิโลกรัม มีเมล็ดโกโก้ที่หมักสมบูรณ์ ประมาณ 81.7%-83.5% และเมื่อทำการหมักโกโก้ 40 กิโลกรัม โดยใช้จุลินทรีย์ตามอัตราส่วนดังกล่าว พบว่าหมักโกโก้ได้สมบูรณ์ 79-84% ในระยะเวลา 4 วัน และยังได้รายงานว่าการใช้กล้าเชื้อผสมเหมาะกับเกษตรกรที่หมักโกโก้ในปริมาณน้อย

นอกจากยีสต์ที่มีบทบาทในการสร้างเอทานอลในการหมักโกโก้แล้ว แบคทีเรียกรดอะซิติกและแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์อีกกลุ่มมีบทบาทสำคัญต่อคุณภาพการหมักเมล็ดโกโก้ โดยทำหน้าที่ในการผลิตกรดเพื่อยับยั้งการงอกของเมล็ดและทำให้เมล็ดโกโก้ตาย แต่การผลิตหัวเชื้อผสมระหว่างยีสต์และแบคทีเรียใช้อาหารและสภาวะในการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน ทำให้เกิดข้อจำกัดในการผลิต ดังนั้นการเลือกใช้ยีสต์ที่มีคุณสมบัติในสร้างกรดแลคติกทดแทนการใช้แบคทีเรียจึงเป็นอีกทางเลือกในการผลิตหัวเชื้อสำหรับการหมักโกโก้ โดย *Lachancea thermotolerans* เป็นยีสต์ที่สามารถพบได้ทั่วไปในอาหารหมักและในปัจจุบันมีการนำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการสร้างเอกลักษณ์ให้กับผลิตภัณฑ์ไวน์และเบียร์ [4,5] แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการทดสอบการใช้ในการหมักโกโก้ งานวิจัยนี้จึงได้นำยีสต์ *L. thermotolerans* มาทำการทดสอบการเป็นหัวเชื้อสำหรับหมักโกโก้ร่วมกับยีสต์ *S. cerevisiae* และ *P. kluyveri* เพื่อศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีการหมักโกโก้โดยใช้

หัวเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจะเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความเฉพาะเหมาะสมกับสภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการแปรรูปและสายพันธุ์ที่เพาะปลูกในประเทศไทย และสร้างอัตลักษณ์ให้กับโกโก้ของประเทศไทยเพื่อให้แข่งขันกับผลิตภัณฑ์โกโก้จากต่างประเทศได้

2. วิธีการศึกษา

2.1 ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในการหมักโกโก้และการจัดจำแนกสายพันธุ์

2.1.1 การคัดแยกยีสต์

แยกยีสต์จากตัวอย่างเมล็ดโกโก้ที่อยู่ในระหว่างการหมักจากแปลงเกษตรกร โดยชั่งตัวอย่างประมาณ 10 กรัม ใส่ฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างที่บ่มไว้มาสตรีก (streak) ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Yeast extract malt extract (YM) agar (ประกอบด้วย 1% D-Glucose, 0.5% Peptone, 0.3% Yeast extract, 0.3% Malt extract และ 1.5% Agar) ที่เติมสารปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอล 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เลือกเก็บเฉพาะโคโลนีที่เป็นยีสต์ และมีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ จากนั้นจึงเก็บลงอาหารเหลว YM broth ที่มีสารละลายกลีเซอรอล 10% เก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –80 °C

2.1.2 การจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์

ทำการส่งตัวอย่างเซลล์ยีสต์ไปยังบริษัท Macrogen (Seoul, Korea) เพื่อสกัดดีเอ็นเอและจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ โดยใช้ NL1 (5-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3) เป็น forward primer และ NL4 (5-GGTCCGTGTTTCAAG ACGG-3) เป็น reverse primer เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของจุลินทรีย์ที่แยกได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank (National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN) โดยมีเกณฑ์ว่าถ้ายีสต์ 2 สายพันธุ์มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ซึ่งมีประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ (คือมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 6 นิวคลีโอไทด์) สายพันธุ์ทั้งสองนั้นจัดจำแนกได้เป็นคนละสปีชีส์ และถ้าหากมีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 0-3 นิวคลีโอไทด์ อาจจัดจำแนกเป็นสปีชีส์เดียวกันหรือสปีชส์ที่ใกล้ชิดกันมาก [6]

2.2 ศึกษาการหมักโกโก้โดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม

เตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการหมักโกโก้โดยเพาะเลี้ยงยีสต์บนอาหารแข็ง YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อจากอาหารแข็งลงในอาหารเหลว YM broth ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายสารละลาย 0.85% (w/v) โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร 1 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับทดสอบการหมักโกโก้

ทดสอบการหมักโกโก้โดยแยกเมล็ดโกโก้จากผลโกโก้ที่แก่เต็มที่ โดยแยกไส้ เมล็ดที่ลีบเสีย และมีราออก บรรจุเมล็ดโกโก้ลงภาชนะหมักจำนวน 20 กิโลกรัม ทำการหมักโดยเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ *S. cerevisiae* (DOA-Y58), *P. kluyveri* (DOA-Y55) และ *L. thermotolerans* (DOA-Y81) อัตราส่วนของกล้าเชื้อผสม DOA-Y58:DOA-Y55:DOA-Y82 เท่ากับ 1:1:1 โดยในการหมักเมล็ดโกโก้ 20 กิโลกรัม ใช้ตะกอนเซลล์ยีสต์ DOA-Y58, DOA-Y55 และ DOA-Y82 ชนิดละ 1 กรัม ผสมรวมกันในน้ำปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปคลุกกับเมล็ดโกโก้ให้เข้ากัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมหรือการหมักตามธรรมชาติ (ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ) ปิดลังหมักด้วยใบตองและคลุมทับด้วยพลาสติก ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อเริ่มทำการหมัก กลับกองเมล็ดโกโก้และสุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดโกโก้ในระหว่างการหมัก ทุก 48 ชั่วโมง นาน 144 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ยีสต์และแบคทีเรียที่มีชีวิต โดยเก็บตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ใน สารละลาย 0.85% (w/v) โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและทำ

การเจือจางเป็นลำดับ จนได้ระดับความเจือจางในระดับ 10^{-6} ปิเปตตัวอย่างจากแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารแข็ง YM agar และ NA Agar เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยใช้เทคนิค Spread Plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของยีสต์และแบคทีเรียบนอาหาร หลังจากหมักเสร็จแล้วนำเมล็ดโกโก้ไปตากแดดโดยเกลี่ยเมล็ดโกโก้บนตะแกรงตากให้มีความหนาของกองไม่เกิน 3 เซนติเมตร เกลี่ยเมล็ดโกโก้ทุกวัน ในช่วงเวลากลางคืนปิดคลุมด้วยผ้าพลาติกเพื่อกันน้ำค้าง ตากจนเมล็ดโกโก้มีความชื้นเหลือไม่เกิน 7% ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ของเมล็ดโกโก้ที่หมักสมบูรณ์ โดยการผ่าเมล็ดและสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีภายในเมล็ดจากสีม่วงเป็นสีน้ำตาล

2.3 การตรวจสอบคุณภาพทางเคมีโดยใช้ GC-MS

นำเมล็ดโกโก้ที่แห้งแล้ว 500 กรัม มาคั่วโดยใช้อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส เวลาประมาณ 20 นาที เมื่อคั่วเสร็จแล้วจะได้เมล็ดโกโก้คั่วที่มีสีน้ำตาลดำ แกะเปลือกหุ้มเมล็ด เก็บตัวอย่างเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการคั่วใส่ถุงพลาสติกสุญญากาศ วิเคราะห์สารให้กลิ่นรสในโกโก้นิป โดยใช้วิธี solid-phase microextraction (SPME) โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดโกโก้คั่ว 50 กรัม บดละเอียดโดยใช้เครื่องบดกาแฟ ชั่งตัวอย่างเมล็ดโกโก้คั่วบดละเอียด 3 กรัมใส่ขวด headspace vial ใช้ไฟเบอร์ที่เคลือบด้วย 50/30 µm Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/ PDMS) (Superco) สกัดตัวอย่างที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนวิเคราะห์ด้วยเครื่อง PerkinElmer Clarus SQ 8 GC-MS และ Elite 1 capillary column (30m x 0.25 mm x 0.25 mm) ใช้แก๊สฮีเลียมที่อัตราการไหล 1 mL/min เป็น carrier gas ใช้อุณหภูมิ injector 250 องศาเซลเซียส 3 นาที ปรับอุณหภูมิของคอลัมน์ดังนี้ อุณหภูมิเริ่มต้น 40 องศาเซลเซียส จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 120 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 3 องศาเซลเซียสต่อนาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 230 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 15 องศาเซลเซียสต่อนาที MS สแกนช่วง m/z 45-500 Da ที่ 70 eV ionization ที่อุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบ MS spectrum กับฐานข้อมูล NIST library

3. ผลการศึกษาและการวิจารณ์

3.1 ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในการหมักโกโก้และการจัดจำแนกสายพันธุ์

การพัฒนาเทคโนโลยีการหมักเมล็ดโกโก้ให้มีคุณภาพดีเนื่องจากการแปรรูปโกโก้เป็นขั้นตอนหลังการเก็บเกี่ยวที่มีความซับซ้อนเช่นเดียวกับการแปรรูปกาแฟ เมล็ดโกโก้ที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักหรือการหมักที่เกิดขึ้นแบบไม่สมบูรณ์จะให้กลิ่นรสไม่ดี ซึ่งในขั้นตอนของการหมักโกโก้ตามธรรมชาตินั้นเกิดโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์จากธรรมชาติ ได้แก่ แบคทีเรียแลคติก แบคทีเรียอะซิติกและยีสต์ โดยในระหว่างการหมักนี้จุลินทรีย์จะทำหน้าที่หลักในการสร้างสารเคมีเพื่อยับยั้งการเจริญของเมล็ดโกโก้และยังสร้างสารตั้งต้นของกลิ่นรสในโกโก้ด้วย อย่างไรก็ตามการหมักที่นานเกินไปจะส่งผลให้จุลินทรีย์อื่น ๆ เช่น แบคทีเรียกลุ่มบาซิลัส และเชื้อรามีการเจริญ ซึ่งจะสร้างสารที่ทำให้กลิ่นรสเสีย ดังนั้นการศึกษาหัวเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการหมักโกโก้จะสามารถลดระยะเวลาในการหมัก ควบคุมและพัฒนาคุณภาพโกโก้ได้ จากการเก็บตัวอย่างเมล็ดโกโก้ที่อยู่ในระหว่างการหมักจากแปลงเกษตรกร จำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งผลการคัดแยกและจัดจำแนกจุลินทรีย์บางส่วนจากตัวอย่างเมล็ดโกโก้หมัก พบยีสต์จำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. cerevisiae*, *Candida dubliniensis*, *P. kluyveri*, *C. orthopsilosis*, *P. kudriavzevii*, *C. ethanolica*, และ *L. thermotolerans* ดังนั้นจึงได้คัดเลือกยีสต์ที่มีการรายงานว่ามีบทบาทย่อยสลายเพคติดและมีบทบาทในการสร้างกลิ่นในการหมักและมีการรายงานการใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการหมักโกโก้ จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. cerevisiae*, *P. kluyveri* [7-8] และจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการสร้างกรดแลคติก ได้แก่ *L. thermotolerans* [6-7] มาทำการทดสอบการเป็นหัวเชื้อสำหรับหมักโกโก้เพื่อทดแทนการใช้แบคทีเรียกรดอะซิติกเพื่อลดความเปรี้ยวของเมล็ดโกโก้ในระหว่างการหมัก

3.2 ผลการศึกษาการหมักโกโก้โดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม

จากการทดสอบการหมักโกโก้พบว่าในการหมักที่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์เปรียบเทียบกับการหมักโดยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ การทดสอบการหมักโกโก้โดยใช้อัตราส่วนของกล้าเชื้อผสม DOA-Y58:DOA-Y55:DOA-Y82 เท่ากับ 1:1:1 โดยในการหมักเมล็ดโกโก้ 20 กิโลกรัม ใช้เซลล์ยีสต์ชนิดละ 1 กรัม พบว่าปริมาณเซลล์ยีสต์เริ่มต้นในระบบหมักที่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์เท่ากับ 7.42 log cfu/g และการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ตามธรรมชาติมีจำนวนยีสต์เริ่มต้น 5.46 log cfu/g เมื่อเวลาในการหมักมากขึ้นจำนวนของยีสต์ในการหมักทั้งสองกรรมวิธีมีเพิ่มขึ้น เมื่อทำการหมักนาน 96 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์ยีสต์ในระบบหมักที่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมมีจำนวนเพิ่มขึ้นเท่ากับ 9.04 log cfu/g อุณหภูมิในระบบหมักเพิ่มขึ้นจาก 32 องศาเซลเซียส เป็น 42 องศาเซลเซียส และการหมักโดยจุลินทรีย์ธรรมชาติมีปริมาณเซลล์ยีสต์ 8.69 log cfu/g อุณหภูมิในระบบหมักสูงสุดเท่ากับ 41.2 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 1a,c)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียในระบบหมัก พบว่าเริ่มต้นการหมักโกโก้มีจำนวนแบคทีเรียในการหมักทั้งสองแบบประมาณ 5 log cfu/g เมื่อทำการหมักนาน 48 และ 96 ชั่วโมง ปริมาณแบคทีเรียการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ทรีย์ตามธรรมชาติมีปริมาณสูงขึ้นถึง 6.80 log cfu ทั้งนี้เนื่องมาจากจำนวนยีสต์ในระบบมีปริมาณใกล้เคียงกับแบคทีเรียเริ่มต้นไม่สามารถควบคุมการเจริญของแบคทีเรียได้ อุณหภูมิในระบบหมักเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย นอกจากนั้นยีสต์ยังย่อยสลายเพคตินเปลี่ยนน้ำตาลและแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นอาหารที่เหมาะสำหรับแบคทีเรีย จึงทำให้มีปริมาณของแบคทีเรียเจริญในระบบหมักได้รวดเร็วมากขึ้น แต่การหมักที่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมยีสต์มีปริมาณและการเจริญรวดเร็วมากพอที่สามารถควบคุมปริมาณแบคทีเรียที่เกิดตามธรรมชาติได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 และจำนวนแบคทีเรียลดลงเมื่อเวลาในการหมักมากขึ้น โดยเมื่อทำการหมักนาน 96 ชั่วโมง จำนวนแบคทีเรียลดลงเหลือ 2.02 log cfu/g ในขณะที่การหมักโดยใช้จุลินทรีย์ธรรมชาติมีปริมาณแบคทีเรีย 6.61 log cfu/g (ภาพที่ 1b)

หลังจากทำการหมักครบ 144 ชั่วโมง นำเมล็ดโกโก้ไปตากจนมีความชื้นเหลือ 7% และสุ่มเมล็ด 300 เมล็ดผ่าเพื่อตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ของเมล็ดโกโก้ที่หมักสมบูรณ์ พบว่าการหมักที่เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมมีเมล็ดโกโก้หมักได้สมบูรณ์ 84% สูงกว่าการหมักโดยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ ที่มีเมล็ดหมักสมบูรณ์ 74% และไม่พบเมล็ดที่ไม่หมักและเมล็ดสีเทาที่มีความบกพร่อง (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่าการหมักโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมสามารถเร่งระยะเวลาในการหมักโกโก้ได้ อย่างไรก็ตามการหมักโดยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติเมื่อหมักนานเกิน 144 ชั่วโมง ทำให้กลิ่นเปรี้ยวคล้ายน้ำส้มสายชูเพิ่มมากขึ้นและทำให้เมล็ดโกโก้มีรสเปรี้ยวมากเกินไป ทำให้ในกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์ต้องมีการใช้ด่างมาช่วยในการลดความเปรี้ยวของเมล็ด

3.3 ผลการตรวจสอบคุณภาพทางเคมีโดยใช้ GC-MS

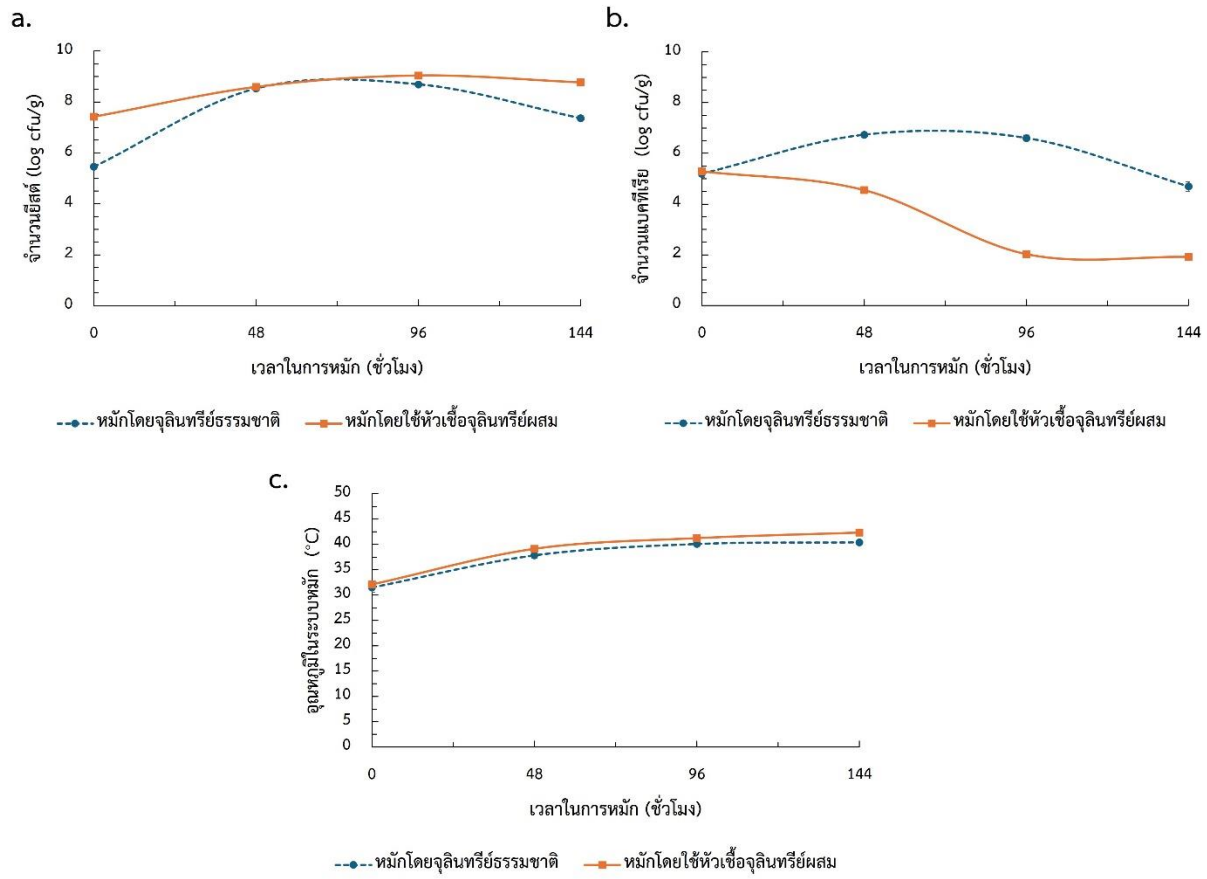
จากการตรวจสอบสารประกอบระเหยได้ของเมล็ดโกโก้คั่วบด โดยใช้เทคนิค Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) ร่วมกับ Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) พบว่าเมล็ดโกโก้คั่วที่ผ่านการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ธรรมชาติและการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมให้สารประกอบระเหยที่ให้กลิ่น จำนวน 27 ชนิด (ภาพที่ 2, ตารางที่ 2) จัดอยู่ในกลุ่ม acids 2 ชนิด กลุ่ม alcohols และ phenols 7 ชนิด กลุ่ม aldehydes และ ketones 8 ชนิด กลุ่ม esters 6 ชนิด กลุ่ม pyrazines 3 ชนิด และกลุ่ม terpenoinds 2 ชนิด เมื่อจัดจำแนกตามกลุ่มของกลิ่นที่ได้จากสารประกอบสามารถแบ่งกลุ่มได้ 8 กลุ่ม ได้แก่ ช็อกโกแลต (chocolate) ถั่ว (nutty) ผลไม้ (fruity) ดอกไม้ (flora) ฝาด (bitter) เปรี้ยว (sours) หมัก (fermented) และฉุน (pungent) (ภาพที่ 3, ตารางที่ 2)

เมื่อทำการวิเคราะห์สารประกอบระเหย พบว่าเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการหมักด้วยหัวเชื้อจุลินทรีย์แสดงพื้นที่ใต้พีคของสารที่ให้กลิ่นในกลุ่มผลไม้และดอกไม้ ได้แก่ linalool, phenylethyl alcohol, phenethyl acetate และ isoamyl acetate มากกว่าการหมักโดยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคของสารที่ให้กลิ่นในกลุ่มช็อกโกแลตและถั่ว พบว่าการหมักทั้งสองวิธีให้พื้นที่ใต้พีคของสารกลุ่มดังกล่าวปริมาณใกล้เคียงกัน โดยการหมักโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมมีสารที่ให้กลิ่นช็อกโกแลต ได้แก่ 3-methylbutanal, 2-methylbutanal, 5-methyl-2-phenyl-2-hexenal และ 2-phenyl-2-

butenal มากกว่าเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามการหมักโกโก้โดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมไม่พบพีคของ acetic acid ในขณะที่การหมักโดยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติพบพีคของ acetic acid ซึ่งผลการวิเคราะห์ดังกล่าวสอดคล้องกับจำนวนแบคทีเรียที่ลดลงในระหว่างการหมัก แสดงให้เห็นว่าการหมักโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก ทำให้เมล็ดโกโก้มีความเปรี้ยวลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าสารกลุ่ม Isoamyl acetate และ 2-Heptanone ให้กลิ่นผลไม้ในโทนของกล้วย อาจเนื่องมาจากการใช้ใบตองปิดกองโกโก้ดังนั้น หากต้องการลดกลิ่นในกลุ่มนี้อาจเปลี่ยนชนิดของวัสดุที่ใช้ในการปิดกองโกโก้ในระหว่างการหมัก

4. สรุปผลการทดลอง

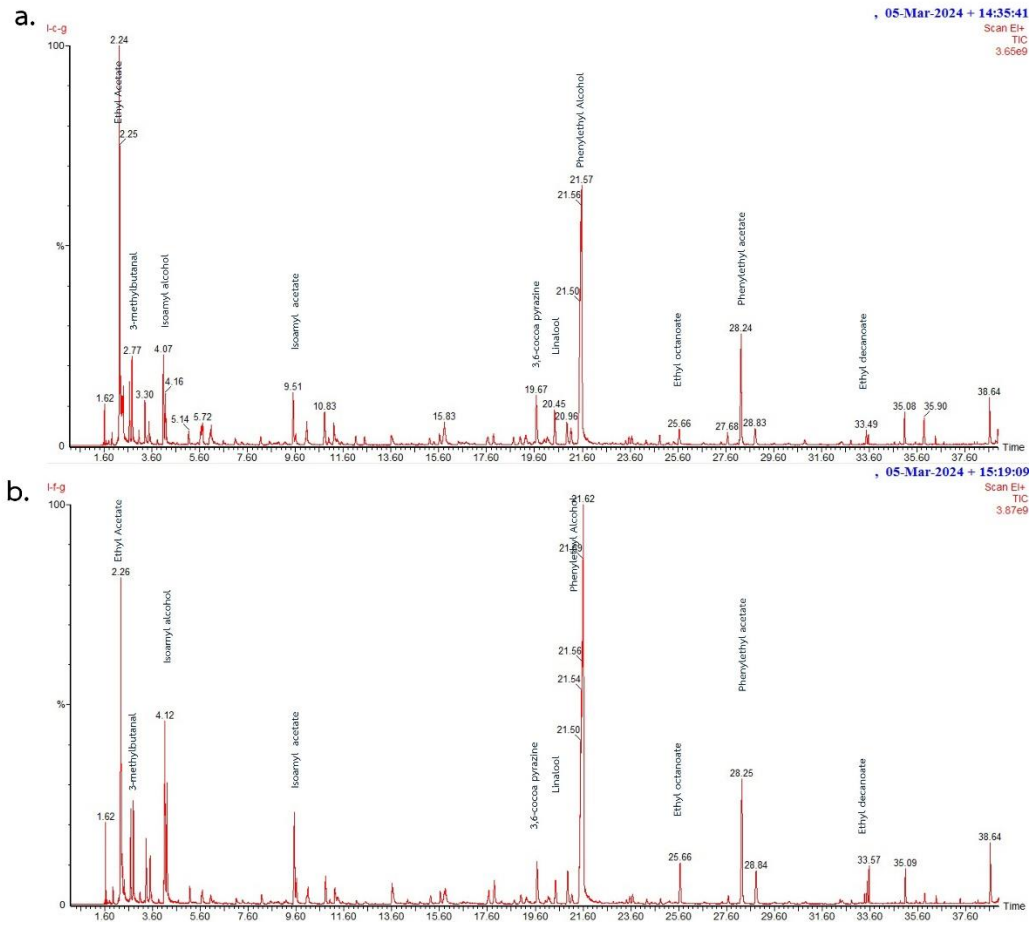
การหมักโกโก้โดยหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม *Saccharomyces cerevisiae* (DOA-Y58), *Pichia kluyveri* (DOA-Y55) *Lachancea thermotolerans* (DOA-Y81) ในอัตราส่วนของกล้าเชื้อผสมเท่ากับ 1:1:1 โดยในการหมักเมล็ดโกโก้ 20 กิโลกรัม ใช้เซลล์ยีสต์ชนิดละ 1 กรัม สามารถหมักเมล็ดโกโก้ให้มีเมล็ดที่หมักสมบูรณ์ 84% ภายใน 144 ชั่วโมง และสามารถควบคุมปริมาณแบคทีเรียตามธรรมชาติที่อาจก่อให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์ในระบบการหมักได้ จากผลการวิเคราะห์โปรไฟล์ของกลิ่นโดยใช้ GC-MS พบว่ากลิ่นของเมล็ดโกโก้คั่วที่หมักโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมมีกลิ่นที่ซับซ้อนมากกว่าการหมักโดยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ โดยมีสารประกอบหลักที่ให้กลิ่นดอกไม้และผลไม้ ได้แก่ linalool, phenylethyl alcohol, phenethyl acetate และ isoamyl acetate และสารที่ให้กลิ่นช็อกโกแลต ได้แก่ 3-methylbutanal, 2-methylbutanal, 5-methyl-2-phenyl-2-hexenal และ 2-phenyl-2-butenal แสดงให้เห็นว่าการใช้กล้าเชื้อผสมยีสต์ 3 สายพันธุ์ มีบทบาทในการสร้างกลิ่นรสในการหมักโกโก้และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้เพื่อพัฒนาคุณภาพการหมักโกโก้ให้มีความแตกต่างจากการหมักโดยวิธีดั้งเดิมได้ โดยการปรับอัตราส่วนของหัวเชื้อผสมและระยะเวลาในการหมักเพื่อให้ได้กลิ่นรสของโกโก้ที่มีเอกลักษณ์



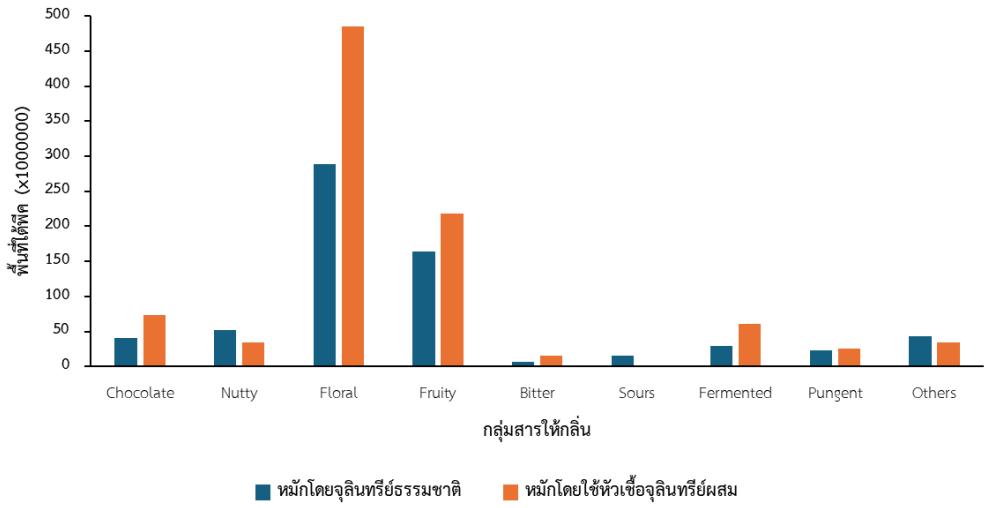
ภาพที่ 1 การเปลี่ยนแปลงจำนวนยีสต์ (a) แบคทีเรีย (b) และอุณหภูมิ (c) ในการหมักโกโก้โดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมและการหมักโดยจุลินทรีย์ธรรมชาติ

ตารางที่ 1 ผลการผ่าเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากการหมักโกโก้โดยจุลินทรีย์ธรรมชาติและการหมักโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม

การหมักเมล็ดโกโก้	**เมล็ดหมักสมบูรณ์** (Well Fermented)	**เมล็ดหมักสมบูรณ์บางส่วน** (Partly purple and partly brown)	**เมล็ดที่ไม่หมัก** (Unfermented)	**เมล็ดสีเทา** (Slate beans)
หมักโดยจุลินทรีย์ธรรมชาติ	74%	20%	4%	2%
หมักโดยหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม	84%	16%	0%	0%



ภาพที่ 2 โครมาโตแกรมแสดงโปรไฟล์ของสารประกอบระเหยที่ได้จากการหมักโกโก้โดยจุลินทรีย์ธรรมชาติ (a) และการหมักโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม (b)



ภาพที่ 3 แผนภาพแสดงกลุ่มของสารให้กลิ่นของเมล็ดโกโก้คั่วที่ได้จากจากการหมักโกโก้โดยจุลินทรีย์ธรรมชาติและการหมักโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม

ตารางที่ 2 สารประกอบระเหยที่พบในเมล็ดโกโก้คั่ว

เวลา (Retention time)	ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีค GC-MS		สารประกอบ (Compounds)	คำอธิบายกลิ่น (Odor description)	อ้างอิง
	หมักโดยจุลินทรีย์ธรรมชาติ	หมักโดยหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม			
Acids					
2.31	ND	9697984	Hexanoic acid	Pungent, Sweat	[9]
2.35	15331154	ND	Acetic acid	Sours, Vinegar	[9]
Alcohols and Phenols					
3.32	12627772	16117574	2-Pentanol	Pungent	[9]
4.08	29127676	61145116	Isoamyl alcohol	Fermented, Balsamic	[9]
4.19	ND	29711994	2-Methyl-1-butanol	Fruity, Grape	[9]
5.72	9054170	ND	2,3-Butanediol	Fruity, Creamy, Buttery	[9]
21.13	8626294	ND	2-Nonanol	Fruity, Citrus orange	[10]
21.6	220614880	378062784	Phenylethyl Alcohol	Floral, Rose	[10]
Aldehydes and Ketones					
2.67	ND	18993110	3-Methylbutanal	Chocolate, Malty	[9]
2.76	21533262	23391328	2-Methylbutanal	Chocolate, Cocoa	[9]
10.11	ND	8330350	2-Heptanone	Fruity, Banana	[10]
13.62	7215146	15711300	Benzaldehyde	Bitter	[9-10]
17.89	ND	12510002	2-Phenylacetaldehyde	Floral, Honey	[9]
20.45	7867435	7023458	2-Nonanone	Fruity, Cheesy	[10]
28.83	10133014	21427158	2-Phenyl-2-butenal	Chocolate, Sweet	[9]
35.08	9320180	9385010	5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal	Chocolate, Cocoa	[9]
Esters					
2.24	109697368	92972240	Ethyl Acetate	Fruity, Pineapple	[9]
9.55	21486140	49671566	Isoamyl acetate	Fruity, Banana	[10]
25.66	7017325	20753342	Ethyl octanoate	Fruity, Floral	[10]
28.24	57021144	69581200	Phenylethyl acetate	Floral, Honey	[9]
33.56	ND	10244212	Ethyl decanoate	Fruity, Pear, Grape	[9]
35.9	10729360	ND	Ethyl palmitate	Pungent, Waxy	[9]
Pyrazines					
11.21	11510507	8497617	2,5-Dimethylpyrazine	Cocoa, Rusted nuts	[9]
15.83	17529080	ND	2-Ethyl-5-methylpyrazine	Nutty, Raw potato	[9]
19.67	23134860	25414724	3,6-Cocoa pyrazine	Nutty	[11]
Terpenoinds					
17.66	ND	8629536	á-Ocimene	Floral, Herb	[10]
20.96	11322659	16709464	Linalool	Floral, Green	[9-10]
Others					
38.64	14085327	19759126	Caffeine		

*ND = Not Detected

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยและพัฒนาพืชสวนอุตสาหกรรมเพื่อเพิ่มผลิตภาพทางการเกษตรและลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมด้วยเทคโนโลยีสมัยใหม่ โครงการวิจัยย่อยนวัตกรรมการแปรรูปกาแฟและโกโก้คุณภาพและการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้สู่ระบบการพัฒนาเกษตรหมุนเวียน คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ผู้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย และขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตรผู้สนับสนุนบุคคลากรและเครื่องมือวิทยาศาสตร์สำหรับการดำเนินงานวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Schwan, F. R., & Alan, E. W. (2004). The Microbiology of Cocoa Fermentation and its Role in Chocolate Quality, *Critical reviews in food science and nutrition*, 44, 205-21.

[2] Batista, N. N., Ramos, C. L., Dias, D. R., Pinheiro, A. C., & Schwan, R. F. (2016). The impact of yeast starter cultures on the microbial communities and volatile compounds in cocoa fermentation and the resulting sensory attributes of chocolate, *Journal of Food Science and Technology,* 53(2), 1101–1110.

[3] Orapin Bhumibhamon, Jantana Jinda, Bonhai Laepet & Piyanut Naka. (2540). Cocoa Fermentation III: Improvement of cocoa fermentation by inoculated with selected mixed culture in laboratory and farm trial, *Kasetsart Journal (Sci.)*, 31,327-341. (In Thai)

[4] Vicente, J., Kelanne, N., Navascués, E., Calderón, F., Santos, A., Marquina, D., Yang, B., & Benito, S. (2023). Combined Use of *Schizosaccharomyces pombe* and a *Lachancea thermotolerans* Strain with a High Malic Acid Consumption Ability for Wine Production, *Fermentation*, 9(2), 165.

[5] Postigo, V., Esteban, S., & Arroyo, T. (2023). *Lachancea thermotolerans*, an Innovative Alternative for Sour Beer Production, *Beverages*, 9(1), 20.

[6] Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences, *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(4), 331–371.

[7] Grondin, E., Shum Cheong, S. A., Caro, Y., Raherimandimby, M., Randrianierenana, A. L., James, S., Nueno-Palop, C., François, J. M., & Petit T. A. (2015). Comparative study on the potential of epiphytic yeasts isolated from tropical fruits to produce flavoring compounds, *International Journal of Food Microbiology*, 203,101-8.

[8] Díaz-Muñoz, C., & De Vuyst, L. (2022). Functional yeast starter cultures for cocoa fermentation, *Journal of Applied Microbiology*, 133(1), 39-66.

[9] Aprotosoaie, A. C., Luca, S. V., & Miron A. (2016) Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products-An Overview, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 73-91.

[10] Bastos, V. S., Uekane, T. M., Bello, N. A., de Rezende, C. M., Flosi Paschoalin, V. M., & Del Aguila, E. M. (2019). Dynamics of volatile compounds in TSH 565 cocoa clone fermentation and their role on chocolate flavor in Southeast Brazil, *Journal of Food Science and Technology*, 56(6), 2874-2887.

[11] The good scents company. (2024, May 15). 3,6-Cocoa pyrazine. https://www.thegoodscents company.com/data/rw 1426491.html