บทบาทของเชื้อจุลินทรีย์ที่เติมในระหว่างการหมัก ต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้ง

Roles of Inoculated Microorganisms during Fermentation on Quality of Dried-Cocoa Beans

นิยม กำลังดี

Niyom Kamlangdee

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2537

หมู่ TP620 .N54 2537 ฉ.2
Bib Key 64435

ชื่อวิทยานิพนธ์ บทบาทของเชื้อจุลินทรีย์ที่เติมในระหว่างการหมักต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้ง

ผู้เขียน นายนิยม กำลังดี

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล)

.....กรรมการ
(ดร.สุกัญญา จันทะชุม)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(ดร.ไพรัตน์ สงวนไทร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ บทบาทของเชื้อจุลินทรีย์ที่เติมในระหว่างการหมักต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้ง

ผู้เขียน นายนิยม กำลังดี

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2537

บ ท คั ด ย่ อ

ยีสต์ แบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแอซีติก เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการหมักเมล็ดโกโก้ การทดลองในห้องปฏิบัติการโดยใช้ยีสต์ 3 ชนิด คือ *Saccharomyces cerevisiae Candida sorbosa* และ *C. sake* เป็นจุลินทรีย์เริ่มต้นในการหมักเมล็ดโกโก้ 500 กรัม ในขวดแก้ว ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่า *S. cerevisiae* มีคุณสมบัติเหมาะสมในการหมักเมล็ดโกโก้มากที่สุด สามารถเจริญในกองหมักได้เร็ว โดยมีจุลินทรีย์สูงสุดหลังจากหมักได้หนึ่งวันเป็น $3.26X10^9$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ และให้อุณหภูมิของกองหมักเป็น 45.6 องศาเซลเซียส เมล็ดโกโก้ที่ได้มีค่าดรรชนีการหมักเป็น 1.16 มีกรดทั้งหมด กรดแลคติก และกรดที่ระเหยได้ ร้อยละ 0.48, 0.07 และ 0.12 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาล (10PR3/1,2) สูงสุดร้อยละ 78 ในการหมักเมล็ดโกโก้โดยใช้แบคทีเรียแลคติก 3 ชนิด คือ *Lactobacillus casei Leuconostoc mesenteroides* และ *Streptococcus thermophilus* เป็นจุลินทรีย์เริ่มต้นในการหมัก พบว่า *L. casei* มีคุณสมบัติเหมาะสมในการหมักมากที่สุด มีจุลินทรีย์เจริญได้ช้ากว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกอื่น ๆ โดยมีจุลินทรีย์สูงสุดในหนึ่งวันหลังการ หมักเป็น $1.74X10^7$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ เมล็ดโกโก้ที่ได้มีค่าดรรชนีการหมักเป็น 0.98 มีกรดทั้งหมด กรดแลคติก และกรดที่ระเหยได้เป็นร้อยละ 0.48, 0.08 และ 0.19 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ชุดการทดลองที่เติม *L. casei* ให้เมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลสูงสุดร้อยละ 60 การหมักเมล็ดโกโก้โดยใช้จุลินทรีย์เริ่มต้นเป็นแบคทีเรียแอซีติก 3 ชนิด ได้แก่ *Acetobacter rancen A. lovaniense* และ *Gluconobacter oxydan* พบว่า *A. rancen* มีความเหมาะสมในการหมักมากที่สุด เจริญในกองหมักได้ดีกว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติกชนิดอื่น ๆ มีจุลินทรีย์สูงสุดในวันที่ 3 ของการหมักเป็น $7.00X10^7$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ เมล็ดโกโก้จากการหมักมีค่าดรรชนีการหมักเป็น 0.99 มีกรดทั้งหมด กรดแลคติก

และกรดที่ระเหยได้เป็นร้อยละ 0.52, 0.02 และ 0.18 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* ให้เมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลสูงสุด เป็นร้อยละ 61

การใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมของ *S. cerevisiae* *L. casei* และ *A. rancen* เติมในการหมักเมล็ดโกโก้ ในขวดแก้วที่บรรจุเมล็ดโกโก้ 500 กรัม พบว่าการใช้เชื้อผสมของ *S. cerevisiae* และ *A. rancen* เติมลงในการหมักเมล็ดโกโก้พร้อมกันในขณะเริ่มต้นการหมัก หรือเติม *S. cerevisiae* ในตอนเริ่มต้นแล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีความเหมาะสมในการหมักเมล็ดโกโก้มากที่สุด โดยทั้งสองชุดการทดลองให้เมล็ดโกโก้ที่มีค่าดรรชนีการหมักเป็น 1.13 และ 1.40 มีน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้เป็นร้อยละ 1.15 และ 1.10 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ มีกรดทั้งหมด และกรดที่ระเหยได้ต่ำ มีกรดแลคติกใกล้เคียงกับชุดการทดลองควบคุม ชุดการทดลองทั้งสองให้เมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลเป็นร้อยละ 82 และ 83 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองอื่น การใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมทั้งสองลักษณะดังกล่าวเติมในการหมักเมล็ดโกโก้ 50 กก. ในกล่องหมักที่หมักตามวิธีการหมักแบบพัฒนา พบว่าชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ให้เมล็ดโกโก้ที่มีคุณภาพดีกว่าชุดการทดลองควบคุมซึ่งหมักโดยจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนจากธรรมชาติ คือเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองทั้งสองมีค่าดรรชนีการหมักเป็น 1.18 มีกรดทั้งหมด กรดที่ระเหยได้ และกรดแลคติกต่ำกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมจุลินทรีย์ และให้เมล็ดโกโก้แห้งที่มีสีน้ำตาลสูงเป็นร้อยละ 91 และ 90 ตามลำดับ

Thesis Title	Roles of Inoculated Microorganisms during Fermentation on Quality of Dried-Cocoa Beans
Author	Mr.Niyom Kamlangdee
Major Program	Biotechnology
Academic Year	1994

Abstract

Yeast, acetic acid bacteria and lactic acid bacteria play important roles in cocoa fermentation. When cocoa beans were fermented in the laboratory (500 g. in glass bottle) for 7 days at 37 °C with yeast, *Saccharomyces cerevisiae, Candida sorbosa* or *Candida sake* as starter culture (5% v/w) it was observed that *S. cerevisiae* was the best starter culture for cocoa fermentation. The culture provided maximal growth of $3.26X10^9$ CFU/g.wet wt. after one day of fermentation. During fermentation the temperature of the cocoa mass was higher than the masses inoculated with other yeasts. *S. cerevisiae* provided cocoa beans with total acid, lactic acid and volatile acid of 0.46, 0.07 and 0.12 %w/w, respectively. After fermentation the fermented beans had fermentation index of 1.16 and 78% of dry beans fermented with *S. cerevisiae* showed cut test with chocolate color (10PR3/1,2). When lactic acid bacteria, *Lactobacillus casei, Leuconostoc mesenteroides* or *Streptococcus thermophilus* were used as inoculum *L. casei* was the best starter culture for cocoa fermentation. It showed maximal growth of $1.74X10^7$ CFU/g.wet wt. after one day of fermentation. The beans fermented with *L. casei* contained 0.48, 0.08 and 0.19 %w/w of total acid, lactic acid and volatile acid, respectively. The fermented beans had fermentation index of 0.98 and 60% of dry beans provided cut test with chocolate color. When *Acetobacter rancen, A. lovaniense* or *Gluconobacter oxydan* was used as starter culture *A. rancen* was the best starter culture for cocoa fermentation. The maximal growth was $7.00X10^7$ CFU/g.wet wt. on the third day of fermentation. The beans fermented with *A. rancen* contained 0.52, 0.02 and 0.18 %w/w of

total acid, lactic acid and volatile acid, respectively. The fermented beans had fermentation index of 0.99 and 61% of dry beans provided cut test with chocolate color.

When cocoa beans were fermented in a glass bottle with mixed cultures of *S. cerevisiae*, *L. casei* and *A. rancen* the combinations of *S. cerevisiae* and *A. rancen* either inoculated together at the begining or inoculated *S. cerevisiae* at the begining followed with *A. rancen* after 24 hours provided cocoa beans with higher fermentation index and lower concentration of lactic acid, volatile acid and total acid compared with beans fermented with other inoculums and control. The cut test of the dry beans fermented with *S. cerevisiae* and *A. rancen* in both combinations showed 82% and 83% of chocolate color. Box fermentation of 50 kg. cocoa beans with mixed starter cultures also showed the same results. Cocoa beans fermented with mixed starter cultures of *S. cerevisiae* and *A. rancen* in both combinations had higher fermentation index and lower concentrations of total acid, lactic acid and volatile acid when compared with natural fermented beans. After fermentation the dry beans fermented with *S. cerevisiae* and *A. rancen* in both conditions provided the cut test with 91% and 90% of chocolate color, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล ประธานคณะกรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำในการค้นคว้าวิจัยและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ดร.สุกัญญา จันทะซุม กรรมการผู้แทนจากโครงการจัดตั้งคณะอุตสาหกรรมเกษตร และผู้ช่วยศาสตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (STDB) ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับปริญญาโท และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ขอขอบคุณ บริษัทไทยโทปี อินเตอร์เนชั่นเนล สาขาสุราษฎร์ธานี ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในการดูงานเป็นเวลา 1 เดือน

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณตา ด้วยความเคารพยิ่ง ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจตลอดมา ขอขอบพระคุณ ครู-อาจารย์ทุกท่าน ที่ได้กรุณาอบรมสั่งสอนมาจนถึงทุกวันนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในโครงการจัดตั้งคณะอุตสาหกรรมเกษตรที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจ ขอขอบคุณ คุณมาริสา จาตุพรพิพัฒน์ และทุกท่านที่มิได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

นิยม กำลังดี

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อ.....(3)

Abstract.....(5)

กิตติกรรมประกาศ.....(7)

สารบาญ.....(8)

รายการตาราง.....(10)

รายการรูป.....(15)

ตัวย่อและสัญลักษณ์.....(23)

บทที่

1 บทนำ.....1

บทนำต้นเรื่อง.....1

ตรวจเอกสาร.....4

1 พันธุ์โกโก้.....5

2 กระบวนการหมักเมล็ดโกโก้.....6

3 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเมล็ดโกโก้.....9

4 การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้.....14

5 การใช้เชื้อเริ่มต้นในการหมักเมล็ดโกโก้.....23

6 เอนไซม์ในเมล็ดโกโก้.....26

7 องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้และการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในระหว่างการหมัก.....28

8 การทำแห้งและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีระหว่างการทำแห้ง.....40

วัตถุประสงค์.....44

2 วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ.....45

วัสดุ.....45

อุปกรณ์.....46

วิธีการ....47
1. การเตรียมวัตถุดิบ : เมล็ดโกโก้....47
2. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์....48
3. การศึกษาสภาวะการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ....48
4. การหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ชนิดเดี่ยว....49
5. บทบาทของเชื้อจุลินทรีย์ผสมต่อการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ....50
6. บทบาทของเชื้อจุลินทรีย์ผสมต่อการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก....51
7. ชุดการหมักควบคุม....52
8. การวิเคราะห์....53
3 ผลและวิจารณ์....54
การศึกษาสภาวะการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ....52
บทบาทของยีสต์ในการหมักเมล็ดโกโก้....71
บทบาทของแบคทีเรียแลคติกในการหมักเมล็ดโกโก้....85
บทบาทของแบคทีเรียแอซีติกในการหมักเมล็ดโกโก้....101
บทบาทของเชื้อจุลินทรีย์ผสมต่อการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ....117
บทบาทของเชื้อจุลินทรีย์ผสมต่อการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก....140
4 สรุป....163
สรุป....163
ข้อเสนอแนะ....168
เอกสารอ้างอิง....169
ภาคผนวก....184
ก. ข้อมูลปฐมภูมิประกอบการวิจัย....184
ข. วิธีการวิเคราะห์เมล็ดโกโก้และเนื้อเยื่อ....190
ค. อาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์และการตรวจนับจุลินทรีย์ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้....203
ง. ตารางข้อมูลปฐมภูมิของการวิจัย....208
ประวัติผู้เขียน....224

รายการตาราง

ตาราง หน้า

1. ชนิดของยีสต์ที่แยกได้จากการหมักเมล็ดโกโก้.....17
2. แบคทีเรียแลคติกที่พบในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในเข่งเป็นเวลา 7 วัน.....22
3. แบคทีเรียแอซีติกที่พบในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในเข่งเป็นเวลา 7 วัน.....22
4. องค์ประกอบต่าง ๆ ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้สด.....29
5. องค์ประกอบของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในเมล็ดโกโก้ที่ไม่ผ่านการอบแห้ง.....31
6. ชนิดและปริมาณของสารโพลีแซคคาไรด์ในเมล็ดโกโก้ที่ไม่ผ่านการหมัก.....32
7. องค์ประกอบของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ในส่วนสกัดโปรตีนจากเมล็ดโกโก้สด.....35
8. ปริมาณกรดที่ระเหยได้และกรดที่ไม่ระเหยในตัวอย่างเมล็ดโกโก้แห้งจาก แหล่งต่าง ๆ.....38
9. การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ที่ไม่ระเหยในเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการหมัก และเมล็ดโกโก้ที่ไม่ผ่านการหมัก.....39
10. ชนิดของกรดที่ให้กลิ่นหอมที่พบในเมล็ดโกโก้.....39
11. ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาการหมักกับค่า cut test ของเมล็ดโกโก้ การเปลี่ยนแปลงกลิ่นรสช็อกโกแลต และการเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีขององค์ประกอบต่าง ๆ.....42
12. การเปลี่ยนแปลงค่า cut test ของเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์ที่คัดเลือก ที่สภาวะต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน.....68
13. องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักด้วยยีสต์ที่คัดเลือกทั้ง 3 ชนิดที่สภาวะต่าง ๆ 69
14. องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้แห้งจากการหมักด้วยยีสต์ที่คัดเลือก ทั้ง 3 ชนิด ที่สภาวะต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน.....70
15. การเปลี่ยนแปลงค่า cut test ของเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์ที่คัดเลือก 3 ชนิด เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....82
16. องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักด้วยยีสต์ทั้ง 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....83

รายการตาราง (ต่อ)

หน้า

ตาราง

17. องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้แห้งจากการหมักด้วยยีสต์ที่คัดเลือก 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน....84
18. การเปลี่ยนแปลงค่า cut test ของเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียแลคติก ที่คัดเลือก เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส....98
19. องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักด้วยแบคทีเรียแลคติก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส....99
20. องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้แห้งจากการหมักด้วยแบคทีเรียแลคติก เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส....100
21. การเปลี่ยนแปลงค่า cut test ของเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียแอซีติก ที่คัดเลือก เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส....114
22. องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักด้วยแบคทีเรียแอซีติก ที่คัดเลือก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส....115
23. องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้แห้งในการหมักด้วยแบคทีเรียแอซีติกที่คัดเลือก เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส....116
24. การเปลี่ยนแปลงค่า cut test ของเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสม เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส....137
25. องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส....138
26. องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน....139
27. การเปลี่ยนแปลงค่า cut test ของเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสม ในกล่องหมัก เป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิห้อง....160
28. องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสม ในกล่องหมัก ที่อุณหภูมิห้อง....161

รายการตาราง (ต่อ)

หน้า

ตาราง

29. องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้แห้งจากการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสม ในกล่องหมัก ที่อุณหภูมิห้อง.....162

หน้า

ตารางภาคผนวก

ก1. ผลผลิตเมล็ดโกโก้โลกระหว่างปีการผลิต 2528 ถึง 2532 แสดงเฉพาะประเทศที่สำคัญ.....184

ก2. ปริมาณการส่งออกเมล็ดโกโก้แห้ง ช็อกโกแลต และผลิตภัณฑ์จากโกโก้ของประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ.2527-พ.ศ.2533.....186

ก3. ปริมาณการนำเข้าผลิตภัณฑ์โกโก้ของประเทศไทยระหว่างปีพ.ศ.2529-พ.ศ.2533.....187

ก4. พื้นที่การเพาะปลูกโกโก้ พื้นที่ที่ให้ผลผลิต และผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ของจังหวัดต่าง ๆ ในภาคใต้ของประเทศไทย ระหว่างปีการเพาะปลูก 2531/32 ถึงปี 2533/34.....188

ข1. ค่า Thiosulphate equivalents ในการหาปริมาณน้ำตาลซูโครส และน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Luff-Schoorl method.....202

ง1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร PDA ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยยีสต์ ที่สภาวะต่าง ๆ.....208

ง2. การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร TYGKCP ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยยีสต์ ที่สภาวะต่าง ๆ.....210

ง3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร PDA และ TYGKCP ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยยีสต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม.....212

ง4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร MRS และ TYGKCP ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยแบคทีเรียแลคติก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม.....213

รายการตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางภาคผนวก

ง5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร DSM และ TYGKCP ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยแบคทีเรียแอซีติก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม....214

ง6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร PDA ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม....215

ง7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร MRS ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม....217

ง8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร DSM ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม....218

ง9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร TYGKCP ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม....219

ง10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร TYGKCP ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมของ *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ในกล่องหมักเป็นเวลา 4 วัน และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก เปรียบเทียบกับการหมักที่ไม่เติมจุลินทรีย์....220

ง11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร PDA ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมของ *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ในกล่องหมักเป็นเวลา 4 วัน และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก เปรียบเทียบกับการหมักที่ไม่เติมจุลินทรีย์....221

รายการตาราง (ต่อ)

หน้า

ตาราง

ง12 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร MRS ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมของ *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ในกล่องหมักเป็นเวลา 4 วัน และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก เปรียบเทียบกับการหมักที่ไม่เติมจุลินทรีย์.....222

ง13 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร DSM ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมของ *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ในกล่องหมักเป็นเวลา 4 วัน และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก เปรียบเทียบกับการหมักที่ไม่เติมจุลินทรีย์.....223

รายการรูป

หน้า

รูป

1. การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* *C. sorbosa* หรือ *C. sake* บนอาหาร PDA และ TYGKCP ที่อุณหภูมิห้อง ในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน และที่ 37 องศาเซลเซียส.....61
2. การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* *C. sorbosa* หรือ *C. sake* บนอาหาร PDA และTYGKCP ที่อุณหภูมิห้อง ในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน และที่ 37 องศาเซลเซียส.....62
3. การเปลี่ยนแปลงพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* *C. sorbosa* หรือ *C. sake* ที่อุณหภูมิห้อง ในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน และที่ 37 องศาเซลเซียส.....63
4. การเปลี่ยนแปลงกรดทั้งหมดของเมล็ดโกโก้ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* *C. sorbosa* หรือ *C. sake* ที่อุณหภูมิห้อง ในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน และที่ 37 องศาเซลเซียส.....64
5. การเปลี่ยนแปลงกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae* *C. sorbosa* หรือ *C. sake* ที่อุณหภูมิห้อง ในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน และที่ 37 องศาเซลเซียส.....64
6. การเปลี่ยนแปลงกรดที่ระเหยได้ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae* *C. sorbosa* หรือ *C. sake* ที่อุณหภูมิห้อง ในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน และที่ 37 องศาเซลเซียส.....65
7. การเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae* *C. sorbosa* หรือ *C. sake* ที่อุณหภูมิห้อง ในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน และที่ 37 องศาเซลเซียส.....65
8. การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครส ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae* *C. sorbosa* หรือ *C. sake* ที่อุณหภูมิห้อง ในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน และที่ 37 องศาเซลเซียส.....66

รายการรูป (ต่อ)

หน้า

รูป

9. การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลซูโครส ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae C. sorbosa* หรือ *C. sake* ที่อุณหภูมิห้อง ในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน และที่ 37 องศาเซลเซียส.....67

10. การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมด บนอาหารแข็ง PDA และ TYGKCP ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *S. cerevisiae C. sorbosa* หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุมเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....77

11. การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *S. cerevisiae C. sorbosa* หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุม เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....78

12. การเปลี่ยนแปลงพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *S. cerevisiae C. sorbosa* หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุมเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....78

13. การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae C. sorbosa* หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุม เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....79

14. การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae C. sorbosa* หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุม เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....79

15. การเปลี่ยนแปลงกรดที่ระเหยได้ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae C. sorbosa* หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุม เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....80

16. การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae C. sorbosa* หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุมเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....80

รายการรูป (ต่อ)

หน้า

รูป

17. การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae C. sorbosa* หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุม เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....81

18. การเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae C. sorbosa* หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุม เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....81

19. การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร MRS และ TYGKCP ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *L. casei Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....93

20. การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *L. casei Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....94

21. การเปลี่ยนแปลงพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ด และเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *L.casei Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน.....94

22. การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมด ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *L. casei Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....95

23. การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *L. casei Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....

24. การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดที่ระเหยได้ ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *L. casei Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....96

รายการรูป (ต่อ)

หน้า

รูป

25. การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลซูโครส ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *L. casei Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....96

26. การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลซูโครส ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *L. casei Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....97

27. การเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ ในระหว่างการหมักด้วย *L. casei Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....97

28. การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร DSM และ TYGKCP ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *A. rancen A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....109

29. การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *A. rancen A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....110

30. การเปลี่ยนแปลงพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *A. rancen A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....110

31. การเปลี่ยนแปลงกรดทั้งหมด ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *A. rancen A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....111

32. การเปลี่ยนแปลงกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *A. rancen A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....111

รายการรูป (ต่อ)

หน้า

รูป

33. การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดที่ระเหยได้ ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *A. rancen* *A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน....112

34. การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลซูโครส ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *A. rancen* *A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน....112

35. การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลซูโครส ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *A. rancen* *A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน....113

36. การเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีการหมัก ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *A. rancen* *A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน....113

37. การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร TYGKCP ในการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 7 วัน....120

38. การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร PDA ในการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน....121

39. การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร DSM ในการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน....122

40. การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร MRS ในการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน....123

41. การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน....127

42. การเปลี่ยนแปลงพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ ในการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน....128

รายการรูป (ต่อ)

หน้า

รูป

43. การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดในเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมัก ด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....129

44. การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย จุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....130

45. การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดที่ระเหยได้ในเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมัก ด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....131

46. การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลซูโครส ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมัก ด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....132

47. การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลซูโครส ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมัก ด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....133

48. การเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีการหมักในเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย จุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....136

49. การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกแล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง และชุดการทดลองควบคุม.....148

50. การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร PDA ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกแล้ว เติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง และชุดการทดลองควบคุม.....149

51. การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร MRS ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกแล้ว เติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง และชุดการทดลองควบคุม.....150

รายการรูป (ต่อ)

หน้า

รูป

52. การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร DSM ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกแล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง และชุดการทดลองควบคุม.....151

53. การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกแล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง และ ชุดการทดลองควบคุม.....152

54. การเปลี่ยนแปลงพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้และเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกแล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง และชุดการทดลองควบคุม.....153

55. การเปลี่ยนแปลงกรดทั้งหมดในเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักในกล่องหมัก และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกแล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง และชุดการทดลองควบคุม.....154

56. การเปลี่ยนแปลงกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักในกล่องหมัก และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกแล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง และชุดการทดลองควบคุม.....155

57. การเปลี่ยนแปลงกรดที่ระเหยได้ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักในกล่องหมัก และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ

รายการรูป (ต่อ)

หน้า

รูป

A. rancen ตอนแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกแล้ว เติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมงและชุดการทดลองควบคุม.....156

58. การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักในกล่องหมัก และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกแล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง และชุดการทดลองควบคุม.....157

59. การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ จากการหมักในกล่องหมัก และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกแล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง และชุดการทดลองควบคุม.....158

60. การเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกแล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง และชุดการทดลองควบคุม.....159

หน้า

รูปภาคผนวก

ก1. ลักษณะ และขนาดของกล่องหมักเมล็ดโกโก้.....189

ตัวย่อและสัญลักษณ์

α	=	alpha
β	=	beta
θ	=	theta
ρ	=	rho
CFU	=	Colony Forming Unit
DMRT	=	Duncan's Multiple Rang Test
DSM	=	อาหารจำเพาะในการคัดเลือกแบคทีเรียแอซีติก
MRS	=	De Man, Rogosa and Sharp agar ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติก
PDA	=	Potato Dextrose Agar ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์
TYGKCP	=	อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ประกอบด้วย Tryptone, Yeast extract, Glucose, K_2HPO_4 และ Cocoa pulp extract
ppm	=	part per million
OD	=	Obtical Density

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

โกโก้ (*Theobroma cacao* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่ง มีเมล็ดเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง บริโภคในรูปเครื่องดื่ม และอาหารขบเคี้ยว เช่น ช็อกโกแลต โกโก้เริ่มปลูกครั้งแรกในอเมริกากลาง และอเมริกาใต้ ต่อมาจึงแพร่หลายออกไปยังภูมิภาคต่าง ๆ ของโลก ผลผลิตโกโก้โลกในปี พ.ศ. 2525 ถึง พ.ศ. 2533 มีอัตราการเพิ่มผลผลิตเมล็ดโกโก้ประมาณร้อยละ 6 ต่อปี กลุ่มประเทศผู้ผลิตที่สำคัญ ได้แก่ ไอเวอรีโคส กานา บราซิล ไนจีเรีย และมาเลเซีย ผลผลิตของประเทศต่าง ๆ แสดงดังตารางภาคผนวก ก1 โดยมีสหรัฐอเมริกาเป็นประเทศนำเข้ามากที่สุด (เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง, 2534; ประพันธ์ บุญกลิ่นขจร และคณะ, 2529)

ประเทศไทยมีความต้องการผลิตภัณฑ์โกโก้เพิ่มสูงขึ้นทุกปี มีการนำเข้าทั้งในรูปเมล็ดโกโก้แห้งและผลิตภัณฑ์จากโกโก้ ช่วง 5 ปีที่ผ่านมาประเทศไทยมีการนำเข้าเพิ่มขึ้นในอัตราเฉลี่ยร้อยละ 60.2 ต่อปี (กสิกรไทย, 2534) (ตารางภาคผนวก ก3) ผลิตภัณฑ์ที่นำเข้าได้แก่ โกโก้เพสต์ ไขมันโกโก้ โกโก้ผงชนิดไม่หวาน ช็อกโกแลต และ อาหารอื่น ๆ ที่ผสมโกโก้ ส่วนเมล็ดโกโก้แห้งมีการนำเข้าในปี พ.ศ. 2527 เท่านั้น หลังจากนั้นไม่นำเข้าเมล็ดโกโก้แห้งอีก ขณะเดียวกันสามารถส่งออกเมล็ดโกโก้แห้งไปยังต่างประเทศตั้งแต่ปี พ.ศ. 2525 เป็นต้นมา ซึ่งมีปริมาณและมูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ กระทั่งในปี พ.ศ. 2532 มีการส่งออกเมล็ดโกโก้แห้งสูงถึง 101.427 ตัน เป็นมูลค่า 2.569 ล้านบาท นอกจากนี้ยังส่งออกในรูปของผลิตภัณฑ์โกโก้ เช่น ช็อกโกแลต ผงโกโก้ และ อาหารปรุงแต่งอื่น ๆ ที่มีโกโก้ (เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง, 2533; 2534) (ตารางภาคผนวก ก2) ตลาดส่งออกเมล็ดโกโก้และผลิตภัณฑ์โกโก้ที่สำคัญได้แก่ มาเลเซีย สิงค์โปร์ ลาว ฮ่องกง และเวียดนาม (ยอดยิ่ง คงทอง, 2529; มณฑา ส.รัตนนูปถัมภ์, 2531)

โกโก้เป็นพืชเศรษฐกิจที่ได้รับการส่งเสริมและสนับสนุนจากรัฐบาล โดยมีเป้าหมายทั้งการพัฒนาการปลูกและการผลิตอย่างครบวงจร การส่งเสริมการปลูกโกโก้เริ่มขึ้นเมื่อ พ.ศ. 2522 ในจังหวัดกระบี่ ชุมพร และนครศรีธรรมราช (วิทย์ สุวรรณวุธ, 2527) การปลูกโกโก้นั้นทำได้ 2 ลักษณะคือ ปลูกแบบพืชเดี่ยว และปลูกเป็นพืชแซมระหว่างพืชอื่น เช่น มะพร้าว ยางพารา และปาล์มน้ำมัน โดยทั่วไปเกษตรกรนิยมปลูกเป็นพืชแซมในสวนมะพร้าวมากที่สุด เพื่อเป็นการเสริม

รายได้ให้แก่เจ้าของสวนมะพร้าว นอกจากนั้นการปลูกโกโก้ในสวนมะพร้าวยังมีผลให้มะพร้าวออกลูกดกขึ้น (มณฑา ส.รัตนนูปถัมภ์, 2531) ทั้งยังสามารถทดแทนการนำเข้าเมล็ดโกโก้ และผลิตภัณฑ์โกโก้ และเป็นแนวทางการส่งออกในอนาคต (กมลลักษณ์ โตสกุล, 2530; กสิกรไทย, 2534; วิทย์ สุวรรณวุธ, 2527) ในปัจจุบันประเทศไทยมีการปลูกโกโก้ในภาคใต้ ภาคตะวันออก และภาค กลางบางจังหวัด (สมศักดิ์ วรรณศิริ, 2532)

กรรมวิธีการผลิตเมล็ดโกโก้แห้งนั้นมีขั้นตอนที่สำคัญ คือ การหมักเมล็ดโกโก้ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเมล็ดโกโก้สด โดยเฉพาะสีและกลิ่นรส และขั้นตอนการอบแห้งเมล็ดโกโก้ Rohan (1963b) ได้ศึกษาคุณภาพของการหมักเมล็ดโกโก้จากวิธีการหมักแบบดั้งเดิม พบว่าเมล็ดโกโก้เปียกที่อยู่ส่วนบนของกองหมักมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏ ขณะที่เมล็ดโกโก้ที่อยู่ส่วนล่างไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อนำไปอบแห้งทำให้ได้เมล็ดโกโก้ที่มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอ ซึ่งเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์และทางเคมีในระหว่างการหมัก และหากใช้เวลาหมักนานเกินไปทำให้ได้เมล็ดโกโก้แห้งที่มีคุณภาพต่ำลงเช่นกัน ระหว่างการหมักน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดถูกเปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์ แล้วในที่สุดเปลี่ยนไปเป็นกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ โดยกิจกรรมของยีสต์ และแบคทีเรีย มีผลให้อุณหภูมิของกองหมักสูงขึ้นและเมล็ดโกโก้สูญเสียการงอก (Quesnel, 1966a) ส่วนเมล็ดโกโก้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่อองค์ประกอบของโปรตีน และ ไนโตรเจน มีการสร้างสารตั้งต้นของกลิ่นรสช็อกโกแลตขึ้นมา (Knapp, 1937; Forsyth, 1952b; Wood, 1985; Rohan, 1963a) สารตั้งต้นดังกล่าวเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาล กรดอะมิโน เม็ดสีฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอล ซึ่งสร้างขึ้นหลังจากเมล็ดโกโก้สูญสิ้นการงอก (Biehl, *et al.*, 1985) แต่กลิ่นรสช็อกโกแลตนั้นจะเกิดขึ้นในขั้นตอนการนำเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักไปตากแห้งแล้วนำไปคั่ว ซึ่งสารให้กลิ่นรสนั้นเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกลุ่มต่าง ๆ (Rohan, 1963a)

Ostovar และ Keeney (1973) ศึกษาจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมักเมล็ดโกโก้ในประเทศทรินิแดด พบว่าระหว่างการหมักมี ยีสต์, *Zymmonas mobilis*, แบคทีเรียแลคติกกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเตอร์ และเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตอร์เจริญอยู่ และช่วงสุดท้ายพบกลุ่ม Bacillus ด้วย Carr (1982) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในมาเลเซีย และแอฟริกา พบว่า ยีสต์ แบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแอซีติก มีบทบาทสำคัญมาก โดยยีสต์เจริญในระยะแรกของการหมักและสร้างแอลกอฮอล์ ต่อมาแบคทีเรียแอซีติกเจริญขึ้นและเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดแอซีติก ส่วนแบคทีเรียแลคติกพบได้ตลอดการหมัก แต่เจริญได้ดีในช่วงที่

ยีสต์เริ่มลดจำนวนลงก่อนที่แบคทีเรียแอซีติกเจริญขึ้นแทนที่ เพราะแบคทีเรียแลคติกเจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้นั้น จะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกของเมล็ดโกโก้ คือเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ โดยในระยะแรกเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีสีชมพูหรือสีขาว ต่อมาเมื่อเมล็ดโกโก้เกิดการหมักจะมีสีคล้ำขึ้น และเมือกจะหายไป โดยการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ พร้อมกับมีการเปลี่ยนแปลงภายในเมล็ดโดยกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่เกิดกิจกรรมได้ในช่วงอุณหภูมิในกองหมัก และค่าพีเอชในเมล็ดโกโก้ที่เหมาะสม ทำให้เกิดกลิ่นรสช็อกโกแลตขึ้น (Wood, 1975)

ดังที่กล่าวมาแล้ว การหมักโกโก้เป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญในการแปรรูปเมล็ดโกโก้ที่มีผลต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้ง และกลิ่นรสช็อกโกแลตในผลิตภัณฑ์สุดท้าย ซึ่งขึ้นกับขบวนการในการบ่มและการหมักเมล็ดโกโก้ (Forsyth and Quesnel, 1963) ในการหมักเมล็ดโกโก้ที่อาศัยจุลินทรีย์ปนเปื้อนตามธรรมชาติซึ่งมีจุลินทรีย์หลายชนิดอยู่ร่วมกันทำให้ได้ผลผลิตโกโก้แห้งที่มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอ และไม่สามารถปรับปรุงประสิทธิภาพของการหมักหรือคุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้ ทั้งยังเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อโรคหรือจุลินทรีย์ที่สร้างสารพิษอื่น ๆ การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษาบทบาทของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในระหว่างการหมักที่มีผลต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้ ทำให้ทราบถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่มีบทบาทอย่างแท้จริงในขบวนการหมัก ซึ่งเป็นข้อมูลเบื้องต้น และเป็นแนวทางในการปรับปรุงกระบวนการผลิตโกโก้ให้ได้เมล็ดโกโก้แห้งที่มีคุณภาพดี และสม่ำเสมอ

ตรวจเอกสาร

โกโก้เป็นพืชยืนต้นเจริญเติบโตได้ดีในภูมิอากาศเขตร้อนและชุ่นชื้น ระหว่างละติจูดที่ 20 องศาเหนือ ถึง 20 องศาใต้ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมระหว่าง 24 ถึง 29 องศาเซลเซียส ปกติโกโก้ต้องการปริมาณฝนตกสม่ำเสมอตลอดทั้งปี โกโก้เป็นพืชที่ไม่ต้องการแสงแดดมาก ส่วนใหญ่ต้องการร่มเงาจากพืชอื่น ดินที่เหมาะสมต่อการปลูกควรเป็นดินร่วนปนทรายมีอินทรีย์วัตถุมาก มีค่าพีเอชประมาณ 6.5 - 7.0 โกโก้เริ่มให้ผลเมื่ออายุได้ 2 - 3 ปี แต่ให้ผลผลิตสูงสุดในช่วง 8 - 15 ปี ผลโกโก้มีลักษณะคล้ายผลมะละกอ ดอกและฝักโกโก้ออกที่บริเวณตาใบของลำต้นและกิ่งแก่ ระยะเวลาตั้งแต่ออกดอกจนถึงผลสุกใช้เวลา 5 - 6 เดือน ผลโกโก้บางพันธุ์มีผิวเรียบ บางพันธุ์มีผิวขรุขระ ผลอ่อนมีสีเขียวแดง เมื่อแก่มีสีเหลืองอมชมพู ผลหนึ่ง ๆ มีเมล็ดอยู่ประมาณ 30 - 45 เมล็ดขึ้นกับพันธุ์โกโก้ (สมศักดิ์ วรรณศิริ, 2532; สิริ ชัยเสรี, 2535)

แหล่งปลูกโกโก้ในประเทศไทยที่สำคัญคือ ภาคใต้ของประเทศ (ตารางภาคผนวก ก4) นอกจากนั้น มีการปลูกในแถบชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก และภาคกลาง อีกด้วย (อรพิน ภูมิภมร และคณะ, 2536) แต่ปัจจุบันการปลูกโกโก้เป็นพืชแซมในสวนมะพร้าวยังไม่ได้รับการจูงใจที่เพียงพอเนื่องจากมีผลตอบแทนต่ำ เมื่อเทียบกับการปลูกกาแฟ ยางพารา หรือปาล์มน้ำมัน ทำให้ผลผลิตโกโก้ภายในประเทศมีไม่เพียงพอกับความต้องการ แต่ละปียังต้องนำเข้าผลิตภัณฑ์โกโก้จากต่างประเทศเป็นมูลค่าสูง (หน่วยวิจัยและพัฒนาการทำฟาร์มพัทลุง, 2531)

เมล็ดโกโก้ที่ได้ เกษตรกรจำหน่ายในรูปของเมล็ดโกโก้เปียก และเมล็ดโกโก้แห้ง ซึ่งมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน คือ ในกรณีที่จำหน่ายแบบเมล็ดโกโก้เปียก เกษตรกรต้องรีบจำหน่ายโดยเร็วภายในเวลาไม่เกิน 1 สัปดาห์หลังจากเก็บเกี่ยวผล หรือภายในเวลา 2 วันถ้าแกะเมล็ดออกจากฝักแล้ว โดยบริษัทผู้รับซื้อต้องนำเมล็ดโกโก้ที่รวบรวมได้ไปทำการหมักและอบแห้งเอง ส่วนการจำหน่ายในรูปเมล็ดโกโก้แห้งนั้น เกษตรกรต้องทำการหมักเมล็ดโกโก้แล้วทำการตากหรืออบแห้งเมล็ดโกโก้ ก่อนที่จะจำหน่ายให้กับผู้ซื้อ ซึ่งเกษตรกรต้องเสียเวลาและค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น ทั้งต้องอาศัยความรู้และประสบการณ์พอสมควร นอกจากนั้นยังต้องมีปริมาณเมล็ดโกโก้มากเพียงพอด้วย (สมศักดิ์ วรรณศิริ, 2532)

ตลาดการซื้อขายเมล็ดโกโก้ นำเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้ส่งเข้าสู่โรงงาน เพื่อแปรรูปเป็นโกโก้ผง โกโก้เหลว และช็อกโกแลต ผลผลิตที่ได้นี้ต่อไปถูกนำไปเป็นส่วนผสมหรือใช้ทำเป็นเครื่องดื่ม

บำรุงกำลัง ขนมขบเคี้ยว ช็อกโกแลต ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตไอศครีมและผลิตภัณฑ์เบเกอรี ใช้เพิ่มกลิ่นและรสชาติในอาหารจำพวกคุกกี้และเค้ก ผสมในลูกอมและลูกกวาดต่าง ๆ ใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง เช่นน้ำหอม ลิปสติก ใช้ผสมในอุตสาหกรรมบุหรี่และอุสาหกรรมผลิตยา เป็นต้น (มงคล ทัศนีย์ทิพากร, 2535; ผานิต งามกรณาธิการ และ วิทย์ สุวรรณวุธ, 2531; หน่วยวิจัยและพัฒนาการทำฟาร์มพัทลุง, 2531) นอกจากนั้นเปลือกโกโก้ยังใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ได้อีกด้วยเพราะมีปริมาณมาก มีแร่ธาตุสูง และมีปริมาณสารทรีโอโบรมีนต่ำ (Abiola and Tewe, 1991)

1. พันธุ์โกโก้

พันธุ์โกโก้ที่นิยมปลูกกันโดยทั่วไปมีด้วยกัน 3 สายพันธุ์ (กสิกรไทย, 2534; สมศักดิ์ วรรณศิริ, 2532) คือ

1.1 พันธุ์ครีโอโล (Criollo)

เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตต่ำ ไม่มีความต้านทานต่อโรคและแมลง ผลมี สีแดงหรือเหลือง เปลือกผลบาง ผิวขรุขระ ก้นผลแหลมและ ผลยาว เมล็ดขนาดใหญ่มีสีขาว หรือ สีม่วงอ่อน มีกลิ่นและรสชาติที่เหมาะสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมผลิตช็อกโกแลต

1.2 พันธุ์ฟอรัสเทอโร (Forastero) มีด้วยกัน 2 กลุ่นใหญ่ คือ

ก กลุ่ม เวสแอฟริกัน อมีโลนาโด (West African Amelonado) เป็นพันธุ์ที่ไม่ทนต่อโรคยอดแห้งและกิ่งแห้ง แต่สามารถต้านทานต่อแมลงได้ดี และผสมตัวเองได้ ฝักมีสีเขียว เมื่อสุกฝักมีสีเหลือง เปลือกหนาก้นผลมน เมล็ดแบนกว่าพันธุ์ครีโอโล และมีสีม่วงเข้ม เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง ทั้งยังเป็นพันธุ์ที่ตลาดมีความต้องการมาก

ข กลุ่ม อัปเปอร์ อเมซอน (Upper Amazon) เป็นพันธุ์ที่เจริญได้รวดเร็วและให้ผลผลิตสูง ทนทานต่อโรคและแมลงบางชนิด กลายพันธุ์ได้ง่าย เพราะเป็นพันธุ์ที่ไม่สามารถผสมตัวเองได้ ผลมีสีเขียว ผลเมื่อสุกมีสีเหลือง เมล็ดมีขนาดเล็กสีม่วงเข้ม ขนาดของผลใกล้เคียงกับพันธุ์เวสแอฟริกันอมีโลนาโด

1.3 พันธุ์ตรินิตาริโอ (Trinitario)

เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตช้า ผลและเมล็ดมีขนาดใหญ่ก้น ผลแหลม มีความต้านทานต่อโรคและแมลงสูง เมล็ดมีคุณภาพสูงกว่าพันธุ์อมีโลนาโด แต่ให้ผลผลิตต่ำกว่า เป็นลูกผสมระหว่าง

พันธุ์คริโอโลกับพันธุ์แอฟริกันอมีโลนาโด ส่วนใหญ่นิยมปลูกกันด้วยต้นติดตา หรือการปักชำ (วิทย์ สุวรรณวุธ, 2527)

การเก็บเกี่ยวผลโกโก้ ควรเก็บเกี่ยวเมื่อผลโกโก้มีสีเหลืองหรือสีส้ม ซึ่งมีอายุจากวันออกดอก ประมาณ 5 - 6 เดือน การเก็บไม่ควรใช้มือปลิดหรือดึง ควรใช้มีดหรือกรรไกรตัดขั้วผลออกจากกิ่ง เพื่อป้องกันการกระทบกระเทือนต่อตำแหน่งขั้วผลในการออกดอกและผลในรุ่นต่อ ๆ ไป (สมศักดิ์ วรรณศิริ, 2532) หากเก็บผลโกโก้ที่ไม่สุกเต็มที่มาหมักพบว่าเมล็ดโกโก้มีปริมาณไขมันต่ำ เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้จากฝักที่ไม่สุกมีน้ำตาลอิสระอยู่ต่ำกว่าปกติ เมื่อหมักทำให้มีเอทานอลต่ำ แต่มีเมทานอลสูงกว่าเมล็ดที่สุกเต็มที่ และพบว่าเมื่อฝักโกโก้สุกมากขึ้นสารเพกตินในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีปริมาณลดลง (Packiyasothy, *et al.*, 1981) ฝักโกโก้ที่เก็บมาจากต้นต้องนำมาผ่าแกะเอาเมล็ดออกมาจากฝักแล้วทำการหมัก เพื่อให้เกิดสารตั้งต้นของกลิ่นรสช็อกโกแลต ก่อนนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จากโกโก้ต่อไป (Wood and Lass, 1985)

2. กระบวนการหมักเมล็ดโกโก้

การหมักเมล็ดโกโก้เป็นขั้นตอนที่จำเป็นสำหรับการสร้างสารตั้งต้นของสารให้กลิ่นรสช็อกโกแลต ถึงแม้ว่าที่จริงแล้วกลิ่นรสช็อกโกแลตนั้นพัฒนาขึ้นเมื่อนำเมล็ดโกโก้แห้งไปทำการคั่วแล้วก็ตาม นอกจากนั้นการหมักยังช่วยป้องกันการย่อยสลายไขมันเนยโกโก้ได้อีก คือกระบวนการหมักไปมีผลยับยั้งการเจริญของต้นอ่อนหรือทำให้เมล็ดโกโก้ตายลง และการหมักยังช่วยเร่งการย่อยสลายเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ให้เร็วขึ้น ทำให้สามารถทำแห้งเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักง่ายขึ้น (Zak, *et al.*, 1972)

ผลโกโก้สุกเมื่อเก็บมาจากต้นแล้วต้องแกะฝักแยกเอาเมล็ดโกโก้ออกมาใส่ในภาชนะสำหรับหมักโดยอาจใช้เข่งสาน ลังไม้ กะบะ หรือกองลงบนพื้นก็ได้ ขณะหมักมีการกลับเมล็ดเป็นครั้งคราวเพื่อให้อากาศแก่กองหมัก และเป็นการผสมเมล็ดโกโก้ที่หมักให้เข้ากัน ทำให้การหมักเกิดสม่ำเสมอ (Rohan, 1963b) วิธีการหมักเมล็ดโกโก้ที่แพร่หลายโดยทั่วไปมีด้วยกัน 5 วิธี (Lehrian and Patterson, 1983) คือ

2.1 การบ่มบนแท่นตากแห้ง (Curing on Drying Platforms)

วิธีนี้ใช้กันมากในประเทศแถบแอฟริกา เช่น เอควาดอร์ โดยแกะเมล็ดโกโก้ออกจากเปลือกแล้วนำไปวางกองบน แท่นที่ใช้สำหรับตากแห้ง ในตอนกลางวันเกลี่ยเมล็ดโกโก้ให้กระจาย

เพื่อตากเมล็ด พอถึงกลางคืนทำการรวบรวมเมล็ดให้เป็นกองไว้อย่างเดิม (Lehrian and Patterson, 1983) แต่เมล็ดโกโก้ที่ได้จาก การหมักโดยวิธีนี้มีคุณภาพต่ำ (Rohan, 1963b)

2.2 **การหมักเมล็ดในเข่ง** (Basket Fermentation)

เป็นวิธีการหมักที่ใช้กันมากในกลุ่มผู้ปลูกโกโก้รายย่อย โดยนำเมล็ดโกโก้ที่แกะออกจากฝักใส่ลงในเข่งที่รองรอบด้วยใบตองสด ขนาดบรรจุต่อเข่งมีตั้งแต่ 20 กิโลกรัม จนถึง 200 กิโลกรัมต่อเข่ง ปิดทับผิวหน้าเมล็ดโกโก้ในเข่งด้วยใบตองสด 2 - 3 ชั้น ระหว่างการหมัก 5 - 7 วันนั้น ทำการผสมกลับกองหมักเมล็ดโกโก้โดย การถ่ายลงเข่งใบอื่นเป็นระยะทุก ๆ 1 หรือ 2 วัน เมื่อครบกำหนดจึงนำเอาเมล็ดโกโก้ไปทำแห้ง (Wood and Lass, 1985) สำหรับชาวสวนโกโก้ในประเทศไทย พบว่าร้อยละ 78 ของเกษตรกรใช้เข่งเป็นภาชนะบรรจุในการหมัก โดยเกษตรกรส่วนใหญ่ (ร้อยละ 61 ของเกษตรกร) ทำการหมัก เป็นเวลา 5 - 7 วัน มีการกลับเมล็ดที่หมักทุก 2 วัน (ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก และคณะ, 2534)

2.3 **การหมักกองสูงบนพื้น** (Heap Fermentation)

เป็นวิธีการหมักที่ใช้กันโดยทั่วไปในสวนขนาดเล็ก เพราะเป็นวิธีที่ใช้อุปกรณ์ง่าย ๆ ในการหมัก และเสียค่าใช้จ่ายต่ำ โดยนำเมล็ดโกโก้สดที่แกะแล้วอย่างน้อยประมาณ 450 กิโลกรัม (ประมาณ 4,000 - 5,000 ผล) มากอง บนใบตองสดที่ปูรองพื้นไว้และมีท่อนไม้ยาว ๆ วางรองไว้ข้างล่างอีกชั้นหนึ่ง เพื่อให้ของเหลวที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักไหลออกมา แล้วนำใบตองสดมาคลุมปิดกองหมักอีกครั้ง เพื่อให้อุณหภูมิของกองหมักสูงขึ้น กองหมักเมล็ดโกโก้ควรมีความสูงประมาณ 60 - 90 เซนติเมตร (Rohan, 1963b) กลับกองหมักทุก 2 วัน โดยคลุกเมล็ดกลับไปมาให้เข้ากันและเปลี่ยนใบตองใหม่เสมอ เพื่อให้การหมักเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ทั้งยังป้องกันการเจริญของเชื้อราที่ผิวของกองหมักได้อีกด้วย หมักเป็นเวลานาน 5 - 7 วัน แล้วนำเมล็ดโกโก้ที่ได้ไปตากแห้ง การหมักแบบนี้เป็นวิธีหนึ่งที่ให้เมล็ดโกโก้แห้งที่มีคุณภาพ (Lehrian and Patterson, 1983)

2.4 **การหมักในกล่องหรือลังไม้** (Box Fermentation)

การหมักแบบนี้ใช้กันในสวนขนาดใหญ่หรือในโรงงานรับซื้อเมล็ดโกโก้สด (มงคล ทัศนีย์ทิพากร, 2535) อย่างไรก็ตามใน ระยะหลังได้มีการปรับปรุงขนาดของกล่องหมักให้เล็กลงเพื่อให้เหมาะสมกับสวนขนาดเล็ก ดังนั้นกล่องหมักที่ใช้อยู่ในปัจจุบันจึงมีหลายขนาด เช่น ขนาด 1X1X1 ฟุต สามารถบรรจุเมล็ดโกโก้สด ได้ 25 กิโลกรัม หรือขนาด 1.5X2X1 ฟุต บรรจุเมล็ดโกโก้สดได้ 50 กิโลกรัม หรือขนาด 3X4X2.5 ฟุต สามารถบรรจุเมล็ดโกโก้สดได้ 800 - 1,000 กิโลกรัม

กล่องหรือลังไม้ที่ใช้หมักต้องเจาะรูด้านล่างและด้านข้างเพื่อให้ระบายของเหลวที่เกิดขึ้นขณะหมักออกได้ การหมักวิธีนี้เมื่อเติมเมล็ดโกโก้ลงในกล่องหมักแล้วต้องปิดทับด้วยใบตองหรือกระสอบป่าน เวลาการหมักมีตั้งแต่ 4 - 7 วัน ระหว่างการหมักทำการกลับเมล็ดทุกวันหรือทุก 2 วัน (Wood and Lass, 1985) การกลับกองหมักกระทำโดยการถ่ายเมล็ดโกโก้จากกล่องใบหนึ่งไปยังกล่องอีกใบหนึ่งซึ่งปกติวางอยู่ในระดับต่ำกว่ากล่องใบแรกและวางติดกัน วิธีนี้ให้เมล็ดโกโก้แห้งที่มีคุณภาพดีเช่นกัน (มงคล ทัศนีย์ทิพากร, 2535; ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก และคณะ, 2534; อรพิน ฎุมิภมร และคณะ, 2536; Rohan, 1963b)

2.5 การหมักในกะบะไม้หรือถาดไม้ (Tray Fermentation)

การหมักเมล็ดโกโก้ด้วยกะบะหรือถาดไม้คิดค้นขึ้นเพื่อแก้ปัญหาจากการหมักโดยวิธีอื่นที่เมล็ดโกโก้บริเวณตรงกลางกองหมักเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลช้ากว่าบริเวณผิวหน้าของกองหมัก เมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักโดยวิธีนี้มีคุณภาพสูง และยังเหมาะสมกับเมล็ดโกโก้ปริมาณน้อย ๆ อีกด้วย กะบะที่ใช้หมักมีหลายขนาด เช่น ขนาด 91X60X10 เซนติเมตร การหมักแต่ละครั้งต้องวางถาดหรือกะบะที่หมักซ้อนกันอย่างน้อย 8 - 12 ชั้น แล้วปิดทับถาดใบบนสุดด้วยใบตองหรือกระสอบป่านเพื่อให้ เกิดความร้อนขึ้น การหมักกระทำโดยนำเมล็ดโกโก้ที่แกะจากฝักแล้วใส่ลงในกะบะไม้ที่เจาะรูด้าน ล่าง วางทิ้งไว้ 1 คืนให้ของเหลวไหลออกมา วันที่สองจึงเอากะบะมาวางเรียงซ้อนกันแล้วคลุมทับ กะบะด้วยใบตอง หรือกระสอบป่าน หรือถุงพลาสติก การให้อากาศแก่กองหมักทำโดยการย้ายกะบะที่อยู่บริเวณตรงกลางขึ้นไว้ด้านบนหรือลงไปไว้ด้านล่างสลับกับกะบะที่อยู่ด้านบนหรือด้าน ล่างที่นำมาไว้ตรงกลาง ระยะเวลาในการหมักประมาณ 4 - 7 วัน ขณะหมักหากเกิดกรดมากเกินไป แก้ไขได้โดยการเพิ่มความถี่ในการสลับเปลี่ยนกะบะให้มากขึ้น เมื่อหมักครบกำหนดแล้วจึงนำเมล็ดโกโก้ไปตากแห้งต่อไป (Lehrian and Patterson, 1983)

อรพิน ฎุมิภมร และคณะ (2536) และ Sanchez (1989) กล่าวว่าการหมักเมล็ดโกโก้นั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นสองขั้นตอน คือ ตอนแรกเป็นการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบภายนอกหรือเยื่อหุ้มเมล็ดในสภาพไร้อากาศ มีการย่อยสลายของน้ำตาลและสารเพกตินในเยื่อหุ้มเมล็ดโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ มีการสร้างแอลกอฮอล์ ต่อจากนั้นเมื่อมีการกลับกองหมักซึ่งเป็นการให้อากาศ แอลกอฮอล์ถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดแอซีติกต่อไป ขั้นตอนที่สองเป็นการเปลี่ยนแปลงภายในเมล็ดโกโก้ด้วยกิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่มีอยู่ในเมล็ด มีการย่อยสลายโปรตีน สารประกอบ

กลุ่มฟีนอลที่ละลายน้ำได้ และแทนนิน ทำให้ช่วยลดความขมของเมล็ดโกโก้ลง กรดแอซีติกจากส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดแพร่เข้าสู่ในเมล็ดโกโก้ และมีการสร้างสารตั้งต้นของกลิ่นรสช็อกโกแลตขึ้นมา Wadsworth และ Howat (1954) อธิบายว่าปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนากลิ่นรสช็อกโกแลตในเมล็ดโกโก้ คือ กระบวนการงอกของเมล็ดในระยะแรกของการหมักเมื่ออุณหภูมิของกองหมักยังมีค่าต่ำ กระบวนการการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิหลังจากผ่านระยะแรกของการหมักจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส และกระบวนการขจัดคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในการหมักเมล็ดโกโก้

3 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเมล็ดโกโก้

ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการหมักเมล็ดโกโก้มีดังต่อไปนี้

3.1 ระยะเวลาในการหมัก

เวลาในการหมักเมล็ดโกโก้อยู่ในช่วง 2 - 12 วัน ซึ่งระยะเวลาที่แตกต่างกันนี้ขึ้นกับภูมิประเทศ ฤดูกาล สถานที่ ปริมาณของเมล็ดโกโก้ กรรมวิธีในการหมัก และพันธุ์ของโกโก้ (Roelofsen, 1958; Rohan, 1963b) เช่นพันธุ์คริโอโลซึ่งมีเมล็ดขนาดใหญ่ค่อนข้างกลม และมีสีขาว หรือพันธุ์ลูกผสมระหว่างเฟอรัสเตอโรกับคริโอโลที่มีเมล็ดเป็นสีม่วงจางหรือเป็นสีขาว ใช้เวลาในการหมักประมาณ 2 - 4 วัน หากเป็นเมล็ดพันธุ์เฟอรัสเตอโร ซึ่งมีขนาดเล็กแบน และมีสีม่วงจะใช้เวลาหมักประมาณ 4 - 12 วัน (Roelofsen, 1958)

Forsyth และ Quesnel (1957a) ได้ให้หลักเกณฑ์ในการพิจารณาถึงการสิ้นสุดของการหมักเมล็ดโกโก้ คือ การใช้ตารางเวลากำหนด การผ่าดูสีเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมัก การสังเกตุการเปลี่ยนแปลงสีภายนอกของเมล็ด การสังเกตการเปลี่ยนแปลงกลิ่นของกองหมัก การลดลงของอุณหภูมิกองหมัก

Wood และ Lass (1985) พบว่าหากหมักเมล็ดโกโก้นานเกินไปทำให้แบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายโปรตีนในสภาพไร้อากาศ (putrefactive bacterias) เจริญได้ มีผลให้เกิดกลิ่นรสของช็อกโกแลตน้อยลง แต่หากระยะเวลาการหมักสั้นเกินไปเมล็ดโกโก้ที่ได้มีสีม่วง และมีรสฝาดหรือขม

3.2 การให้อากาศแก่กองหมัก

การให้อากาศแก่กองหมักเมล็ดโกโก้มีผลให้เกิดการออกซิไดซ์ของเอทานอลที่สร้างขึ้นโดยยีสต์ในช่วงแรกของการหมักในสภาพไร้อากาศไปเป็นกรดแอซีติก ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว

เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาสั้น ๆ มีผลให้เกิดการสลายส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นของเหลว (Lehrian and Patterson, 1983)

Lopez และ Quesnel (1973) พบว่าหากเกิดความล่าช้าในการให้อากาศ หรือการกลับกองหมัก มีผลให้การสร้างกรดแอซีติกเกิดขึ้นช้ากว่าปกติ และมีผลทำให้ปริมาณกรดในตอนสุดท้ายของการหมักสูงขึ้นด้วย ถึงแม้ว่าอุณหภูมิของกองหมักเพิ่มขึ้นเหมือนปกติ Lopez (1979) ทำการศึกษาปริมาณออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในกองหมักเมล็ดโกโก้โดยใช้กล่องหมัก พบว่าหลังจากหมักได้ 16 ชั่วโมง บริเวณตรงกลางกองหมักมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มสูงขึ้นถึงร้อยละ 98.50 จากสภาวะดังกล่าวนี้ทำให้มีการสร้างเอทานอลและกรดแลคติกขึ้นในบริเวณที่มีออกซิเจนจำกัด เมื่อกลับกองหมักสภาวะดังกล่าวจะสิ้นสุดอย่างรวดเร็ว การกลับกองหมักเป็นการเติมออกซิเจนแก่กองหมัก ทำให้มีการสร้างกรดแอซีติก กรดที่สร้างขึ้นในช่วงแรกของการหมักเป็นตัวจำกัดปริมาณกรดแอซีติกในเมล็ดโกโก้ โดยกรดแอซีติกมีผลต่อการเจริญของยีสต์และยับยั้งการสร้างเอทานอล

Carr, *et al.* (1979) ศึกษาการหมักเมล็ดโกโก้ สรุปว่าการให้อากาศแก่กองหมักมีอิทธิพลอย่างมากต่อการสร้างกรดแลคติก คือ ในระยะแรกของการหมัก เมื่อเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เกิดการพองตัวจะไปจำกัดช่องว่างภายในกองหมัก ทำให้อากาศแพร่เข้าไปได้น้อย ในสภาวะดังกล่าวกองหมักมีค่ารีดอกซ์โพเทนเชียลต่ำ กระบวนการสร้างกรดแลคติกผ่านวิถีไกลโคไลซีสเกิดขึ้นได้ มีผลให้แบคทีเรียแลคติกเจริญได้ดีกว่ายีสต์ แต่ถ้าภายในกองหมักมีอากาศจะทำให้มีค่ารีดอกซ์โพเทนเชียลสูง ยีสต์สามารถเจริญได้ดีกว่า และทำให้เกิดการหมักได้เป็นแอลกอฮอล์

การให้อากาศในระยะหลังของการหมักช่วยให้เกิดการออกซิไดซ์ของกรดแอซีติก เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (Carr, *et al.*, 1979) นอกจากนั้นการกดทับเมล็ดโกโก้ก่อนการหมักเพื่อขจัดของเหลวในเยื่อหุ้มเมล็ดออกไป หรือการให้อากาศตั้งแต่ตอนเริ่มต้นการหมักสามารถลดความเป็นกรดของเมล็ดลงได้อีกด้วย (Chong, *et al.*, 1978)

Biehl, *et al.* (1990) ทดลองนำเมล็ดโกโก้มาผึ่งแดดหรืออบด้วยความร้อนก่อนการหมัก พบว่าสามารถช่วยลดความเป็นกรดของเมล็ดลงได้ ทั้งยังช่วยลดปริมาณเยื่อหุ้มเมล็ด และน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดลง เมื่อนำเมล็ดโกโก้ไปหมักทำให้กองหมักมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเร็วกว่าปกติ เพราะกองหมักในช่วงแรกไม่มีสภาพไร้อากาศ ทั้งยังช่วยลดปริมาณกรดแอซีติก ทำให้เมล็ดโกโก้มี ความเป็นกรดลดลง

3.3 ขนาดของกองหมักและปริมาณของเมล็ดโกโก้ที่ใช้หมัก

ปริมาณเมล็ดโกโก้ที่ใช้หมักมีผลต่ออัตราการให้อากาศแก่กองหมัก หากกองหมักมีขนาดใหญ่บริเวณผิวหน้าของกองหมักมีการถ่ายเทอากาศดีกว่า เป็นผลให้อุณหภูมิบริเวณผิวของกองหมักเพิ่มขึ้นเร็วกว่าบริเวณกลางกองหมัก ถ้ากองหมักมีขนาดเล็กมากทำให้อากาศสามารถแพร่เข้าสู่กองหมักได้ดีกว่า ความร้อนที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มกิจกรรมของจุลินทรีย์จะแพร่ออกจากกองหมักได้ง่าย (Lehrian and Patterson, 1983) การหมักเมล็ดโกโก้ปริมาณน้อย ๆ มีผลทำให้สูญเสียความร้อนได้เร็วกว่าปกติ แนวทางหนึ่งในการหมักเมล็ดโกโก้ปริมาณน้อย ๆ ให้ได้ผลดี คือ ควรกลับกองหมักให้น้อยครั้งและควรทำฉนวนหุ้มภาชนะหมักเพื่อลดการสูญเสียความร้อน (ประพันธ์ บุญกลิ่นขจร และคณะ, 2529; Glossop, 1983) Rohan (1963b) กล่าวว่าในการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยกล่องหมัก ความลึกของกองหมักไม่ควรเกิน 90 เซนติเมตร หากลึกมากไปทำให้บริเวณกลางกองหมักไม่เกิดการหมักขึ้นหรือเกิดขึ้นได้น้อย การเพิ่มขึ้นของความร้อนในกองหมักนั้นพบว่าหากมีการเพิ่มอย่างช้า ๆ ให้เมล็ดโกโก้แห้งที่มีกลิ่นรสช็อกโกแลตดีกว่าการที่ความร้อนของกองหมักเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Biehl, *et al.*, 1985)

3.4 การกลับกองหมักหรือการคนเมล็ดโกโก้ที่หมัก

การกลับกองหมักเป็นวิธีการผสมเมล็ดโกโก้ให้สัมผัสกับอากาศ และช่วยให้อากาศแพร่เข้าสู่ภายในกองหมักได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนั้นยังทำให้กองหมักมีการผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ป้องกันการจับกันเป็นก้อนของเมล็ดโกโก้ และป้องกันการเกิดเชื้อราบริเวณผิวหรือมุมอับของกองหมัก วิธีการในการกลับกองหมักและช่วงเวลาในการกลับกองหมักนั้นแตกต่างกันไปขึ้นกับวิธีการหมักเมล็ดโกโก้ ระยะเวลาในการกลับกองนั้นอาจเป็นทุก ๆ 1 วัน 2 วัน หรือ 4 วัน การกลับกองเมล็ดโกโก้ในช่วงแรกของการหมักเป็นการให้อากาศแก่กองหมัก ช่วยให้มีการสร้างเอทานอลและยับยั้งการสร้างกรดแลคติกได้ (Lehrian and Patterson, 1983) อย่างไรก็ตามการกลับกองหมักไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของเมล็ดโกโก้ แต่มีผลให้การสร้างกรดแอซีติกเกิดขึ้นช้ากว่าปกติ (Said and Samarakhody, 1984)

Dougan (1979) และ Dougan, *et al.* (1981) ศึกษาผลของการกลับกองต่อการให้อากาศ โดยการวัดปริมาณออกซิเจนในกองหมักผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า การกลับกองหมักในช่วง 3 วันแรกของการหมัก มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของออกซิเจนในกองหมัก คือ ปริมาณออกซิเจนเพิ่มขึ้นหลังจากมีการกลับกองหมักในครั้งแรกแต่ลดลงเมื่อมีการกลับกองหมักครั้งที่สอง การกลับ

กองหมักทุกวันไม่จำเป็นในการเพิ่มออกซิเจนแก่กองหมัก และการกลับกองหมักทุกวันยังทำให้อุณหภูมิของกองหมักลดลงอีกด้วย ซึ่งทำให้อัตราการเกิดเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ต่ำลง และทำให้กรดแอซีติกในเมล็ดโกโก้แห้งเพิ่มขึ้น

3.5 ความล่าช้าระหว่างการเก็บเกี่ยวและการแกะฝักโกโก้

การเก็บฝักโกโก้ก่อนการหมักมีผลต่อการหมักคือเมื่อนำเมล็ดไปหมักทำให้ อุณหภูมิของกองหมักเพิ่มขึ้นรวดเร็ว (Hancock, 1949; Rohan, 1963b; Wood and Lass, 1985) เพราะการเก็บฝักโกโก้ไว้ทำให้มีการสูญเสียความชื้น ช่วยให้อากาศแพร่เข้าไปภายในกองหมักได้ง่ายขึ้น ทั้งยังช่วยลดปริมาณน้ำและของแข็งในเมล็ดโกโก้ลง ซึ่งเป็นผลจากการระเหย และ กระบวนการออกซิเดชันของน้ำตาลกลูโคส (Biehl, *et al.*, 1989) Dougan (1980) พบว่าการเก็บฝักโกโก้ไว้ก่อนการหมัก ทำให้การสร้างกรดและการแพร่ของกรดเข้าไปในเมล็ดโกโก้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยกรดแอซีติกในเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากผลโกโก้ทั้งที่ผ่านการเก็บฝักไว้ 1 สัปดาห์ และไม่ผ่านการเก็บฝักไว้มีค่าไม่แตกต่างกัน แต่ปรากฏว่าปริมาณกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการเก็บฝักโกโก้ไว้ก่อนการหมัก 1 สัปดาห์ มีค่าสูงกว่าเมล็ดโกโก้ที่ไม่ได้เก็บฝักไว้ก่อนการหมัก นอกจากนี้ยังพบว่าฝักโกโก้ที่เก็บไว้ก่อนการหมักเป็นเวลา 2 - 4 วัน ให้สัดส่วนของเมล็ดสีม่วง และเมล็ดที่มีรอยย่นต่ำกว่าการเก็บฝักโกโก้ไว้วันเดียว (Maclean and Wickens, 1952)

Berbert (1979) และ Biehl, *et al.* (1989) กล่าวว่าการเก็บฝักโกโก้ไว้ก่อนทำการหมักเป็นสาเหตุให้เกิดการสูญเสียน้ำตาลซูโครสจากปฏิกิริยาอินเวอชัน (inversion) ได้สูงถึงร้อยละ 25 ของน้ำตาลซูโครสในเมล็ด ทั้งยังมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ เป็นผลให้เมล็ดแห้งลง แต่มีรายงานของนักวิจัยหลายท่านที่กล่าวว่าคุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากการเก็บฝักโกโก้ไว้ก่อนการหมัก และเมล็ดโกโก้ที่ไม่ผ่านการเก็บฝักไว้ก่อนนั้นไม่มีความแตกต่างกัน (Howat, *et al.*, 1957; Chong, *et al.*, 1978)

Lopez (1979) รายงานว่าการแยกเอาเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้บางส่วนออก ก่อนทำการหมักมีผลให้เวลาในการหมักสั้นลง ทำให้อุณหภูมิของกองหมักเพิ่มขึ้นเร็วกว่า และปริมาณกรดที่ระเหยได้ในเมล็ดโกโก้ที่แยกเอาเยื่อหุ้มเมล็ดออกบางส่วนมีค่าสูงกว่าชุดควบคุมเล็กน้อย ส่วนค่าพีเอชของเมล็ดโกโก้ที่แยกเอาเยื่อหุ้มเมล็ดออกบางส่วนนั้น มีค่าสูงกว่าชุดควบคุม ซึ่งหมายถึงว่ามีการสร้างกรดชนิดอื่นที่ไม่ใช่กรดแอซีติก เช่น กรดแลคติก ขึ้นมา

Abdul Samah, *et al.* (1993a) ได้เปรียบเทียบการหมักเมล็ดโกโก้ที่ได้จากฝักแก่เต็มที่เปรียบเทียบกับฝักโกโก้ที่ยังไม่แก่เต็มที่ ในกล่องหมักเป็นเวลา 6 วัน พบว่าเมล็ดโกโก้จากฝักที่แก่จัด มีกรดแอซีติกสูงกว่า (15.70 มิลลิกรัมต่อกรัมเมล็ดโกโก้ และ 11.00 มิลลิกรัมต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ตามลำดับ) เมล็ดโกโก้จากฝักที่แก่จัดเมื่อหมักจะมีค่าพีเอชสูงกว่าเล็กน้อย เมล็ดโกโก้จากฝักแก่เต็มที่ให้ค่า cut test ของเมล็ดสีน้ำตาลเป็นร้อยละ 40 ขณะที่เมล็ดจากฝักที่ไม่แก่เต็มที่มีค่าเพียงร้อยละ 27 และระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้จากฝักที่ไม่แก่เต็มที่จะมีเชื้อราที่สร้างเส้นใยเจริญมากกว่าเมล็ดโกโก้ที่แก่เต็มที่

ขั้นตอนการหมักเมล็ดโกโก้นั้นอาจมีการบ่มฝักโกโก้ก่อนนำมาผ่าแกะเอาเมล็ดออกมา การบ่มฝักโกโก้ทำให้ความชื้นในเนื้อเยื่อโกโก้ลดลงมีผลให้เวลาในการหมักสั้นลง และยังเป็นการรวบรวมผลโกโก้ให้เพียงพอต่อการหมักในแต่ละครั้งอีกด้วย (Lehrian and Patterson, 1983) ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก และคณะ (2534) ได้ทดลองเปรียบเทียบกรรมวิธีการหมัก การบ่มฝักโกโก้ก่อนการหมัก และความถี่ในการกลับเมล็ดโกโก้ขณะหมัก สรุปได้ว่าการบ่นฝักโกโก้ก่อนการหมักช่วยลดเวลาในการหมักแบบใช้กล่องหมักจากเวลา 6 วัน เหลือเพียง 4 วัน โดยให้ค่าดรรชนีการหมักสูงเป็น 1.0 - 1.1 มีกรดแลคติก กรดที่ระเหยได้ และกรดทั้งหมดต่ำกว่าชุดการทดลองควบคุม ส่วนความถี่ในการกลับเมล็ดโกโก้ พบว่าเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากชุดการทดลองที่มีการกลับเมล็ดทุก 2 วัน มีคุณภาพของดีกว่าชุดการทดลองที่กลับเมล็ดโกโก้ในวันที่ 2 และ 3 ของการหมัก โดยมีกรดทั้งหมด กรดแลคติก และกรดที่ระเหยได้ต่ำกว่า

3.6 การตายของเมล็ดโกโก้

ในระหว่างที่ทำการหมักเมล็ดโกโก้จะถูกทำลายการงอก เมื่อเมล็ดโกโก้สูญเสียการงอกทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ไปกระตุ้นให้มีการรวมตัวกันของสารตั้งต้นและเอนไซม์ต่าง ๆ ในเมล็ดโกโก้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่เป็นสารตั้งต้นของกลิ่นรสช็อกโกแลตขึ้น ในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการหมัก เมล็ดโกโก้สร้างเอทานอลและกรดแอซีติกขึ้น มีปริมาณสูงถึงร้อยละ 3.5 และร้อยละ 0.4 ตามลำดับ (Wadsworth and Howet, 1954) ซึ่งเป็นระดับที่สามารถทำลายการงอกของเมล็ดโกโก้ได้ และการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิของการหมักนั้นมีผลทำลายการงอกของเมล็ดโกโก้น้อยกว่าการเพิ่มขึ้นของเอทานอลและกรดแอซีติกในขณะหมักเมล็ดโกโก้ (Jinap, 1989; Quesnel, 1965a; Roelofsen, 1958) แต่อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นถึง 45 - 50 องศาเซลเซียสสามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดโกโก้ที่หมักได้เช่นกัน (Knapp, 1937)

Lopez (1973) และ Carr, *et al.* (1979) กล่าวว่าใบเลี้ยงของเมล็ดโกโก้ (cotyledons) เป็นแหล่งสารประกอบคาร์บอนที่สำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเมล็ดโกโก้ที่เปลี่ยนไปเป็น เอทานอล กรดแอซีติก และน้ำตาลบางชนิดเมื่อเมล็ดตายลง นอกจากนี้น้ำที่มีอยู่ในเมล็ดในของโกโก้จะเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 35 ในขณะเก็บเกี่ยว เป็นร้อยละ 40 หลังจากที่เมล็ดสูญเสียการงอก

การศึกษาเพื่อปรับปรุงกระบวนการหมักเมล็ดโกโก้นั้นมีในหลาย ๆ แนวทาง เช่นการศึกษาผลความลึกของกองหมักและปริมาณเมล็ดโกโก้ที่ใช้หมักในแต่ละครั้ง (Rohan, 1963b) การศึกษาขนาดและรูปร่างของภาชนะที่หมัก (ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก และคณะ, 2534) การเติมสารเคมีต่าง ๆ เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ โซเดียมไธโอซัลเฟต กรด หรือน้ำตาลลงไปในการหมักเมล็ดโกโก้ (Lehrian and Patterson, 1983; Roelofsen, 1958) การควบคุมสิ่งต่าง ๆ เหล่านี้ในขณะหมัก มักจะคำนึงถึงผลทางด้านกายภาพและทางเคมีของเมล็ดโกโก้มากกว่าการเปลี่ยนแปลงด้านจุลินทรีย์ รวมถึงความรู้ในด้านชนิดของจุลินทรีย์ที่มีผลต่อคุณภาพกลิ่นรสของเมล็ดโกโก้ยังมีน้อย

4. การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

4.1 แหล่งของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในธรรมชาติ

โดยปกติแล้วส่วนของเมล็ดและเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อหรือเกือบปลอดเชื้อจุลินทรีย์ที่ปะปนลงไปนั้นได้รับมาจากสิ่งแวดล้อมหลังจากที่เมล็ดถูกแกะออกจากฝักแล้ว (Lehrian and Patterson, 1983; Forsyth and Quesnel, 1963) ปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้ในระหว่างการแปรรูปคือจุลินทรีย์ที่พบในระหว่างการหมัก การหมักเมล็ดโกโก้ที่ประสบผลสำเร็จจะต้องมีปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ที่เหมาะสม บทบาทของจุลินทรีย์ในการหมักเมล็ดโกโก้นอกจากเกี่ยวข้องกับการเกิดกลิ่นรสแล้ว ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างกรด และกระบวนการย่อยสลายโปรตีนในเมล็ดโกโก้อีกด้วย (Biehl, *et al.*, 1989)

มีกลุ่มนักวิจัยหลายท่านได้ศึกษาและจำแนกกลุ่มของจุลินทรีย์ที่พบในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ ซึ่งพบว่า ยีสต์ แบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแอซีติก มีบทบาทสำคัญต่อการหมักเมล็ดโกโก้ (ดวงใจ ช่วยสถิตย์, 2535; Carr, 1982; 1985; Ostovar and Keeney, 1973; Passos, *et al.*, 1984; Rombouts, 1952)

ยีสต์เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในการหมักเมล็ดโกโก้มีการคัดแยกยีสต์จากแหล่งต่าง ๆ ที่อาจเป็นแหล่งปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในการหมัก เช่น จากมือคนงาน จากกล่องหมักเก่า ๆ จากเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ และเปลือกโกโก้แห้ง หรือจากมีดที่ใช้ผ่าฝักโกโก้ (Ostovar and Keeney, 1973) และยังมีรายงานว่ายีสต์บางชนิดมีการปนเปื้อนมาจากใบและดอกของโกโก้ (Lehrian and Patterson, 1983) จุลินทรีย์แต่ละชนิดที่พบในการหมักนั้นมีปริมาณแตกต่างกันไป แต่เมื่อแกะฝักโกโก้ออกยีสต์มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว De Camargo, *et al.* (1963) รายงานว่าปริมาณของจุลินทรีย์เริ่มต้นของการหมักเมล็ดโกโก้มีประมาณ $1.5X10^9$ เซลล์ต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการปฏิบัติต่อเมล็ดโกโก้ก่อนการหมัก Ostovar และ Keeney (1973) พบว่าจุลินทรีย์เริ่มต้นในการหมักโกโก้มีประมาณ $2.3X10^5$ เซลล์ต่อกรัมเมล็ดโกโก้ และจุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวของฝักโกโก้ส่วนใหญ่เป็น *Micrococcus luteus* และจุลินทรีย์ที่แยกได้จากมือคนงานเป็นพวก *Echerichia coli, Aerobacter aerogenes, Bacillus megaterium* และยีสต์

Gilbert (1980) รายงานว่าแมลงในกลุ่มแมลงหวี่หรือแมลงวันผลไม้ มีบทบาทสำคัญในการนำพายีสต์และแบคทีเรียมาสู่กองหมักเมล็ดโกโก้ เช่นเดียวกับ Ostovar และ Keeney (1973) พบว่าแมลงวันผลไม้ชนิด *Drosophila melanogaster* เป็นพาหะที่สำคัญในการแพร่กระจาย และนำยีสต์และแบคทีเรียมาสู่กองหมักเมล็ดโกโก้ในระยะแรกของการหมัก

4.2 ยีสต์

ยีสต์เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่พบได้มากที่สุดในช่วงระยะ 1 - 2 วันแรก ของการหมัก กระบวนการหมักของยีสต์มีการใช้น้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้อย่างรวดเร็วนอกจากได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอทานอลแล้ว ยังได้กรด เอสเทอร์ กลีเซอรอล และสารประกอบอัลดีไฮด์อีกด้วย ยีสต์มีการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเพกตินออกมาย่อยสลายเยื่อหุ้มเมล็ดเกิดเป็นของเหลว กระบวนการเมตาบอลิซึมของยีสต์ ทำให้พีเอชของเมล็ดโกโก้ลดลงเป็นประมาณ 4.0 โดยการเกิดเมตาบอลิซึมของกรดซิตริก (Roelofsen, 1958)

สภาวะการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ของการหมักเมล็ดโกโก้ อันได้แก่ การกวนหรือการให้อากาศ ค่าพีเอชของกองหมัก ความเข้มข้นของเอทานอล และปริมาณสารตั้งต้นในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ เป็นปัจจัยที่ส่งเสริมให้ยีสต์แต่ละชนิดเจริญได้ในการหมักแต่ละครั้งแตกต่างกันไป ยีสต์ชนิดต่าง ๆ ที่พบได้ในการหมักเมล็ดโกโก้แสดงดังตาราง 1

ยีสต์ที่เจริญในการหมักเมล็ดโกโก้นั้นไม่ได้เจริญพร้อมกัน แต่จะเจริญตามกันตามแต่สภาวะความเหมาะสมกับแต่ละชนิด ขึ้นอยู่กับการกลับกองหมักเมล็ดโกโก้ ยีสต์บางกลุ่ม เช่น *Saccharomyces* spp. เจริญได้ดีเมื่อมีน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้สูง และมีความเข้มข้นออกซิเจนในระดับต่ำ แต่ในทางตรงกันข้าม *Candida krusei* เจริญได้ดีในสภาพที่มีอากาศ และใช้ เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Lehrian and Patterson, 1983) ยีสต์ที่เจริญในที่ที่มีอุณหภูมิสูงเป็นกลุ่มที่เจริญได้ดีในสภาวะที่ความร้อนของกองหมักสูงสุด ขณะที่ยีสต์ที่เจริญในช่วงอุณหภูมิปกติเจริญได้ดีและมีมากในช่วงแรกของการหมัก ซึ่งพบได้บริเวณกลางกองหมักช้ากว่าบริเวณผิวกองหมัก

Carr, *et al.* (1980) พบว่ายีสต์กลุ่ม *Kloeckera* sp. เจริญได้ก่อนกลุ่ม *Saccharomyces* sp. แต่ยีสต์กลุ่มหลังมีบทบาทในการหมักมากกว่า De Carmago, *et al.* (1963) รายงานว่า *Geotrichum candidum* และ *Candida mycoderma* ที่พบในกองหมักเมล็ดโกโก้มีกิจกรรมย่อยสลายสารเพกตินได้ และ *Geotrichum candidum* สามารถสร้างเอนไซม์เอนโด-โพลิกาแลกทูโรเนส (endo-polygalacturonase) ได้ที่พีเอช 4.5 - 5.0 ซึ่งเอนไซม์นี้มีคุณสมบัติในการย่อยสลายกรดแลคติกได้เป็นกรดโมโน- ได- และไตร-กาแลคทูโรนิก (Fogarty and Kelly, 1983)

อรพิน ภูมิภมร และคณะ (2536) ศึกษาการหมักเมล็ดโกโก้ในเข่งหมัก และในลังไม้เป็นเวลา 6 วัน โดยกลับกองหมักวันละครั้งในระยะสองวันแรกของการหมัก พบว่ายีสต์ที่เจริญในกองหมักเมล็ดโกโก้เป็นกลุ่มที่เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic yeasts) ซึ่งจะพบได้ในปริมาณมากในช่วงแรกของการหมัก ประมาณ $1.60X10^6$ ถึง $1.64X10^6$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ หลังจากนั้นยีสต์จะมีปริมาณลดลง

ดวงใจ ช่วยสถิตย์ (2535) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีสต์ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ 2 ชุด ชุดแรกหมักในโรงเรือนสำหรับหมักเมล็ดโกโก้ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร มียีสต์เริ่มต้นประมาณ $2.11X10^5$ โคโลนีต่อกรัม ชุดที่สองหมักที่คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มียีสต์เริ่มต้นน้อย แต่ทั้งสองชุดการทดลองยีสต์เจริญเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันแรกของการหมักเป็น $2.16X10^7$ - $1.64X10^8$ โคโลนีต่อกรัม หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงจนสิ้นสุดการหมัก ซึ่งมียีสต์อยู่ $1.00X10^2$ - $1.30X10^3$ โคโลนีต่อกรัม จากการหมักทั้งสองครั้งนั้นชนิดของยีสต์ที่พบแตกต่างกัน คือชุดแรกมี *Candida sorbosa* และ *Candida Krusei* ปริมาณใกล้เคียงกัน โดย *Candida sorbosa* พบได้ตลอดการหมัก ขณะที่ *Candida Krusei* พบได้ในระยะหลังของการหมัก ส่วนชุดที่สองพบ *Saccharomyces serevisiae* มากที่สุด และพบตลอดการหมัก นอกจากนี้ยังพบ *Candida sake* และ *C. tropicalis* เจริญอยู่ด้วยในระยะสุดท้ายของการหมัก

ตาราง 1 ชนิดของยีสต์ที่แยกได้จากการหมักเมล็ดโกโก้

ยีสต์ที่พบ	เอกสารอ้างอิง
Candida sp.	(1), (2)
C. catenulata	(6)
C. krusei	(2), (6), (7)
C. mycoderma	(2)
C. parapsilosis	(2)
C. sake	(7)
C. sorbosa	(7)
C. tropicalis	(7)
Debrayomyces sp.	(1)
Endomycopsis javanensis	(4)
Geotrichum candidum	(2), (4)
Hanseniaspors sp.	(1)
Hansenula sp.	(1)
H. anomala	(5), (6)
Kloeckera sp.	(1)
K. apiculata	(2), (5), (6)
Pichia sp.	(1)
P. farinosa	(6)
P. fermentans	(2), (5), (6)
P. membranaefaciens	(2), (5), (6)
Rhodotorula sp.	(1)
Saccharomyces sp.	(2), (6)
S. carlsbergensis	(2)
S. cerevisiae	(2), (7)
S. cerevisiae var. *ellipsoideus*	(6)

ตาราง 1 (ต่อ)

ยีสต์ที่พบ	เอกสารอ้างอิง
S. chevalieri	(3)
S. rosei	(5)
Schizosaccharomyces sp.	(1)
S. pombe	(6)
Trichosporon cutaneum	(5)
T. pullulans	(6)
Torulopsis sp.	(1), (2)
T. candida	(3), (4)
T. castellii	(3)
T. holmii	(3)
T. rosei	(6)

ที่มา : (1) Carr, *et al.* (1979, 1980)

(2) De Carmago, *et al.* (1963)

(3) Gauthier, *et al.* (1977)

(4) Maravalhas (1966)

(5) Martelli และ Dettmar (1961)

(6) Rombouts (1952)

(7) ดวงใจ ช่วยสถิตย์ (2535)

4.3 แบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกสามารถพบได้ตลอดการหมักมีทั้งกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเตตีฟซึ่งสามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดแลคติกด้วยวิถีไกลโคลิซีส และกลุ่มเฮทโทโรเฟอร์เมนเตตีฟ ซึ่งเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดแลคติก เอทานอล กรดแอซีติก และคาร์บอนไดออกไซด์ ด้วยวิถีฟอสโฟคีโตเลส ดังนั้นบทบาทสำคัญของแบคทีเรียแลคติกในกระบวนการหมัก คือ การสร้างกรดให้รสเปรี้ยว และสร้างสารให้กลิ่นหอมต่าง ๆ (นภา โล่ทอง, 2534) แบคทีเรียแลคติกเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มไมโครแอโรไฟล์ (microaerophile) เจริญได้ดีในสภาพที่มีความเข้มข้นออกซิเจนต่ำ หรือมีออกซิเจนอยู่แต่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูง ซึ่งสภาวะดังกล่าวนี้เกิดขึ้นในช่วงที่เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์และยุบตัวลง รวมทั้งยีสต์มีปริมาณลดลงด้วย แบคทีเรียแลคติกพบได้สูงในวันแรกของการหมัก เนื่องจากกองหมักมีสภาพไร้อากาศ (Passos, *et al.*, 1984; Wood, 1985;) แบคทีเรียแลคติกที่พบในการหมักเมล็ดโกโก้ส่วนใหญ่อยู่ในสกุลแลคโตบาซิลลัส อันได้แก่ *Lactobacillus lactis, L. bulgaricus, L. acidophilus, L. casei, L. plantarum, L. fermentum, L. fermenti, Leu. mesenteroides* และในช่วงสุดท้ายของการหมักมีแบคทีเรียแลคติกกลุ่ม *Streptococcaceae* sp. เจริญได้ในปริมาณสูง (Lehrian and Patterson, 1983)

การศึกษาการแยกแบคทีเรียแลคติก โดย ดวงใจ ช่วยสถิตย์ (2535) ซึ่งหมักเมล็ดโกโก้ 2 ชุดในเข่งหมัก เป็นเวลา 7 วัน สามารถจำแนกแบคทีเรียแลคติกได้ 3 สกุล ดังตาราง 2 โดยมีแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นอยู่ประมาณ $1.85X10^5$ โคโลนีต่อกรัม และมีค่าสูงสุดในวันแรกของการหมักเป็น $1.07X10^8$ - $3.09X10^8$ โคโลนีต่อกรัม แบคทีเรียแลคติกที่พบในปริมาณมากได้แก่ *Lactobacillus casei, Leuconostoc mesenteroides, Streptococcus lactis* และ *S. thermophilus*

4.4 แบคทีเรียแอซีติก

แบคทีเรียแอซีติกเจริญได้รวดเร็วและมีปริมาณมากที่สุดเมื่อเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ เกิดการย่อยสลาย และมีการให้อากาศเพียงพอ โดยเฉพาะหลังจากที่ยีสต์กับแบคทีเรียแลคติกมีจำนวนลดลง แบคทีเรียแอซีติกมี 2 สกุล คือ สกุล Gluconobacter ซึ่งสามารถออกซิไดซ์เอทานอล เป็นกรดแอซีติกได้แต่ไม่สามารถออกซิไดซ์กรดแอซีติกไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ และสกุล Acetobacter เป็นกลุ่มที่ต้องใช้อากาศในการเจริญ (Strictly aerobic bacterias) ซึ่งสามารถใช้น้ำตาลเฮกโซส และกลีเซอรอลได้ที่พีเอช 7.0 - 4.5 สามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดแอซีติกได้ กรดแอซีติกและกรดแลคติกถูกออกซิไดซ์ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ (Krieg and Hott,

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

1986) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียแอซีติกกลุ่มนี้ประมาณ 30 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 5 - 42 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.5 - 6.3 แต่เจริญได้ตั้งแต่พีเอช 4.0 - 7.0 (Lehrian and Patterson, 1983) ส่วน อรพิน ภูมิภมร และคณะ (2536) พบว่าแบคทีเรียที่ผลิตกรดแอซีติกเป็นกลุ่มที่เจริญในช่วงอุณหภูมิปานกลางเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเป็นพวก low mesophilic bacterias ส่วนกลุ่มที่เป็น high mesophilic bacterias คือเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส นั้นมีน้อย

Carr, *et al.* (1980) แยก *Acetobacter rancen, A. xylinum* และ *A. ascendens* จากการหมักเมล็ดโกโก้ในประเทศกานา และแยก *A. rancen, A. xylinum, A. lovaniensis* ได้จากการหมักเมล็ดโกโก้ในประเทศมาเลเซีย แบคทีเรีย *A. rancen* และ *A. ascendens* มีคุณสมบัติที่สามารถออกซิไดซ์เอทานอลและสารแลคเทตได้ (Stanier, *et al.*, 1986) และจากการศึกษาพบ *Gluconobacte oxydan* ในกองหมักเมล็ดโกโก้ในระยะแรกของการหมักเท่านั้น และจุลินทรีย์ชนิดนี้ใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้าย สามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดแอซีติกได้ แต่ไม่สามารถออกซิไดซ์กรดแอซีติกหรือกรดแลคติกไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ (Carr, *et al.*, 1980) ดวงใจ ช่วยสถิตย์ (2535) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแอซีติกในการหมักเมล็ดโกโก้ ซึ่งหมักที่ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร พบว่ามีแบคทีเรียแอซีติกเริ่มต้น เท่ากับ $2.85X10^3$ โคโลนีต่อกรัม หลังจากนั้นพบแบคทีเรียแอซีติกได้ตลอดการหมัก ในระยะสุดท้ายของการหมักมีจุลินทรีย์ตั้งแต่ $2.68X10^7$ - $1.00X10^8$ โคโลนีต่อกรัม และทำการหมักที่คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งตอนเริ่มต้นการหมักไม่พบแบคทีเรียแอซีติก หลังจากนั้นมีแบคทีเรียแอซีติกสูงสุดในวันที่ 3 ของการหมัก แบคทีเรียแอซีติกที่พบมากในการหมัก ได้แก่ *Acetobacter rancen, A. lovaniense* และ *Gluconobacter oxydan* แบคทีเรียแอซีติกที่พบในการหมักเมล็ดโกโก้ทั้งสองครั้งแสดงดังตาราง 3

Ostovar และ Keeney (1973) แยก *A. aceti* และ *A. suboxydans* ได้จากการหมักเมล็ดโกโก้แบบกล่องหมัก *A. aceti* เจริญได้ดีในสภาวะที่มีเอทานอล และสามารถออกซิไดซ์สารแลคเตตได้อย่างช้า ๆ แต่ *A. suboxydans* ไม่สามารถเจริญได้ เพราะแม้ว่าออกซิไดซ์เอทานอลได้ แต่ไม่สามารถออกซิไดซ์สารประกอบแอซีเทตได้ นอกจากนั้นยังแยก *A. roseum* (sic) ได้จากการหมักเมล็ดโกโก้เช่นกัน แต่จุลินทรีย์นี้ไม่สามารถออกซิไดซ์กรดแอซีติกได้ แบคทีเรียแอซีติกสามารถพบได้ตลอดเวลาการหมักเมล็ดโกโก้ (Roelofsen, 1958) การเจริญของแบคทีเรียแอซีติก

ทำให้อุณหภูมิของกองหมักสูงขึ้นถึงประมาณ 50 องศาเซลเซียส หรือมากกว่านั้น มีการสร้างกรดต่าง ๆ ขึ้น เป็นสาเหตุทำให้เมล็ดโกโก้ตายและมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาเคมีในเมล็ดโกโก้ เกิดสารตั้งต้นที่ก่อให้เกิดกลิ่นรสช็อกโกแลตขึ้นมา (Wood and Lass, 1985)

4.5 จุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์และเจริญในสภาพที่มีอากาศ และแบคทีเรียอื่น ๆ

ในระยะสุดท้ายของการหมักเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นและอุณหภูมิลดลง หรือในขณะ ทำแห้ง จุลินทรีย์กลุ่มสร้างสปอร์และเจริญในสภาวะที่มีอากาศ โดยเฉพาะกลุ่ม Bacillus สามารถเจริญได้ (Ostovar and Keeney, 1973) มีรายงานว่า *B. subtilis* มีความสัมพันธ์โดยตรงกับสาร tetramethylpyrazine (TMP) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม alkylpyrazine ที่เป็นสารเริ่มต้นชนิดหนึ่งของสารให้กลิ่นรสในเมล็ดโกโก้ (Zak, *et al.*, 1972)

จุลินทรีย์อื่น ๆ ที่พบได้ในการหมักเมล็ดโกโก้ได้แก่ *Leuconostoc* spp. ซึ่งมีบทบาทคล้ายกับ *Lactobacillus* spp. ส่วน *Micrococcus* spp. นั้นหากมีในกองหมักช่วยทำให้ความเป็นกรดของเมล็ดลดลง เนื่องจากสามารถไปเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดซ์กรดแอซีติกและกรดแลคติก (Ostovar and Keeney, 1973) นอกจากนี้ยังพบ *Zymomonas mobilis* ได้ในสภาวะที่เมล็ดโกโก้มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง จุลินทรีย์ชนิดนี้เจริญได้ในช่วงพีเอช 3.7 - 8.0 และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 30 องศาเซลเซียส (Carr, 1979) โดยจะไปเปลี่ยนแปลงน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส ด้วยกระบวนการหมักได้เป็นเอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นส่วนใหญ่ มีกรดแลคติกเล็กน้อย และเมื่อให้อากาศสามารถออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดแอซีติก มีการสะสมสารอะซีตัลดีไฮด์ขึ้น การหมักเมล็ดโกโก้หากมีการจำกัดออกซิเจนสารอะซีตัลดีไฮด์ และเอทานอลที่สะสมอยู่ในเมล็ดจะมีผลทำลายการงอกของเมล็ดโกโก้ได้ดีกว่ากรดแอซีติก สำหรับจุลินทรีย์กลุ่ม *Actinomyces* หากเจริญในกองหมักเมล็ดโกโก้ทำให้เกิดการเน่าเสียกับเมล็ดโกโก้ในระหว่างการหมัก และเป็นสาเหตุให้เกิดกลิ่นเหม็นอับ และมีรสชาติที่ผิดปกติ (De Carmago, *et al.*, 1963)

4.6 เชื้อราชนิดอื่น ๆ ที่ไม่อยู่ในกลุ่มของยีสต์

โดยปกติสามารถพบรากลุ่มที่สร้างเส้นใยได้ในกองหมักเมล็ดโกโก้ซึ่งทำให้เกิดการเสื่อมเสียต่อเมล็ดโกโก้ Roelofsen (1958) ได้ให้ข้อสังเกตถึงราที่พบในกองหมักว่าราทำให้เกิดการย่อยสลายส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดและเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ (shell) และมีผลต่อการเกิดกลิ่นรสที่ผิดปกติของเมล็ดโกโก้ ปัจจัยสำคัญที่เป็นตัวกำหนดชนิดและปริมาณของเชื้อราที่พบในกองหมัก ได้แก่ ช่วงฤดูกาล ลักษณะอุณหภูมิ และการเก็บรักษาฝักโกโก้

ตาราง 2 แบคทีเรียแลคติกที่พบในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในเข่งเป็นเวลา 7 วัน

สกุล Streptococcus	สกุล Leuconostoc	สกุล Lactobacillus
S. thermophilus[1,2]	*Leu. dextranicum*[1]	*L. plantarum*[1,2]
S. lactis[1]	*Leu. mesenteroides*[1,2]	*L. casei*[1]
S. mitis[1,2]		
S. faecium[1]		
S. zooepidemicus[2]		
S. equi[2]		

ที่มา : ดัดแปลงจาก ดวงใจ ช่วยสถิตย์ (2535)

1 หมักในโรงเรือนสำหรับหมักเมล็ดโกโก้ ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร

2 หมักที่คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ตาราง 3 แบคทีเรียแอซีติกที่พบในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในเข่งเป็นเวลา 7 วัน

สกุล Gluconobacter	สกุล Acetobacter
G. oxydan[1]	*A. ascendens*[1]
	A. lovaniense[1,2]
	A. rancen[1,2]
	A. mesoxydans[1]

ที่มา : ดัดแปลงจาก ดวงใจ ช่วยสถิตย์ (2535)

1 หมักในโรงเรือนสำหรับหมักเมล็ดโกโก้ ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร

2 หมักที่คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

5. การใช้เชื้อเริ่มต้นในการหมักเมล็ดโกโก้

ปกติแล้วในกองหมักเมล็ดโกโก้มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถเจริญได้ แต่มีจุลินทรีย์น้อยชนิดที่มีบทบาทอย่างแท้จริงในการหมัก จุลินทรีย์อื่น ๆ ที่พบอาจเป็นจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่ไม่มีผลต่อการหมักซึ่งในกระบวนการหมักไม่สามารถขจัดออกได้ (นภา โล่ทอง, 2534) มีการศึกษาต่าง ๆ พยายามคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการหมักเมล็ดโกโก้ แล้วทำการเติมจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้กลับลงไปในการหมักเมล็ดโกโก้เพื่อพัฒนาคุณภาพของเมล็ดโกโก้ ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีการศึกษาทางด้านนี้มากที่สุด การเติมยีสต์ลงไปในการหมักเมล็ดโกโก้ครั้งแรก ๆ ทำเพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรียแอซีติก หรือเพิ่มระยะการเจริญของยีสต์ให้นานขึ้น โดยอาจเติมในรูปของยีสต์บริสุทธิ์ หรือเชื้อผสมลงไป แต่การศึกษาเหล่านี้ไม่ได้ประสบความสำเร็จมากนัก (Lehrian and Patterson, 1983)

Wadsworth และ Howat (1954) ทดลองหมักเมล็ดโกโก้ที่ต่างกัน 2 วิธี วิธีแรกแกะเมล็ดโกโก้ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ แล้วเติมเชื้อผสมของ *Hansenula anomala* และ *Bacillus orleanense* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่พบในการหมักตามธรรมชาติ ปริมาณ $2X10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรของสารละลาย Ringer's solution หมัก 7 วัน กลับเมล็ดทุก 2 วัน แล้วทำแห้งด้วยตู้อบอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จนมีความชื้นประมาณร้อยละ 6 พบว่าเมล็ดโกโก้ที่ได้มีสีน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ มีเมล็ดสีม่วงแกมน้ำตาลเพียงเล็กน้อย เปรียบเทียบกับการหมักเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic fermentation) โดยฉีดพ่นด้วยสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 84 ชั่วโมง แล้วบ่มต่อที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าในตอนสุดท้ายเมล็ดบวมขึ้น และมีของเหลวสีน้ำตาลอยู่ภายในเนื้อเมล็ดมีสีม่วงจาง เมื่อนำไปอบแห้งแบบเดียวกับชุดแรกเมล็ดแห้งที่ได้ไม่จับแน่นกับผนังหุ้มเมล็ดและมีสีน้ำตาลเข้ม เมล็ดโกโก้ทั้ง 2 ชุดการทดลองเมื่อทำเป็นช็อกโกแลตให้กลิ่นรสช็อกโกแลตที่ไม่แตกต่างกัน Roelofsen (1958) ศึกษาการหมักเมล็ดโกโก้ในประเทศกานา โดยเติมผงเชื้อยีสต์ *Zygosaccharomyces marxianus* (Hensen), *S. fragrans* (Beijerinck) และ *S. cerevisiae* (Hensen) ซึ่งเป็นยีสต์ที่แยกได้จากการหมักเมล็ดโกโก้และสามารถย่อยสลายเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ได้ พบว่ายีสต์ทั้ง 3 ชนิดสามารถย่อยสลายเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ได้ โดยในตอนเริ่มต้นใช้ยีสต์ 10 กิโลกรัมละลายในน้ำ 30 ลิตร แล้วผสมเข้ากับเมล็ดโกโก้ 1,000 กิโลกรัม ซึ่งมีปริมาณของยีสต์อยู่เท่ากับ $4.0X10^6$ เซลล์ต่อเมล็ดโกโก้ 1 เมล็ด ในขณะที่จุลินทรีย์อื่นมีปริมาณเพียง $2.0X10^6$ เซลล์ต่อเมล็ดโกโก้ 1 เมล็ด การหมักโดยการเติมยีสต์นั้น

ทำให้อุณหภูมิของกองหมักเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ช่วงเวลาที่ยีสต์เจริญเป็นกลุ่มเด่นนานขึ้นและเยื่อหุ้มเมล็ดถูกย่อยสลายได้ดีกว่าปกติ อย่างไรก็ตาม หลังจากหมักได้ 2 วันแล้วองค์ประกอบของจุลินทรีย์ก็กลับเข้าสู่สภาพปกติอีก และเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้ไม่มีความแตกต่างจากชุดการหมักที่ไม่มีการเติมเชื้อ เว้นแต่ผนังหุ้มเมล็ดนั้นมีสีแดงกว่าปกติ

Sanchez, *et al.* (1985) ทดลองหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักที่บรรจุเมล็ดโกโก้กล่องละ 70 กิโลกรัม โดยแยกเติมยีสต์ 3 ชนิด คือ *Saccharomyces chevalieri* และ *Candida zeylanoides* ซึ่งแยกได้จากการหมักเมล็ดโกโก้ หรือ *Kluveromyces fargilis* ในตอนแรกของการหมัก ด้วยความเข้มข้น $5X10^6$ เซลล์ต่อกรัมเมล็ดโกโก้ กลับเมล็ดในเวลา 24, 48 และ 96 ชั่วโมง แล้วนำไปทำแห้งด้วยแสงแดดเป็นเวลา 15 วัน พบว่าชุดการทดลองที่เติม *S. chevalieri* และชุดที่เติม *C. zeylanoides* จุลินทรีย์ทั้งสองชนิดเจริญได้ดี และให้เมล็ดโกโก้ที่มีคุณภาพเป็นที่ยอมรับได้ แต่ *S. chevalieri* เจริญได้ดีกว่า *C. zeylanoides* เมื่อทดสอบการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสของช็อกโกแลตที่ได้ ด้วยวิธี triangle tests พบว่าทั้งสองชุดการทดลองมีคุณภาพดีกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมจุลินทรีย์ อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนชุดการทดลองที่เติม *K. fargilis* ให้ผลิตภัณฑ์โกโก้ที่ไม่ดี และจุลินทรีย์ชนิดนี้ถูกปนเปื้อนได้ง่าย ช็อกโกแลตที่ได้มีคุณภาพทางประสาทสัมผัสต่ำกว่าชุดควบคุม

Sanchez, *et al.* (1988) ศึกษาจุลินทรีย์ที่แยกได้จากการหมักเมล็ดโกโก้ในธรรมชาติจำนวน 7 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถเจริญได้ดีในสภาพที่เป็นกรดและมีความเหมาะสมในการหมักเมล็ดโกโก้ เพื่อพัฒนาการหมักเมล็ดโกโก้แบบ 3 ระยะ พบว่าสายพันธุ์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ 2 สายพันธุ์ คือ *Torulopsis candida* และ *Saccharomyces chevalieri* รวมถึงสายพันธุ์กลายของ *S. chevalieri* สามารถใช้ในการหมักเมล็ดโกโก้แบบดังกล่าวได้ เนื่องจากสามารถเกิดกระบวนการหมักได้ในสภาพมีอากาศและมีความสามารถในการย่อยสลายสารเพกตินได้ดี และใช้แอลกอฮอล์ในการเจริญได้ โดยไม่มีผลกระทบกระบวนการสร้างกรดแอซีติก ส่วน *K. fargilis* สามารถใช้ในการหมักและให้เมล็ดโกโก้ที่มีคุณภาพดีเช่นกัน แต่ *Candida norvegensis* นั้นจะสูญเสียประสิทธิภาพการหมักในสภาพที่มีอากาศ เช่นเดียวกับ *Brettanomyce* ssp. และ *Dekkera intermedia* ที่ไม่สามารถย่อยสลายสารเพกตินได้ จึงไม่เหมาะสมในการหมักเมล็ดโกโก้

Sanchez (1989) ทำการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก 2 ชุด ซึ่งบรรจุเมล็ดโกโก้สดกล่องละ 100 กิโลกรัม ชุดแรกเติม *Candida famata* C-30 ความเข้มข้น $5.0X10^5$ เซลล์ต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ในตอนเริ่มต้นการหมัก หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง จึงเติมด้วย *Acetobacter* sp. B-46

ความเข้มข้น 5.0X10^5 เซลล์ต่อกรัมเมล็ดโกโก้ตามลงไป ซึ่งจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดแยกได้จากการหมักเมล็ดโกโก้ตามปกติ ชุดที่สองเติม *Brettanomyces claussenii* C-Y-31-2-2 ความเข้มข้น 5.0X10^5 เซลล์ต่อกรัมเมล็ดโกโก้ในตอนแรกของการหมักเปรียบเทียบผลการทดลองกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์ พบว่าในชุดการทดลองที่ 2 มีอุณหภูมิของกองหมักสูงสุดเมื่อหมักได้ 24 ชั่วโมง และมีปริมาณกรดที่ระเหยได้สูงสุด เมื่อเทียบกับชุดการทดลองทั้งหมดในวันที่ 3 ของการหมัก การเติม *Brettanomyces claussenii* C-Y-31-2-2 ในระยะแรกของการหมักมีแนวโน้มให้เมล็ดโกโก้ที่มีคุณภาพดี แต่ไม่ช่วยลดเวลาการหมักลง และไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแอซีติกทั้งสองชุดการทดลองให้ช็อกโกแลตที่มีความแตกต่างจากชุดควบคุม ในชุดแรกถึงแม้ให้เมล็ดโกโก้ที่มีคุณภาพใกล้เคียงกับชุดควบคุม แต่ช็อกโกแลตที่ได้มีความเป็นกรด และมีรสขมมากกว่าชุดควบคุม ทำให้การยอมรับทางประสาทสัมผัสต่ำกว่าช็อกโกแลตจากชุดควบคุม ส่วนช็อกโกแลตที่ได้จากชุดที่สองนั้นมีคุณภาพการยอมรับต่างจากชุดควบคุมแต่มีคุณภาพดีกว่าชุดการทดลองแรก ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องจากในขณะหมักกองหมักชุดที่ 2 มีอุณหภูมิสูงสุดในช่วง 2 วันแรกของการหมัก และมีความเป็นกรดสูงสุดในวันที่ 3 ของการหมัก

Abdul Samah, *et al.* (1992) ศึกษาการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักโดยเติม *Saccharomyces. cerevisiae* สายพันธุ์ธรรมชาติ ความเข้มข้น 1X10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธีการฉีดพ่นสารละลายของเชื้อดังกล่าว 20 มิลลิลิตร ลงบนเมล็ดโกโก้ 10 กิโลกรัม บ่มเป็นเวลา 6 วัน เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น พบว่าค่าพีเอชของเมล็ดโกโก้ของชุดที่เติมยีสต์ดังกล่าว มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองควบคุม มีเอทานอลและกรดแอซีติกในเมล็ดสูงกว่าชุดควบคุม ส่วนกลิ่นรสช็อกโกแลตในเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองทั้งสองโดยรวมแล้วไม่มีความแตกต่างกัน แต่ชุดที่เติมยีสต์สามารถลดความขมของช็อกโกแลตลงได้ประมาณร้อยละ 25

Abdul Samah, *et al.* (1993) ศึกษาการเติม *Acetobacter xylinum* ในการหมักเมล็ดโกโก้ เปรียบเทียบกับการหมักตามปกติ ใช้เชื้อเริ่มต้นประมาณ 1X10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ฉีดพ่นลงบนเมล็ดโกโก้ 10 กิโลกรัม บ่มเป็นเวลา 6 วัน พบว่าเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียมีค่าพีเอชต่ำกว่าชุดควบคุมตลอดการหมัก และเมล็ดโกโก้จากชุดที่เติมแบคทีเรียแอซีติกมีปริมาณกรดแอซีติกสูงกว่า ทั้งยังมีกลิ่นรสต่ำกว่าชุดควบคุม

6. เอนไซม์ในเมล็ดโกโก้

สามารถจำแนกเอนไซม์ต่าง ๆ ในเมล็ดโกโก้ออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ กลุ่ม anthocyanin glycosidases กลุ่ม polyphenol oxidases และ กลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน การเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของเอนไซม์ในเมล็ดโกโก้ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะการย่อยสลายที่ไม่ต้องการอากาศ และระยะการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของออกซิเจน (Forsyth and Quesnel, 1963) การเกิดกระบวนการออกซิเดชั่นของเอทานอลและกรดแอซีติกอันมีสาเหตุจากการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิของกองหมักเป็นผลให้เอนไซม์ในเมล็ดโกโก้เกิดกิจกรรมขึ้น มีการปล่อยสารตั้งต้นของสารให้กลิ่นรสช็อกโกแลตในเมล็ดโกโก้ออกมา เอนไซม์ส่วนใหญ่ในเมล็ดโกโก้เกิดกิจกรรมที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส และที่พีเอช 3.0 - 5.0 (Lehrian and Patterson, 1983)

6.1 เอนไซม์กลุ่ม ไกลโคซิเดส (Glycosidases)

ดรรชนีการหมักของเมล็ดโกโก้วัดโดยใช้การเปลี่ยนสีของเมล็ดโกโก้จากสารสีม่วงไปเป็นสารสีน้ำตาล เมล็ดโกโก้หากมีสีหินชนวนหรือสีเทาแสดงว่าเป็นเมล็ดโกโก้ที่ยังไม่เกิดการหมัก Maravalhas (1970) พบว่าการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำเงินอ่อน ๆ ของเม็ดสีแอนโธไซยานินในเมล็ด เกิดจากการปลดปล่อยกลุ่มแอมโมเนียของกรดอะมิโน ด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์ amino acid oxidases ความเข้มของสีม่วงแดงในเมล็ดโกโก้สัมพันธ์กับค่าพีเอชที่ลดลง การตายของเมล็ดและกิจกรรมของเอนไซม์ไกลโคซิเดส เอนไซม์ไกลโคซิเดสทำหน้าที่ตัดโมเลกุลของแอนโธไซยานินออกเป็นน้ำตาล และแอนโธไซยานิดิน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงรูปร่างทางโมเลกุลนี้ทำให้เกิดการฟอกสีม่วงของเนื้อเยื่อเมล็ดโกโก้ ภายใต้สภาวะไร้อากาศ หลังจากนั้นเอนไซม์โพลิฟีนอลออกซิเดสจึงทำปฏิกิริยาในช่วงสุดท้ายของการหมักและการทำแห้ง ทำให้เกิดการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลขึ้นในเมล็ดโกโก้

เมล็ดโกโก้ที่ไม่ผ่านการหมักนั้นมีเม็ดสี β-D-galactosidyl cyanidin และ 3-α-L-arabinosidyl cyanidin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารไซยานิดีน อันเป็นสารตั้งต้นการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์กลุ่มไกลโคซิเดส แต่ยังไม่ทราบกลไกการเกิดปฏิกิริยาที่แน่นอนสันนิฐานว่าอาจมีเอนไซม์ชนิดหนึ่งเข้าจับกับสายที่เป็นพันธะแบบแอลฟา (α-linkages) ส่วนเอนไซม์อีกชนิดเข้าจับกับสายที่เป็นพันธะเบตา (β-inkages) เอนไซม์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ศึกษาในรูปของเอนไซม์ที่ไม่บริสุทธิ์โดยการสกัดด้วยอะซีโตน พีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ประมาณ 3.8 - 4.5 แต่สามารถคงตัวได้ตั้งแต่

พีเอช 4.0 - 9.0 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสได้นาน 17 ชั่วโมง (Forsyth and Quesnel, 1957a; 1975b)

6.2 เอนไซม์กลุ่มโปรติเอส (Proteases)

ในระหว่างการหมักที่มีสภาพไร้อากาศนั้น การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนกรดอะมิโนโปรตีนเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน Dewitt (1957) ศึกษาการปล่อยกรดอะมิโนไนโตรเจน และโปรตีนไนโตรเจน ระหว่างการหมักของเมล็ดโกโก้พันธ์ ICS-1 ในประเทศตรินิแดด ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าปริมาณไนโตรเจนที่ไม่ละลายในเอทานอลลดลงอย่างมาก ขณะเดียวกันมีการเพิ่มของกรดอะมิโนไนโตรเจนมากขึ้น อัตราส่วนของการเปลี่ยนแปลงค่าดังกล่าวมีค่าต่ำในช่วงฤดูร้อน อันมีสาเหตุมาจากการระเหยน้ำอย่างรวดเร็วของเมล็ดโกโก้ในขณะหมักจนทำให้ค่า water activity ในเมล็ดมีต่ำกว่าจุดวิกฤตของการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน นอกจากนั้นพบว่าการให้ความร้อนแก่เมล็ดโกโก้ที่อุณหภูมิ 40 45 และ 50 องศาเซลเซียส มีผลในการเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนไนโตรเจนน้อยกว่าการเพิ่มระยะเวลาในการหมักเมล็ดโกโก้

6.3 เอนไซม์กลุ่มโพลิฟีนอล ออกซิเดส (polyphenol oxydases)

เอนไซม์กลุ่มนี้มีการศึกษากันมาก มีความสำคัญมากในระยะการบ่มเมล็ดโกโก้มีความสัมพันธ์กับการเตรียมเมล็ดโกโก้ในการหมัก การรักษาเมล็ดโกโก้ และการวิเคราะห์เอนไซม์ ปฏิกิริยาของเอนไซม์ โพลิฟีนอล ออกซิเดส คือ เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารอิพิคาทิชิน (-)-epicatechin) ไปเป็นควิโนน (quinone) ซึ่งจะเกิดการรวมกับตัวเองหรือสารประกอบควิโนนตัวอื่น ๆ เป็นสารประกอบสีน้ำตาลขึ้น การออกซิไดซ์อิพิคาทิชินทำให้เกิดสีน้ำตาลอย่างถาวรขึ้นในเมล็ดโกโก้ เป็นผลให้มีการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดและมีผลในการลดปริมาณโปรตีนอันเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์โปรติเอสลง ปฏิกิริยาของเอนไซม์ โพลิฟีนอล ออกซิเดส และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาดังกล่าวมีความสำคัญต่อการหมักเมล็ดโกโก้ คือ ก่อให้เกิดสารสีน้ำตาลขึ้นในเมล็ดโกโก้ ช่วยลดความขมของสารแทนนินลงและทำให้โปรตีนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซึ่งโปรตีนสีน้ำตาลนั้นมีผลช่วยลดกลิ่นไหม้ในเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการอบแห้งลงได้ (Lehrian and Patterson, 1983)

Grifiths (1957) แยกสารแอนโธไซยานิน 2 ชนิด คือ ลิวโคแอนโธไซยานิน (leucoanthocyanin) และอิพิคาทิชิน ออกมาจากเมล็ดโกโก้ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นกระดาษ แล้วนำแผ่นกระดาษมาพ่นด้วยสารละลายเอนไซม์โพลิฟีนอลออกซิเดสจากเมล็ดโกโก้ พบว่าโกโก้

พันธุ์ฟอรัสเตอโร และคริโอโล ให้ผลการทดลองที่เหมือนกันคือสารอิพิคาทิชินนั้น เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล

Quesnel (1966, 1968) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โพลิฟีนอลออกซิเดสจากเมล็ดโกโก้ โดยเตรียมในรูปการตกตะกอนด้วยอะซีโตน พบว่าส่วนสกัดได้มีค่าพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 6 อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 31.5 องศาเซลเซียส ถึง 34.5 องศาเซลเซียส และพบว่าเอนไซม์โพลิฟีนอลออกซิเดสในเมล็ดโกโก้นั้น ถูกยับยั้งด้วยสารพิษบางชนิดที่มีส่วนประกอบของทองแดงอยู่ คือสารไดเอทิลไดไธโอคาร์บาเมต ซึ่งมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งที่ได้จากเมล็ดโกโก้ที่ผ่านและไม่ผ่านการหมัก คุณสมบัติของเอนไซม์โพลิฟีนอลออกซิเดส ในเมล็ดโกโก้มีความแปรปรวนไปตามสายพันธุ์ของโกโก้ (Lehrian and Patterson, 1983)

7. องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ และการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในระหว่างการหมัก

การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้นั้น มีทั้งการเปลี่ยนแปลงในเยื่อหุ้มเมล็ดซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงภายนอก และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในเมล็ดโกโก้ เป็นผลให้เอนไซม์ต่าง ๆ ในเมล็ดโกโก้เกิดกิจกรรมขึ้น มีการสร้างสารต่าง ๆ ที่เป็นสารตั้งต้นของกลิ่นรสช็อกโกแลตขึ้นมา

7.1 การเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

องค์ประกอบในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีน้ำอยู่ประมาณร้อยละ 80 - 90 นอกจากนั้นเป็นองค์ประกอบอื่น แต่ไม่มีกรดที่ระเหยได้ และแอลกอฮอล์อยู่ (Forsyth and Quesnel, 1963; Jones and Jones, 1984) องค์ประกอบต่าง ๆ แสดงดังตาราง 4 เมื่อหมักเมล็ดโกโก้น้ำตาลส่วนใหญ่ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ถูกใช้ไปภายใน 24 - 48 ชั่วโมง แอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีค่าสูงสุดประมาณวันที่ 2 - 3 ของการหมัก หลังจากนั้นลดปริมาณลง กรดแลคติกเพิ่มขึ้นตลอดการหมัก ขณะที่กรดแอซีติกเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 4 - 5 ของการหมัก หลังจากนั้นมีปริมาณลดลง เช่นกัน (Wood and Lass, 1985) ส่วนกรดซิตริกและกรดมาลิกถูกย่อยสลายในระหว่างการหมัก (Roelofsen, 1958)

Quesnel (1968) กล่าวว่าการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในกองหมักเมล็ดโกโก้นั้นมีความสัมพันธ์กับความเป็นกรดและการเพิ่มขึ้นของพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้สดมีพีเอชประมาณ 3.5 - 4.0 ตลอดการหมักพีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 5.0 - 6.5 เป็นผลจากปัจจัย 2 ประการ

ประการแรกคือ มีการสร้างกรดแลคติก และกรดแอซีติกขึ้นมา ซึ่งมีความแรงของการแตกตัวน้อยกว่ากรดซิตริก ทั้งยังเกิดการออกซิไดซ์ขึ้นกับกรดซิตริก และประการที่สองคือการให้อากาศแก่กองหมักทำให้เกิดการออกซิไดซ์ของกรดแลคติกและกรดแอซีติกขึ้นตามมา

Packiyasothy, *et al.* (1981) พบว่าเมล็ดโกโก้ที่เก็บเกี่ยวก่อนระยะเวลากำหนดประมาณ 45 วัน เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้จะมีน้ำตาลอิสระอยู่น้อย เมื่อนำมาหมักจะเกิดเอทานอลต่ำกว่าเมล็ดโกโก้ที่สุกเต็มที่ นอกจากนั้นฝักโกโก้ที่แก่เต็มที่มีปริมาณสารเพกตินในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ต่ำลงด้วย

ตาราง 4 องค์ประกอบต่าง ๆ ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้สด

องค์ประกอบ	ร้อยละโดยน้ำหนัก
น้ำ	80-90
น้ำตาลกลูโคส	8-13
น้ำตาลซูโครส	0.4-1.0
กรดอินทรีย์ที่ระเหยไม่ได้	0.2-0.4
สารอัลบูมินอยด์ และสารให้ความฝาด	0.5-0.7
เกลือ (โพแตส โซดา แคลเซี่ยม แมกนีเซียม)	0.4-0.45
แป้ง	ปริมาณเล็กน้อย
น้ำตาลฟรุกโตส	ปริมาณเล็กน้อย
เหล็กออกไซด์	0.03
กรดอินทรีย์ที่ระเหยได้	ไม่มี
แอลกอฮอล์	ไม่มี

ที่มา : ดัดแปลงจาก Forsyth and Quesnel (1963); Jones and Jones (1984)

7.2 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของเมล็ดในโกโก้

7.2.1 น้ำตาล

Carbulis (1954; 1955) ใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นกระดาษจำแนกชนิดของน้ำตาลในเมล็ดโกโก้ออกได้เป็น ดี-ฟรุกโตส ดี-กลูโคส ดี-กาแลคโตส ซูโครส ราฟฟิโนส สตาไครโอส มีลิไบโอส เมโนไตรโอส และน้ำตาลอื่น ๆ ที่ไม่สามารถจำแนกได้อีก 3 ชนิด ส่วนในเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการอบแห้งแล้วนั้นพบว่า มีกลีเซอรอล อิโนซีทอล และโพลิแซคคาไรด์เพนทีโอส คือ verbascotetraose และ verbascoe การอบแห้งเมล็ดโกโก้นั้นเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลของกรดอะมิโนกับน้ำตาลอิสระในเมล็ดโกโก้ ทำให้ปริมาณน้ำตาลอิสระในเมล็ดโกโก้ลดลง (Lehrian and Patterson, 1983)

Rohan และ Stewart (1967) ศึกษาการย่อยสลายของน้ำตาลซูโครสเป็นกลูโคส และฟรุกโตส ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในประเทศกานา และไนจีเรีย โดยการวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้ตลอดเวลาการหมัก 6 วัน พบว่าน้ำตาลทั้งหมดมีค่าลดลงตลอดการหมัก ส่วนน้ำตาลรีดิวซ์นั้นมีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 4 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์จึงลดลง และพบว่าเมล็ดโกโก้จากกานาและไนจีเรียหลังจากสิ้นสุดการหมักแล้วมีน้ำตาลในรูปน้ำตาลทั้งหมดอยู่ประมาณร้อยละ 70 และร้อยละ 60 ตามลำดับ

Reineccius, *et al.* (1972) ศึกษาและรายงานชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่พบในเมล็ดโกโก้และเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ดังตาราง 5 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชนิดของน้ำตาลที่พบในเมล็ดโกโก้สายพันธุ์ต่าง ๆ นั้นไม่แตกต่างกัน แต่อัตราส่วนน้ำตาลที่พบจะแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ที่เห็นชัดเจนคือ อัตราส่วนของน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส เมล็ดโกโก้สายพันธุ์จากบราซิลมีอัตราส่วนน้ำตาลฟรุกโตสต่อน้ำตาลกลูโคสเป็น 16:1 เมล็ดโกโก้สายพันธุ์จากการ์นามีอัตราส่วนน้ำตาลฟรุกโตสต่อน้ำตาลกลูโคสเป็น 7:1 สายพันธุ์จากอาร์ริบามีอัตราส่วนต่ำกว่า 2:1 และสายพันธุ์จาก Sanchez มีค่าอัตราส่วนเป็น 1:1 ซึ่งปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความแตกต่างของอัตราส่วนดังกล่าวคือกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่มีในการหมัก เมล็ดโกโก้ในเมล็ดโกโก้สดที่เก็บมาจากต้นใหม่ ๆ พบว่าน้ำตาลซูโตรสเพียงชนิดเดียวที่มีปริมาณมาก ในระหว่างการหมักน้ำตาลซูโครสถูกย่อยสลายเป็นน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตสอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 3 วันแรกของการหมัก

ตาราง 5 องค์ประกอบของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในเมล็ดโกโก้ที่ไม่ผ่านการอบแห้ง

น้ำตาล	แหล่งปลูกโกโก้ต่าง ๆ			
	Sanchez[1]	Arriba[2]	Bahia[3]	Ghana[3]
	ร้อยละ (ในรูปน้ำตาลอิสระทั้งหมด)			
เพนทิทอล	2.4	4.5	2.7	3.0
ฟรุกโตส	19.4	21.8	52.3	57.0
ซอร์โบส	2.4	3.3	9.8	6.1
แอลฟา- และ เบตา-กลูโคส	18.5	14.0	3.3	8.2
แมนนิทอล	2.2	2.3	21.4	8.9
อิโนซิทอล	1.6	1.5	4.2	2.3
ซูโครส	53.6	51.4	4.2	14.0
น้ำตาลชนิดอื่น ๆ	0.9	1.2	2.1	0.5
น้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด	40.3	38.2	66.4	71.3
	มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม เมล็ดโกโก้			
ซูโครส	1000.0	683.0	55.0	120.0
น้ำตาลรีดิวซ์	747.0	510.0	855.0	612.0
น้ำตาลทั้งหมด	1856.0	1332.0	1308.0	858.0

ที่มา : Reineccius, *et al.* (1972)

1 = เมล็ดโกโก้ที่ไม่ผ่านการหมัก

2 = เมล็ดโกโก้ที่ผ่านการหมักในระยะสั้น ๆ (2 - 3 วัน)

3 = เมล็ดโกโก้ที่ผ่านการหมักอย่างสมบูรณ์

Berbert (1979) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลระหว่างการหมักในเมล็ดโกโก้จากบราซิลในเมล็ดและเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ พบว่าเมล็ดโกโก้ที่ไม่ผ่านการหมักนั้นน้ำตาลส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครส หลังจากหมักเมล็ดโกโก้เป็นเวลา 6 วัน น้ำตาลซูโครสทั้งหมดถูกย่อยสลายมีน้ำตาลฟรุกโตสเพิ่มขึ้นในระยะ 4 วันแรกของการหมัก และมีระดับคงที่จนสิ้นสุดการหมัก น้ำตาลกลูโคสมีปริมาณต่ำเกือบตลอดการหมัก อัตราส่วนของน้ำตาลฟรุกโตสต่อน้ำตาลกลูโคสมีค่าเป็น 9:1 และปริมาณน้ำตาลส่วนใหญ่ในเยื่อหุ้มเมล็ดและผนังเมล็ดมีการเปลี่ยนแปลงคือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส มีปริมาณลดลงในระหว่างการหมักแต่น้ำตาลแมนนิทอลมีปริมาณเพิ่มขึ้น

7.2.2. โพลิแซคคาไรด์

Rohan (1963b) รายงานการศึกษาปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ต่าง ๆ ในเมล็ดโกโก้แห้งจากแอฟริกาตะวันตกที่ไม่ผ่านการหมัก แสดงดังตาราง 6 แต่ปรากฏว่าเมล็ดโกโก้ที่ได้นั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงบางอย่างที่เป็นผลจากการหมักขึ้นในระหว่างการทำแห้ง เพราะผลการทดลองไม่ปรากฏปริมาณของน้ำตาลซูโครสอยู่เลย

ตาราง 6 ชนิดและปริมาณของสารโพลิแซคคาไรด์ในเมล็ดโกโก้ที่ไม่ผ่านการหมัก

องค์ประกอบ	ร้อยละในเมล็ดแห้ง
กลูโคส	0.30
ซูโครส	ไม่พบ
แป้ง	6.10
เพกติน	2.25
เส้นใย	2.09
เซลลูโลส	1.92
เพนโตแซน	1.27
เยื่อเมือก และ กัม	0.38

ที่มา : Rohan (1963b)

Schmieder และ Keeney (1980) ศึกษาปริมาณและคุณลักษณะของแป้งในเมล็ดโกโก้ พบว่ามีอยู่ร้อยละ 4.50 - 7.00 โดยศึกษาจากตัวอย่างเมล็ดโกโก้ที่สุ่มเก็บมาจากแหล่งปลูกต่างกัน 7 แห่ง มีค่าเฉลี่ยของแป้งในเมล็ดโกโก้ตัวอย่างมีค่าเป็นเท่ากับร้อยละ 5.3 ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้แบบกล่องหมักเป็นเวลา 6 วัน ในประเทศบราซิล พบว่าแป้งในเมล็ดโกโก้เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ซึ่งในตอนแรกมีประมาณร้อยละ 5.5 เมื่อเทียบกับปริมาณของแข็งทั้งหมดในเมล็ด แต่ในวันสุดท้ายของการหมักมีแป้งเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 6.5 ของปริมาณของแข็งทั้งหมดในเมล็ด การเพิ่มขึ้นของแป้งในเมล็ดโกโก้นี้มีผลจากการที่เมล็ดสูญเสียปริมาณของแข็งที่ละลายได้อื่น ๆ ที่ไม่ใช่แป้ง แต่ Lehrian และ Patterson (1983) กล่าวว่าในระหว่างการหมักไม่พบการเปลี่ยนแปลงของแป้งในเมล็ดโกโก้ และแป้งในเมล็ดโกโก้ประกอบด้วยอะไมโลสร้อยละ 36 และอะไมโลเพกตินร้อยละ 64

7.2.3. โปรตีน

Hardy และ Rodriguse (1952) ศึกษาปริมาณของสารประกอบไนโตรเจนในเมล็ดโกโก้พันธุ์คริโอโล และพันธุ์ไฟอเรสเตอร์โรที่ไม่ผ่านการหมัก พบว่า พันธุ์ไฟอเรสเตอร์โรมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสูงกว่าพันธุ์คริโอโล แต่การที่เมล็ดโกโก้มีปริมาณโปรตีนสูงนั้นต้องใช้เวลาในการหมักนานกว่าพันธุ์ที่มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่า นอกจากนี้ต้นโกโก้ที่มีอายุอ่อนจะให้เมล็ดโกโก้ที่มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดสูงกว่าเมล็ดโกโก้จากต้นที่มีอายุมาก (Offem, 1990)

Dewitt (1957) แยกสารประกอบไนโตรเจนในเมล็ดโกโก้สด โดยการสกัดด้วยเอทานอล สามารถแยกออกได้เป็นส่วนของสารที่ละลายได้ในเอทานอล และส่วนที่ไม่ละลายในเอทานอล ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าในเมล็ดโกโก้สดนั้นประกอบด้วยปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และเปปไทด์อยู่น้อย องค์ประกอบของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ในส่วนสกัดโปรตีนจากเมล็ดโกโก้สด แสดงดังตาราง 7

การเปลี่ยนแปลงโปรตีนในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้นั้นพบว่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงสองวันแรกของการหมัก ทั้งนี้เพราะว่าไนโตรเจนจากส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ด มีการเคลื่อนย้ายเข้าสู่ภายในเมล็ด หลังจากนั้นปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมดลดลงในอัตราที่เกือบคงที่ตลอดการหมัก การย่อยสลายโปรตีนนั้นเกิดขึ้นหลังจากเริ่มต้นการหมักต่อไปจนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก การลดลงของโปรตีนสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และเปปไทด์ (Dewitt, 1957; Roelofsen, 1958) แต่เมล็ดโกโก้ที่มีปริมาณกรดอะมิโน

หรือเปปไทด์สูงไม่ได้เป็นปัจจัยสำคัญในการทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดีกับเมล็ดโกโก้ (Biehl, *et al.*, 1985)

Niepage (1961) พบว่าโปรตีนทั้งหมดในเมล็ดโกโก้ที่ไม่ผ่านการหมักประกอบด้วย อัลบูมินร้อยละ 8.2 โกลบูลินร้อยละ 2.1 โปรลามีนร้อยละ 4.7 กลูทีลินร้อยละ 16.3 และองค์ประกอบที่ไม่ละลายอีกร้อยละ 69.9 ส่วนเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการหมักแล้วมีอัลบูมินร้อยละ16.4 โกลบูลินร้อนละ 1.2 โปรลามีนร้อยละ 7.7 กลูทีลินร้อยละ 32.3 และองค์ประกอบที่ไม่ละลายอีกร้อยละ 42.5 แต่รายงานครั้งนี้ไม่ได้คำนึงถึงการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารโพลิฟีนอลกับโปรตีน ซึ่งปริมาณกรดอะมิโนจำนวนมากในองค์ประกอบที่ไม่ละลายน้ำนั้นเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของโปรตีนกับสารเพกตินในระหว่างที่มีการย่อยสลายโปรตีน

Zak และ Keeney (1976a; 1976b) ทำการหมักเมล็ดโกโก้ในประเทศตรินิแดด พบว่าในระหว่างที่ฝักโกโก้พัฒนาจากฝักอ่อนไปเป็นฝักแก่ ปริมาณโปรตีนในเมล็ดโกโก้มีค่าลดลงประมาณร้อยละ 25 แต่เมื่อฝักโกโก้แก่เต็มที่แล้วปริมาณโปรตีนทั้งหมดในเมล็ดโกโก้เปลี่ยนแปลงไม่มาก และในระหว่างการหมักปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ลดลงถึงร้อยละ 56 ความสัมพันธ์ของอัตราส่วนกรดอะมิโนทั้ง 4 กลุ่ม เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการหมักคือ อัลบูมินเพิ่มขึ้นร้อยละ 40 - 70 ขณะที่โกลบูลิน โปรลามีน และกลูทีลินมีปริมาณลดลง การลดลงของโปรตีนที่สกัดได้เป็นผลจากการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลในเมล็ดโกโก้ ส่วนอัลบูมินที่เพิ่มขึ้นเกิดจากการย่อยสลายโปรตีนของสารประกอบโปรตีนเชิงซ้อนในเมล็ดโกโก้

ตาราง 7 องค์ประกอบของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ในส่วนสกัดโปรตีนจากเมล็ดโกโก้สด

กรดอะมิโน	มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อเมล็ด	ร้อยละโมล
กรดแอสพาติก	1.63	12.96
กรดกลูตามิก	2.28	20.03
ไกลซีน	1.43	6.41
อาลานีน	0.84	4.47
วาลีน	0.43	3.01
ลิวซีน	0.67	5.24
ไอโซลิวซีน	0.25	1.96
ซีรีน	0.93	5.84
ทรีโอนีน	0.72	5.13
เฟนิลอาลานีน	0.68	6.71
ไฮโรซีน	0.63	6.82
ซีสติอีน	0.07	1.00
เมไธโอนีน	0.05	0.44
โปรลีน	0.71	4.88
ทริปโตเฟน	0.18	1.10
ฮีสติดีน	0.24	0.74
ไลซีน	1.36	5.94
อาร์จินีน	2.82	7.34
แอมโมเนีย	4.36	-
	ผลรวม 20.28 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อเมล็ด	

ที่มา : Dewitt (1957)

7.2.4. ไขมัน

ปริมาณไขมันในเมล็ดโกโก้มีอยู่มากกว่าร้อยละ 50 โดยน้ำหนักเมล็ดโกโก้แห้ง (Lehrian and Patterson, 1983) ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันที่สำคัญคือ กรดปาล์มมิติก กรดสเตียริก และกรดโอลีอิก นอกจากนี้ยังประกอบด้วยกรดไขมันชนิดอื่น ๆ ในปริมาณต่ำ คือ กรดไมริสติก กรดลิโนลีอิก กรดลิโนลีนิก กรดอราไคดิก ซึ่งในไขมันโกโก้นั้นมีสารไตรกลีเซอไรด์อยู่ประมาณร้อยละ 98 Packiyasothy, *et al.* (1981) กล่าวว่าการหมักเมล็ดโกโก้ที่ได้จากฝักที่ยังไม่แก่เต็มที่จะมีการสูญเสียไขมันในเมล็ดสูงถึงประมาณร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบกับฝักโกโก้ที่แก่เต็มที่ Humphries (1939) ทำการหมักเมล็ดโกโก้ในประเทศทรินิแดด พบว่าปริมาณไขมันในเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการหมักเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 4 เมื่อเทียบกับน้ำหนักแห้ง เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวไปเปลี่ยนให้อยู่ในรูปปริมาณไขมันที่มีต่อเมล็ดโกโก้แห้ง 100 เมล็ด พบว่าปริมาณไขมันเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงสองวันแรกของการหมักหลังจากนั้นลดลงในอัตราคงที่จนสิ้นสุดการหมัก มีผลให้ปริมาณไขมันทั้งหมดลดลงเล็กน้อยในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 6) แต่ปริมาณที่ลดลงนี้มีน้อยมากจนไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งประมาณได้ว่าไขมันในเมล็ดโกโก้ไม่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมัก (อรพิน ภูมิภมร และคณะ, 2536; Bracco, *et al.*, 1969; Forsyth and Quesnel, 1963; Roelofsen, 1958)

7.2.5. กรดอินทรีย์

กรดอินทรีย์ที่ระเหยได้และระเหยไม่ได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสารอาหารในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ขณะหมักโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ หลังจากนั้นกรดจึงแพร่เข้าไปยังส่วนเมล็ดโกโก้ ทำให้ค่าพีเอชของเมล็ดลดลง (Jinap, 1989) Rohan และ Stewart (1964) ศึกษากรดที่ระเหยได้ และกรดที่ไม่ระเหยในเมล็ดโกโก้ โดยใช้ตัวอย่างเมล็ดโกโก้แห้งจากแหล่งต่าง ๆ 8 แหล่ง พบว่ากรดแอซีติกเป็นกรดระเหยได้ที่พบในปริมาณสูงสุด มีค่าเฉลี่ยในตัวอย่างเมล็ดโกโก้ เท่ากับร้อยละ 0.30 ปริมาณกรดระเหยได้ทั้งหมดอยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 0.33 - 1.14 ปริมาณกรดที่ไม่ระเหยมีค่าโดยเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 1.26 และมีช่วงอยู่ระหว่างร้อยละ 1.04 - 5.25 ซึ่งมีกรดซิตริกอยู่มากที่สุด ดังตาราง 8 นอกจากนั้นมีกรดทาร์ตาริก (tartaric acid) กรดแลคติก และกรดฟอสฟอริกอยู่ในปริมาณเล็กน้อย

Weissberger, *et al.* (1971) ศึกษากรดอินทรีย์ที่ไม่ระเหยในเมล็ดโกโก้แห้ง จากแหล่งต่าง ๆ พบว่ามีกรดอินทรีย์ 7 ชนิด ได้แก่ กรดกลูตามิก กรดแลคติก กรดออกซาลิก กรดซัคซินิก

กรดมาลิก กรดทาร์ทาริก และกรดซิตริก และกรดฟอสฟอริกอีก 1 ชนิด ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์แต่ละชนิดแปรเปลี่ยนไปตามแหล่งที่มาของเมล็ดโกโก้ การเปลี่ยนแปลงนี้เป็นผลจากความแตกต่างของกระบวนการจัดการหลังการเก็บผลโกโก้ที่แตกต่างกันไปในแต่ละภูมิภาค การเปลี่ยนแปลงของกรดอินทรีย์ที่ไม่ระเหยในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ แสดงดังตาราง 9 กรดแลคติกที่เพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของกรดซิตริก โดยกระบวนการออกซิเดชั่น

Lopez และ Quesnel (1973) ศึกษากรดที่ระเหยได้ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักเป็นเวลา 8 วัน ที่สภาวะต่าง ๆ กัน พบว่าในฤดูฝนซึ่งเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีความชื้นสูง ทำให้เกิดการจำกัดการไหลผ่านของอากาศในกองหมัก เกิดการสร้างกรดอินทรีย์ที่ระเหยได้น้อยกว่าการหมักในช่วงที่เป็นฤดูแล้ง กรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ถูกสร้างขึ้นในช่วงแรกของการหมักจนถึงขั้นตอนการทำแห้ง การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเอทานอลและกรดแอซีติกในเมล็ดโกโก้เกิดขึ้นหลังการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอทานอล และกรดแอซีติกในเยื่อหุ้มเมล็ด กรดแอซีติกในเยื่อหุ้มเมล็ดซึมผ่านเข้าสู่เมล็ดโกโก้ทำให้เมล็ดโกโก้ตาย เอนไซม์ในเมล็ดเกิดการทำงาน ซึ่งมีผลต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้ (Biehl, *et al.*, 1982; Roelofsen, 1958) การหมักเมล็ดโกโก้หากหยุดลงในขณะที่มีความเข้มข้นของกรดแอซีติกสูงก็ไม่มีผลต่อปริมาณกรดแอซีติกในเมล็ดโกโก้มาก หากรีบนำเมล็ดโกโก้ที่ได้ไปทำแห้งโดยทันที ช็อกโกแลตที่เตรียมจากเมล็ดโกโก้ที่มีปริมาณกรดสูงนั้นมีคุณสมบัติของกลิ่นรสช็อกโกแลตต่ำลง แต่การที่เมล็ดโกโก้มีกรดสูงไม่ได้เป็นปัจจัยสำคัญในการสร้างกลิ่นรสที่ดีของเมล็ดโกโก้ (Biehl, *et al.*, 1985)

Quesnel (1965b) ศึกษากรดที่ให้กลิ่นหอม (aromatic acids) ในเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการหมักแล้ว พบว่ามีทั้งหมด 11 ชนิด ในจำนวนนี้มีอยู่ 5 ชนิด ที่พบได้ในเมล็ดโกโก้ที่ไม่ผ่านการหมัก แสดงดังตาราง 10

ตาราง 8 ปริมาณกรดที่ระเหยได้ และกรดที่ไม่ระเหยในตัวอย่างเมล็ดโกโก้แห้งจากแหล่งต่าง ๆ

ตัวอย่างเมล็ดโกโก้จากแหล่งต่าง ๆ	กรดที่ระเหยได้ (ร้อยละกรดแอซีติก)[1]			กรดที่ไม่ระเหย (% Eq.Wt.60)[1]		
	รูปอิสระ	รูปไม่อิสระ	รวม	รูปอิสระ	รูปไม่อิสระ	รวม
อาร์ครา	0.27	0.13	0.40	0.91	1.07	1.98
อาริบาร์	0.36	0.54	0.90	0.54	0.50	1.04
บราซิล	0.43	0.10	0.53	0.48	1.48	1.96
คาร์รูปาโน	0.23	0.91	1.14	4.43	0.82	5.25
เกรนาดา	0.17	0.17	0.34	0.64	1.18	1.82
นิวกินี	0.88	0.21	1.09	1.44	1.23	2.67
เปอร์โต คาร์บิลโล	0.16	0.17	0.33	0.87	1.33	2.20
ซานเซสต์	0.22	0.15	0.37	0.80	0.79	1.59

ที่มา : Rohan และ Stewart (1964)

1 = คิดโดยเทียบต่อหน่วยน้ำหนักแห้ง

ตาราง 9 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ที่ไม่ระเหยในเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการหมักและเมล็ดโกโก้ที่ไม่ผ่านการหมัก

กรด	เมล็ดที่ไม่ผ่านการหมัก	เมล็ดที่ผ่านการหมัก
	(กรัมต่อ 100 กรัมเมล็ดโกโก้สด)	
แลคติก	0.15	2.34
ออกซาลิก	0.25	0.28
ซัคซินิก	0.06	0.03
มาลิก	0.11	0.09
ซิตริก	0.98	0.42

ที่มา : Weissberger, *et al.* (1971)

ตาราง 10 แสดงชนิดของกรดที่ให้กลิ่นหอมที่พบในเมล็ดโกโก้

ชนิดกรด	เมล็ดโกโก้ที่ผ่านการหมัก	เมล็ดโกโก้ที่ไม่ผ่านการหมัก
อีสคูลีติน	+	-
พารา-คูมาริก	+	+
เฟอรูอิก	+	+
ออร์โท-ไฮดรอกซีฟีนิลแอซีติก	+	-
พารา-ไฮดรอกซีเบนซิอิก	+	+
พารา-ไฮดรอกซีฟีนิลแอซีติก	+	-
ฟีนิลแอซีติก	+	-
โฟลรีติก	+	-
โปรโตคาทีคูอิก	+	-
ไซรีมจิก	+	+
วานิลลิก	+	+

ที่มา : Quesnel (1965b), + = พบในเมล็ดโกโก้, - = ไม่พบในเมล็ดโกโก้

8. การทำแห้งและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีระหว่างการทำแห้ง

เมล็ดโกโก้หลังจากที่หมักครบตามเวลาแล้วถูกนำไปทำแห้งด้วยวิธีการตากแดดโดยตรง หรือใช้ตู้อบแห้ง การทำแห้งทำให้ความชื้นในเมล็ดลดลง ปริมาณกรดที่ระเหยได้ลดลง ก่อให้เกิดการออกซิเดชั่นของสารตั้งต้นของกลิ่นรสช็อกโกแลต และมีผลต่อการพัฒนาของกรดแลคติก ซึ่งหากความชื้นในเมล็ดลดลงในอัตราที่ช้าเกินไปทำให้กรดแลคติกเกิดได้ดี นอกจากนั้นการทำแห้งยังยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนเมล็ดโกโก้ได้ด้วย เพื่อให้ได้เมล็ดโกโก้แห้งที่มีคุณภาพและสามารถเก็บไว้ได้นานควรมีความชื้นสุดท้ายในเมล็ดโกโก้ไม่เกินร้อยละ 7 ทั้งยังป้องกันการเสื่อมเสียของเมล็ดจากแมลงได้ด้วย (มงคล ทัศนีย์ทิพากร, 2535)

Rohan (1963b) แบ่งวิธีการอบแห้งเมล็ดโกโก้เป็นสองวิธีคือการอบแห้งแบบธรรมชาติโดยใช้แสงอาทิตย์ และการอบแห้งแบบเทียม (artificial drying) หรือการอบแห้งด้วยตู้อบ โดยทั่วไปการทำแห้งเมล็ดโกโก้เกษตรกรนิยมใช้วิธีการตากแดดบนถาดไม้ บนกระสอบป่าน หรือบนวัสดุพื้นเรียบซึ่งทำได้ง่าย และประหยัดค่าใช้จ่าย แต่วิธีนี้สามารถให้ผลดีต่อเมื่อมีปริมาณ และระยะเวลาของแสงแดดนานเพียงพอ (Lehrian and Patterson, 1983) การทำแห้งโดยแสงอาทิตย์ใช้เวลาประมาณ 6 วัน ในที่ที่มีอากาศแห้งและใช้เวลานานถึง 3 สัปดาห์ในที่ที่มีอากาศชื้น ส่วนการทำแห้งเมล็ดโกโก้โดยการอบแห้งด้วยความร้อนจากแหล่งอื่น ซึ่งสามารถใช้ได้ดีกรณีที่มีเมล็ดโกโก้มาก ๆ และในฤดูฝน หรือช่วงที่อากาศมีความชื้นสูง แต่ Carr, *et al.* (1979) กล่าวว่าวิธีการทำแห้งทั้ง 2 วิธีที่กล่าวมานั้นให้คุณภาพของเมล็ดโกโก้ที่ไม่แตกต่างกัน ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิกและคณะ (2534) ได้เปรียบเทียบวิธีการอบแห้งเมล็ดโกโก้ โดยการอบแห้งด้วยแสงอาทิตย์โดยตรง อบแห้งโดยใช้ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และการอบแห้งแบบ 2 ระยะ คือ อบแห้งด้วยแสงอาทิตย์โดยตรงจนมีความชื้นร้อยละ 20 - 25 แล้วนำมาอบต่อด้วยตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนเมล็ดโกโก้มีความชื้นร้อยละ 7 พบว่าเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการอบแห้งแบบ 2 ระยะมีคุณภาพที่ดีกว่าในด้านปริมาณกรด สีของเมล็ดโกโก้แห้ง และลักษณะทางกายภาพ

ในขณะทำแห้งมีการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญคือ การเกิดสีน้ำตาลของเมล็ดโกโก้อันเป็นสีเฉพาะของช็อกโกแลตขึ้น ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้ขณะทำแห้งคือ อัตราของการทำแห้ง การทำแห้งที่มีอัตราการระเหยอย่างรวดเร็วโดยใช้อากาศร้อนปานกลาง (65 องศาเซลเซียส) ไหลผ่านในตอนแรกของการอบแห้งนั้นให้ผลที่ดีกว่า เพราะทำให้ความชื้นที่ผิวหน้าของกองเมล็ดโกโก้ที่อบระเหยได้โดยไม่ทำให้เนื้อเมล็ดโกโก้เกิดการหดตัวหรือมีรอยย่น ผลอันนี้ทำให้ออกซิเจน

ซึมผ่านผนังหุ้มเมล็ดได้ ในช่วงสุดท้ายของการอบแห้งเมื่อมีการให้อากาศที่มีอุณหภูมิสูงขึ้นกว่าเดิม (80 องศาเซลเซียส) โดยให้อัตราการไหลผ่านของอากาศต่ำกว่าตอนแรกจะช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนสีของเมล็ดเป็นสีน้ำตาลขึ้น และทำให้ผนังหุ้มเมล็ดเกาะติดกับผิวเมล็ดน้อยลงด้วย คุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้งมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ปริมาณกรดในเมล็ด สีของเมล็ดโกโก้แห้ง ความชื้นในเมล็ดโกโก้แห้ง ปริมาณเมล็ดที่มีเชื้อรา และน้ำหนักของเมล็ดแห้งต่อ 100 เมล็ด โดยเฉพาะกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้แห้ง เพราะกรดชนิดนี้ไม่สามารถขจัดออกได้ในขั้นตอนต่อ ๆ ไป ต่างกับกรดที่ระเหยได้ซึ่งสามารถขจัดออกได้ในการทำแห้งและการผลิตผลิตภัณฑ์ตอนสุดท้าย (Wood and Lass, 1985)

Tomlims, *et al.* (1993) พบว่าสายพันธุ์ของโกโก้ ระยะเวลาในการเก็บฝักโกโก้ และวิธีการหมักเมล็ดโกโก้ มีผลต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้ทั้งด้านเคมี และกายภาพในระหว่างการหมัก แต่วิธีการทำแห้งทั้งแบบใช้แสงแดดโดยตรงและการอบแห้งแบบเทียม ให้คุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้ไม่แตกต่างกันเมื่อใช้วิธีการวัดปริมาณกรด และการผ่าดูสีของเมล็ดแห้ง (cut test) การผ่าดูสีของเมล็ดโกโก้แห้งเป็นวิธีการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดโกโก้ที่ง่าย และทำได้สะดวก โดยอาศัยพื้นฐานการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลของเมล็ดโกโก้ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก กระบวนการเกิดสีน้ำตาลในเมล็ดโกโก้นั้นเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนและกรดอะมิโน (Rohan and Stewart, 1966) รวมถึงการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารโพลิฟีนอลในเมล็ดกับอากาศในสภาพที่มีกรดแอซีติกและอากาศอยู่ (Sanchez, *et al.*, 1985)

นอกจากนี้มีรายงานถึงการใช้อาศัยการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก เช่น ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในเมล็ด เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงสภาวะและคุณภาพของเมล็ดโกโก้ที่หมักอีกด้วย (Bracco, *et al.*, 1969) ค่าดรรชนีของการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบต่าง ๆ ในเมล็ดโกโก้พันธุ์เฟอรัสเตอโร (Amelonado) ที่ได้จากการหมักในกล่องหมัก เป็นเวลา 6 วัน แสดงดังตาราง 11 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาการหมัก กับค่า cut test ของเมล็ดโกโก้ กลิ่นรส ซ็อกโกแลต และค่าดรรชนีองค์ประกอบต่าง ๆ

ตาราง 11 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาการหมักกับค่า cut test ของเมล็ดโกโก้ การเปลี่ยนแปลงกลิ่นรสช็อกโกแลต และการเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีขององค์ประกอบต่าง ๆ

เวลาการหมัก (วัน)	เมล็ดโกโก้ (100 เมล็ด) (cut test)			กลิ่นรสช็อกโกแลต	ค่าดรรชนีองค์ประกอบต่าง ๆ		
	น้ำตาล	ม่วง	หินชนวน		Nitrogen index	Catechin index	Carbohydrate index
0	-	94	6	ไม่มีกลิ่นโกโก้ มีกลิ่นถั่ว รสฝาด	30	1.70	0.245
2	-	80	20	ไม่มีกลิ่นโกโก้ ฉุนกรด รสฝาด	35	0.81	0.262
4	42	54	4	มีกลิ่นโกโก้อ่อน ชม ฝาด	60	0.81	0.915
6	-	-	-	-	40	0.50	1.470
6'	88	10	2	กลิ่นโกโก้แรง ชม ปกติ มีกรดต่ำ	33	0.23	1.660

ที่มา : ดัดแปลงจาก Bracco, *et al.* (1969)

Nitrogen index = (Soluble N/Total N)*100

Catechin index = (catechins/Soluble tannins)

Carbohydrate index = (Glucose + Fructose)/Sucrose

6' = เมล็ดโกโก้ที่ผ่านการทำแห้งด้วยแสงแดดแล้ว

- = ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

โดยทั่ว ๆ ไป เมล็ดโกโก้แห้งที่ได้มาตรฐานต้องมีลักษณะดังนี้

1. ความชื้นของเมล็ดไม่ควรเกินร้อยละ 7
2. น้ำหนักเฉลี่ยของเมล็ดโกโก้แห้งไม่ต่ำกว่า 1 กรัมต่อ 1 เมล็ด
3. มีปริมาณของเปลือกหุ้มเมล็ด (Testa) ไม่เกินร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก
4. มีเมล็ดที่มีเชื้อราไม่ควรเกินร้อยละ 7
5. มีเมล็ดที่มีสีเทาหรือสีหินชนวนไม่เกินร้อยละ 3
6. มีเมล็ดที่มีสีม่วงไม่เกินร้อยละ 3
7. มีเมล็ดที่มีสีม่วงบางส่วนและสีน้ำตาลบางส่วน ได้ร้อยละ 20 ถึงร้อยละ 40
8. มีเมล็ดที่ถูกแมลงเจาะ เมล็ดลีบ และเมล็ดเสียรวมกันไม่เกินร้อยละ 3
9. ไขมันในเมล็ดโกโก้แห้งไม่ต่ำกว่าร้อยละ 55 โดยน้ำหนัก

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์และทางเคมีของเมล็ดโกโก้ที่หมักด้วยจุลินทรีย์ในกลุ่ม ยีสต์ แบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแอซีติก ชนิดต่าง ๆ ที่แยกได้จากธรรมชาติ ในระดับห้องปฏิบัติการ
2. ศึกษาการใช้เชื้อเริ่มต้นที่คัดเลือกในกลุ่มของ ยีสต์ แบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแอซีติก ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ และทางเคมีของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักในกล่องหมัก โดยวิธีการหมักแบบพัฒนา
3. ศึกษาคุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่คัดเลือก
4. เพื่อเป็นแนวทางการพัฒนาการใช้เชื้อบริสุทธิ์เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักเมล็ดโกโก้ของเกษตรกร

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. ผลโกโก้

ใช้ผลโกโก้สดจากสวนของ นายจบ ปานดำ ตำบลสระแก้ว อำเภอ ท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช ซึ่งเป็นพันธุ์โกโก้ที่ได้จากกรมส่งเสริมการเกษตร

2. จุลินทรีย์และอาหารเพาะเลี้ยง

ใช้จุลินทรีย์ที่พบในปริมาณมาก จากการหมักเมล็ดโกโก้ตามปกติในธรรมชาติ 3 กลุ่ม คือ ยีสต์ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae, Candida sorbosa* และ *C. sake* แบคทีเรียแลคติก ได้แก่ *Lactobacillus casei, Leuconostoc mesenteroides* และ *Streptococcus thermophilus* แบคทีเรียแอซีติก ได้แก่ *Acetobacter rancen, A. lovaniense* และ *Gluconobacter oxydan* (ดวงใจ ช่วยสถิตย์, 2535) แยกเก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญเต็มที่แต่ละชนิดในอาหารวุ้นที่เหมาะสมดังนี้ ยีสต์แยกเก็บในอาหาร PDA slant Agar แบคทีเรียแลคติกแยกเก็บในอาหาร MRS Agar แบคทีเรียแอซีติกแยกเก็บในอาหาร Acetobacter Agar แล้วเก็บเชื้อจุลินทรีย์ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำมาทำการถ่ายเชื้อใหม่ทุกสองเดือน

3. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์

สารเคมี และวิธีการเตรียมที่ใช้ในการวิเคราะห์ (แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ข.) อันประกอบด้วย

3.1 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด

3.2 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก

3.3 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดระเหยได้

3.4 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลรีดิวซ์

3.5 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาค่าดรรชนีการหมัก

อุปกรณ์

1. <u>เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง</u>

1.1 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb

1.2 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Model U-2000 ของบริษัท Hitashi Koki Co., Ltd.

1.3 เครื่องแยกเหวี่ยง ชนิดปรับอุณหภูมิได้ Model H-103 NR Series ของบริษัท Kokusan Ensinri Co., Ltd.

1.4 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) Model HM-7E ของบริษัท Tokyo TOA Electronics Ltd.

1.5 เครื่องปั่นละเอียด (Homoginizer) Model AM-8 ของบริษัท Nihonseiki Kaisha Ltd. และเครื่องปั่นผสม (Waring blender)

1.6 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง Model WB-6001-g89061 ของบริษัท Sartorius

1.7 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง Model 4210P ของบริษัท Sartorius

1.8 เครื่องเขย่า (Orbital mixer) ของบริษัท Denley

1.9 ตู้บ่มเชื้อ และตู้อบไฟฟ้า ของบริษัท Memmert.

1.10 ชุดวิเคราะห์หาไขมัน โดยวิธี Soxhlet apparatus Model ME. ของบริษัท Electrothermal Co., Ltd.

1.11 ชุดเครื่องมือวิเคราะห์หากรดที่ระเหยได้

1.12 เครื่องอังน้ำเดือด ชนิดปรับอุณหภูมิได้ 20 - 110 องศาเซลเซียส ของบริษัท Memmert.

1.13 ชุดเครื่องมือวิเคราะห์หาน้ำตาลซูโครส และน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปน้ำตาลกลูโคส

1.14 หม้อนึ่งความดัน

1.15 ตู้เขี่ยเชื้อ (Larminar air flow cabinet) และอุปกรณ์เขี่ยเชื้อ

1.16 ตู้อบแห้งแบบกระแสลมเป่า

2. อุปกรณ์อื่น ๆ

2.1 ปิเปตขนาด 1, 5, 10 และ 25 มิลลิลิตร

2.2 บิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อม clamp

2.3 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 150, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร

2.4 บิกเกอร์ขนาด 50, 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร

2.5 หลอดฝาเกลียวขนาด 13 X 100 มิลลิเมตร

2.6 หลอดทดลองขนาด 12 X 100 และ 16 X 150 มิลลิเมตร

2.7 ขวดฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร

2.8 กระบอกตวงขนาด 100, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร

2.9 จานเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ขนาด 15 X 100 มิลลิเมตร

2.10 ขวดปรับปริมาตร ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร

2.11 เทอร์โมมิเตอร์

2.12 ชุดกรวยกรองแบบสุญญากาศ และกระดาษกรองเบอร์ 1

2.13 โถดูดความชื้น

2.14 กล่องไม้ขนาด 34X76X32 เซนติเมตร (กล่องคู่) (รูปภาคผนวก ก1)

2.15 สมุดเทียบสี Munsell (Macbeth, Division of Kollmorgen Instruments Corporation)

วิธีการ

1. การเตรียมวัตถุดิบ : เมล็ดโกโก้

นำผลโกโก้สุกที่ได้จากสวนของเกษตรกร บ่มไว้ในกระสอบป่านเป็น เวลา 3 วัน แล้ว ทำความสะอาดผลโกโก้โดยล้างด้วยน้ำคลอรีนเข้มข้น 200 ppm และผึ่งให้แห้ง ทำการผ่าเปลือกแกะเมล็ดโกโก้สดทั้งหมดออกจากไส้เมล็ดภายในตู้เขี่ยเชื้อด้วยความระมัดระวัง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ นำเมล็ดโกโก้แบ่งใส่ขวดฝาเกลียวขนาด 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใบละ 500 กรัม สำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

ใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักโกโก้ ประกอบด้วย ยีสต์ แบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแอซีติก ที่พบเป็นปริมาณมากในขั้นตอนการหมักกลุ่มละ 3 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารเหลวดังนี้

- ยีสต์ เลี้ยงในอาหารเหลว Malt Extract
- แบคทีเรียแลคติก เลี้ยงในอาหารเหลว MRS
- แบคทีเรียแอซีติก เลี้ยงในอาหารเหลว Acetobacter

วิธีการเลี้ยง แยกถ่ายเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด ทั้งกลุ่มของยีสต์ และ แบคทีเรียจากหลอดอาหารแข็งที่เก็บเชื้อไว้ ลงเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหาร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 - 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เลี้ยงนาน 18 - 24 ชั่วโมง ทำการแยกเชื้อออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 7000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อสองครั้ง เก็บเชื้อส่วนหนึ่งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อีกส่วนเตรียมเป็นสารแขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์สำหรับใช้เติมลงในการหมักเมล็ดโกโก้

3. การศึกษาสภาวะการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ

ใช้ยีสต์ 3 ชนิดที่พบมากในการหมักเมล็ดโกโก้ตามธรรมชาติ คือ *S. cerevisiae, C. sorbosa* และ *C. sake* เติมลงในขวดฝาเกลียวที่มีเมล็ดโกโก้สด 500 กรัม โดยแยกเติม *S. cerevisiae C.sorbosa หรือ C. sake* ปริมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.5 (Coleman and Ooraikul, 1989) ซึ่งมีเซลล์จุลินทรีย์ประมาณ 10^5 CFUต่อมิลลิลิตรลงไป แล้วนำไปหมักเป็นเวลา 7 วัน ที่สภาวะต่าง ๆ คือ หมักที่อุณหภูมิห้อง หมักในภาชนะที่หุ้มฉนวนกันความร้อน และหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล ทำการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ ทำการวัดอุณหภูมิ และสุ่มตัวอย่างแต่ละชุดการทดลองที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน มาวิเคราะห์ทางเคมีและทางจุลินทรีย์ คือ ค่าพีเอช ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริก กรดแลคติก กรดระเหยได้ในรูปกรดแอซีติก น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปน้ำตาลกลูโคส ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ตรวจนับยีสต์ และ วัดค่า

ดรรชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ เมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมัก 7 วัน นำไปทำแห้งด้วยแสงแดดร่วมกับการอบด้วย ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 - 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 5 วัน กลับเมล็ดทุก ๆ 5 ชั่วโมง จนความชื้นของเมล็ดลดลงเหลือประมาณร้อยละ 7 - 9 แล้วสุ่มตัวอย่างเมล็ดโกโก้แห้งมาวิเคราะห์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครส กรดทั้งหมด กรดที่ระเหยได้ กรดแลคติก ค่าพีเอช ค่าดรรชนีการหมัก ปริมาณไขมัน ปริมาณความชื้น และหาค่า Cut test

เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ เพื่อคัดเลือกสภาวะการหมักที่เหมาะสม สำหรับใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อ ๆ ไป

4. การหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ชนิดเดียว

4.1 <u>บทบาทของยีสต์ในการหมักเมล็ดโกโก้</u>

ใช้ยีสต์แต่ละสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ คือ *S. cerevisiae*, *C. sorbosa* และ *C. sake* และเพาะเลี้ยงตามการทดลองข้อ 2 เติมลงในขวดฝาเกลียวที่มีเมล็ดโกโก้สด 500 กรัม ภายใต้เทคนิคปลอดเชื้อ ใช้เชื้อเริ่มต้นปริมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.5 (Coleman and Ooraikul, 1989) ซึ่งมีเซลล์จุลินทรีย์ประมาณ 10^5 CFUต่อมิลลิลิตรลงไป ทำการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ และทำการหมักในสภาวะที่เหมาะสมตามการทดลองข้อ 3 เป็นเวลา 7 วัน ระหว่างการหมักมีการกำจัดของเหลวที่เกิดจากกระบวนการหมักภายในภาชนะหมักออกทิ้งด้วยปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำการวัดอุณหภูมิ และสุ่มตัวอย่างแต่ละชุดการทดลองที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและทางจุลินทรีย์เช่นเดียวกับข้อ 3

เปรียบเทียบผลที่ได้ภายในกลุ่ม เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสม มากที่สุดเพียงสายพันธุ์เดียว สำหรับใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

4.2 <u>บทบาทของแบคทีเรียแลคติกในการหมักเมล็ดโกโก้</u>

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 4.1 แต่ใช้แบคทีเรียแลคติกแต่ละสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ คือ *L. casei*, *Leu. mesenteroides* และ *S. thermophilus* เป็นเชื้อเริ่มต้นแทน โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง

ประมาณ 0.25 (Coleman and Ooraikul, 1989) ซึ่งมีเซลล์จุลินทรีย์ประมาณ 10^5 CFUต่อมิลลิลิตร ลงไป และตรวจนับแบคทีเรียแลคติก

เปรียบเทียบผลที่ได้ภายในกลุ่ม เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่เหมาะสมมากที่สุดมาเพียงสายพันธุ์เดียว สำหรับใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

4.3 บทบาทของแบคทีเรียแอซีติกในการหมักเมล็ดโกโก้

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 4.1 แต่ใช้แบคทีเรียแอซีติกแต่ละสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ คือ *A. rancen, A. lovaniense* และ *G. oxydan* เป็นเชื้อเริ่มต้นแทน โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.25 (Coleman and Ooraikul, 1989) ซึ่งมีเซลล์จุลินทรีย์ประมาณ 10^5 CFUต่อมิลลิลิตรลงไป และตรวจนับแบคทีเรียแอซีติก

เปรียบเทียบผลที่ได้ภายในกลุ่ม เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียแอซีติกที่เหมาะสมมากที่สุดมาเพียงสายพันธุ์เดียว สำหรับใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

5. บทบาทของเชื้อจุลินทรีย์ผสมต่อการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ

การหมักด้วยจุลินทรีย์หลายชนิดจะใช้ ยีสต์ แบคทีเรียแลคติก และ แบคทีเรียแอซีติกที่คัดเลือกได้ในการทดลองข้อ 4.1 - 4.3 เติมลงในขวดฝาเกลียวที่มีเมล็ดโกโก้ 500 กรัม โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ในขั้นตอนนี้ทำการศึกษาถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้เติมในลักษณะต่าง ๆ กันคือ

5.1 ใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการทดลองข้อ 4 เติมลงไปพร้อมกันในตอนเริ่มต้นการหมักเมล็ดโกโก้ โดยใช้เชื้อเริ่มต้นแต่ละสายพันธุ์ปริมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ แล้วหมักที่สภาวะที่เหมาะสมตามการทดลองข้อ 3 ซึ่งมีชุดการทดลองที่ต่างกัน 3 ชุดการทดลอง ดังนี้

5.1.1 เติมยีสต์ชนิดที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1 แบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.2 และแบคทีเรียแอซีติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.3 ลงไปพร้อมกัน

5.1.2 เติมเฉพาะยีสต์ชนิดที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1 และแบคทีเรียแลคติกชนิดที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.2 ลงไปพร้อมกันในการหมัก

5.1.3 เติมเฉพาะยีสต์ชนิดที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1 และแบคทีเรียแอซีติกชนิดที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.3 ลงไปพร้อมกันในการหมัก

5.2 ใช้จุลินทรีย์ที่คัดเลือกเติมในระยะการหมักที่ต่าง ๆ กัน โดยอ้างอิงการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ จากการศึกษาของ ดวงใจ ช่วยสถิตย์ เมื่อปี พ.ศ. 2535) และใช้เชื้อเริ่มต้นแต่ละสายพันธุ์ปริมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ ซึ่งมีชุดการทดลองในลักษณะต่าง ๆ กัน คือ

5.2.1 เติมยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1 ตอนเริ่มต้นของการหมักโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ หมักที่สภาวะที่เหมาะตามข้อ 3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเติมแบคทีเรียแอซีติกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.3 ลงไป

5.2.2 เติมยีสต์และแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1 และ 4.2 ลงไปในตอนเริ่มต้นของการหมัก โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ หมักที่สภาวะที่เหมาะตามข้อ 3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมแบคทีเรียแอซีติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.3 ลงไป

5.2.3 เติมยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1 ลงไปในตอนเริ่มต้นของการหมักโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ หมักที่สภาวะที่เหมาะตามข้อ 3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.2 และแบคทีเรียแอซีติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.3 ลงไปพร้อมกัน

ทำการหมักต่อจนครบ 7 วัน ระหว่างการหมักทำการวัดอุณหภูมิ และเก็บตัวอย่างแต่ละชุดการทดลองที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน เพื่อตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและทางจุลินทรีย์เช่นเดียวกันกับการทดลองใน ข้อ 3.1

5.3 เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการทดลองข้อ 5.1 และ 5.2 โดยการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติของ ปริมาณกรดแลคติก ค่าดรรชนีการหมัก กรดทั้งหมด กรดที่ระเหยได้ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมัก และในเมล็ดโกโก้แห้ง และค่า Cut Test ของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากการหมัก เพื่อหาความแตกต่างของชุดการทดลอง แล้วคัดเลือกชุดการทดลองที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

6. บทบาทของเชื้อจุลินทรีย์ผสมต่อการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก

ใช้จุลินทรีย์และสภาวะการหมักที่คัดเลือกได้จากการทดลองในตอนที่ 5.3 เติมลงในกองเมล็ดโกโก้ที่เตรียมไว้สำหรับหมัก ซึ่งบรรจุอยู่ในกล่องหมักขนาด 34X76X32 เซนติเมตร (มีลักษณะเป็นกล่องคู่ ดังรูปภาคผนวก ก1) โดยทำการทดลองหมักเมล็ดโกโก้ทั้งหมด 2 ครั้ง ในแต่

ละครั้งใช้เชื้อเริ่มต้นของจุลินทรีย์ปริมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก และหมักด้วยวิธีการหมักแบบพัฒนาตามวิธีของ ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก และคณะ (2534) ที่ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร ทำการวัดอุณหภูมิ และสุ่มตัวอย่างเมล็ดโกโก้หมักที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมัก คือ ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิกองหมัก กรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริก กรดแลคติก กรดที่ระเหยได้ในรูปกรดแอซีติก ปริมาณน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้และในเมล็ดโกโก้ ตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์ แบคทีเรียแลคติก แบคทีเรียแอซีติก และวัดค่าดรรชนีการหมักของเมล็ดโกโก้

เมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักในวันสุดท้ายของการหมักถ่ายใส่ตะแกรงเหล็กกล้าไร้สนิมขนาด 55X110X5 เซนติเมตร (กXยXส) แล้วนำไปทำแห้งด้วยแสงแดดจนมีความชื้นลดลงเหลือประมาณร้อยละ 20 - 25 โดยน้ำหนักเปียก แล้วนำเมล็ดโกโก้ไปอบต่อด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส กลับเมล็ดทุก 3 ชั่วโมง จนเมล็ดโกโก้ที่อบมีความชื้นลดลงเหลือประมาณร้อยละ 7 - 9 โดยน้ำหนักแห้ง เปรียบเทียบผลการทดลองกับชุดการหมักควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ในการทดลองข้อ 7.2

7. ชุดการหมักควบคุม

7.1 ใช้เมล็ดโกโก้สด 500 กรัม ใส่ในขวดฝาเกลียวขนาด 500 มิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากการทดลองข้อ 1 ปล่อยให้เกิดการหมักที่สภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 3.2 โดยไม่เติมเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใด วัดอุณหภูมิ และเก็บตัวอย่างเมล็ดโกโก้ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน มาวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี และทางจุลินทรีย์เช่นเดียวกับข้อที่ 3 เมล็ดโกโก้ที่ได้ในวันสุดท้ายของการหมักนำไปทำแห้งแบบเดียวกับการทดลองในข้อดังกล่าว เปรียบเทียบผลการทดลองกับชุดการทดลองในข้อที่ 4 และข้อที่ 5

7.2 หมักเมล็ดโกโก้ด้วยวิธีการหมักแบบพัฒนาตามวิธีของ ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก และคณะ (2534) ปล่อยให้เกิดการหมักตามปกติในกล่องหมักขนาด 34X76X32 เซนติเมตร (กล่องคู่) แต่ไม่เติมเชื้อจุลินทรีย์ใด ๆ ลงไป วัดอุณหภูมิ และเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน นำมา วิเคราะห์ค่าต่าง ๆ เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 6 เมล็ดโกโก้ที่ได้ในวันสุดท้ายของการหมักนำไป ทำแห้งเช่นเดียวกันกับข้อ 6 เปรียบเทียบผลการทดลองกับชุดการทดลองในข้อ 6

8. การวิเคราะห์

8.1 การวิเคราะห์ทางเคมี (ภาคผนวก ข)

- วัดค่าความเป็นกรดด่าง ทั้งในส่วนเมล็ดและเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้
- วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปร้อยละกรดซิตริก (A.O.A.C., 1990)
- วิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก (Barber and Summerson, 1941)
- วิเคราะห์ปริมาณกรดที่ระเหยได้ในรูปร้อยละกรดแอซีติก (A.O.A.C., 1990)
- วิเคราะห์ปริมาณของน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Luff-Schoorl Method (A.O.A.C., 1990; Egan, *et al.*, 1981) ทั้งในส่วนเมล็ดและเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้
- วิเคราะห์ปริมาณไขมันในเมล็ดโกโก้แห้ง (A.O.A.C., 1990)
- ปริมาณความชื้นในเมล็ดโกโก้แห้ง (A.O.A.C., 1990)
- ตรวจสอบสี และความสมบูรณ์ของเมล็ดโกโก้แห้ง ด้วยวิธี Cut Test ใช้เมล็ดโกโก้แห้ง 30 เมล็ด ผ่าเป็นสองซีก แล้วเทียบสีของเมล็ดกับสมุดเทียบสี Munsell โดยแบ่งสีออกเป็นสีน้ำตาลช็อกโกแลต (10PR3/1 หรือ 2) สีม่วงแกมน้ำตาล สีหินชนวน และสีอื่น ๆ แล้วคิดเป็นร้อยละ ของเมล็ดสีต่าง ๆ

8.2 หาค่าดรรชนีการหมัก (Fermentation Index) ของเมล็ดโกโก้ขณะหมัก (Gourieva and Tserevitinov, 1979) (ภาคผนวก ข)

8.3 การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ตรวจนับจุลินทรีย์โดยวิธี Standard Plate Count Technique (American Public Health Association, 1960) (ภาคผนวก ค) ดังนี้

- ตรวจนับจำนวนเซลล์ยีสต์ บนอาหาร PDA Agar
- ตรวจนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียแลคติก บนอาหาร MRS Agar
- ตรวจนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียแอซีติก บนอาหาร DSM Agar
- ตรวจนับจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ทั้งหมด บนอาหาร TYGKCP Agar

8.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการทดลองในเชิงสถิติ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์จากผลการทดลองที่ได้ทั้งทางกายภาพและทางเคมีกับชนิดหรือกลุ่มของจุลินทรีย์ ที่ใช้ในการหมักเมล็ดโกโก้แต่ละชุดการทดลองในเชิงสถิติ (เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง) โดยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Rang Test) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Irristate Version 91 (1991)

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

การศึกษาสภาวะการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ

ยีสต์ชนิดที่พบในปริมาณมากจากการหมักเมล็ดโกโก้ตามธรรมชาติ 3 ชนิด ได้แก่ *Saccharomyses cerevisiae, Candida sorbosa* และ *C. sake* (ดวงใจ ช่วยสถิตย์, 2535) นำมาเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ ใช้ยีสต์แต่ละชนิดประมาณ 10^5 CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ หมักเมล็ดโกโก้ในสภาวะที่แตกต่างกัน 3 สภาวะ ได้แก่ ที่อุณหภูมิห้อง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และหมักในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของชุดทดลองทั้งด้านจุลินทรีย์และทางเคมี ผลการตรวจนับจุลินทรีย์จากชุดการทดลองต่าง ๆ ระหว่างการหมักเป็นเวลา 7 วัน บนอาหาร PDA และ TYGKCP แสดงดังรูป 1

ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นในชุดการทดลองต่าง ๆ ที่เติมยีสต์แต่ละชนิดมีค่า $6.46X10^5$ ถึง $7.94X10^5$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร PDA พบว่า ชุดการทดลองที่เติมยีสต์และหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีปริมาณจุลินทรีย์สูงสุดหลังจากหมักได้หนึ่งวัน หลังจากนั้นมีปริมาณจุลินทรีย์ลดลงจนถึงวันสุดท้ายของการหมักซึ่งมีจุลินทรีย์ประมาณ $1.29X10^5$ ถึง $1.48X10^5$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ส่วนชุดการทดลองที่หมักที่อุณหภูมิห้อง และชุดที่หมักในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน มีการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ใกล้เคียงกัน โดยมีจุลินทรีย์ในวันสุดท้ายของการหมักประมาณ $7.53X10^6$ และ $6.70X10^6$ CFU ต่อกรัมเมล็ดโกโก้

การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP ตลอดการหมัก 7 วัน ในการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยยีสต์ที่คัดเลือก ที่สภาวะต่าง ๆ มีลักษณะใกล้เคียงกับการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร PDA โดยชุดการทดลองที่หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีจุลินทรีย์ในวันสุดท้ายลดลงเนื่องจากอุณหภูมิเพิ่มขึ้นสูงเป็นปัจจัยสำคัญในการทำลายจุลินทรีย์ โดยเฉพาะยีสต์ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส (Sanchez, *et al.*, 1985) ส่วนการหมักที่อุณหภูมิห้อง หรือในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน มีจุลินทรีย์ลดลงจากในระยะแรกของการหมักเช่นเดียวกัน ปริมาณจุลินทรีย์ในอาหาร PDA และ TYGKCP ของชุดการทดลองต่าง ๆ ในเวลาเดียวกันมีปริมาณใกล้

เคียงกัน จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่ายีสต์เจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 2 วันแรกของการหมัก เพราะว่าสภาวะของการหมักในช่วงระยะแรกนั้นเกิดสภาพไร้อากาศขึ้น และมีแหล่งอาหารโดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้อย่างเพียงพอรวมทั้งพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดยังมีค่าต่ำประมาณ 4.5 - 5.0 ซึ่งเหมาะสม แก่การเจริญของยีสต์ด้วย (Wood and Lass, 1985)

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของกองหมักโดยใช้ยีสต์ และหมักที่สภาวะต่าง ๆ แสดงดังรูป 2 พบว่าทุกชุดการทดลองมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นในช่วงแรกของการหมัก หลังจากนั้นมีค่าลดลงจนถึงวันสุดท้ายของการหมัก ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับอุณหภูมิเริ่มต้น ในชุดการทดลองที่หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิสูงกว่าชุดการทดลองที่หมักที่อุณหภูมิห้อง หรือหมักในภาชนะหุ้มฉนวน ตลอดการหมัก เมื่อเปรียบเทียบชนิดของยีสต์ที่ต่างกันแต่หมักในสภาวะเดียวกัน พบว่าทุกสภาวะการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีอุณหภูมิสูงสุด โดยชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีค่าสูงสุดในวันที่ 2 ของการหมักเป็น 45.0 องศาเซลเซียส ส่วนชุดการทดลองที่หมักที่อุณหภูมิห้อง ให้ค่าอุณหภูมิสูงสุดในวันที่ 2 เป็น 39.5 องศาเซลเซียส และชุดการทดลองที่หมักในภาชนะหุ้มด้วยฉนวนกันความร้อนมีอุณหภูมิสูงสุดในวันที่ 3 ของการหมักเป็น 38.8 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ชุดการทดลองที่หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสูง ทำให้การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลและสารต่าง ๆ ภายในเมล็ดโกโก้โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่มีในเมล็ดเกิดกิจกรรมได้ดีกว่า (Forsyth and Quesnel, 1963) การหมักที่อุณหภูมิห้อง หรือการหมักในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน นอกจากนั้นการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่สูงขึ้นยังมีผลต่อการลดลงของยีสต์เนื่องจากอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นสูงเป็นปัจจัยสำคัญในการทำลายจุลินทรีย์โดยเฉพาะยีสต์ ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส (Sanchez, *et al.*, 1985) และหากอุณหภูมิของกองหมักเพิ่มขึ้นไม่สูงเพียงพอจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ และทางเคมีต่าง ๆ ภายในเมล็ดโกโก้เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ ทำให้เมล็ดโกโก้ที่ได้มีคุณภาพไม่ดี อุณหภูมิในวันสุดท้ายของการหมักจากชุดการทดลองที่หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีค่าสูงกว่าการหมักที่สภาวะ อื่น ๆ เป็นเพราะในระหว่างการหมักนั้นมีการควบคุมอุณหภูมิสภาพแวดล้อมของการหมักเป็น 37 องศาเซลเซียส จึงทำให้อุณหภูมิของการหมักไม่ลดลงต่ำกว่าอุณหภูมิดังกล่าว

การเปลี่ยนแปลงพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้และเมล็ดโกโก้ ในชุดการทดลองต่าง ๆ ที่เติมยีสต์ และหมักที่สภาวะต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน แสดงดังรูป 3 ค่าพีเอชเริ่มต้นของเมล็ดโกโก้

และเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีค่าเป็น 6.75 และ 3.45 ตามลำดับ พีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในทุกชุดการทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการหมักนานขึ้น ขณะที่ค่าพีเอชของเมล็ดโกโก้ลดลงเมื่อเวลาการหมักนานขึ้น ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีพีเอชของเมล็ดโกโก้และเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในวันที่ 4 ของการหมักแตกต่างกันน้อยที่สุด โดยมีค่าเป็น 5.80 และ 5.30 ตามลำดับ ทำให้เมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักจากชุดการทดลองดังกล่าวมีค่าพีเอชต่ำที่สุด ส่วนอีก 2 ชุดการทดลองที่เหลือนั้นเมล็ดโกโก้ที่ได้มีพีเอชต่ำกว่าชุดการทดลอง ที่เติม *S. cerevisiae* จากผลการทดลองชุดการทดลองที่เติม *C. sake* มีค่าพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของเมล็ดโกโก้นั้นมีผลมาจากปริมาณกรดทั้งหมด กรดที่ระเหยได้ และกรดแลคติก (Sanchez, 1985)

ปริมาณกรดทั้งหมดคิดในรูปกรดซิตริก ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยยีสต์ที่คัดเลือก ที่สภาวะต่าง ๆ แสดงได้ดังรูป 4 ในเมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีปริมาณกรดทั้งหมดเป็นร้อยละ 0.30 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ระหว่างการหมักทุกชุดการทดลองมีปริมาณกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นในระยะ 4 วันแรกของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณกรดทั้งหมดลดลงจนสิ้นสุดการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีปริมาณกรดทั้งหมดต่ำกว่าชุดการทดลองที่เติมยีสต์ชนิดอื่นที่หมักในสภาวะเดียวกัน ในวันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* *C. sorbosa* หรือ *C. sake* และหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีกรดทั้งหมดเป็นร้อยละ 0.50, 0.60 และ 0.71 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ปริมาณกรดทั้งหมดในเมล็ดโกโก้มีอิทธิพลต่อค่าพีเอชของเมล็ดโกโก้ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดขึ้นอยู่กับปริมาณกรดแลคติก และกรดแอซีติกอีกด้วย

ปริมาณกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักจากชุดการทดลองต่าง ๆ มีปริมาณเพิ่มขึ้นตลอดการหมัก แสดงดังรูป 5 ตอนเริ่มต้นของการหมักเมล็ดโกโก้มีปริมาณกรดแลคติกอยู่ร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก เนื่องจากกรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ที่ไม่ระเหยจึงสะสมอยู่ในเมล็ดโกโก้ตลอดเวลาการหมัก และกรดแลคติกนั้นเกิดมาจากกระบวนการออกซิเดชั่นของกรดซิตริกได้อีกด้วย (Weissberger, *et al.*, 1971) จากผลการทดลองชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีปริมาณกรดแลคติกต่ำกว่าชุดการทดลองที่เติมยีสต์อื่น ๆ และเมื่อพิจารณาถึงสภาวะการหมักที่แตกต่างกันแต่เติมยีสต์ชนิดเดียวกัน พบว่าการหมักเมล็ดโกโก้ที่อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส ให้เมล็ดโกโก้ที่มีปริมาณกรดแลคติกต่ำกว่าการหมักที่สภาวะอื่น ๆ ปริมาณกรดแลคติกในวันสุดท้ายของการหมักจากชุดการทดลองต่าง ๆ แสดงดังตาราง 13

กรดที่ระเหยได้คิดในรูปกรดแอซีติก ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ที่สภาวะต่าง ๆ ด้วยยีสต์ที่คัดเลือก เป็นเวลา 7 วัน แสดงดังรูป 6 ในเมล็ดโกโก้เริ่มต้นก่อนการหมักมีปริมาณกรดที่ระเหยได้เป็นร้อยละ 0.09 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก กรดที่ระเหยได้มีปริมาณสูงสุดในวันที่ 3 ของการหมัก และสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในเมล็ดโกโก้ หลังจากนั้นปริมาณกรดที่ระเหยได้ลดลง ในวันสุดท้ายของการหมักปริมาณของกรดแอซีติกในชุดการทดลองต่าง ๆ มีค่าร้อยละโดยน้ำหนักของกรดที่ระเหยได้ประมาณ 0.11 ถึง 0.21 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ชุดการทดลองที่เติม *S. serevisiae* และหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณกรดแอซีติกในเมล็ดต่ำที่สุด และชุดการทดลองที่เติม *C. sake* มีกรดที่ระเหยได้สูงกว่าชุดการทดลองอื่นตลอดการหมัก ดังตาราง 13 เมื่อมีการให้อากาศโดยการคนเมล็ดโกโก้ในขวดหมัก รวมทั้งมีการถ่ายของเหลวที่เกิดขึ้นในขวดหมักออกทิ้งไป รวมทั้งกรดแอซีติกสามารถออกซิไดซ์ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้อีกด้วยเมื่อมีอากาศเพียงพอ (Carr, *et. al.*, 1979) จึงเกิดการออกซิไดซ์แอลกอฮอล์เป็นกรดแอซีติกหลังจากการหมักได้ 2 วัน ทำให้ค่าพีเอชของกองหมักเมล็ดโกโก้ลดลง มีผลให้ยีสต์ลดปริมาณลง ทำให้ปริมาณของแอลกอฮอล์ที่ถูกสร้างโดยยีสต์ลดลง และเป็นผลให้กรดแอซีติกที่เกิดจากกระบวนการออกซิไดซ์ของแอลกอฮอล์ลดลงด้วย รวมทั้งกรดแอซีติกในเมล็ดโกโก้นั้นมีการระเหยออกไปได้

การเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์ที่คัดเลือกแต่ละชนิดและหมักในสภาวะต่าง ๆ ดังที่กล่าวมาแล้ว แสดงดังรูป 7 พบว่าเมล็ดโกโก้เริ่มต้นก่อนการหมักมีค่าดรรชนีการหมักเป็น 0.52 แสดงว่าเมล็ดโกโก้ที่บ่มไว้ก่อนการหมักนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบภายในเมล็ดแล้วเช่นกัน ระหว่างการหมักทุกชุดการทดลองมีค่าดรรชนีการหมักเพิ่มขึ้น โดยชุดการทดลองที่หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีค่าสูงกว่าการหมักที่อุณหภูมิห้อง หรือหมักในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน เพราะว่าการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนั้น กองหมักมีอุณหภูมิสูงเพียงพอแก่การเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ในเมล็ดโกโก้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารสีม่วงไปเป็นสารสีน้ำตาลได้ดีกว่าการหมักที่อุณหภูมิห้อง หรือหมักในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน หลังจากการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน เมล็ดโกโก้มีค่าดรรชนีการหมักใกล้เคียงกับ 1 ซึ่งเป็นค่าดรรชนีการหมักที่ดี (Wood and Lass,

1985) ขณะที่การหมักที่อุณหภูมิห้อง และการหมักในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อนให้ค่าดรรชนีการหมักที่ใกล้เคียงกับ 1 ในวันที่ 6 - 7 ของการหมัก และเมื่อพิจารณาในสภาวะการหมักแบบเดียวกันพบว่าการเติม *S. cerevisiae* ให้เมล็ดโกโก้ที่มีค่าดรรชนีการหมักสูงกว่าชุดการทดลองที่เติมยีสต์ชนิดอื่น ๆ ซึ่งสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของกองหมักที่พบว่าในชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีอุณหภูมิสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ค่าดรรชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักจากชุดการทดลองต่าง ๆ แสดงดังตาราง 13

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คิดในรูปน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ตลอดการหมัก 7 วัน มีการเปลี่ยนแปลงดังรูป 8 ตอนเริ่มต้นการหมักเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีปริมาณน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดเป็นร้อยละ 9.56 และ 1.13 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Forsyth และ Quesnel (1963) ซึ่งกล่าวว่าเมล็ดโกโก้สดมีน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ประมาณร้อยละ 8 - 13 โดยน้ำหนัก และมีน้ำตาลซูโครสอยู่ร้อยละ 0.4 - 1.0 โดยน้ำหนัก การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ในทุกชุดการทดลองมีปริมาณลดลงตลอดการหมัก สาเหตุที่ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วงแรกของการหมักลดลงไม่มาก เป็นผลจากกิจกรรมของยีสต์ที่ย่อยสลายน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ไปเป็นน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส ซึ่งพบว่าน้ำตาลซูโครสถูกย่อยสลายไปเกือบหมดภายในวันที่ 2 ของการหมัก จากนั้นเหลือปริมาณน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้น้อยมาก น้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ ในสภาวะที่กองหมักมีพีเอชต่ำ มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง และมีปริมาณออกซิเจนต่ำ ทำให้ยีสต์สามารถเจริญ และเปลี่ยนน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ไปเป็นแอลกอฮอล์ได้ดี (Abdul Samah, *et al.*, 1992) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลองต่าง ๆ พบว่าชุดการทดลองที่หมักเมล็ดโกโก้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสที่เวลาเดียวกันต่ำกว่าชุดการทดลองที่หมักที่อุณหภูมิห้อง หรือชุดการทดลองที่หมักในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวันสุดท้ายของการหมักของชุดการทดลองต่าง ๆ มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงดังตาราง 13

น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักมีการเปลี่ยนแปลงดังรูป 9 ปริมาณน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดในตอนเริ่มต้นของการหมักมีค่าร้อยละ 0.60 และ 2.13 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ในระยะ 2 วันแรกของการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ในทุกชุดการทดลองมีปริมาณค่อนข้างคงที่ หลังจากนั้นน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้ของทุกชุดการทดลองมีปริมาณเพิ่มขึ้นจนสิ้นสุดการหมัก

โดยชุดการทดลองที่หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นสูงกว่าการหมักที่สภาวะอื่น ๆ เนื่องจากการที่กองหมักมีอุณหภูมิสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ทำให้กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในเมล็ดโกโก้เกิดขึ้นได้ดีกว่าชุดการทดลองอื่นมีการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากกว่าชุดการทดลองอื่น แต่ในระยะสุดท้ายของการหมักปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักที่สภาวะต่าง ๆ กันมีปริมาณไม่แตกต่างกัน โดยชุดการทดลองที่หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีน้ำตาลรีดิวซ์เป็นร้อยละ 0.98 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ส่วนปริมาณน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้พบว่าทุกชุดการทดลองมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในระยะ 2 วันแรกของการหมัก แต่ในช่วงสุดท้ายของการหมักมีการลดลงไม่มาก โดยชุดการทดลองที่หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีการลดลงของน้ำตาลซูโครสเร็วกว่าการหมักที่อุณหภูมิห้อง หรือหมักในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน ประมาณ 2 เท่า เพราะชุดการทดลองที่หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิสูงเพียงพอที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลในเมล็ดโกโก้ โดยปฏิกิยาของเอนไซม์ในเมล็ดได้ (Forsyth and Quesnel, 1963) วันสุดท้ายของการหมักเมล็ดโกโก้จากทุกชุดการทดลองมีน้ำตาลซูโครสแตกต่างกัน และชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีน้ำตาลซูโครสเหลืออยู่ในเมล็ดโกโก้น้อยที่สุด คือร้อยละ 0.08 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักแสดงดังตาราง 13

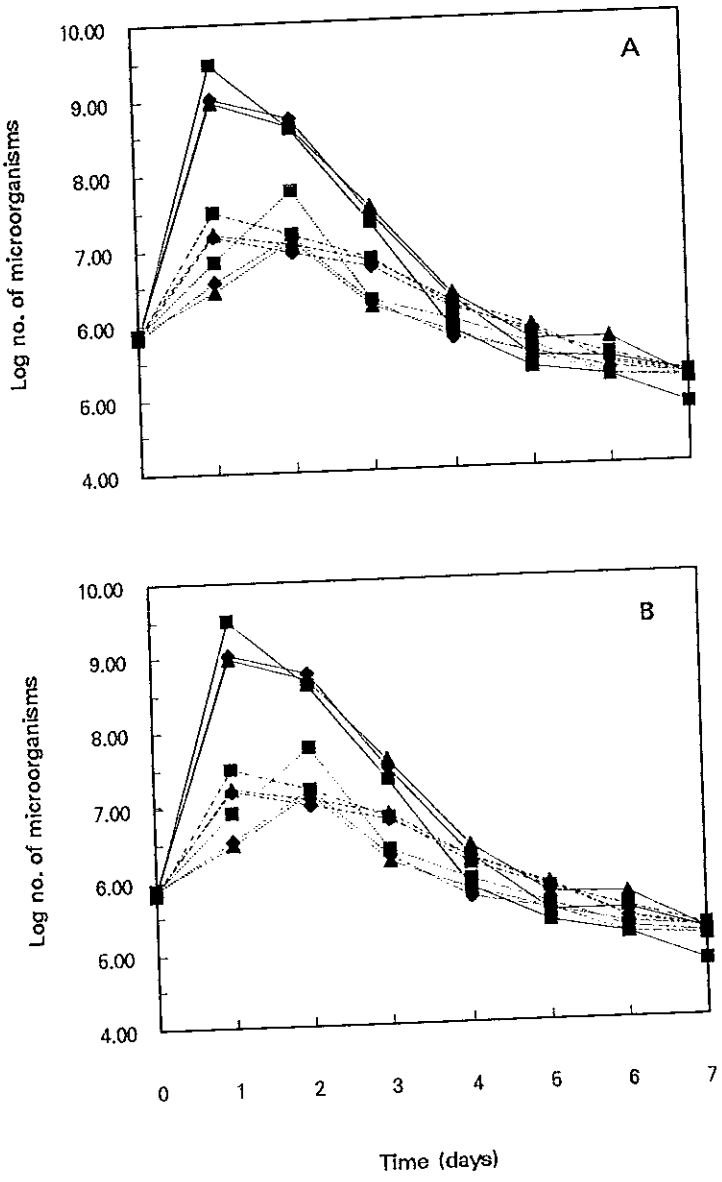
เมื่อนำเมล็ดโกโก้ที่ได้จากชุดการทดลองต่าง ๆ ไปทำแห้ง โดยการตากแดดเป็นเวลา 3 วัน แล้วอบด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 - 10 ชั่วโมง แล้วนำเมล็ดโกโก้ แห้งมาผ่าเป็นสองซีกเพื่อหาค่า Cut Test ของเมล็ดโกโก้แห้ง ได้ค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้สีต่าง ๆ แสดงดังตาราง 12 เมล็ดโกโก้แห้งจากชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้ค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลช็อกโกแลต (10PR3/1,2) สูงสุด และแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนชุดการทดลองที่หมักที่อุณหภูมิห้อง และการหมักในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อนมีค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลต่ำ เพราะว่าในการหมักนั้น มวลเมล็ดโกโก้มีน้อยทำให้อุณหภูมิของกองหมักเพิ่มขึ้นไม่สูงพอและสูญเสียความร้อนได้ง่าย ทำให้การเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาเคมีในเมล็ดโกโก้โดยกิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ เกิด ขึ้นไม่สมบูรณ์

จากค่าร้อยละเฉลี่ยของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้ในตาราง 12 แสดงให้เห็นว่า ชุดการทดลองที่หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้ค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลช็อกโกแลต (10PR

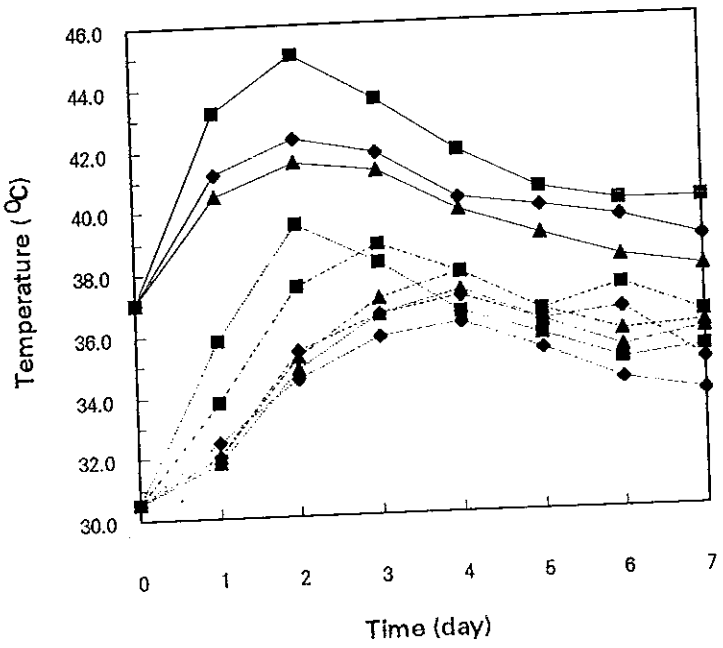
3/1,2) สูงที่สุด และแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แสดงว่าอุณหภูมิของกองหมักซึ่งเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์และการเพิ่มปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์ เป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งในการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบภายในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมัก (อรพิน ภูมิภมร และคณะ, 2536) เมื่ออุณหภูมิของกองหมักสูงเพียงพอทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ ในเมล็ดโกโก้เกิดการทำงาน มีการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้นพวกน้ำตาล และสารโพลีฟีนอลชนิดต่าง ๆ ไปเป็นสารที่ให้สี และกลิ่นรสช็อกโกแลตในที่สุด ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการหมักเมล็ดโกโก้ที่อุณหภูมิห้อง และการหมักในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อนนั้น ให้เมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลต่ำ แต่จะมีเมล็ดโกโก้ที่มีสีน้ำตาลบางส่วนและสีม่วงบางส่วนอยู่สูง ซึ่งเมื่อนำไปทำเป็นช็อกโกแลตจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีรสขม (Wood and Lass, 1985)

ดังนั้นการศึกษาถึงสภาวะของการหมักที่เหมาะสมในการควบคุมอุณหภูมิที่เกิดขึ้นในการหมักให้คงอยู่นั้น พบว่าการหมักเมล็ดโกโก้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสมมากกว่าการหมักที่อุณหภูมิห้อง หรือการหมักในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน เนื่องจากชุดการทดลองดังกล่าวมีอุณหภูมิกองหมักสูงเพียงพอ และมีจุลินทรีย์ในการหมักเพิ่มขึ้นสูงสุด ทำให้มีการย่อยสลายเยื่อหุ้มเมล็ดอย่างรวดเร็ว ทั้งยังมีค่าดรรชนีการหมักที่ใกล้เคียง 1 ตั้งแต่วันที่ 4 ของการหมัก นอกจากนั้นเมล็ดโกโก้ที่ได้จากชุดการทดลองที่หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีปริมาณกรดทั้งหมด กรดแลคติก และกรดที่ระเหยได้ต่ำ รวมถึงค่าพีเอชของเมล็ดโกโก้ที่ได้มีค่าสูงและให้ค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลช็อกโกแลตสูงกว่าชุดการทดลองอื่น

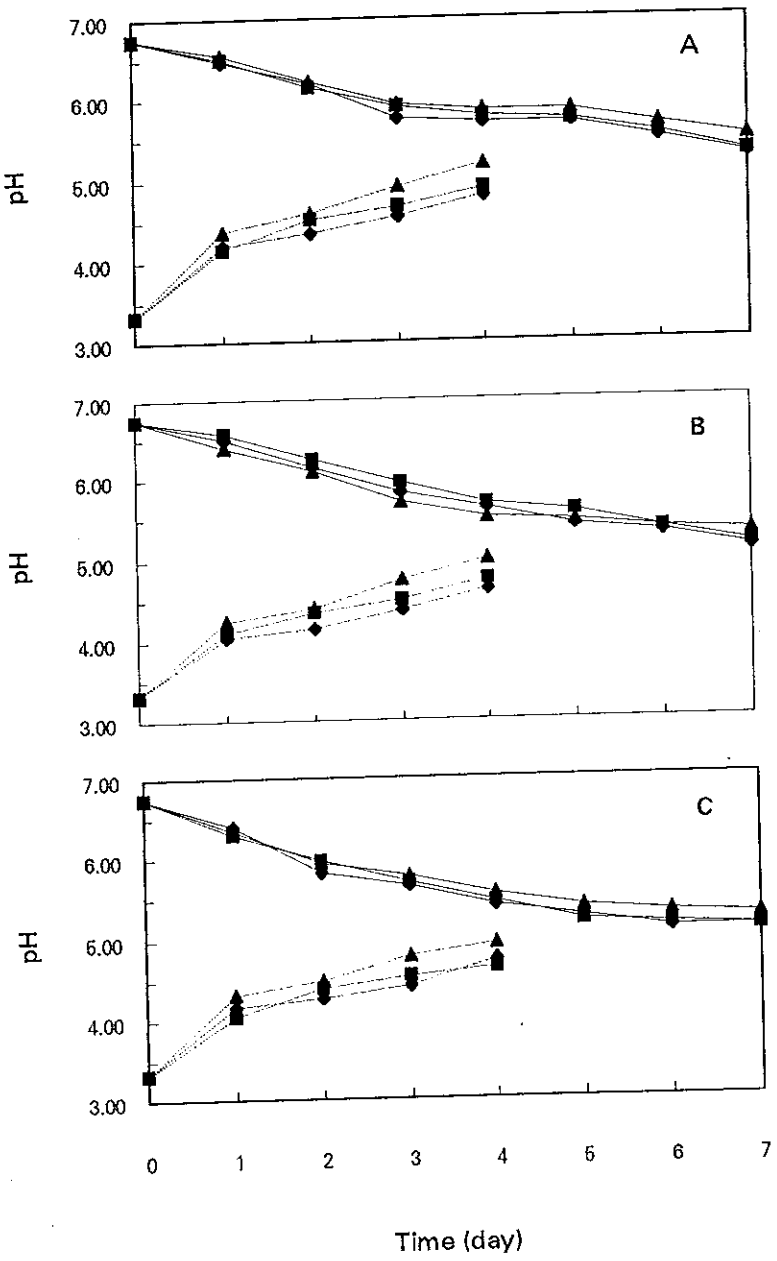
องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ที่ได้จากวันสุดท้ายของการหมัก ด้วยยีสต์ที่สภาวะต่าง ๆ แสดงดังตาราง 13 และองค์ประกอบของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์ที่คัดเลือกทั้ง 3 ชนิด ในสภาวะต่าง ๆ แสดงดังตาราง 14



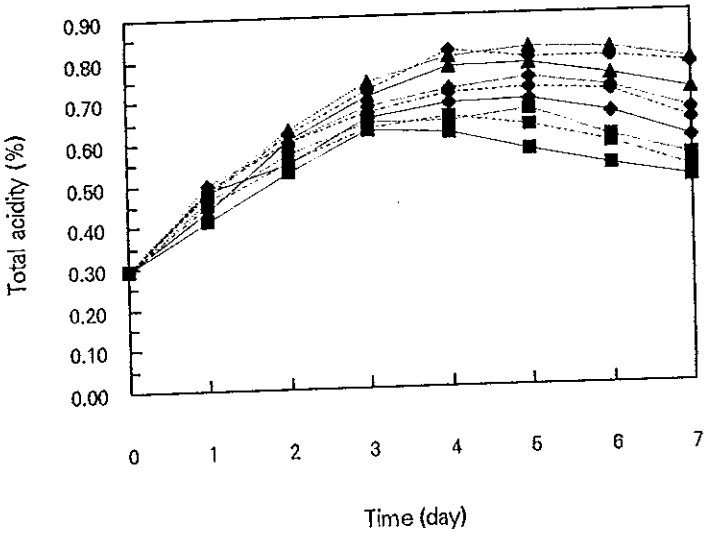
รูป 1 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* (-■-) *C. sorbosa* (-◆-) หรือ *C. sake* (-▲-) บนอาหาร PDA (A) และ TYGKCP (B) ที่อุณหภูมิห้อง (------) ในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน (---) และที่ 37 องศาเซลเซียส (——)



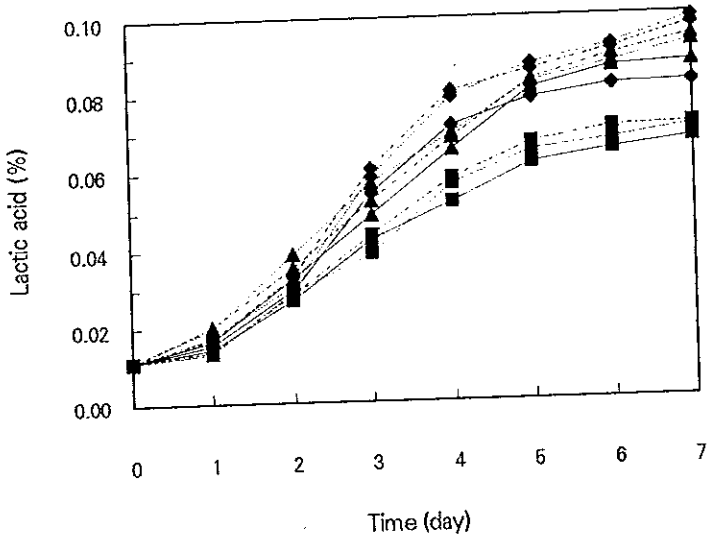
รูป 2 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* (-■-) *C. sorbosa* (-◆-) หรือ *C. sake* (-▲-) ที่อุณหภูมิห้อง (·····) ในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน (---) และที่ 37 องศาเซลเซียส (——)



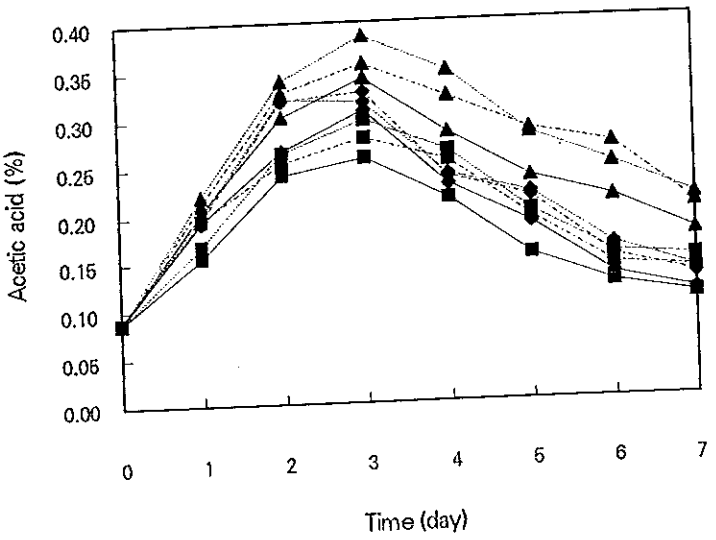
รูป 3 การเปลี่ยนแปลงพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ (·····) และเมล็ดโกโก้ (——) ระหว่างการหมักของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* (A) *C. sorbosa* (B) หรือ *C. sake* (C) ที่อุณหภูมิห้อง (-■-) ในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน (-◆-) และที่ 37 องศาเซลเซียส (-▲-)



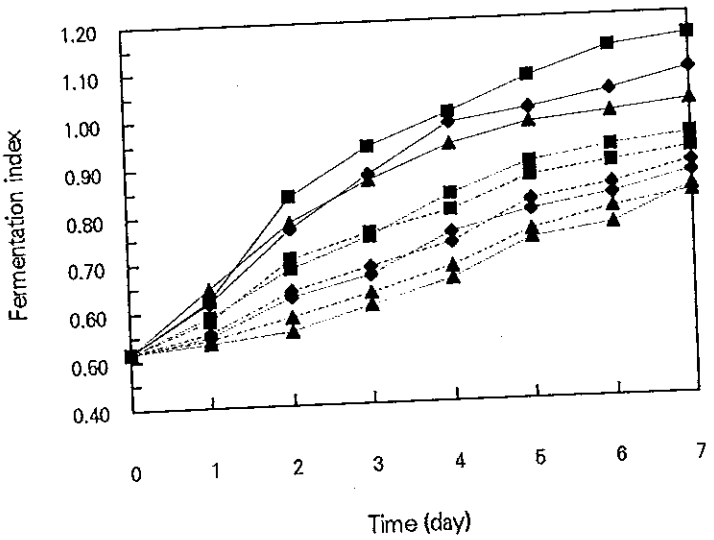
รูป 4 การเปลี่ยนแปลงกรดทั้งหมดในเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae* (-■-) *C. sorbosa* (-◆-) หรือ *C. sake* (-▲-) ที่อุณหภูมิห้อง (------), ภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน (---) และที่ 37 องศาเซลเซียส (——)



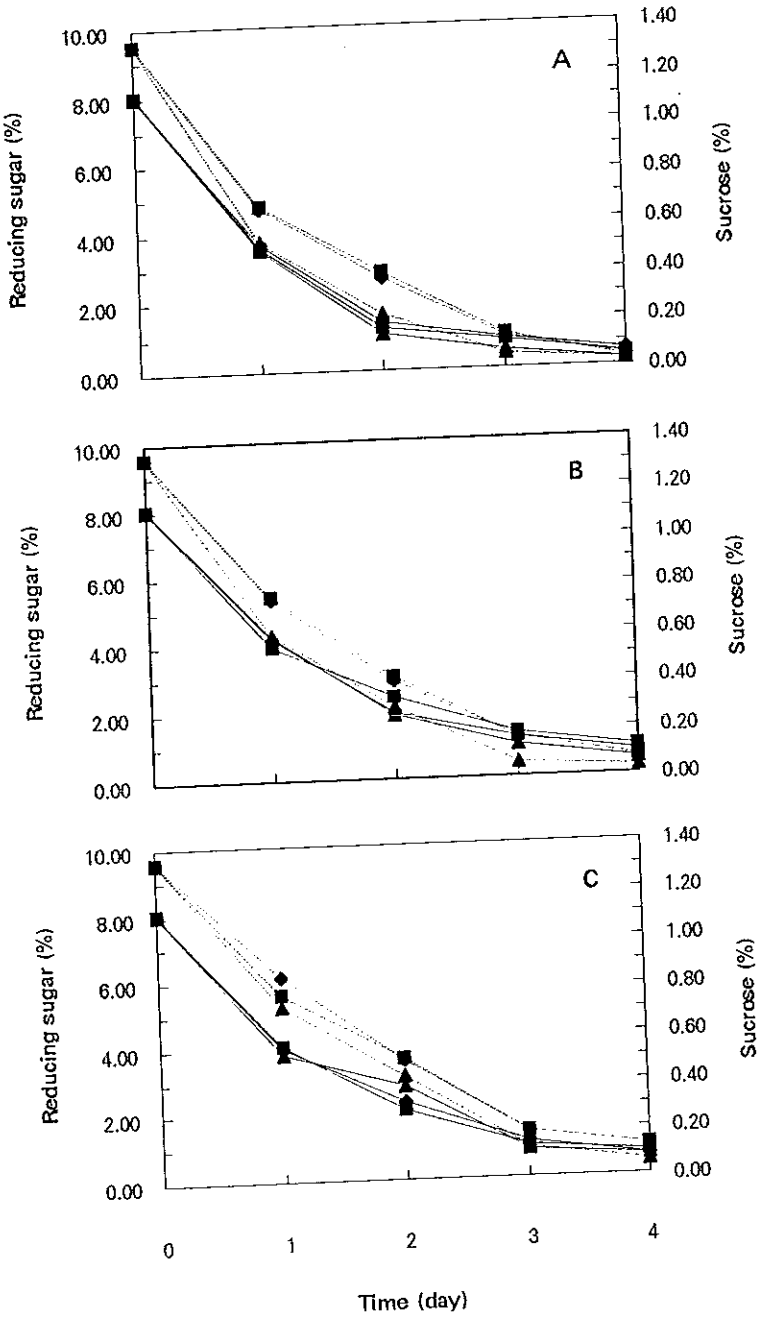
รูป 5 การเปลี่ยนแปลงกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae* (-■-) *C. sorbosa* (-◆-) หรือ *C. sake* (-▲-) ที่อุณหภูมิห้อง (------) ในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน (---) และที่ 37 องศาเซลเซียส (——)



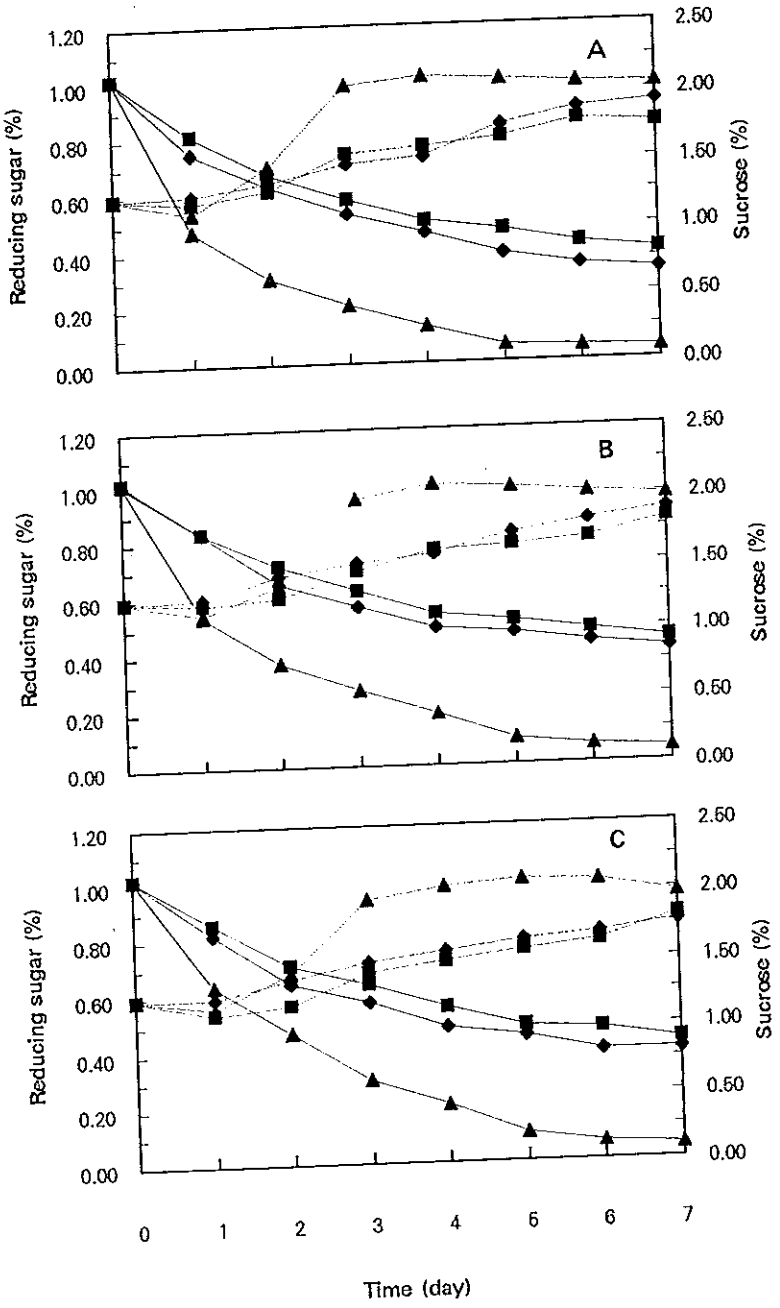
รูป 6 การเปลี่ยนแปลงกรดที่ระเหยได้ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae* (-■-) *C. sorbosa* (-◆-) หรือ *C. sake* (-▲-) ที่อุณหภูมิห้อง (------) ในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน (---) และที่ 37 องศาเซลเซียส (——)



รูป 7 การเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae* (-■-) *C. sorbosa* (-◆-) หรือ *C. sake* (-▲-) ที่อุณหภูมิห้อง (------) ในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน (---) และที่ 37 องศาเซลเซียส (——)



รูป 8 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ (------) และน้ำตาลซูโครส (——) ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae* (A) *C. sorbosa* (B) หรือ *C. sake* (C) ที่อุณหภูมิห้อง (-■-) ในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน (-◆-) และที่ 37 องศาเซลเซียส (-▲-)



รูป 9 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ (▪▪▪▪▪) และน้ำตาลซูโครส (——) ในเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae* (A) *C. sorbosa* (B) หรือ *C. sake* (C) ที่อุณหภูมิห้อง (-■-) ในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน (-◆-) และที่ 37 องศาเซลเซียส (-▲-)

ตาราง 12 การเปลี่ยนแปลงค่า Cut Test ของเมล็ดโก้โก้ที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์ที่คัดเลือก ที่สภาวะต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน

ชุดการทดลอง (ยีสต์ที่เติม)	สีเมล็ดโกโก้แห้ง (ร้อยละ)*			
	สีน้ำตาล	สีม่วงแกมน้ำตาล	สีหินชนวน	สีอื่น ๆ
		หมักที่อุณหภูมิห้อง		
S. cerevisiae	67.56a**	29.89b	2.55b	0.00c
C. sorbosa	61.67b	30.11ab	6.22a	2.00a
C. sake	60.53b	32.11a	6.25a	1.11b
		หมักในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน		
S. cerevisiae	69.53a	28.75c	1.72c	0.00b
C. sorbosa	63.35b	30.87b	4.67a	1.11a
C. sake	60.86c	35.71a	3.42b	0.00b
		หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส		
S. cerevisiae	74.78a	24.11b	1.11b	0.00b
C. sorbosa	69.61c	23.47c	5.59a	1.33a
C. sake	71.13b	26.37a	1.11b	1.39a

* เป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

** อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันของแต่ละสภาวะการหมัก แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตาราง 13 องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมัก ด้วยยีสต์ที่คัดเลือกทั้ง 3 ชนิด ที่สภาวะต่าง ๆ

	ชนิดของยีสต์ที่เติม								
	หมักที่อุณหภูมิห้อง			หมักในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน			หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส		
องค์ประกอบ[1]	*S. cerevisiae*	*C. sorbosa*	*C. sake*	*S. cerevisiae*	*C. sorbosa*	*C. sake*	*S. cerevisiae*	*C. sorbosa*	*C. sake*
น้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ (%)[2]	0.23±0.02^{c} [3]	0.61±0.03^{b}	0.87±0.03^{a}	0.26±0.03^{c}	0.52±0.03^{b}	0.89±0.04^{a}	0.18±0.02^{c}	0.23±0.03^{b}	0.42±0.01^{a}
น้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ (%)[2]	0.06±0.01^{b}	0.11±0.00^{a}	0.10±0.01^{a}	0.07±0.01^{c}	0.10±0.01^{a}	0.09±0.00^{b}	0.02±0.01^{c}	0.07±0.01^{b}	0.09±0.00^{a}
น้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้ (%)	0.84±0.02^{a}	0.86±0.03^{a}	0.87±0.01^{a}	0.92±0.02^{a}	0.90±0.04^{ab}	0.84±0.02^{b}	0.98±0.04^{a}	0.95±0.04^{ab}	0.94±0.03^{b}
น้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ (%)	0.82±0.02^{b}	0.91±0.02^{a}	0.89±0.04^{a}	0.67±0.03^{b}	0.84±0.03^{a}	0.81±0.04^{a}	0.08±0.01^{b}	0.10±0.02^{a}	0.10±0.01^{a}
ดรรชนีการหมัก(OD460/OD530)	0.96±0.04^{a}	0.87±0.02^{b}	0.83±0.03^{c}	0.91±0.00^{a}	0.88±0.02^{ab}	0.82±0.01^{b}	1.16±0.05^{a}	1.08±0.04^{b}	1.01±0.02^{b}
ปริมาณกรดทั้งหมด (%)	0.55±0.01^{c}	0.66±0.01^{b}	0.79±0.01^{a}	0.52±0.02^{c}	0.64±0.03^{b}	0.77±0.02^{a}	0.50±0.02^{c}	0.60±0.02^{b}	0.71±0.03^{a}
ปริมาณกรดที่ระเหยได้ (%)	0.15±0.01^{b}	0.13±0.01^{b}	0.21±0.03^{a}	0.13±0.02^{b}	0.13±0.00^{b}	0.20±0.02^{a}	0.11±0.02^{b}	0.11±0.01^{b}	0.17±0.02^{a}
ปริมาณกรดแลคติก (%)	0.07±0.00^{b}	0.10±0.01^{a}	0.09±0.01^{a}	0.07±0.00^{b}	0.10±0.01^{a}	0.09±0.01^{a}	0.07±0.01^{b}	0.08±0.00^{ab}	0.09±0.00^{a}
พีเอช	5.30±0.00^{a}	5.15±0.00^{b}	5.10±0.01^{c}	5.28±0.00^{a}	5.12±0.01^{b}	5.10±0.00^{b}	5.50±0.01^{a}	5.32±0.01^{b}	5.25±0.01^{b}

1 ค่าร้อยละโดยน้ำหนักสด; ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2 ปริมาณน้ำตาลที่วัดได้ในวันที่ 4 ของการหมัก

3 อักษรเหมือนกันในแถวนอนเดียวกันของแต่ละสภาวะการหมัก แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตาราง 14 องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้แห้งจากการหมัก ด้วยยีสต์ที่คัดเลือกทั้ง 3 ชนิด ที่สภาวะต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน

	ชนิดของยีสต์ที่เติม								
	หมักที่อุณหภูมิห้อง			หมักในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน			หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส		
องค์ประกอบ[1,2]	*S. cerevisiae*	*C. sorbosa*	*C. sake*	*S. cerevisiae*	*C. sorbosa*	*C. sake*	*S. cerevisiae*	*C. sorbosa*	*C. sake*
น้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้ (%)	0.87±0.02^{b3}	0.96±0.01^{a}	0.93±0.03^{a}	0.71±0.02^{a}	0.74±0.01^{a}	0.68±0.04^{b}	1.07±0.03^{a}	0.98±0.03^{a}	0.97±0.04^{a}
น้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ (%)	0.79±0.03^{b}	0.93±0.04^{a}	0.85±0.03^{ab}	0.69±0.01^{b}	0.81±0.03^{a}	0.78±0.02^{a}	0.09±0.04^{b}	0.09±0.01^{b}	0.12±0.04^{a}
ดรรชนีการหมัก(OD460/OD530)	0.95±0.07^{a}	0.89±0.03^{ab}	0.85±0.02^{b}	0.91±0.03^{a}	0.90±0.01^{a}	0.88±0.02^{b}	1.17±0.01^{a}	1.10±0.04^{ab}	1.04±0.05^{b}
ปริมาณกรดทั้งหมด (%)	0.58±0.04^{b}	0.65±0.03^{ab}	0.74±0.05^{a}	0.50±0.02^{b}	0.61±0.04^{ab}	0.68±0.04^{a}	0.46±0.04^{c}	0.53±0.04^{b}	0.66±0.02^{a}
ปริมาณกรดที่ระเหยได้ (%)	0.15±0.02^{ab}	0.12±0.04^{b}	0.18±0.03^{a}	0.14±0.03^{b}	0.15±0.03^{b}	0.19±0.03^{a}	0.10±0.04^{b}	0.11±0.03^{b}	0.15±0.03^{a}
ปริมาณกรดแลคติก (%)	0.12±0.01^{a}	0.11±0.00^{a}	0.12±0.01^{a}	0.12±0.01^{a}	0.12±0.01^{a}	0.13±0.02^{a}	0.09±0.02^{b}	0.11±0.01^{a}	0.11±0.02^{a}
พีเอช	5.35±0.15^{a}	5.15±0.10^{b}	5.15±0.00^{b}	5.43±0.10^{a}	5.30±0.12^{ab}	5.28±0.10^{b}	5.70±0.12^{a}	5.40±0.05^{b}	5.32±0.05^{b}
ปริมาณไขมัน (%)	51.13±0.35^{b}	52.61±0.46^{a}	52.47±0.47^{a}	53.10±0.38^{a}	52.84±0.45^{b}	53.06±0.61^{a}	53.71±0.46^{a}	52.69±0.37^{a}	53.34±0.50^{a}
ปริมาณความชื้น (%)	8.93±0.27^{a}	8.26±0.18^{ab}	8.10±0.12^{b}	8.03±0.11^{b}	8.67±0.14^{a}	8.91±0.11^{a}	7.93±0.22^{b}	8.01±0.18^{ab}	8.47±0.15^{a}

1 ค่าร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง

2 ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3 อักษรเหมือนกันในแถวนอนเดียวกันของแต่ละสภาวะการหมัก แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

บทบาทของยีสต์ในการหมักเมล็ดโกโก้

การศึกษาในขั้นตอนนี้ใช้ยีสต์ 3 ชนิด ซึ่งพบในปริมาณมากจากการหมักเมล็ดโกโก้ตามธรรมชาติ คือ *S. cerevisiae*, *C. sorbosa* และ *C. sake* (ดวงใจ ช่วยสถิตย์, 2535) เติมลงในการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ ใช้เชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง (Coleman and Ooraikul, 1989) ซึ่งมีจุลินทรีย์ประมาณ $4.33X10^5$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ของชุดการทดลองที่เติมยีสต์และชุดการทดลองควบคุม แสดงดังรูป 10

สำหรับชุดการทดลองที่เติมยีสต์นั้น การเปลี่ยนแปลงจุลินทรียบนอาหาร PDA มีค่าใกล้เคียงกับการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP ทุกชุดการทดลองที่เวลาเดียวกันจุลินทรีย์บนอาหารทั้ง 2 ชนิดไม่มีความแตกต่างกัน แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในการหมักเมล็ดโกโก้นั้นเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เติมลงไปเป็นสำคัญ ปริมาณจุลินทรีย์ในกองหมักเพิ่มขึ้นรวดเร็วใน 2 วันแรกของการหมัก หลังจากนั้นมีจุลินทรีย์ลดลงจนสิ้นสุดการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นรวดเร็ว และมีค่าสูงสุดในวันแรกของการหมักทั้งบนอาหาร PDA และ TYGKCP เป็น $3.26X10^9$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ และ $3.80X10^9$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ตามลำดับ สำหรับชุดการทดลองที่เติม *C. sorbosa* หรือ *C. sake* มีจุลินทรีย์สูงสุดในวันที่ 2 ของการหมัก หลังจากนั้นมีปริมาณลดลง เนื่องจากยีสต์กลุ่ม *Saccharomyces* spp. เจริญได้ดีในสภาพที่มีน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้สูง และมีความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำ แต่ยีสต์กลุ่ม *Candida* spp. นั้น สามารถเจริญได้ดีในที่ที่มีอากาศและสามารถใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Lehrian and Patterson, 1983) จุลินทรีย์ในวันสุดท้ายของการหมักมีค่าประมาณ $1.59X10^5$ ถึง $3.16X10^5$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ชุดการทดลองควบคุมนั้นในวันแรกของการหมักตรวจไม่พบจุลินทรีย์บนอาหารทั้ง 2 ชนิด หลังจากนั้นจุลินทรีย์มีปริมาณเพิ่มขึ้นโดยมีจุลินทรีย์ในอาหาร PDA สูงสุดในวันที่ 6 ของการหมักเป็น $7.41X10^3$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ และในวันสุดท้ายของการหมักมีจุลินทรีย์บนอาหาร PDA ประมาณ $4.68X10^3$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ การเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในชุดการทดลองควบคุม ทั้งที่ตอนแรกของการหมักตรวจไม่พบจุลินทรีย์ แสดงว่าเมล็ดโกโก้เริ่มต้นนั้นปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ แต่ได้รับการปนเปื้อนจากแหล่งภายนอกในตอนหลัง เช่น จุลินทรีย์ที่ปะปนในอากาศ (Ostovar and Keeney, 1973) จากผลการทดลองแสดงว่ายีสต์

S. cerevisiae สามารถเจริญได้เร็วในการหมักทั้งยังให้ปริมาณจุลินทรีย์สูงสุด ยีสต์ที่เพิ่มขึ้นในระยะแรกของการหมักมีการใช้อาหารในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้รวดเร็ว และการที่กองหมักมีค่าพีเอชลดลง และมีอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นในตอนหลัง เป็นปัจจัยสำคัญในการทำลายจุลินทรีย์โดยเฉพาะยีสต์ ทำให้จุลินทรีย์ในระยะสุดท้ายของการหมักลดลง (Wood and Lass, 1985; Sanchez, *et al.*, 1985)

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยยีสต์ทั้ง 3 ชนิด แสดงดังรูป 11 ในระยะแรกของการหมักทุกชุดการทดลองมีอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น และมีค่าสูงสุดในวันที่ 2 ของการหมัก หลังจากนั้นมีค่าลดลงจนสิ้นสุดการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีอุณหภูมิสูงกว่าชุดการทดลองอื่น โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 2 ของการหมักเป็น 45.6 องศาเซลเซียส ขณะที่ชุดการทดลองที่เติม *C. sorbosa* หรือ *C. sake* และชุดควบคุมมีอุณหภูมิสูงสุดเป็น 41.8, 41.5 และ 39.5 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีจุลินทรีย์เจริญได้สูง ทำให้มีเมตาบอลิซึมของสารอาหารโดยเฉพาะน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์โดยกระบวนการหมักได้ดี ทำให้มีความร้อนเกิดขึ้นจากขบวนการดังกล่าวมากกว่าชุดทดลองอื่น ๆ อุณหภูมิของกองหมักเมล็ดโกโก้ที่เพิ่มขึ้นนี้มีผลยับยั้งและทำลายการเจริญของยีสต์ที่มีอยู่ ทำให้ยีสต์ลดลงในระยะสุดท้ายของการหมัก สาเหตุที่อุณหภูมิของกองหมักลดลงในระยะหลังของการหมัก เนื่องจากจุลินทรีย์ใช้สารอาหารในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้หมดไป ดังนั้นความร้อนที่เกิดจากขบวนการเมตาบอลิซึมของน้ำตาลและขบวนการออกซิเดชันของเอทานอลจึงมีปริมาณจำกัด รวมถึงการหมักเมล็ดโกโก้ในภาชนะขนาดเล็กซึ่งมวลเมล็ดโกโก้มีน้อย ทำให้มีการสูญเสียความร้อนได้เร็ว (Glossop, 1983)

การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ด และเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยยีสต์ 3 ชนิด แสดงดังรูป 12 เมล็ดโกโก้และเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.65 และ 4.20 ตามลำดับ เมื่อเวลาการหมักเพิ่มขึ้นพีเอชของเมล็ดโกโก้มีค่าลดลงขณะที่ค่าพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดมีค่าสูงขึ้น ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีค่าพีเอชในเมล็ดโกโก้ลดลงต่ำสุดและแตกต่างจากชุดการทดลองอื่น ส่วนชุดการทดลองที่เติม *C. sorbosa* หรือ *C. sake* มีค่าพีเอชของเมล็ดโกโก้ที่ใกล้เคียงกัน จากรูป 12 พบว่าการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้นั้นวัดได้เพียงวันที่ 4 ของการหมัก เนื่องจากเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์เปลี่ยนไปเป็นของเหลวที่เกิดขึ้นจากการหมัก ค่าพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีค่าสูง เป็นผลให้ความเป็นกรดในเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองดังกล่าวมีค่าต่ำกว่า

ชุดการทดลองอื่น ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้มีค่าพีเอชในเมล็ดลดลงเนื่องจากในการหมักนั้น มียีสต์และจุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญและสร้างกรดแลคติก กรดที่ระเหยได้ รวมทั้งกรดชนิดอื่น ๆ ขึ้น จากสารตั้งต้นในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เพื่อการเจริญและเกิดขบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ (อรพิน ภูมิภมร และคณะ, 2536) และเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในเมล็ดโกโก้อีกด้วย ซึ่งทำให้ เมล็ดโกโก้ภายหลังการหมักมีค่าพีเอชต่ำลง

ปริมาณกรดทั้งหมด ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ ด้วยยีสต์ทั้ง 3 ชนิด แสดงดังรูป 13 ในตอนเริ่มต้นการหมักเมล็ดโกโก้มีกรดทั้งหมดเป็นร้อยละ 0.29 โดยน้ำหนักต่อ น้ำหนัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นน้อยที่สุด โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 2 ของการหมัก ขณะที่ชุดการทดลองอื่น ๆ มีปริมาณกรดเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 4 ของการหมัก แล้วมี ค่าลดลงจนสิ้นสุดการหมัก วันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae, C. sorbosa,* หรือ *C. sake* มีกรดทั้งหมดเป็นร้อยละ 0.46, 0.53 และ 0.71 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ สำหรับเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองควบคุมซึ่งไม่เติมยีสต์ลงไป มีกรดทั้งหมดเพิ่มสูง กว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ตั้งแต่วันที่ 1 - 3 ของการหมัก ในวันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลอง ควบคุมมีปริมาณกรดทั้งหมดร้อยละ 0.73 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก

การเปลี่ยนแปลงกรดแลคติกในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยยีสต์ทั้ง 3 ชนิด แสดง ดังรูป 14 เมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีกรดแลคติกประมาณร้อยละ 0.02 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก กรดแลคติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นตลอดการหมัก ในระยะแรกของการหมักกรดแลคติกมีค่าต่ำและมี ค่า ใกล้เคียงกันในทุกชุดการทดลอง แต่วันที่ 2 ถึง 4 ของการหมักกรดแลคติกเพิ่มขึ้นอย่างรวด เร็ว เนื่องจากสารไพรูเวตอันเป็นตัวกลางที่เกิดจากขบวนการหมัก สามารถเปลี่ยนไปเป็นกรด แลคติกได้ในสภาวะไร้อากาศ (Stanier, *et al.*, 1986) รวมทั้งกรดซิตริกในเมล็ดโกโก้สามารถ เปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติกได้อีกด้วย (Passos, *et al.*, 1984) และจากการที่กรดแลคติกเป็นกรด อินทรีย์ที่ไม่ระเหยจึงสะสมในเมล็ดโกโก้ตลอดระยะการหมัก ในตอนสุดท้ายของการหมักปริมาณ กรดเพิ่มขึ้นไม่มาก เพราะกรดแลคติกสามารถถูกออกซิไดซ์ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ ด้วย (Krieg and Hott, 1986) ในวันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae, C sorbosa,* หรือ *C. sake* และ ชุดการทดลองควบคุม มีกรดแลคติกเป็นร้อยละ 0.07, 0.09, 0.1(และ 0.07 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ

กรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยยีสต์ทั้ง 3 ชนิด มีการเปลี่ยนแปลงแสดงดังรูป 15 เมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีกรดแอซีติกร้อยละ 0.25 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก กรดแอซีติกมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นในระยะ 3 วันแรกของการหมัก หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงจนสิ้นสุดการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* หรือ *C. sorbosa* มีกรดแอซีติกในวันสุดท้ายของการหมักต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ส่วนชุดการทดลองควบคุมมีกรดแแอซีติกลดลงไม่มาก ในวันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae*, *C. sorbosa*, หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุมมี กรดแอซีติกเป็นร้อยละ 0.12, 0.11, 0.23 และ 0.20 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ กรดแอซีติกที่เพิ่มขึ้นในช่วงแรกของการหมัก เกิดจากยีสต์สร้างเอทานอลโดยการหมักน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มาก เมื่อมีการให้อากาศโดยการคนเมล็ดโกโก้ทำให้เกิดการออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดแอซีติก หลังจากนั้นเมื่อยีสต์มีปริมาณลดลง รวมทั้งน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ลดลง ทำให้มีเอทานอลลดลงด้วย กระบวนการออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดแอซีติกจึงเกิดขึ้นน้อยลง อีกทั้งกรดแอซีติกยังถูกออกซิไดซ์ไปเป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์อีกด้วย (Carr, *et al.*, 1979)

การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ แสดงดังรูป 16 พบว่าชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสลดลงเร็วกว่าชุดทดลองอื่น เนื่องจากเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ถูกย่อยสลายโดย *S. cerevisiae* อย่างรวดเร็ว น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีค่าเป็นร้อยละ 10.11 และ 6.25 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ในวันที่ 4 ของการหมักน้ำตาลรีดิวซ์จากชุดทดลองที่เติม *S. cerevisiae*, *C. sorbosa*, หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุม มีค่าร้อยละ 0.19, 0.22, 0.39 และ 0.48 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ส่วนน้ำตาลซูโครสในวันสุดท้ายของการหมักมีค่าร้อยละ 0.02, 0.06, 0.09 และ 0.17 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าน้ำตาลทั้งสองชนิดในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองควบคุมลดลงจากวันแรกของการหมักน้อยที่สุด เพราะว่าชุดการทดลองควบคุมมีจุลินทรีย์เจริญอยู่น้อย ทำให้ย่อยสลายน้ำตาลซูโครสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตสได้ต่ำ แต่ชุดทดลองที่เติม *S. cerevisiae* น้ำตาลทั้ง 2 ชนิดในเยื่อหุ้มเมล็ดลดลงมากที่สุด แสดงว่า *S. cerevisiae* สามารถย่อยสลายน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ได้ดี สอดคล้องกับการศึกษาของ Sanchez, *et al.* (1985) และยังสามารถย่อยสลายน้ำตาลไปเป็นแอลกอฮอล์ได้ดีอีกด้วย (Roelofsen, 1958) ชุดทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีของ

เหลวเกิดขึ้นในขวดหมักเร็วกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ เนื่องจาก *S. cerevisiae* สามารถย่อยสลายสารเพกตินในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ (Roelofsen, 1958) อันเป็นคุณลักษณะของจุลินทรีย์ที่ต้องการในการหมักเมล็ดโกโก้ (Sanchez, *et al.*, 1988)

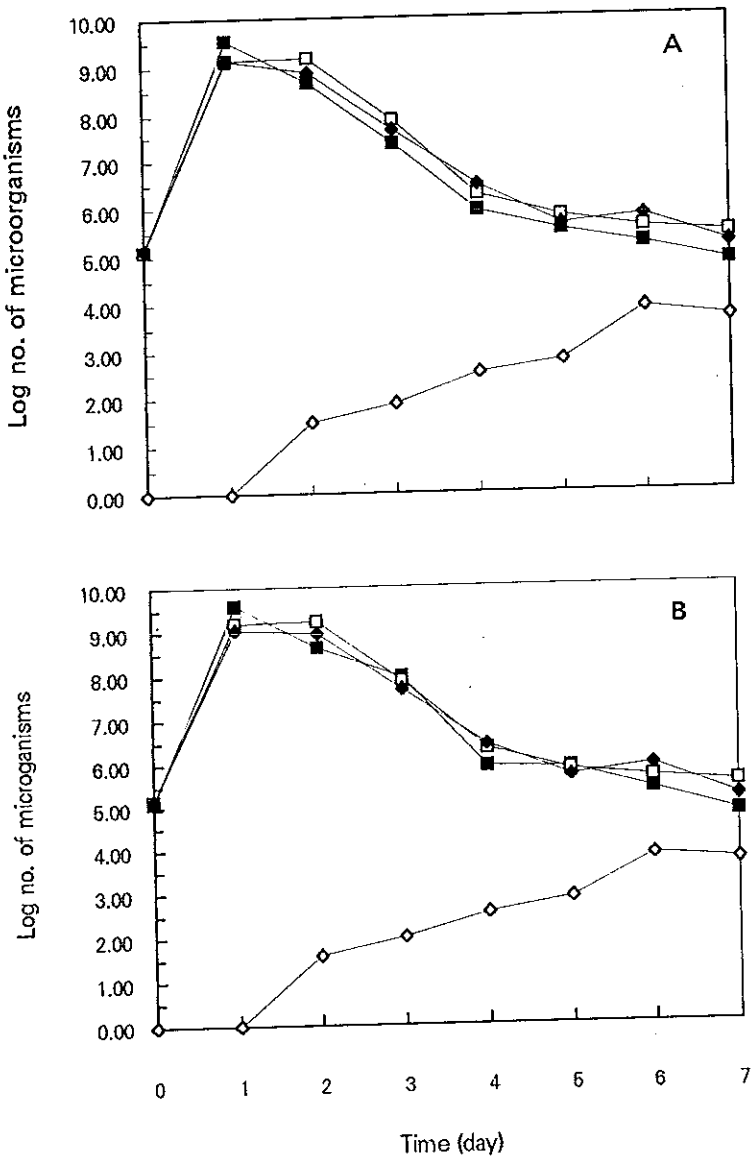
การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ แสดงดังรูป 17 ในเมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสร้อยละ 0.58 และ 2.02 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ น้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้มีค่าลดลงตลอดการหมัก โดยมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในตอนแรกของการหมัก เนื่องจากในช่วงแรกของการหมักเมล็ดโกโก้มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ในเมล็ดโกโก้ คือ มีอุณหภูมิ และมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น จากนั้นเมื่ออุณหภูมิของกองหมักลดลง กิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มนี้จึงลดลง ในวันสุดท้ายของการหมักน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้จากชุดทดลองที่เติม *S. cerevisiae, C. sorbosa,* หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุม มีค่าเป็นร้อยละ 0.06, 0.08, 0.07 และ 0.15 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ในระยะ 2 วันแรกของการหมัก น้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้มีค่าลดลงทุกชุดการทดลอง เนื่องจากน้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้เป็นสารตั้งต้นโดยกิจกรรมของเอนไซม์ภายในเมล็ดโกโก้ หลังจากนั้นน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 4 ของการหมัก ช่วงสุดท้ายของการหมักน้ำตาลรีดิวซ์เปลี่ยนแปลงไม่มากนัก น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเป็นผลจากการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ด้วยเอนไซม์ ในวันสุดท้ายของการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae, C. sorbosa,* หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุม มีค่าเป็นร้อยละ 0.98, 0.98, 0.99 และ 0.94 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ

ค่าดรรชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ในระหว่างการหมักด้วยยีสต์ และชุดการทดลองควบคุม แสดงดังรูป 18 ตลอดเวลาการหมักค่าดรรชนีการหมักมีค่าเพิ่มขึ้นทุกชุดการทดลอง เมล็ดโกโก้ตอนเริ่มต้นมีค่าดรรชนีการหมักเป็น 0.53 แสดงว่าเมล็ดโกโก้ที่บ่มไว้ 3 วัน ก่อนแกะเอาเมล็ดมาหมักเกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบภายในเมล็ดแล้วเช่นกัน หลังจากการหมัก 1 วัน ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีค่าดรรชนีการหมักสูงกว่าชุดการทดลองอื่นจนสิ้นสุดการหมัก วันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae, C. sorbosa,* หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุม มีค่าดรรชนีการหมักเป็น 1.16, 1.08, 0.99 และ 0.98 ตามลำดับ จากรูป 18 พบว่าในวันที่ 4 ของการหมักนั้นชุดการทดลองที่เติมยีสต์ทั้ง 3 ชนิด มีค่าดรรชนีการหมักที่ใกล้เคียงกับค่า 1.0 ซึ่งเป็นค่าดรรชนีการหมักที่บอกถึงการหมักที่ดี (Wood and Lass, 1985) แสดงว่า

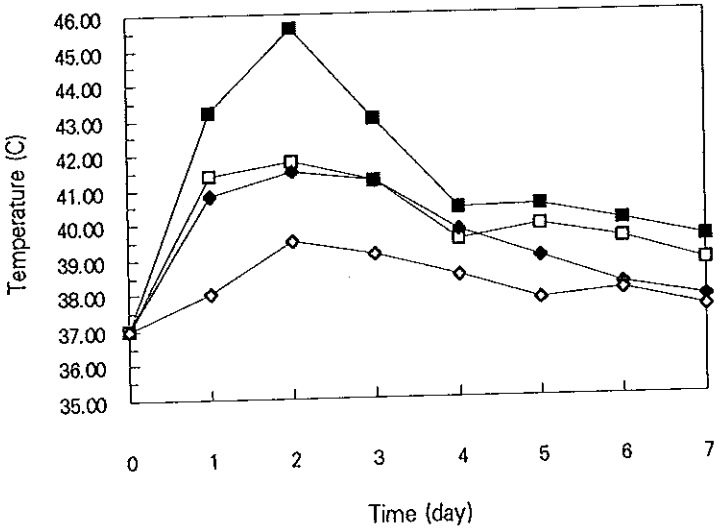
การหมักเมล็ดโกโก้ด้วยยีสต์นั้น เมล็ดโกโก้มีการเปลี่ยนแปลงในการหมักที่ดีตั้งแต่ประมาณวันที่ 4 ของการหมัก

หลังจากหมักเมล็ดโกโก้ครบ 7 วัน นำเมล็ดโกโก้ที่ได้ทั้ง 4 ชุดการทดลอง ไปทำแห้ง แล้วนำเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้มาผ่าเมล็ดเพื่อหาค่า Cut Test ของเมล็ดโกโก้สีต่าง ๆ ผลที่ได้แสดงดังตาราง 15 ซึ่งชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาล (10PR3/1,2) สูงสุด และมีความแตกต่างจากชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนชุดการทดลองควบคุมนั้นมีค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้ที่มีสีดังกล่าวน้อยที่สุด และมีค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้สีม่วงแกมน้ำตาลสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ซึ่งเป็นลักษณะของเมล็ดโกโก้ที่เกิดการหมักไม่สมบูรณ์ แสดงว่าเมล็ดโกโก้หากปล่อยให้เกิดการหมักขึ้นตามปกติต้องใช้ระยะเวลาในการหมักนานขึ้น

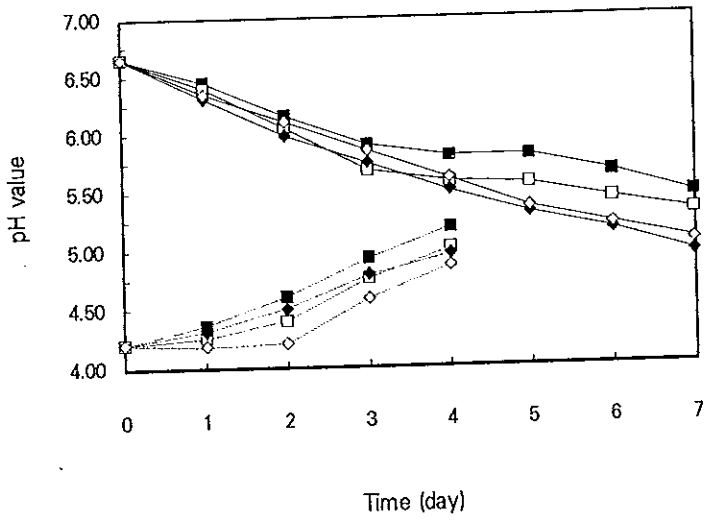
องค์ประกอบต่าง ๆ ของเมล็ดโกโก้ที่ได้ในวันสุดท้ายของการหมักด้วยยีสต์ทั้ง 3 ชนิด แสดงดังตาราง 16 และเมื่อนำไปทำแห้งแล้วมีคุณภาพดังตาราง 17 ดังนั้นผลการศึกษาเพื่อคัดเลือกยีสต์ที่เหมาะในการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ พบว่าการหมักเมล็ดโกโก้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วย *S. cerevisiae* มีความเหมาะสมมากกว่าชุดการทดลองอื่น เนื่องจากชุดการทดลองดังกล่าวมีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นสูงสุด เกิดการย่อยสลายเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ได้เร็ว ทั้งมีค่าดรรชนีการหมักสูง และมีอุณหภูมิของกองหมักเพิ่มขึ้นสูงเพียงพอที่ทำให้เอนไซม์ต่าง ๆ ในเมล็ดโกโก้เกิดกิจกรรม นอกจากนั้นเมล็ดโกโก้ที่ได้จากชุดการทดลองดังกล่าวยังมีปริมาณกรดทั้งหมด กรดแลคติก และกรดที่ระเหยได้ต่ำ มีค่าพีเอชสูงกว่าชุดการทดลองอื่น และยังให้ค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลช็อกโกแลตสูงกว่าชุดการทดลองอื่น



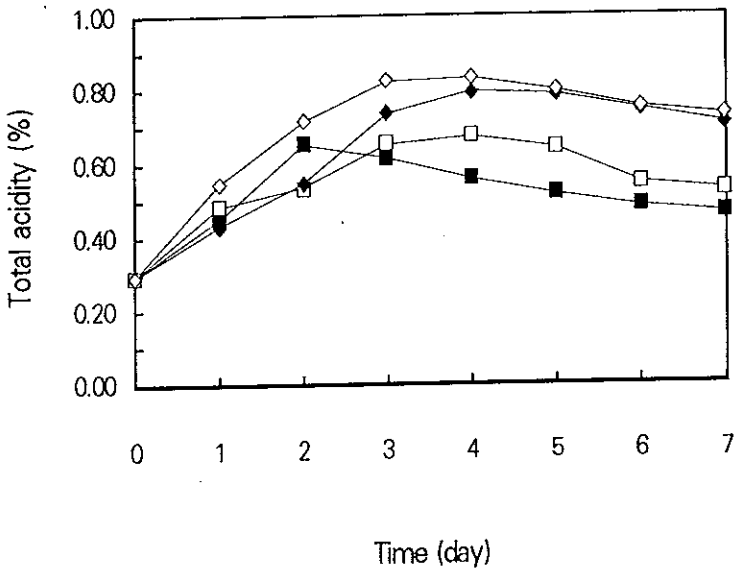
รูป 10 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร PDA (A) และ TYGKCP (B) ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *S. cerevisiae* (-■-), *C. sorbosa* (-□-), *C. sake* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



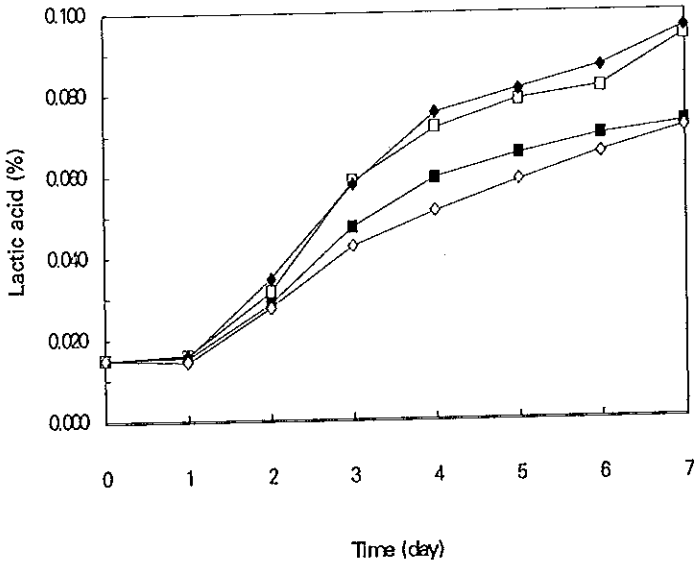
รูป 11 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *S. cerevisiae* (-■-), *C. sorbosa* (-□-), *C. sake* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



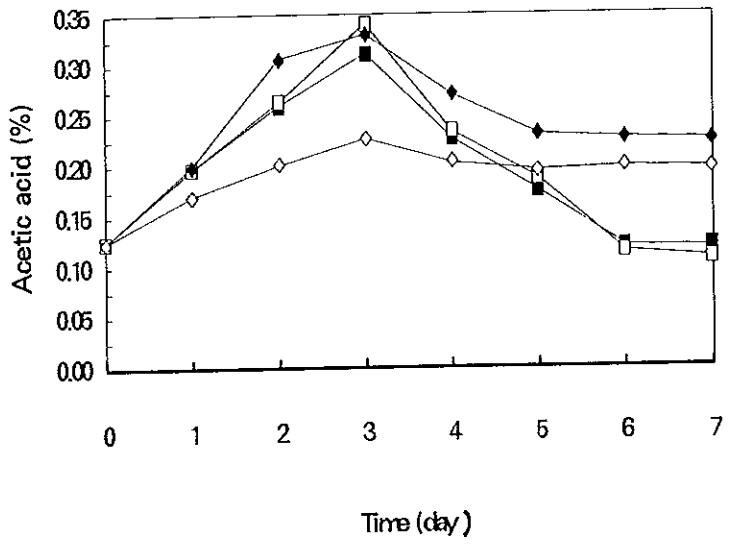
รูป 12 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ (------) และเมล็ดโกโก้ (——) ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *S. cerevisiae* (-■-), *C. sorbosa* (-□-), *C. sake* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



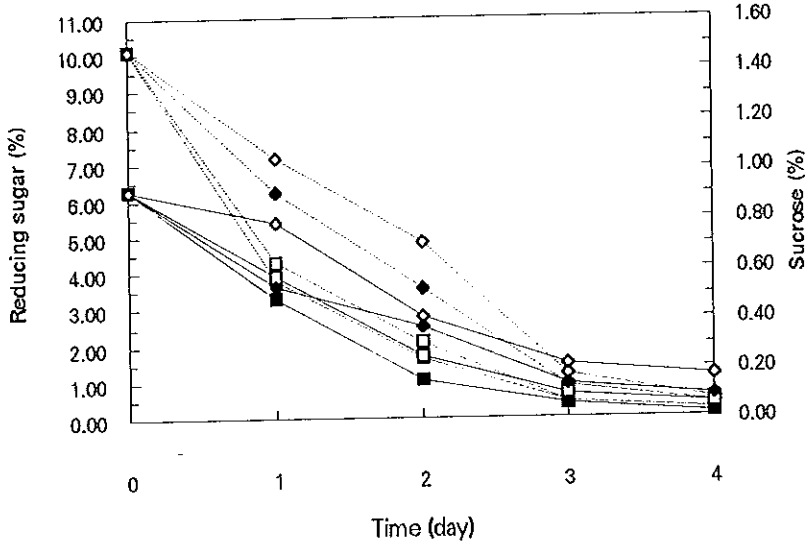
รูป 13 การเปลี่ยนแปลงกรดทั้งหมดในเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae* (-■-), *C. sorbosa* (-□-), *C. sake* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



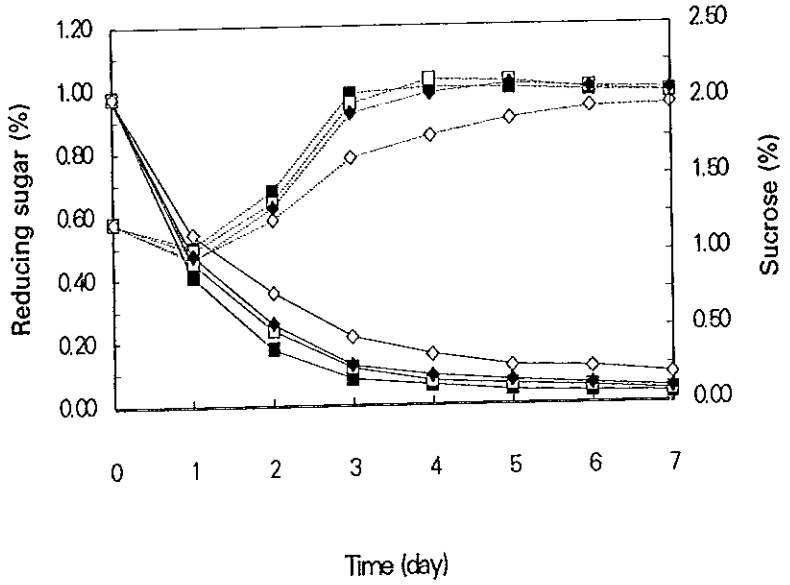
รูป 14 การเปลี่ยนแปลงกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae* (-■-), *C. sorbosa* (-□-), *C. sake* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



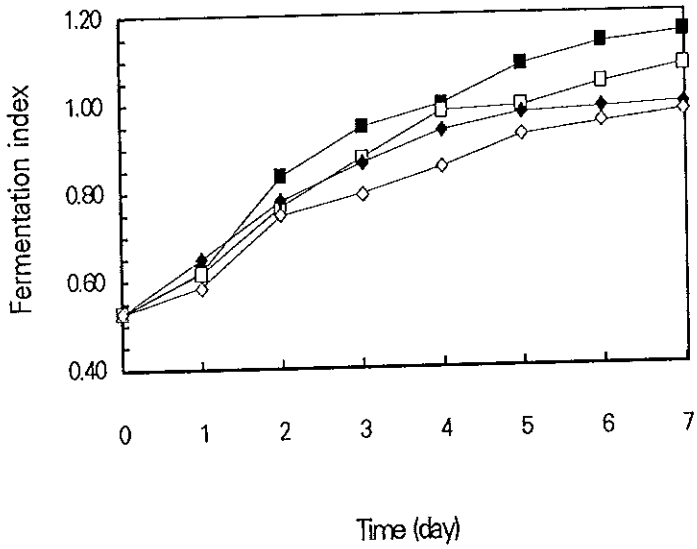
รูป 15 การเปลี่ยนแปลงกรดที่ระเหยได้ในเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae* (-■-), *C. sorbosa* (-□-), *C. sake* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



รูป 16 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ (------) และน้ำตาลซูโครส (——) ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae* (-■-), *C. sorbosa* (-□-), *C. sake* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



รูป 17 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ (------) และน้ำตาลซูโครส (——) ในเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae* (-■-), *C. sorbosa* (-□-), *C. sake* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



รูป 18 การเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ ในระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae* (-■-), *C. sorbosa* (-□-), *C. sake* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ตาราง 15 การเปลี่ยนแปลง ค่า Cut Test ของเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์ทั้ง 3 ชนิด เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ชุดการทดลอง (ยีสต์ที่เติม)	สีเมล็ดโกโก้แห้ง (ร้อยละ)[1]			
	สีน้ำตาล	สีม่วงแกมน้ำตาล	สีหินชนวน	สีอื่น ๆ
S. cerevisiae	77.78^{a} [2]	21.11^{c}	1.11^{c}	0.00^{b}
C. sorbosa	71.11^{b}	22.22^{bc}	4.44^{b}	0.67^{ab}
C. sake	70.00^{b}	24.44^{b}	5.56^{b}	0.00^{b}
Control	42.22^{c}	38.89^{a}	14.44^{a}	1.33^{a}

1 ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

2 อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตาราง 16 องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมัก ด้วยยีสต์ที่คัดเลือก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

องค์ประกอบ[1]	ชนิดของยีสต์ที่เติม			
	S. cerevisiae	*C. sorbosa*	*C. sake*	Control
น้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ด (%)[3]	0.19 ± 0.02[d 2]	0.22 ± 0.01[c]	0.39 ± 0.01[b]	0.48 ± 0.01[a]
น้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ด (%)[3]	0.02 ± 0.01[c]	0.06 ± 0.01[bc]	0.09 ± 0.01[ab]	0.17 ± 0.01[a]
น้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ด (%)	0.98 ± 0.01[a]	0.98 ± 0.01[a]	0.99 ± 0.01[a]	0.96 ± 0.01[a]
น้ำตาลซูโครสในเมล็ด (%)	0.06 ± 0.01[b]	0.06 ± 0.01[b]	0.07 ± 0.00[b]	0.15 ± 0.01[a]
ดรรชนีการหมัก (OD460/OD530)	1.16 ± 0.01[a]	1.08 ± 0.01[b]	0.99 ± 0.01[c]	0.98 ± 0.01[c]
ปริมาณกรดทั้งหมด (% กรดซิตริก)	0.46 ± 0.01[b]	0.53 ± 0.01[b]	0.71 ± 0.01[a]	0.73 ± 0.01[a]
ปริมาณกรดที่ระเหยได้ (% กรดแอซีติก)	0.12 ± 0.01[c]	0.11 ± 0.01[c]	0.23 ± 0.01[a]	0.20 ± 0.01[b]
ปริมาณกรดแลคติก (% กรดแลคติก)	0.07 ± 0.00[c]	0.09 ± 0.01 [b]	0.10 ± 0.00[a]	0.07 ± 0.00[c]
ค่าพีเอช	5.45 ± 0.00[a]	5.30 ± 0.00[a]	5.15 ± 0.00[b]	4.85 ± 0.00[c]

1 ค่าร้อยละโดยน้ำหนักสด ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2 อักษรเหมือนกันในแถวนอนเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

3 ปริมาณน้ำตาลที่วัดได้ในวันที่ 4 ของการหมัก

ตาราง 17 องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้แห้งจากการหมักด้วยยีสต์ที่คัดเลือก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

องค์ประกอบ[1]	ชนิดของยีสต์ที่เติม			
	S. cerevisiae	*C. sorbosa*	*C. sake*	Control
น้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้ (%)	0.99 ± 0.03^{a} [2]	0.96 ± 0.04^{b}	0.94 ± 0.03^{c}	0.95 ± 0.04^{b}
น้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ (%)	0.06 ± 0.01^{b}	0.07 ± 0.01^{b}	0.06 ± 0.01^{b}	0.13 ± 0.03^{a}
ดรรชนีการหมัก (OD460/OD530)	1.19 ± 0.04^{a}	1.13 ± 0.05^{b}	1.05 ± 0.06^{c}	1.01 ± 0.04^{c}
ปริมาณกรดทั้งหมด (% กรดซิตริก)	0.32 ± 0.02^{c}	0.41 ± 0.04^{b}	0.46 ± 0.05^{a}	0.50 ± 0.04^{a}
ปริมาณกรดที่ระเหยได้ (% กรดแอซีติก)	0.09 ± 0.01^{c}	0.10 ± 0.02^{c}	0.12 ± 0.03^{a}	0.10 ± 0.03^{b}
ปริมาณกรดแลคติก (% กรดแลคติก)	0.10 ± 0.01^{c}	0.13 ± 0.00^{b}	0.13 ± 0.00^{a}	0.12 ± 0.01^{bc}
ปริมาณไขมัน (%)	54.47 ± 1.65^{a}	52.57 ± 3.10^{b}	51.83 ± 2.73^{c}	51.45 ± 2.52^{c}
ปริมาณความชื้น (%)	8.35 ± 0.95^{c}	9.45 ± 0.83^{a}	9.50 ± 0.91^{a}	9.10 ± 0.53^{b}
ค่าพีเอช	5.75 ± 0.05^{a}	5.45 ± 0.05^{b}	5.30 ± 0.10^{b}	5.00 ± 0.08^{c}

1 ค่าร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2 อักษรเหมือนกันในแถวนอนเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

บทบาทของแบคทีเรียแลคติกในการหมักเมล็ดโกโก้

แบคทีเรียแลคติกที่ใช้ศึกษาในตอนนี้มี 3 ชนิด คือ *Lactobacillus casei, Leuconostoc mesenteroides* และ *Streptococcus thermophilus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลคติกที่พบมากในการหมักเมล็ดโกโก้ตามธรรมชาติ (ดวงใจ ช่วยสถิตย์, 2535) *L. casei* และ *S. thermophilus* เป็นแบคทีเรียแลคติกกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ ส่วน *Leu. mesenteroides* อยู่ในกลุ่มเฮทโทโรเฟอร์เมนเตทีฟ (ดวงใจ ช่วยสถิตย์, 2535; Passos, *et al.*, 1984) นำแบคทีเรียแลคติกแต่ละชนิดเติมลงในขวดหมักเมล็ดโกโก้ ใช้แบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก มีจุลินทรีย์ประมาณ $2.95X10^5$ ถึง $3.09X10^5$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สุ่มตัวอย่างทุกวัน เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิด ขึ้นทั้งด้านจุลินทรีย์ และด้านเคมีของเมล็ดโกโก้ทั้ง 3 ชุดการทดลอง เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมจุลินทรีย์ลงไป

การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร MRS ซึ่งเป็นอาหารจำเพาะต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติก และอาหาร TYGKCP ซึ่งเป็นอาหารที่จุลินทรีย์ทั่วไปที่เจริญในการหมักเมล็ดโกโก้สามารถเจริญได้ แสดงดังรูป 19 พบว่าทุกชุดการทดลองมีปริมาณจุลินทรีย์บนอาหาร MRS เพิ่มขึ้นในระยะ 2 วันแรกของการหมัก โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 2 ของการหมักเป็น $1.62X10^8$, $3.72X10^7$, $5.37X10^7$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Passos, *et al.* (1984) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลคติกในการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก ในประเทศบราซิล พบว่าในระยะ 48 ชั่วโมงแรกของการหมักนั้น แบคทีเรียแลคติกมีปริมาณสูง เนื่องจากในระยะดังกล่าวปริมาณอากาศในกองหมักเป็นปัจจัยจำกัดการเจริญของยีสต์ และส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแลคติก เพราะแบคทีเรียแลคติกนั้นไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (Passos, *et al.*, 1984; Staman, 1979) หลังจากนั้นทุกชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกมีจุลินทรีย์ลดลง วันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติม *L. casei, Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม มีจุลินทรีย์บนอาหาร MRS เป็น $1.12X10^4$, $3.02X10^4$, $5.37X10^4$ และ $9.44X10^2$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ตามลำดับ

เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างกรดแลคติกขึ้นในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้แล้วไม่สามารถระเหยได้ในขั้นตอนต่อ ๆ ไป จากผลการทดลองที่ได้ชุดการทดลองที่เติม *Leu. mesenteroides* และ *S. thermophilus* มีจุลินทรีย์สูงกว่าชุดการทดลองที่เติม *L. casei* ดังนั้นการที่

มีแบคทีเรียแลคติกอยู่ในกองหมักมาก อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มีการเพิ่มของกรดแลคติกในกองหมักเมล็ดโกโก้ (Rohan and Stewart, 1964; Weissberger, *et el.*, 1971)

การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP พบว่าทุกชุดการทดลองมีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นใน 2 วันแรกของการหมัก เช่นเดียวกับบนอาหาร MRS หลังจากนั้นจุลินทรีย์มีปริมาณลดลงจนสิ้นสุดการหมัก และทุกชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกที่เวลาเดียวกันปริมาณจุลินทรีย์บนอาหารทั้ง 2 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในการหมักเมล็ดโกโก้นั้นเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เติมลงไปเป็นสำคัญ ส่วนชุดการทดลองควบคุมในระยะ 2 วันแรกของการหมัก ไม่พบจุลินทรีย์บนอาหารทั้ง 2 ชนิด แต่หลังจากนั้นมีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น และมีจุลินทรีย์สูงสุดในวันสุดท้ายของการหมัก วันสุดท้ายของการหมักมีปริมาณจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP ของชุดการทดลองที่เติม *L. casei, Leu. mesenteroides,* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม เป็น $1.32X10^4$, $3.39X10^4$, $6.17X10^4$ และ $9.55X10^2$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียแลคติกในการหมักเมล็ดโกโก้มีผลสอดคล้องกับรายงานของ Passos, *et al.* (1984) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียแลคติกในตระกูล Lactobacilaceae สามารถเจริญได้ดีในระยะแรกของการหมัก ขณะที่ในช่วงสุดท้ายของการหมักเมล็ดโกโก้นั้น แบคทีเรียแลคติกกลุ่ม Streptococcaceae สามารถเจริญและมีปริมาณที่สูงกว่าในกองหมัก ปรากฏการณ์นี้อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้แบคทีเรียกลุ่มแบซิลลัสเจริญได้ในระยะสุดท้ายของการหมักเมล็ดโกโก้ตามธรรมชาติ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในระหว่างการหมัก

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขวดหมักเมล็ดโกโก้ที่หมักด้วยแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 ชนิด และชุดการทดลองควบคุม แสดงดังรูป 20 อุณหภูมิเริ่มต้นของทุกชุดการทดลองเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ในชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 ชุด มีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นในระยะ 2 วันแรกของการหมัก แล้วมีค่าลดลงจนสิ้นสุดการหมัก โดยชุดการทดลองที่เติม *L. casei, Leu. mesenteroides* และ *S. thermophilus* มีอุณหภูมิสูงสุดเป็น 41.0, 40.5 และ 38.5 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญของแบคทีเรียแลคติก ที่มีค่าระหว่าง 40 ถึง 42 องศาเซลเซียส (Forsyth and Quesnel, 1963) การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในระยะแรกของกองหมักเป็นผลจากการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่มีการย่อยสลายน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Berbert, 1979; Passos, *et al.*, 1984) และกรดอินทรีย์โดยเฉพาะกรดซิตริก (Forsyth and Quesnel, 1963) ไปเป็น

กรดแลคติก กรดแอซีติก และคาร์บอนไดออกไซด์ ในแบคทีเรียแลคติกกลุ่มเฮทโทโรเฟอร์เมนเตทีฟ หรือเป็นสารอะซีติลเมทิลคาร์ไบนอล (acetylmethyl carbinol) และคาร์บอนไดออกไซด์ ในแบคทีเรียแลคติกกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ และปล่อยพลังงานความร้อนออกมา (Passos, *et. al.*, 1984) สำหรับชุดการทดลองควบคุมมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในระยะแรกของการหมักเท่านั้น เพราะชุดควบคุมมีจุลินทรีย์เจริญอยู่น้อย โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมักเป็น 38.5 องศาเซลเซียส การที่อุณหภูมิของกองหมักลดลงในระยะสุดท้ายของการหมักเป็นผลจากมวลของเมล็ดโกโก้ที่ใช้หมักมีน้อย ดังนั้นความร้อนจากขบวนการหมัก ขบวนการเมตาบอลิซึมของน้ำตาล และขบวนการออกซิเดชันของเอทานอลและกรดอินทรีย์มีปริมาณต่ำ ไม่คงอยู่ในภาชนะหมักได้นานเพียงพอ รวมถึงการหมักเมล็ดโกโก้ปริมาณน้อย ๆ จะสูญเสียความร้อนได้เร็วกว่าปกติ (Glossop, 1983)

การเปลี่ยนแปลงพีเอชในเมล็ดโกโก้และเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในระหว่างการหมักด้วยแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 ชนิด แสดงดังรูป 21 เมล็ดโกโก้และเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.68 และ 3.76 ตามลำดับ เมื่อเวลาการหมักเพิ่มขึ้นเมล็ดโกโก้มีค่าพีเอชลดลง ขณะที่เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีค่าพีเอชเพิ่มสูงขึ้น ในชุดการทดลองที่เติม *L. casei* มีพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักเป็น 5.65 ซึ่งสูงกว่าพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกชนิดอื่น ๆ ส่วนพีเอชในเมล็ดโกโก้นั้นชุดการทดลองที่เติม *Leu. mesenteroides* มีค่าต่ำที่สุด และชุดการทดลองควบคุมมีพีเอชในเมล็ดสูงสุด ซึ่งสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ การเพิ่มขึ้นของพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในระยะแรกของการหมักนั้นมีผลส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแลคติก เพราะที่พีเอชต่ำ ๆ (3.6 - 4.0) จะเป็นอันตรายต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติก (Forsyth and Quesnel, 1963) ในวันสุดท้ายของการหมักพีเอชของเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติม *L. casei*, *Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุมมีค่าเป็น 5.65, 5.45, 5.50 และ 5.70 ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงกรดทั้งหมดระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ แสดงดังรูป 22 เมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีกรดทั้งหมดเป็นร้อยละ 0.29 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ซึ่งทุกชุดการทดลองมีกรดทั้งหมดสูงขึ้นในช่วงแรกแล้วมีค่าลดลงในระยะสุดท้ายของการหมัก ในชุดการทดลองที่เติม *L. casei* มีกรดทั้งหมดต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นเกือบตลอดการหมัก สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชที่ได้ ปริมาณกรดทั้งหมดในเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักจากชุดการทดลองที่เติม

L. casei, Leu. mesenteroides, หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุมมีค่าร้อยละ 0.48, 0.55, 0.71 และ 0.68 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ซึ่งชุดการทดลองที่เติม *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม มีกรดทั้งหมดสูงกว่าอีก 2 ชุดการทดลองที่เหลือ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ปริมาณกรดทั้งหมดในวันสุดท้ายของการหมักมีค่าต่ำลง เนื่องจากกรดซิตริกสามารถเปลี่ยนไปเป็น กรดแลคติก กรดแอซีติก และคาร์บอนไดออกไซด์ได้ โดยกิจกรรมของแบคทีเรียแลคติก (Passos, *et al.*, 1984) และเป็นผลจากเมื่อมีการให้อากาศแก่กองหมักเมล็ดโกโก้ กรดซิตริกถูกออกซิไดซ์เป็นกรดแลคติกได้ (Weissberger, *et al.*, 1971)

กรดแลคติกในเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่หมักด้วยแบคทีเรียแลคติกแต่ละชนิดเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม แสดงดังรูป 23 ตลอดการหมักกรดแลคติกมีปริมาณเพิ่มขึ้น เนื่องจากกรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ที่ไม่ระเหยมีการสะสมอยู่ในเมล็ดโกโก้ตลอดการหมัก จากรูปกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้เริ่มต้นมีค่าร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก กรดแลคติกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระหว่างวันที่ 2 - 5 ของการหมัก เป็นผลมาจากมีจุลินทรีย์เพิ่มปริมาณขึ้นมากในระยะดังกล่าว กรดแลคติกในชุดการทดลองที่เติม *L. casei* หรือ *S. thermophilus* มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่เติม *Leu. mesenteroides* เพราะว่าแบคทีเรียแลคติก 2 ชนิดแรกอยู่ในกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสด้วยวิถี Embden-Meyerhof ได้ผลผลิตเป็นกรดแลคติกสูงกว่าร้อยละ 85 ส่วน *Leu. mesenteroides* นั้นเป็นแบคทีเรียแลคติกในกลุ่มเฮทโทโรเฟอร์เมนเตทีฟ ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านวิถี Hexose monophosphste ได้ผลผลิตเป็นกรดแลคติกประมาณร้อยละ 50 นอกจากนี้ยังได้เป็นเอทานอล กรดแอซีติก กลีเซอรอล แมนนีทอล และคาร์บอนไดออกไซด์อีกด้วย (Passos, *et al.*, 1984) กรดแลคติกในเมล็ดโกโก้จาก วันสุดท้ายของการหมักของชุดการทดลองที่เติม *L. casei, Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุมมีค่าเป็นร้อยละ 0.08, 0.07, 0.08 และ 0.04 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ กรดแลคติกในชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่เติมด้วยยีสต์ เพราะแบคทีเรียแลคติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดแลคติกได้โดยตรงดังที่กล่าวข้างต้น ส่วนชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรียแลคติก มีกรดแลคติกต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น เพราะว่าชุดการทดลองควบคุมมีจุลินทรีย์อยู่น้อย เป็นผลให้การย่อยสลายสารอาหารโดยเฉพาะน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในเยื่อหุ้มเมล็ดเกิดขึ้นได้น้อย

การเปลี่ยนแปลงกรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 ชนิด แสดงดังรูป 24 เมล็ดโกโก้เริ่มต้นก่อนการหมักมีกรดที่ระเหยได้ร้อยละ 0.13 โดยน้ำหนัก ใน 3 วันแรกของการหมัก ทุกชุดการทดลองมีกรดที่ระเหยได้เพิ่มขึ้น เนื่องจากในระยะดังกล่าวเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ยังย่อยสลายไม่หมด ทำให้จุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่เจริญในการหมักสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ได้ และมีการสร้างเอทานอลขึ้นในกองหมัก ในระยะต่อมาเมื่อให้อากาศแก่กองหมักจะเกิดการออกซิเดชันของเอทานอลเป็นกรดแอซีติก แล้วกรดแอซีติกจะซึมผ่านผนังหุ้มเมล็ดโกโก้เข้าสู่ภายในเมล็ดโกโก้ในเวลาต่อมา (Roelofsen, 1958) เมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองที่เติม *Leu. mesenteroides* มีกรดแอซีติกสูงกว่าชุดการทดลองอื่น และมีค่าสูงสุดในวันที่ 3 ของการหมัก เป็นร้อยละ 0.40 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก เพราะ *Leu. mesenteroides* เป็นแบคทีเรียแลคติกกลุ่มเฮทโทโรเฟอร์เมนเทตีฟ ที่สร้างกรดแอซีติกได้ในขณะสร้างกรดแลคติก และกรดแอซีติกดังกล่าวสามารถแพร่เข้าสู่ภายในเมล็ดโกโก้ได้ (Passos, *et al.*, 1984) ชุดการทดลองควบคุมมีกรดแอซีติกในเมล็ดโกโก้ต่ำที่สุด หลังจากนั้นกรดแอซีติกมีค่าลดลงจนสิ้นสุดการหมัก กรดที่ระเหยได้มีค่าลดลงเนื่องจากในระยะดังกล่าวกรดแอซีติกถูกออกซิไดซ์ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ในวันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติม *L. casei, Leu. mesenteroides, หรือ S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม ให้เมล็ดโกโก้ที่มีกรดที่ระเหยได้เป็นร้อยละ 0.19, 0.22, 0.21 และ 0.17 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่หมักด้วยแบคทีเรียแลคติกชนิดต่าง ๆ แสดงดังรูป 25 น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เริ่มต้นมีค่าร้อยละ 11.02 และ 2.16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ชุดการทดลองที่เติม *L. casei* น้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีค่าลดลงต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น ขณะที่ชุดการทดลองควบคุมมีน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงน้อยที่สุด เนื่องจาก *L. casei* เป็นแบคทีเรียแลคติกในกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ ใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านวิถี Embden-Meyerhof pathway ซึ่งสามารถย่อยสลายน้ำตาลกลูโคสได้ดีกว่า *Leu. mesenteroides* ที่เป็นแบคทีเรียแลคติกกลุ่มเฮทโทโรเฟอร์เมนเตทีฟ ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านวิถี Hexose monophosphate pathway อันเป็นวิถีในการสร้างสารตัวกลางที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมต่าง ๆ กัน มีการสร้างพลังงานน้อย และมีการใช้กลูโคสต่ำ (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2533) น้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 ชุดการทดลองลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 - 4 ของการหมัก เพราะในระยะดังกล่าว

จุลินทรีย์ในกองหมักมีปริมาณสูง วันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติม *L. casei, Leu. mesenteroides,* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม มีน้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เป็นร้อยละ 1.51, 1.87, 1.74 และ 6.26 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ และมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

น้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ตลอดการหมักมีค่าลดลง ในวันสุดท้ายของการหมัก น้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติม *L. casei, Leu. mesenteroides,* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม มีค่าเป็นร้อยละ 0.10, 0.18, 0.22 และ 0.48 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ การลดลงของน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้นั้นสัมพันธ์กับการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ในชุดการทดลองควบคุมน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสลดลงน้อยกว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติก เนื่องจากชุดควบคุมมีจุลินทรีย์ต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น

จากผลการทดลองการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยการเติมแบคทีเรียแลคติก เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในการหมักเมล็ดโกโก้ที่เติมด้วยยีสต์ พบว่าการเติมด้วยแบคทีเรียแลคติกนั้นเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ถูกย่อยสลายได้น้อยกว่า และเหลือน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้สูงกว่า การหมักที่เติมด้วยยีสต์

การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ ในระหว่างการหมักแสดงดังรูป 26 เมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลซูโครสร้อยละ 0.92 และ 1.73 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ตลอดการหมักน้ำตาลซูโครสมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในระยะแรกของการหมัก หลังจากนั้นจนสิ้นสุดการหมักน้ำตาลซูโครสลดลงเพียงเล็กน้อย เนื่องจากในระยะแรกของการหมักน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ถูกย่อยสลายไปเป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตสอย่างรวดเร็ว (Reineccius, *et al.*, 1972) เพราะกองหมักมีอุณหภูมิสูงขึ้น และเมล็ดโกโก้มีความเป็นกรดมากขึ้นจึงทำให้เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในเมล็ดโกโก้เกิดกิจกรรม หลังจากนั้นเมื่อกองหมักมีอุณหภูมิลดลง ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ลดลง รวมทั้งปริมาณน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้มีค่าลดต่ำลงด้วย จึงทำให้การลดลงของน้ำตาลซูโครสในตอนสุดท้ายของการหมักมีน้อย ในวันสุดท้ายของการหมักน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติม *L. casei, Leu. mesenteroides,* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม มีค่าร้อยละ 0.21, 0.30, 0.27 และ 0.53 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ

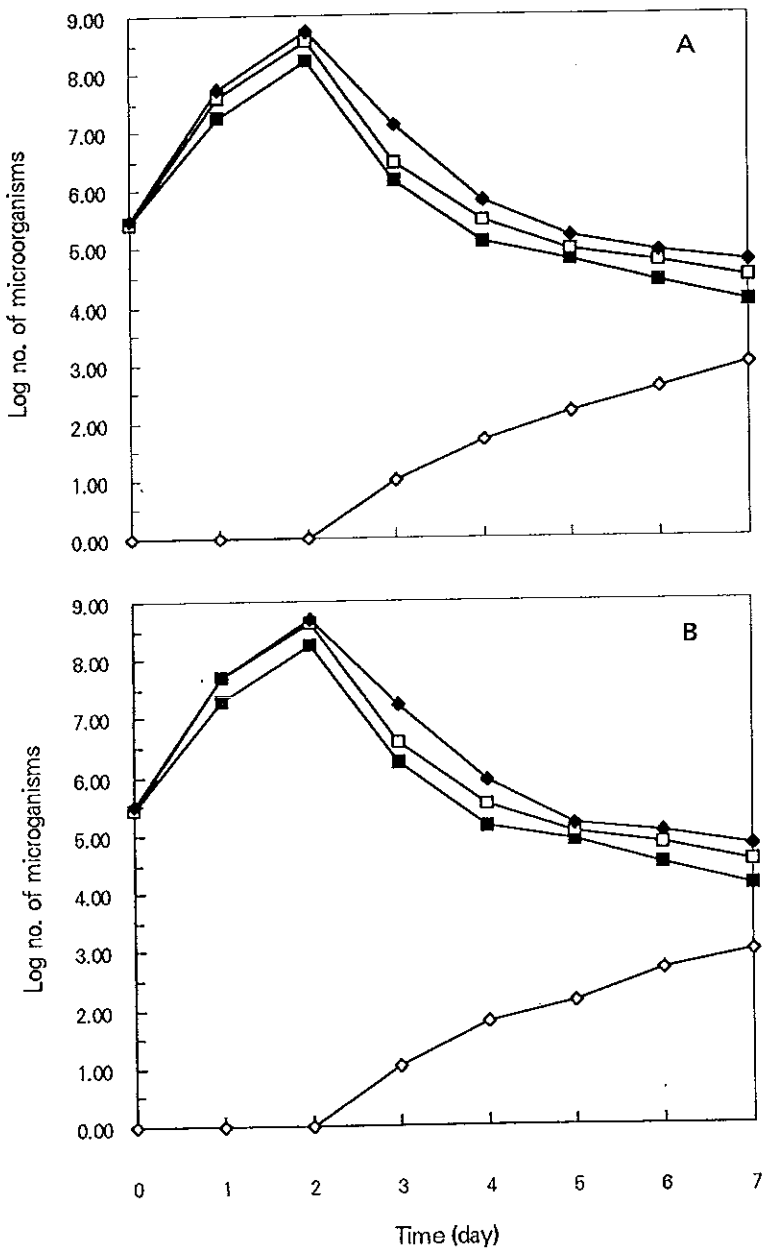
ส่วนน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกชนิดต่าง ๆ นั้น ในระยะแรกของการหมักมีค่าสูงขึ้นจากค่าเริ่มต้นที่มีค่าเป็นร้อยละ 0.92 โดยน้ำหนัก น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเป็นผลจากการย่อยน้ำตาลซูโครสภายในเมล็ดโกโก้ด้วยกิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ หลังจากนั้นน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการหมัก เพราะว่าในระยะดังกล่าวน้ำตาลรีดิวซ์บางส่วนในเมล็ดโกโก้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารตั้งต้นของสารให้กลิ่นรส สอดคล้องกับรายงานของ Rohan และ Stewart (1967) ซึ่งพบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้ มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นในระยะ 3 - 4 วันแรกของการหมักหลังจากนั้นมีปริมาณลดลง ในวันสุดท้ายของการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติม *L. casei*, *Leu. mesenteroides*, หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุมมีค่าร้อยละ 1.14, 1.01, 1.00 และ 0.96 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ การที่ชุดการทดลองที่เติม *L. casei* มีน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ เป็นผลให้สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลไปเป็นสารสีน้ำตาลและสารตั้งต้นของสารให้กลิ่นรสช็อกโกแลตในระยะการทำแห้งและในการแปรรูปเมล็ดโกโก้ได้ดีกว่าเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกชนิดอื่น (Lahrian and Patterson, 1983)

การเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักในชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม แสดงดังรูป 27 เมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีค่าดรรชนีการหมักเป็น 0.50 เมื่อระยะการหมักนานขึ้นทุกชุดการทดลองมีค่าดรรชนีการหมักเพิ่มสูงขึ้น โดยใน 2 วันแรกของการหมัก ค่าดรรชนีการหมักมีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย เพราะในระยะดังกล่าวเมล็ดโกโก้มีการเปลี่ยนแปลงภายในเมล็ดน้อย ซึ่งเป็นผลจากปัจจัยแวดล้อม เช่น กองหมักมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นน้อย และค่าพีเอชของเมล็ดโกโก้ลดลงไม่มาก เมื่อกองหมักมีอุณหภูมิและพีเอชเหมาะสม ทำให้เอนไซม์เกิดกิจกรรมเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในเมล็ดโกโก้ โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของเม็ดสีจากสารสีม่วงเป็นสารสีน้ำตาลช็อกโกแลตเกิดได้ดี (Forsyth and Quesnel, 1963) ทำให้ค่าดรรชนีการหมักซึ่งเป็นการวัดสัดส่วนของสารสีน้ำตาลต่อสารสีม่วงมีค่าสูงขึ้นในวันต่อ ๆ มา วันสุดท้ายของการหมักเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองต่าง ๆ มีค่าดรรชนีการหมักเป็น 0.98, 0.96, 0.97 และ 0.86 ตามลำดับ ซึ่งค่าดรรชนีการหมักที่ได้มีค่าต่ำ เมื่อเทียบกับการทดลองที่เติมด้วยยีสต์ ถึงแม้ทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน แต่ค่าดรรชนีการหมักที่ได้มีค่าไม่ถึง 1 ซึ่งเป็นค่าดรรชนีการหมักที่ดีพอ (Wood and Lass, 1985) แสดงว่าแบคทีเรียแลคติกนั้นมีบทบาทในด้านการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเมล็ดโกโก้น้อยกว่ายีสต์

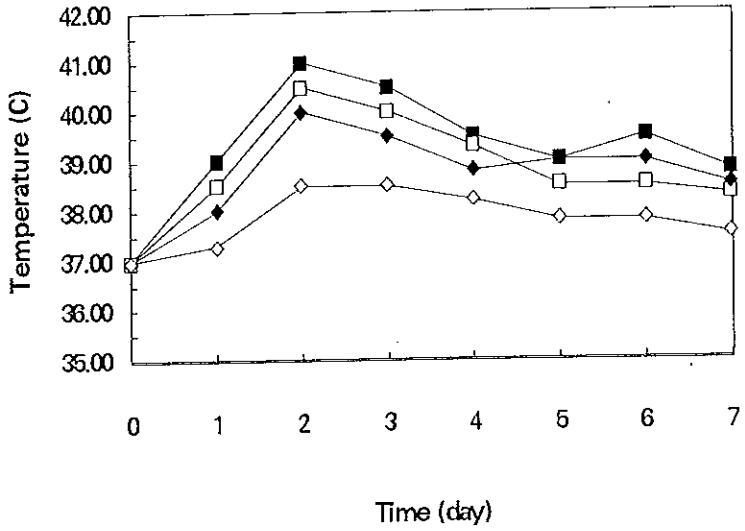
หลังจากสิ้นสุดการหมักนำเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองต่าง ๆ ที่เติมแบคทีเรียแลคติก ทั้ง 3 ชุด และชุดการทดลองควบคุม ไปทำแห้ง แล้วนำเมล็ดโกโก้ที่ได้มาผ่าเมล็ดเพื่อหาค่า Cut Test ของเมล็ดโกโก้สีต่าง ๆ ผลที่ได้แสดงได้ดังตาราง 18 ชุดการทดลองที่เติม *L. casei* นั้น ให้ค่าร้อยละเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลช็อกโกแลต (10PR3/1,2) สูงสุดและมีค่าแตกต่างจากชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนชุดการทดลองที่เติม *Leu. mesenteroides* ให้ค่าเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลสูงกว่าชุดการทดลองที่เติม *S. thermophilus* ซึ่งให้ค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลไม่แตกต่างกับชุดการทดลองควบคุม และจากผลการทดลองพบว่าค่า Cut test ของ เมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียแลคติกมีค่าต่ำกว่าการหมักด้วยยีสต์ ทั้งนี้เพราะการหมักด้วยยีสต์นั้นกองหมักมีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในเมล็ดโกโก้มากกว่าการหมักด้วยแบคทีเรียแลคติก

องค์ประกอบต่าง ๆ ของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักด้วยแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แสดงดังตาราง 19 ส่วนองค์ประกอบของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียแลคติก แสดงดังตาราง 20

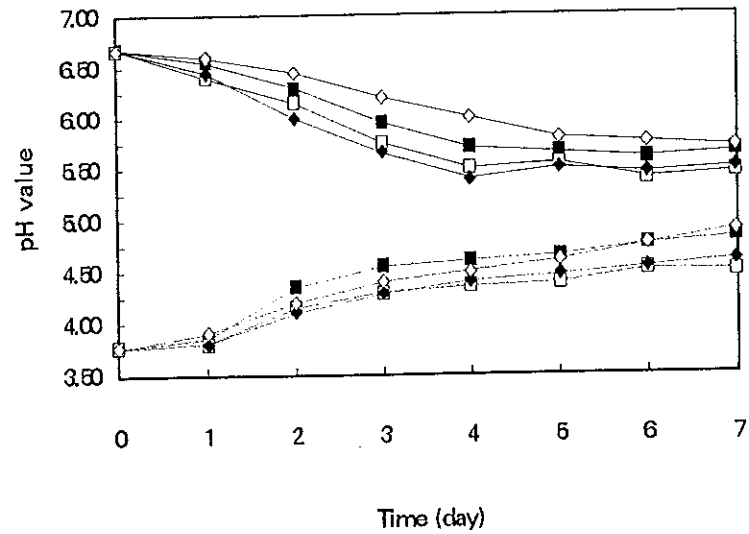
ดังนั้นการศึกษาบทบาทของแบคทีเรียแลคติกเพื่อคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่เหมาะสมสำหรับการหมักเมล็ดโกโก้ พบว่าการหมักเมล็ดโกโก้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสด้วย *L. casei* มีความเหมาะสมมากกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ เมล็ดโกโก้จากการหมักด้วยแบคทีเรียดังกล่าว มีคุณภาพที่ดีกว่าเมล็ดที่ได้จากชุดการทดลองอื่น คือ มีค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาล ค่าดรรชนีการหมักสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ และมีอุณหภูมิกองหมักสูงกว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกชนิดอื่น ๆ นอกจากนั้นเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองดังกล่าวยังมีปริมาณกรดทั้งหมด กรดแลคติก และกรดที่ระเหยได้ต่ำ มีน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้สูง ทั้งยังสามารถย่อยสลายน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ได้ดีกว่าชุดการทดลองอื่น รวมถึงพีเอชของเมล็ดโกโก้ที่ได้มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอีกด้วย



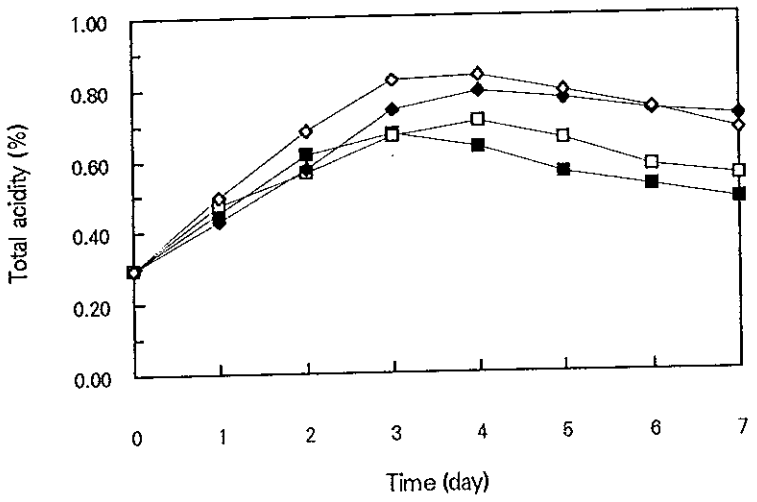
รูป 19 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร MRS (A) และ TYGKCP (B) ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *L. casei* (-■-), *Leu. mesenteroides* (-□-), *S. thermophilus* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



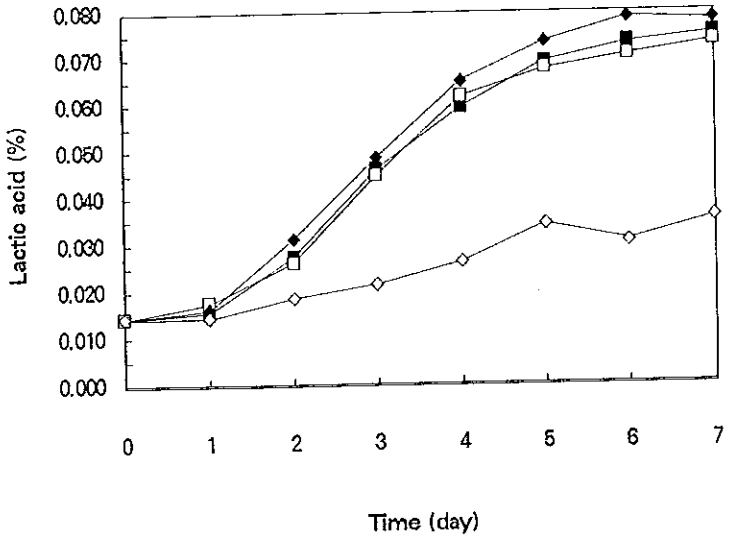
รูป 20 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *L. casei* (-■-), *Leu. mesenteroides* (-□-), *S. thermophilus* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



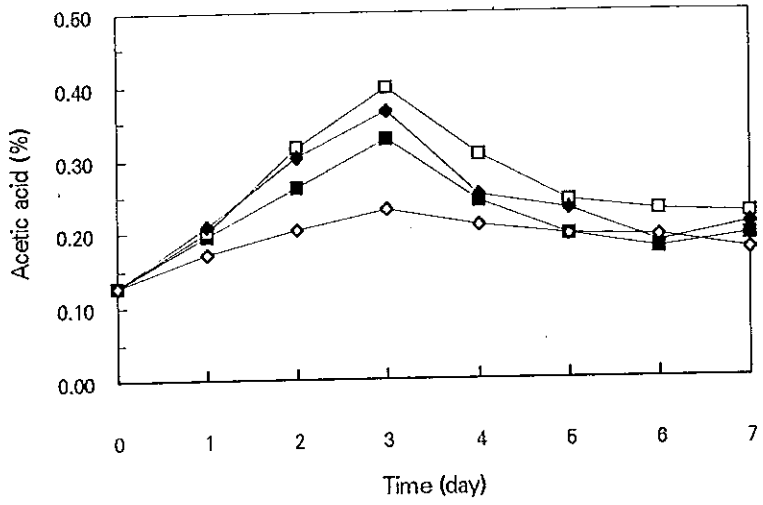
รูป 21 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ด (------) และเมล็ดโกโก้ (——) ระหว่างการหมักด้วย *L. casei* (-■-), *Leu. mesenteroides* (-□-), *S. thermophilus* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



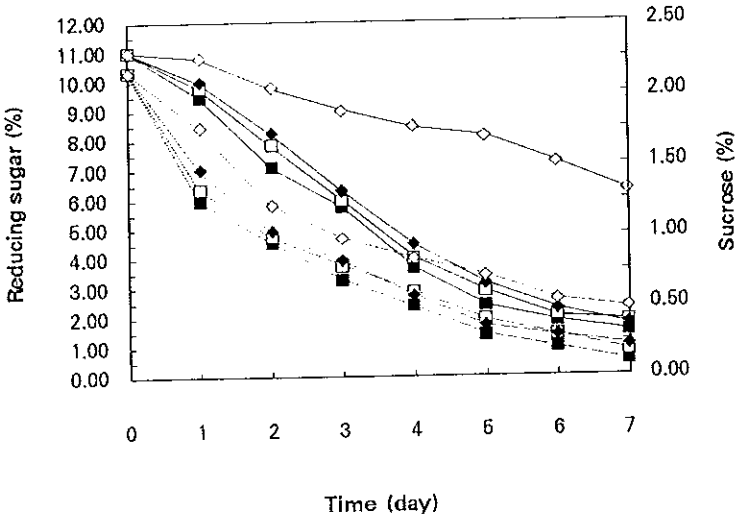
รูป 22 การเปลี่ยนแปลงกรดทั้งหมดในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *L. casei* (-■-), *Leu. mesenteroides* (-□-), *S. thermophilus* (-◆-) และ ชุดการทดลองควบคุม (-◇-) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



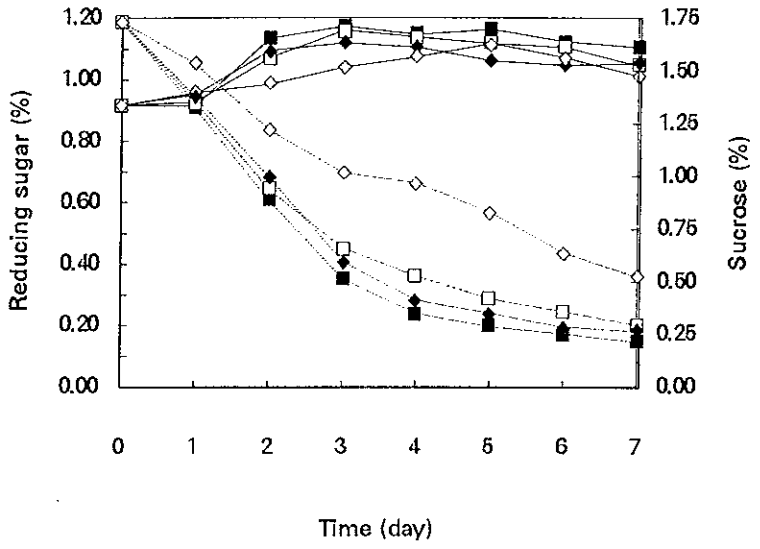
รูป 23 การเปลี่ยนแปลงกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *L. casei* (-■-), *Leu. mesenteroides* (-□-), *S. thermophilus* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



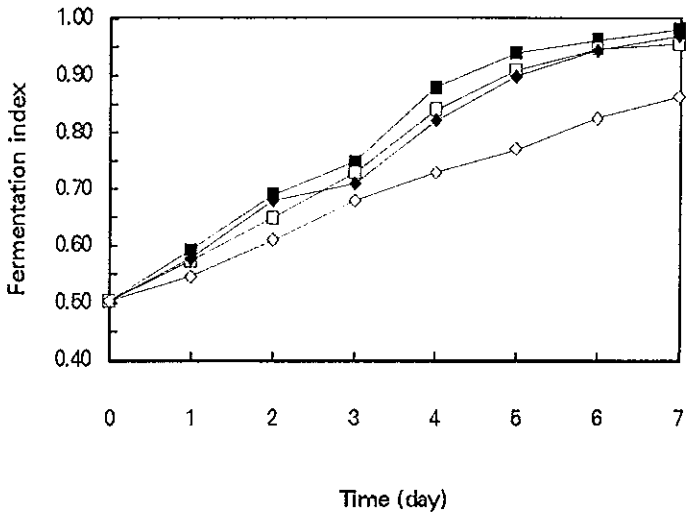
รูป 24 การเปลี่ยนแปลงกรดที่ระเหยได้ในเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *L. casei* (-■-), *Leu. mesenteroides* (-□-), *S. thermophilus* (-◆-) และ ชุดการทดลองควบคุม (-◇-) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



รูป 25 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ (——) และน้ำตาลซูโครส (·····) ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *L. casei* (-■-), *Leu. mesenteroides* (-□-), *S. thermophilus* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



รูป 26 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ (——) และน้ำตาลซูโครส (·····) ในเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *L. casei* (-■-), *Leu. mesenteroides* (-□-), *S. thermophilus* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



รูป 27 การเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ ในระหว่างการหมักด้วย *L. casei* (-■-), *Leu. mesenteroides* (-□-), *S. thermophilus* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ตาราง 18 การเปลี่ยนแปลงค่า Cut Test ของเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือก เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ชุดการทดลอง (จุลินทรีย์ที่เติม)	สีเมล็ดโกโก้แห้ง (ร้อยละ)[1]			
	สีน้ำตาล	สีม่วงแกมน้ำตาล	สีหินชนวน	อื่น ๆ
L. casei	59.78[a 2]	35.56[b]	4.67[b]	0.00[b]
Leu. mesenteroides	52.22[b]	37.78[ab]	10.00[a]	0.00[b]
S. thermophilus	46.67[c]	37.78[ab]	10.00[a]	5.56[a]
Control	45.56[c]	40.00[a]	11.11[a]	3.33[a]

1 ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

2 อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตาราง 19 องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 7) ด้วยแบคทีเรียแลคติก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

องค์ประกอบ[1]	แบคทีเรียแลคติกที่เติม			
	L. casei	*Leu. mesenteroides*	*S. thermophilus*	Control
น้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ด (%)[3]	1.51 ± 0.03^{c} [2]	1.87 ± 0.04^{b}	1.75 ± 0.04^{b}	6.26 ± 0.05^{a}
น้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ด (%)[3]	0.10 ± 0.03^{d}	0.18 ± 0.03^{c}	0.22 ± 0.02^{b}	0.48 ± 0.03^{a}
น้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ด(%)	1.14 ± 0.03^{a}	1.01 ± 0.03^{b}	1.00 ± 0.04^{b}	0.96 ± 0.05^{c}
น้ำตาลซูโครสในเมล็ด (%)	0.21 ± 0.02^{d}	0.30 ± 0.03^{b}	0.27 ± 0.02^{c}	0.53 ± 0.03^{a}
ดรรชนีการหมัก (OD460/OD530)	0.98 ± 0.01^{a}	0.96 ± 0.04^{b}	0.97 ± 0.02^{ab}	0.86 ± 0.03^{c}
ปริมาณกรดทั้งหมด (% กรดซิตริก)	0.48 ± 0.01^{d}	0.55 ± 0.01^{c}	0.71 ± 0.02^{a}	0.68 ± 0.01^{b}
ปริมาณกรดที่ระเหยได้ (% กรดแอซีติก)	0.19 ± 0.01^{b}	0.22 ± 0.01^{a}	0.21 ± 0.01^{a}	0.17 ± 0.01^{c}
ปริมาณกรดแลคติก (% กรดแลคติก)	0.08 ± 0.01^{ba}	0.07 ± 0.00^{b}	0.08 ± 0.01^{a}	0.04 ± 0.00^{c}
ค่าพีเอช	5.65 ± 0.10^{a}	5.45 ± 0.15^{b}	5.50 ± 0.05^{b}	5.70 ± 0.12^{a}

1 ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ (โดยน้ำหนักสด) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2 อักษรเหมือนกันในแถวนอนเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

3 เป็นปริมาณน้ำตาลในวันที่ 4 ของการหมัก

ตาราง 20 องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้แห้งจากการหมักด้วยแบคทีเรียแลคติก เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

องค์ประกอบ[1]	แบคทีเรียแลคติกที่เติม			
	L. casei	*Leu. mesenteroides*	*S. thermophilus*	Control
น้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้ (%)	1.86 ± 0.01^{a} [2]	1.48 ± 0.01^{c}	1.54 ± 0.01^{b}	1.44 ± 0.01^{c}
น้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ (%)	0.18 ± 0.03^{c}	0.23 ± 0.02^{a}	0.24 ± 0.02^{b}	0.48 ± 0.02^{a}
ดรรชนีการหมัก (OD460/OD530)	0.99 ± 0.01^{a}	0.96 ± 0.02^{c}	0.97 ± 0.01^{b}	0.90 ± 0.02^{c}
ปริมาณกรดทั้งหมด (% กรดซิตริก)	0.41 ± 0.02^{c}	0.57 ± 0.03^{b}	0.61 ± 0.02^{a}	0.52 ± 0.01^{a}
ปริมาณกรดที่ระเหยได้ (% กรดแอซีติก)	0.06 ± 0.01^{c}	0.07 ± 0.01^{c}	0.07 ± 0.01^{a}	0.02 ± 0.01^{d}
ปริมาณกรดแลคติก (% กรดแลคติก)	0.09 ± 0.01^{c}	0.13 ± 0.00^{a}	0.11 ± 0.01^{b}	0.10 ± 0.00^{c}
ค่าพีเอช	5.81 ± 0.07^{a}	5.60 ± 0.15^{b}	5.73 ± 0.10^{ab}	5.85 ± 0.13^{a}
ปริมาณความชื้น (%)	8.15 ± 0.95^{b}	8.91 ± 1.04^{a}	7.86 ± 0.56^{c}	8.48 ± 1.08^{ab}
ปริมาณไขมัน (%)	54.35 ± 1.10^{b}	53.97 ± 1.25^{c}	55.28 ± 1.35^{a}	54.70 ± 1.57^{b}

1 ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ (โดยน้ำหนักแห้ง) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2 อักษรเหมือนกันในแถวนอนเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

บทบาทของแบคทีเรียแอซีติกในการหมักเมล็ดโกโก้

แบคทีเรียแอซีติกที่ใช้ศึกษามี 3 ชนิด ได้แก่ *Acetobacter rancen, A. lovaniense* และ *Gluconobacter oxydan* ซึ่งเป็นชนิดที่พบปริมาณมากจากการหมักเมล็ดโกโก้ตามธรรมชาติ (ดวงใจ ช่วยสถิตย์, 2535) นำแบคทีเรียแอซีติกแต่ละชนิดเติมลงในขวดหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เมล็ดโกโก้ 500 กรัม ใช้เชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก มีเซลล์จุลินทรีย์ประมาณ $2.11X10^5$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร DSM และอาหาร TYGKCP แสดงดังรูป 28 ทุกชุดการทดลองมีจุลินทรีย์บนอาหาร DSM เพิ่มขึ้นในระยะแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *G. oxydan* มีจุลินทรีย์เจริญได้เร็วกว่าชุดการทดลองอื่นและมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 2 ของการหมัก เป็น $3.31X10^7$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ สอดคล้องกับการรายงานของ Carr และคณะ (1980) ที่สามารถพบ *G. oxydan* ได้สูงสุดในระยะแรกของการหมัก หลังจากนั้นจนสิ้นสุดการหมักจุลินทรีย์ชนิดนี้มีปริมาณลดลง ปริมาณจุลินทรีย์ตลอดการหมักของชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติกทั้ง 3 ชุดการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* หรือ *A. lovaniense* มีจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงสุดในวันที่ 3 ของการหมักเป็น $7.08X10^7$ และ $4.27X10^7$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ตามลำดับ ชุดการทดลองควบคุมในตอนเริ่มต้นการหมักตรวจไม่พบจุลินทรีย์ แต่เมื่อการหมักผ่านไป 2 วัน สามารถพบจุลินทรีย์ได้ประมาณ $1.05X10^1$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ชุดควบคุมมีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นตลอดการหมัก วันสุดท้ายของการหมักมีจุลินทรีย์ประมาณ $1.29X10^4$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ การเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในชุดการทดลองควบคุม เกิดจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากแหล่งอื่นในภายหลัง (Ostovar and Keeney, 1973) ปริมาณจุลินทรีย์ในวันสุดท้ายของการหมักบนอาหาร DSM ของชุดการทดลองที่เติม *A. rancen, A. lovaniense,* หรือ *G. oxydan* มีค่าเป็น $1.35X10^5$, $2.24X10^5$ และ $4.68X10^5$ CFUต่อกรัมเมล็ด โกโก้ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่าในช่วงสุดท้ายของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *G. oxydan* มีจุลินทรีย์สูงกว่าชุดการทดลองอื่น เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้สามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดแอซีติกได้ แต่ไม่สามารถออกซิไดซ์กรดแอซีติกเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำได้ (Carr, *et al.*, 1980) เมื่อกองหมักมีจุลินทรีย์ชนิดนี้อยู่สูงทำให้มีการสร้างกรดแอซีติกสูง ดังนั้นแบคทีเรีย

ชนิดนี้ไม่มีความเหมาะสมในการใช้หมักเมล็ดโกโก้ เนื่องจากปริมาณของจุลินทรีย์ที่สร้างกรดแลคติก และกรดแอซีติก จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณกรดทั้งสองชนิด (Abdul Samah, 1993b)

การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP พบว่าทุกชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติก มีจุลินทรีย์เพิ่มสูงขึ้นในช่วงแรกของการหมัก แล้วหลังจากนั้นจึงมีค่าลดลงจนสิ้นสุดการหมัก เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร DSM และจำนวนจุลินทรีย์บนอาหารทั้ง 2 ชนิด ของทุกชุดการทดลองที่ระยะเวลาเดียวกันนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ วันสุดท้ายของการหมักปริมาณจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP ของชุดการทดลองที่เติม *A. rancen*, *A. lovaniense*, หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม มีค่าเป็น $1.58X10^5$, $2.57X10^5$, $4.89X10^5$ และ $1.86X10^4$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ตามลำดับ แบคทีเรียแอซีติกในตอนสุดท้ายของการหมักมีปริมาณลดลงไม่มาก สอดคล้องกับรายงานของ ดวงใจ ช่วยสถิตย์ (2535) และอรพิน ภูมิภมร และคณะ (2536) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียแอซีติกเจริญได้ตลอดระยะการหมัก แต่มีปริมาณลดลงเล็กน้อยในระยะหลังของการหมัก เพราะแบคทีเรียแอซีติกสามารถเจริญได้ในสภาพของอุณหภูมิ และพีเอชช่วงกว้าง (Lehrian and Patterson, 1983)

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยแบคทีเรียแอซีติกแต่ละชนิด แสดงดังรูป 29 ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติกมีอุณหภูมิเพิ่มสูงใน 3 วันแรกของการหมัก และในระยะหลังของการหมักจะมีอุณหภูมิลดลง ชุดการทดลองที่เติม *G. oxydan* มีอุณหภูมิสูงสุดในวันที่ 2 ของการหมัก เป็น 42.2 องศาเซลเซียส เพราะว่า *G. oxydan* เจริญได้เร็วในระยะแรก และเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้ายในการออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดแอซีติก ซึ่งมีการปล่อยพลังงานความร้อนออกมามาก (Carr, *et al.*, 1980) เนื่องจากแบคทีเรียแอซีติกสามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดแอซีติก และออกซิไดซ์กรดแอซีติกเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ ในสภาวะที่มีอากาศ มีการปล่อยพลังงานความร้อนออกมาสูงเป็น 118.20 และ 209.40 กิโลแคลอรีต่อโมล ตามลำดับ (Forsyth and Quesnel, 1963)

สำหรับชุดการทดลองควบคุมอุณหภูมิในระยะแรกของการหมัก มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เนื่องจากในระยะดังกล่าวจุลินทรีย์ที่เจริญในชุดการทดลองควบคุมมีต่ำ หลังจากผ่านวันแรกของการหมักไป อุณหภูมิมีค่าเพิ่มขึ้นเช่นกัน และมีค่าสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมัก เป็น 38.5 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจึงมีค่าลดลงจนสิ้นสุดการหมัก สาเหตุหนึ่งที่อุณหภูมิของชุดการทดลองที่

เติมแบคทีเรียแอซีติกมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรียแอซีติกเพราะว่าปริมาณจุลินทรีย์ที่มีในขวดหมักเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติกมีปริมาณมากกว่าชุดการทดลองควบคุม (Abdul Samah, *et al.*, 1993) อุณหภูมิในวันสุดท้ายของการหมักในชุดการทดลองที่เติม *A. rancen*, *A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม มีค่าเป็น 39.0, 38.5, 38.8 และ 37.5 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อุณหภูมิของกองหมักลดลงในระยะหลังเป็นผลจากความร้อนที่เกิดขึ้นในการหมักโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์มีปริมาณน้อย (Glossop, 1983)

การหมักเมล็ดโกโก้ด้วยแบคทีเรียแอซีติกชนิดต่าง ๆ มีการเปลี่ยนแปลงพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดและเมล็ดโกโก้ แสดงดังรูป 30 เมล็ดโกโก้และเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีค่าพีเอชเป็น 6.46 และ 4.50 ตามลำดับ เมื่อเวลาการหมักเพิ่มขึ้นเมล็ดโกโก้มีค่าพีเอชลดลง ขณะที่เยื่อหุ้มเมล็ดมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้น ค่าพีเอชของเมล็ดโกโก้ในชุดการทดลองต่าง ๆ ลดลงรวดเร็วในระยะแรกของการหมัก ซึ่งชุดการทดลองที่เติม *A. rancen*, *A. lovaniense* และชุดการทดลองควบคุม มีค่าต่ำสุดในวันที่ 3 ของการหมัก ขณะที่ชุดการทดลองที่เติม *G. oxydan* มีค่าต่ำสุด ในวันที่ 4 ซึ่งสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงกรดแอซีติกในเมล็ดโกโก้ เมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* มีค่าพีเอชลดลงน้อยที่สุด และมีค่าใกล้เคียงกับชุดการทดลองควบคุม วันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองทั้งหมดมีค่าพีเอชของเมล็ดโกโก้ใกล้เคียงกัน โดยชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* , *A. lovaniense*, หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม มีค่าพีเอชเป็น 5.65, 5.50, 5.40 และ 5.60 ตามลำดับ จากรูป 30 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เพียงวันที่ 4 ของการหมักเท่านั้น เพราะว่าหลังจากวันที่ 4 ของการหมัก เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในกองหมักเป็นของเหลวและเยื่อเมือก ทุกชุดการทดลองมีค่าพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักเพิ่มขึ้น โดยชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* มีค่าพีเอชในส่วนดังกล่าวเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมัก ค่าพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในชุดทดลองที่เติม *A. rancen*, *A. lovaniense*, หรือ *G. oxydan* และชุดทดลองควบคุม มีค่าเป็น 4.95, 4.86, 4.65 และ 4.80 ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มทำนองเดียวกับการศึกษาของ Abdul Samah, *et al.* (1993) ที่ทำการหมักเมล็ดโกโก้โดยการเติม *A. xylinum* พบว่าค่าพีเอชของเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองดังกล่าวทั้งในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ และในเมล็ดโกโก้มีค่าต่ำกว่าชุดการทดลองควบคุม ปริมาณกรดที่สูงในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีผลทำให้ความเป็นกรดของเมล็ดโกโก้เพิ่มขึ้น โดยกรดในเยื่อหุ้มเมล็ดจะซึมผ่านผนัง

หุ้มเมล็ดเข้าสู่ภายในเมล็ดโกโก้ ซึ่งสัมพันธ์กับการลดลงของพีเอชในเมล็ดโกโก้ (Roelofsen, 1958; Forsyth and Quesnel, 1963)

การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดของเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติก และชุดการทดลองควบคุม แสดงดังรูป 31 ตอนเริ่มต้นการหมักเมล็ดโกโก้มีกรดทั้งหมดร้อยละ 0.32 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ปริมาณกรดทั้งหมดในเมล็ดโกโก้มีค่าเพิ่มขึ้นในระยะแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *G. oxydan* มีกรดทั้งหมดในเมล็ดโกโก้สูงกว่าชุดการทดลองอื่นและมีค่าสูงสุดในวันที่ 3 ของการหมัก เป็นร้อยละ 1.13 โดยน้ำหนัก และชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* มีกรดเพิ่มขึ้นน้อยที่สุดเป็นร้อยละ 0.84 โดยน้ำหนัก วันสุดท้ายของการหมักเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติม *A. rancen*, *A. lovaniense*, หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม มีกรดทั้งหมดเป็นร้อยละ 0.52, 0.59, 0.74 และ 0.68 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดในเมล็ดโกโก้จากรายงานของ Abdul Samah, *et al.* (1993) พบว่าการเติม *A. xylinum* ในการหมักทำให้เมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักปริมาณกรดทั้งหมดสูงกว่าชุดการทดลองควบคุม ทั้งนี้ในเมล็ดโกโก้ตอนเริ่มต้นการหมักมีปริมาณกรดทั้งหมดสูงกว่าชุดการทดลองควบคุมถึง 2.5 เท่า (0.19 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ต่อ 0.07 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) การลดลงของกรดซิตริกในระยะสุดท้ายของการหมักเป็นผลจากเมื่อมีการให้อากาศแก่กองหมักโดยการกวนเมล็ดโกโก้ ทำให้กรดซิตริกถูกออกซิไดซ์เป็นกรดแลคติกได้ (Weissberger, *et al.*, 1971) และพบว่ากรดแอซีติกและกรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีปริมาณมากที่สุดในการหมักเมล็ดโกโก้ (Abdul Samah, *et al.*, 1993)

การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติกระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยแบคทีเรียแอซีติกชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม แสดงดังรูป 32 กรดแลคติกในเมล็ดโกโก้เริ่มต้นมีค่าร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก และทุกชุดการทดลองมีกรดแลคติกเพิ่มขึ้น ในวันสุดท้ายของการหมักเมล็ดโกโก้จากชุดทดลองที่เติม *A. rancen*, *A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* มีกรดแลคติกเป็นร้อยละ 0.03, 0.02 หรือ 0.02 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ จากผลการทดลอง กรดแลคติกในเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่หมักด้วยแบคทีเรียแอซีติกมีค่าสูงกว่าการหมักด้วยยีสต์ เนื่องจากขบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียแอซีติกกับยีสต์นั้นแตกต่างกัน (Stainer, 1986) ชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรียแอซีติกมีกรดแลคติกต่ำกว่าชุดการ

ทดลองอื่น ๆ เนื่อง จากชุดการทดลองดังกล่าวมีจุลินทรีย์เจริญอยู่น้อย ดังนั้นการย่อยสลายสารอาหารโดยเฉพาะน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดเกิดขึ้นได้น้อย สอดคล้องกับรายงานของ Abdul Samah, *et al.* (1993)

กรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยแบคทีเรียแอซีติก และชุดการทดลองควบคุม มีการเปลี่ยนแปลงแสดงดังรูป 33 เมล็ดโกโก้เริ่มต้นมีกรดที่ระเหยได้ร้อยละ 0.22 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ในวันแรกของการหมักทุกชุดการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดที่ระเหยได้เพียงเล็กน้อย เนื่องจากแบคทีเรียแอซีติกยังมีปริมาณต่ำ ในวันที่ 1 - 3 ของการหมักมีกรดที่ระเหยได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นมีค่าลดลงในทุกชุดการทดลองเช่นเดียวกับรายงานของ Abdul Samah, *et al.* (1993) และทุกชุดการทดลองมีค่าสูงสุดในวันที่ 3 ของการหมัก โดยชุดการทดลองที่เติม *G. oxydan* มีกรดที่ระเหยได้สูงสุดเป็นร้อยละ 0.63 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ส่วนชุดการทดลองที่เติม *A. rancen, A. lovaniense* และชุดการทดลองควบคุมมีปริมาณกรดที่ระเหยได้สูงสุดเป็นร้อยละ 0.47, 0.56 และ 0.42 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ชุดการทดลองที่เติม *G. oxydan* มีกรดที่ระเหยได้สูงกว่าชุดการทดลองอื่นเกือบตลอดการหมัก และมีผลสอดคล้องกับปริมาณกรดทั้งหมด เพราะว่า *G. oxydan* เจริญได้เร็วในการหมักและมีปริมาณจุลินทรีย์มากที่สุด จึงออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดแอซีติกได้มากกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ กรดที่ระเหยได้ มีปริมาณลดลงในระยะสุดท้ายของการหมัก เนื่องจากแบคทีเรียแอซีติกมีปริมาณลดลงในระยะดังกล่าว รวมถึงน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ลดลงเป็นผลให้มีเอทานอลลดลง ทำให้การออกซิไดซ์ของเอทานอลเป็นกรดแอซีติกเกิดได้น้อยลงเมื่อมีการให้อากาศ นอกจากนี้การให้อากาศแก่กองหมัก ทำให้เกิดการออกซิไดซ์ของกรดแอซีติกไปเป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ได้ (Sanchez, 1989) และกรดชนิดนี้ยังเกิดการระเหยได้ด้วย ในวันสุดท้ายเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วย *A. rancen, A. lovaniense*, หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม มีกรดที่ระเหยได้เป็นร้อยละ 0.18, 0.22, 0.25 และ 0.13 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ที่หมักด้วย แบคทีเรียแอซีติก แสดงดังรูป 34 น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เริ่มต้นมีค่าเป็นร้อยละ 10.01 และ 0.79 โดยน้ำหนัก ชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* มีน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสลดลงเร็วกว่าชุดการทดลองอื่น แสดงว่า *A. rancen* สามารถย่อยสลายเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ได้ดีกว่าแบคทีเรียแอซีติกชนิดอื่นที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาล

ซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้นั้น สามารถศึกษาได้เพียงวันที่ 4 ของการหมักเท่านั้น หลังจากนั้นเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้จะเปื่อยยุ่ยไม่สามารถที่นำมาวิเคราะห์ได้ จากรูป 34 พบว่าในระยะแรกของการหมัก *A. rancen* และ *A. lovaniense* สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีกว่า *G. oxydan* สังเกตได้จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* และ *A. lovaniense* มีค่าต่ำกว่าชุดการทดลองที่เติม *G. oxydan* ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับชุดการทดลองควบคุม

น้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองต่าง ๆ ลดลงอย่างรวดเร็วในระยะ 2 วันแรกของการหมัก หลังจากนั้นมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนักเนื่องจากในระยะแรกของการหมักจุลินทรีย์ในชุดการทดลองเหล่านั้นมีปริมาณมากทำให้ย่อยสลายน้ำตาลรีดิวซ์ได้เร็ว แต่เมื่อจุลินทรีย์ลดลงเป็นผลให้มีการย่อยสลายน้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้น้อยลง ชุดการทดลองที่เติม *A. rancen*, *A. lovaniense*, หรือ *G. oxydan* และ ชุดควบคุมมีน้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดในวันที่ 4 ของการหมัก เป็นร้อยละ 0.84, 0.93, 1.27 และ 1.35 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ขณะที่ Abdul Samah, *et al.* (1993) รายงานว่าน้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ถูกย่อยสลายหมดไปภายใน 4 วัน ของการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก

ก่อนการหมักมีน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ร้อยละ 0.80 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ระหว่างการหมักน้ำตาลซูโครสมีปริมาณลดลงเนื่องจากถูกย่อยสลายไป ในชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* มีน้ำตาลซูโครสต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ตลอดการหมัก แสดงว่า *A. rancen* สามารถย่อยสลายน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ได้ดีกว่าแบคทีเรียแอซีติกชนิดอื่น ๆ ในชุดการทดลองควบคุม ซึ่งไม่เติมจุลินทรีย์ลงไปในการหมัก น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสลดลงน้อยกว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติก วันสุดท้ายของการหมักน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในชุดการทดลองที่เติม *A. rancen*, *A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม มีค่าร้อยละ 0.10, 0.12, 0.14 และ 0.12 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้มีความแตกต่างกับการทดลองที่เติมยีสต์ในการหมักเมล็ดโกโก้ การเติมแบคทีเรียแอซีติกในการหมักมีการย่อยสลายน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ได้ต่ำกว่ายีสต์ ซึ่งมีน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้จากวันที่ 4 ของการหมักอยู่สูงกว่าชุดการทดลองที่เติมยีสต์

การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วยแบคทีเรียแอซีติกที่คัดเลือก แสดงดังรูป 35 ในเมล็ดโกโก้ตอนเริ่มต้นการหมักมีน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสเป็นร้อยละ 0.58 และ 1.95 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ตลอดการหมัก 7 วัน

น้ำตาลซูโครสมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในระยะ 2 วันแรก หลังจากนั้นน้ำตาลซูโครสลดลงไม่มาก เนื่องจากในระยะแรกของการหมักนั้น ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติก มีอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น และเมล็ดโกโก้มีความเป็นกรดมากขึ้น ทำให้เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในเมล็ดโกโก้เกิดกิจกรรม (Lehrian and Patterson, 1983) รวมทั้งน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้มีค่าลดลงด้วย ในวันสุดท้ายของการหมัก น้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติม *A. rancen*, *A. lovaniense*, หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม มีค่าร้อยละ 0.24, 0.38, 0.33 และ 0.45 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ

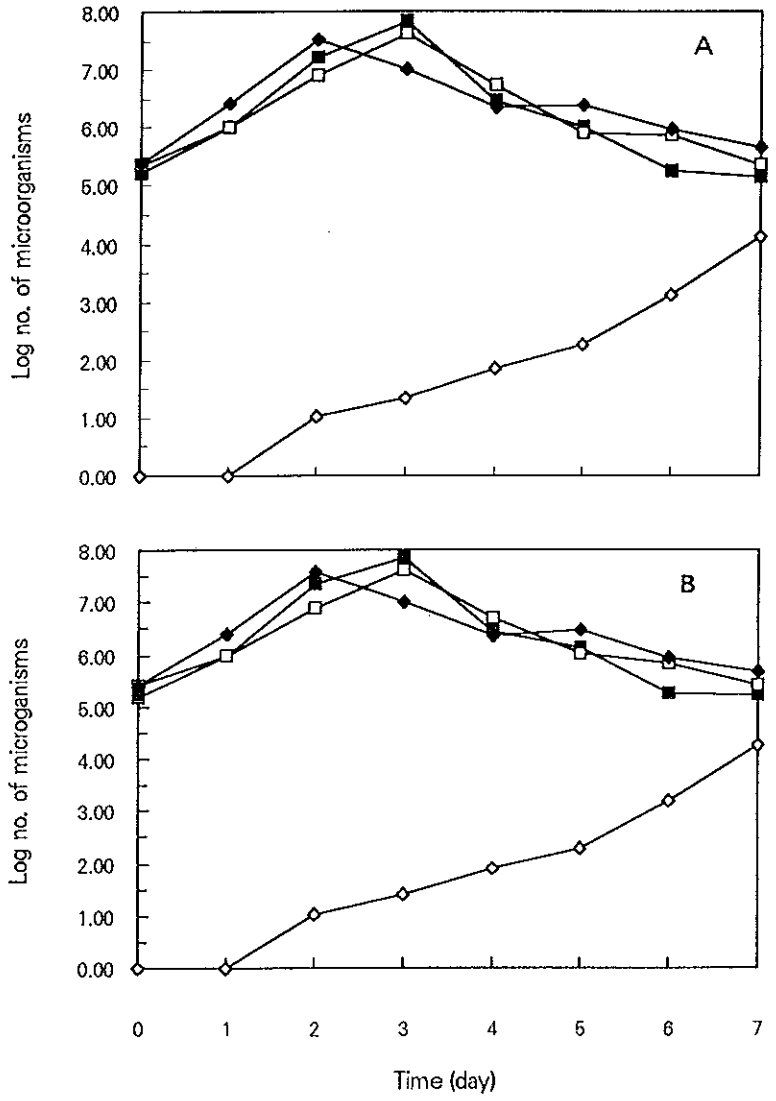
น้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยแบคทีเรียแอซีติกทั้ง 3 ชนิด และในชุดการทดลองควบคุม ในระยะ 2 วันแรกของการหมักมีค่าเปลี่ยนแปลงไม่มากนักจากค่าเริ่มต้น ซึ่งมีค่าเป็นร้อยละ 0.58 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก หลังจากนั้นน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้มีปริมาณเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 - 4 ของการหมักแล้วมีค่าคงที่ตลอดการหมัก น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเป็นผลจากการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ด้วยกิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ ขณะที่ Abdul Samah, *et al.* (1993) รายงานว่าน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้นั้นมีปริมาณค่อนข้างคงที่ตลอดการหมัก น้ำตาลรีดิวซ์ในวันสุดท้ายของการหมักจากชุดการทดลองที่เติม *A. rancen*, *A. lovaniense*, หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม มีค่าเป็นร้อยละ 0.67, 0.64, 0.63 และ 0.59 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ น้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองที่หมักด้วยยีสต์ พบว่าในกรณีที่เติมยีสต์นั้นมีน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่า เพราะว่าการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยยีสต์มีอุณหภูมิของกองหมักสูงกว่า และมีพีเอชของเมล็ดที่เหมาะสมแก่การเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ในเมล็ดโกโก้มากกว่า ซึ่งน้ำตาลในเมล็ดโกโก้เป็นตัวกลางสำคัญที่เปลี่ยนไปเป็นสารสีน้ำตาล และสารให้กลิ่นรสช็อกโกแลตในระยะการทำแห้ง และในกระบวนการแปรรูปเมล็ดโกโก้ได้ (Wood and Lass, 1985)

การเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ในชุดการทดลองต่าง ๆ ที่หมักด้วยแบคทีเรียแอซีติก เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม แสดงดังรูป 36 ทุกชุดการทดลองมีค่าดรรชนีการหมักเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเวลาการหมักนานขึ้น ในวันแรกของการหมักค่าดรรชนีการหมักเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากค่าเริ่มต้นซึ่งมีค่าเป็น 0.52 เมื่อให้อากาศแก่กองหมักทำให้กองหมักมีอุณหภูมิและพีเอชเพิ่มขึ้นสูงเพียงพอที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเมล็ดโกโก้ โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของเม็ดสีจากสารสีม่วงเป็นสารสีน้ำตาลช็อกโกแลตเกิดขึ้นได้ดี (Quesnel, 1968;

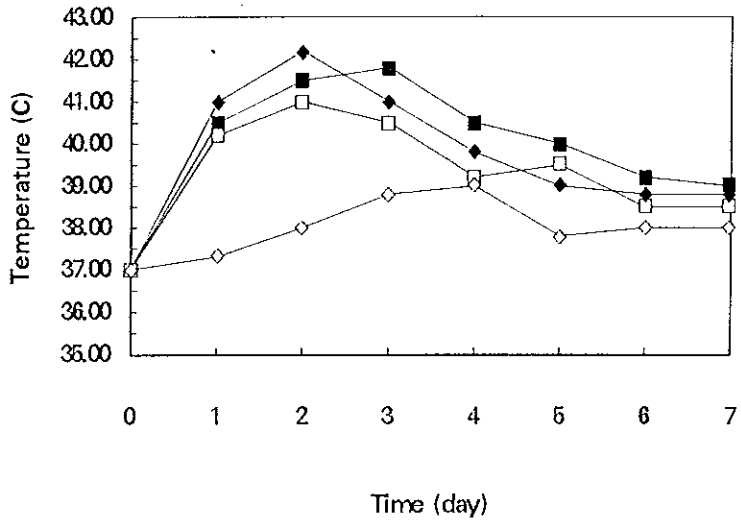
Lehrian and Petterson, 1983) ทำให้ค่าดรรชนีการหมักมีค่าสูงขึ้นในวันต่อ ๆ มา และในวันสุดท้ายของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *A. rancen, A. lovaniensis,* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม มีค่าดรรชนีการหมักเป็น 0.99, 0.96, 0.92 และ 0.88 ตามลำดับ ค่าดรรชนีการหมักที่ได้นี้มีค่าต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองที่เติมยีสต์ ถึงแม้ทำการหมักเป็นเวลานาน 7 วัน แต่ค่าดรรชนีการหมักที่ได้มีค่าไม่ถึง 1.00 ยกเว้นชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* ซึ่งมีค่าดรรชนีการหมักสูงสุดและมีค่าใกล้เคียงกับ 1 มากที่สุด

เมื่อนำเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติกและชุดการทดลองควบคุม ไปผ่าเมล็ดเพื่อหาค่า Cut Test ของเมล็ดโกโก้ และความสมบูรณ์ของเมล็ดโกโก้แห้ง ผลที่ได้แสดงดังตาราง 21 พบว่าชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* มีค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลช็อกโกแลต (10PR3/1,2) สูงสุด และแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนชุดการทดลองที่เติม *A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* ให้ค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลช็อกโกแลตไม่แตกต่างกัน แต่มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองควบคุม ซึ่งมีค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้สีม่วงแกมน้ำตาลหรือเมล็ดโกโก้ที่เกิดการหมักที่ไม่สมบูรณ์สูงกว่าชุดการทดลองอื่น

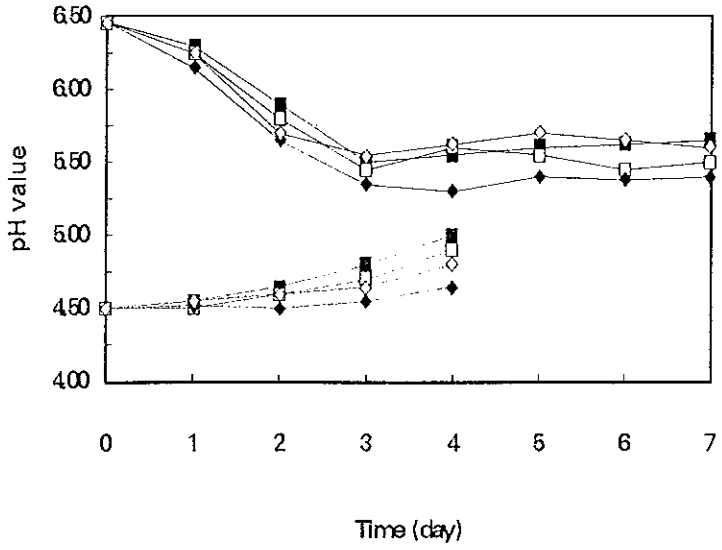
องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักด้วยแบคทีเรียแอซีติกและชุดการทดลองควบคุม แสดงดังตาราง 22 และเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้มีองค์ประกอบต่าง ๆ แสดงดังตาราง 23 ดังนั้นการศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียแอซีติกที่เหมาะสมสำหรับการหมักเมล็ดโกโก้ พบว่า *A. rancen* มีความเหมาะสมมากกว่าแบคทีเรียแอซีติกชนิดอื่น ถึงแม้การเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในกองหมักมีไม่สูงมาก แต่คุณภาพของเมล็ดโกโก้จากการหมักด้วยแบคทีเรียชนิดนี้ดีกว่าเมล็ดที่ได้จากชุดการทดลองอื่น คือ ให้ค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลช็อกโกแลตสูงสุด มีค่าดรรชนีการหมัก และอุณหภูมิกองหมักสูงเพียงพอที่ให้เอนไซม์ต่าง ๆ ในเมล็ดโกโก้เกิดการทำงาน นอกจากนั้นเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองดังกล่าวยังมีปริมาณกรดทั้งหมด กรดแลคติก และกรดที่ระเหยได้ต่ำ มีน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้สูง ทั้งยังสามารถย่อยสลายน้ำตาลรีดิวซ์และซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ได้ดี รวมถึงเมล็ดโกโก้ที่ได้มีพีเอชสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ถึงแม้ว่าค่าพีเอชในตอนสุดท้ายของการหมักหรือในเมล็ดโกโก้แห้ง ไม่สามารถใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงลักษณะกลิ่นรสช็อกโกแลตได้ แต่หากเมล็ดโกโก้แห้งมีค่าพีเอชต่ำ หรือมีความเป็นกรดสูงจะมีผลทำให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีรสเปรี้ยวได้ (Jinap, 1989)



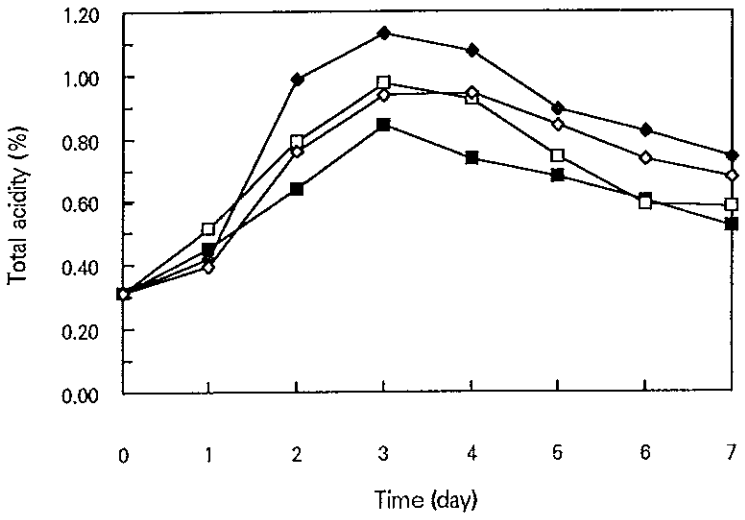
รูป 28 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมด บนอาหาร DSM (A) และ TYGKCP (B) ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *A. rancen* (-■-), *A. lovaniense* (-□-), *G. oxydan* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



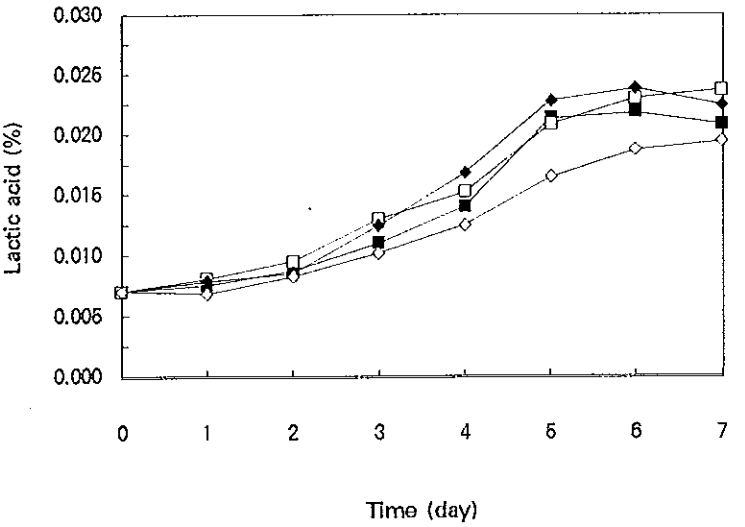
รูป 29 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *A. rancen* (-■-), *A. lovaniense* (-□-), *G. oxydan* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



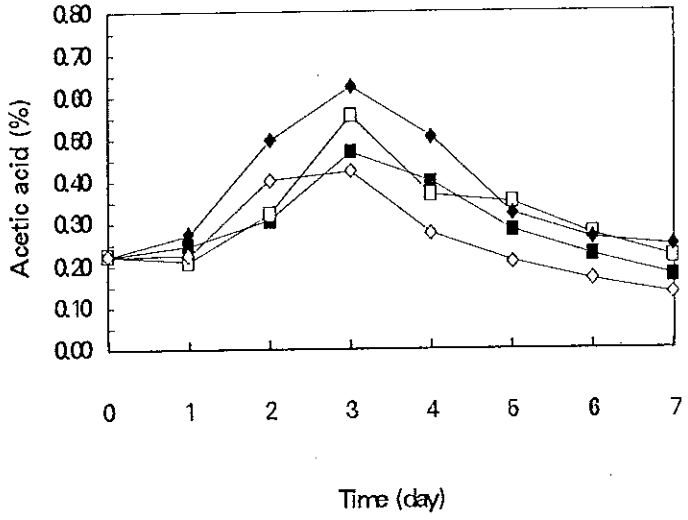
รูป 30 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ (·····) และเมล็ดโกโก้ (——) ระหว่างการหมักด้วย *A. rancen* (-■-), *A. lovaniense* (-□-), *G. oxydan* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



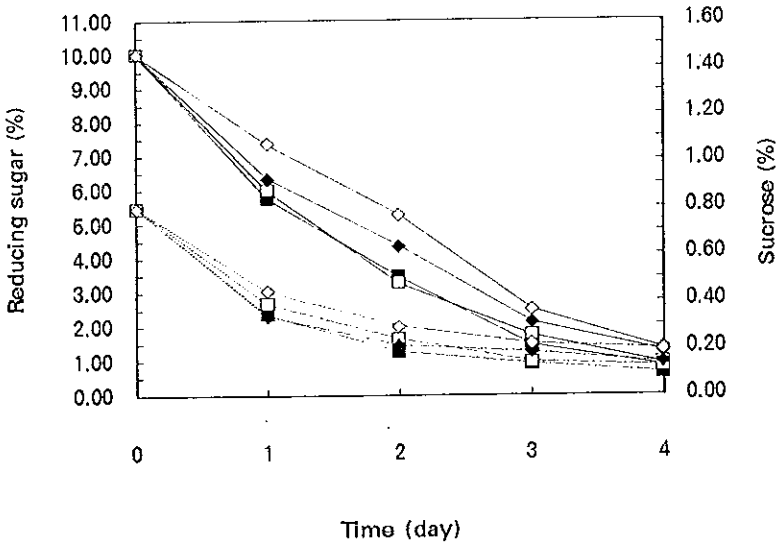
รูป 31 การเปลี่ยนแปลงกรดทั้งหมดในเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *A. rancen* (-■-), *A. lovaniense* (-□-), *G. oxydan* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



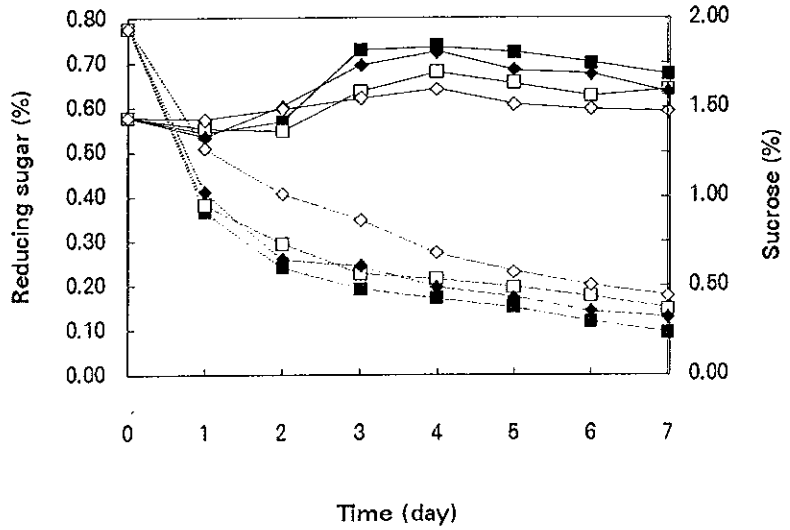
รูป 32 การเปลี่ยนแปลงกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *A. rancen* (-■-), *A. lovaniense* (-□-), *G. oxydan* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



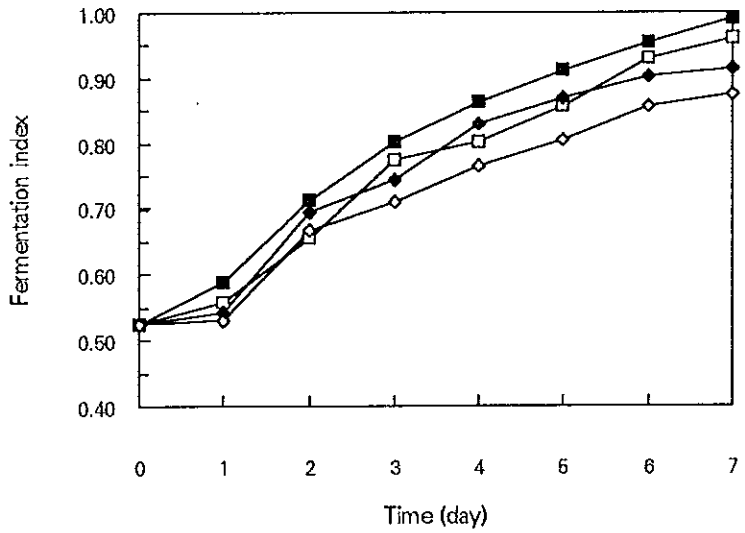
รูป 33 การเปลี่ยนแปลงกรดที่ระเหยได้ในเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *A. rancen* (-■-), *A. lovaniense* (-□-), *G. oxydan* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



รูป 34 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ (——) และน้ำตาลซูโครส (·····) ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *A. rancen* (-■-), *A. lovaniense* (-□-), *G. oxydan* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



รูป 35 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ (——) และน้ำตาลซูโครส (·····) ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *A. rancen* (-■-), *A. lovaniense* (-□-), *G. oxydan* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



รูป 36 การเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีการหมัก ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *A. rancen* (-■-), *A. lovaniense* (-□-), *G. oxydan* (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-◇-) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ตาราง 21 การเปลี่ยนแปลงค่า Cut Test ของเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียแอซีติก ที่คัดเลือก เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ชุดการทดลอง (จุลินทรีย์ที่เติม)	สีเมล็ดโกโก้แห้ง (ร้อยละ)[1]			
	สีน้ำตาล	สีม่วงแกมน้ำตาล	สีหินชนวน	สีอื่น ๆ
A. rancen	61.11[a 2]	33.11[b]	5.56[bc]	2.22[b]
A. lovaniense	50.00[b]	38.89[a]	7.78[b]	3.33[b]
G. *oxydan*	52.22[b]	41.11[a]	4.44[c]	2.22[b]
Control	42.22[c]	38.89[a]	11.11[a]	7.78[a]

1 ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

2 อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตาราง 22 องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมัก ด้วยแบคทีเรียแอซีติก ที่คัดเลือก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

องค์ประกอบ[1]	ชนิดของแบคทีเรียแอซีติกที่เติม			
	A. rencen	*A. lovaniense*	*G. oxydan*	Control
น้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ด (%)[3]	0.84 ± 0.02^{d}[2]	0.93 ± 0.04^{c}	1.27 ± 0.04^{b}	1.35 ± 0.04^{a}
น้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ด (%)[3]	0.10 ± 0.01^{c}	0.12 ± 0.02^{bc}	0.14 ± 0.02^{b}	0.20 ± 0.02^{a}
น้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ด (%)	0.67 ± 0.00^{a}	0.64 ± 0.00^{a}	0.63 ± 0.00^{a}	0.59 ± 0.00^{b}
น้ำตาลซูโครสในเมล็ด (%)	0.24 ± 0.02^{c}	0.38 ± 0.02^{b}	0.33 ± 0.02^{b}	0.45 ± 0.02^{a}
ดรรชนีการหมัก (OD460/OD530)	0.99 ± 0.02^{a}	0.96 ± 0.02^{ab}	0.92 ± 0.03^{b}	0.88 ± 0.04^{c}
ปริมาณกรดทั้งหมด (% กรดซิตริก)	0.52 ± 0.03^{c}	0.59 ± 0.02^{c}	0.74 ± 0.03^{a}	0.68 ± 0.04^{b}
ปริมาณกรดที่ระเหยได้ (% กรดแอซีติก)	0.18 ± 0.04^{b}	0.22 ± 0.03^{ab}	0.25 ± 0.02^{a}	0.13 ± 0.02^{c}
ปริมาณกรดแลคติก (% กรดแลคติก)	0.02 ± 0.01^{b}	0.02 ± 0.00^{a}	0.02 ± 0.01^{a}	0.02 ± 0.01^{b}
ค่าพีเอช	5.65 ± 0.00^{a}	5.50 ± 0.00^{b}	5.40 ± 0.00^{c}	5.60 ± 0.00^{a}

1 ค่าร้อยละโดยน้ำหนักสด ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2 อักษรเหมือนกันในแถวเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

3 เป็นปริมาณน้ำตาลที่วัดได้ในวันที่ 4 ของการหมัก

ตาราง 23 องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้แห้งในการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยแบคทีเรียแอซีติกที่คัดเลือก เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

องค์ประกอบ[1]	ชนิดของแบคทีเรียแอซีติกที่เติม			
	A. rencen	*A. lovaniense*	*G. oxydan*	Control
น้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ด (%)	0.54 ± 0.03[a2]	0.50 ± 0.03[b]	0.55 ± 0.02[a]	0.51 ± 0.03[b]
น้ำตาลซูโครสในเมล็ด (%)	0.23 ± 0.01[c]	0.31 ± 0.02[b]	0.29 ± 0.01[bc]	0.38 ± 0.02[a]
ดรรชนีการหมัก (OD460/OD530)	0.99 ± 0.03[a]	0.98 ± 0.02[a]	0.95 ± 0.02[b]	0.92 ± 0.02[c]
ปริมาณกรดทั้งหมด (% กรดซิตริก)	0.43 ± 0.02[b]	0.42 ± 0.02[b]	0.54 ± 0.03[a]	0.51 ± 0.03[a]
ปริมาณกรดที่ระเหยได้ (% กรดแอซีติก)	0.12 ± 0.02[b]	0.15 ± 0.02[a]	0.14 ± 0.028[a]	0.11 ± 0.02[b]
ปริมาณกรดแลคติก (% กรดแลคติก)	0.01 ± 0.01[b]	0.02 ± 0.01[a]	0.02 ± 0.00[a]	0.01 ± 0.01[b]
ปริมาณไขมัน (%)	55.10 ± 1.15[a]	54.35 ± 0.95[b]	53.72 ± 1.83[c]	53.64 ± 1.05[c]
ปริมาณความชื้น (%)	9.05 ± 0.75[b]	8.76 ± 0.87[c]	8.93 ± 0.90[bc]	9.20 ± 1.05[a]
ค่าพีเอช	5.40 ± 0.10[a]	5.20 ± 0.10[b]	5.10 ± 0.10[c]	5.10 ± 0.05[c]

1 ค่าร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2 อักษรเหมือนกันในแถวเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

บทบาทของเชื้อจุลินทรีย์ผสมต่อการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ

การใช้ยีสต์ แบคทีเรียแอซีติก และแบคทีเรียแลคติก ที่คัดเลือกได้จากการทดลองตอนที่ผ่านมาได้แก่ *S. cerevisiae* *A. rancen* และ *L. casei* เตรียมเป็นเชื้อจุลินทรีย์ผสม โดยใช้เชื้อเริ่มต้นแต่ละชนิดปริมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก เติมลงในขวดหมักเมล็ดโกโก้ในลักษณะต่าง ๆ กัน โดยอาศัยลักษณะการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ตามการหมักเมล็ดโกโก้ในธรรมชาติเป็นเกณฑ์ในการจัดชุดการทดลอง (รายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 5) การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP ของชุดการทดลองต่าง ๆ แสดงดังรูป 37 พบว่าทุกชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ผสมมีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นรวดเร็วในระยะแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติมเชื้อผสมของ *S. cerevisiae, A. rancen* และ *L. casei* ลงไปพร้อมกันในตอนแรกของการหมัก มีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันแรกของการหมักเป็น $3.16X10^9$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ หลังจากนั้นจุลินทรีย์มีปริมาณลดลง โดยชุดการทดลองที่เติมเชื้อผสมของ *S. cerevisiae* และ *L. casei* ในตอนเริ่มต้นการหมักมีจุลินทรีย์ต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ตลอดการหมัก ขณะที่ชุดการทดลองที่เติมเชื้อผสม *S. cerevisiae* และ *L. casei* ในตอนเริ่มต้นการหมัก แล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีจุลินทรีย์สูงกว่าชุดการทดลองอื่นตลอดการหมัก ส่วนชุดควบคุมซึ่งไม่เติมจุลินทรีย์ลงไปตอนแรกตรวจไม่พบจุลินทรีย์ในกองหมักแต่หลังจากนั้นจะมีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น และมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมักเป็น $3.10X10^4$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้แล้วมีปริมาณลดลงจนสิ้นสุดการหมัก

การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร PDA แสดงดังรูป 38 ชุดการทดลองที่เติมยีสต์มีจุลินทรีย์ใกล้เคียงกันในตอนเริ่มต้นการหมัก ซึ่งมีค่าประมาณ $3.10X10^5$ ถึง $3.30X10^5$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ และมีปริมาณจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นในวันแรกของการหมัก ทั้งนี้เพราะในระยะแรกของการหมักนั้นกองหมักมีสภาพไร้อากาศ และมีน้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เพียงพอ รวมทั้งเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ขณะนั้นมีพีเอชเหมาะแก่การเจริญของยีสต์ (Wood and Lass, 1985) ส่วนชุดการทดลองควบคุมมีการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ใกล้เคียงกับบนอาหาร TYGKCP คือในวันแรกของการหมักตรวจไม่พบจุลินทรีย์ หลังจากนั้นมีจุลินทรีย์เพิ่มสูงขึ้นจนถึงวันที่ 4 ของการหมักแล้ว ในตอนสุดท้ายของการหมักมีจุลินทรีย์ลดลง จากรูป 38 ชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมักมีจุลินทรีย์บนอาหาร PDA ลดลงเร็วกว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียดังกล่าวในระยะหลัง (หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง) แต่ในระยะสุดท้ายของการหมักทุกชุดการทดลองมีจุลินทรีย์บน

อาหาร PDA ลดลง และชุดการทดลองต่าง ๆ มีปริมาณจุลินทรีย์ในวันสุดท้ายของการหมักบนอาหาร PDA ประมาณ $3.10X10^4$ ถึง $1.03X10^5$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้

การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร DSM แสดงดังรูป 39 ในชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมัก มีจุลินทรีย์บนอาหาร DSM ประมาณ $4.05X10^5$ ถึง $4.20X10^5$ CFU ต่อกรัมเมล็ดโกโก้ และมีปริมาณจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นในระยะ 2 วันแรกของการหมัก หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการหมัก ส่วนชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นถึงวันที่ 4 ของการหมัก และมีปริมาณสูงสุดเป็น $6.65X10^7$ ถึง $8.50X10^7$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ หลังจากนั้นมีปริมาณลดลง ในวันสุดท้ายของการหมักมีจุลินทรีย์ใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมัก สอดคล้องกับรายงานของ Roelofsen (1958) ซึ่งพบแบคทีเรียแอซีติกได้ในปริมาณสูงตลอดการหมัก ส่วนชุดการทดลองที่ไม่เติม *A. rancen* และชุดการทดลองควบคุมในระยะแรกของการหมักไม่พบจุลินทรีย์บนอาหาร DSM แต่หลังจากนั้นสามารถพบจุลินทรีย์บนอาหาร DSM ได้เช่นกัน และมีจุลินทรีย์ในวันสุดท้ายประมาณ $8.50X10^1$ และ $8.05X10^2$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ตามลำดับ

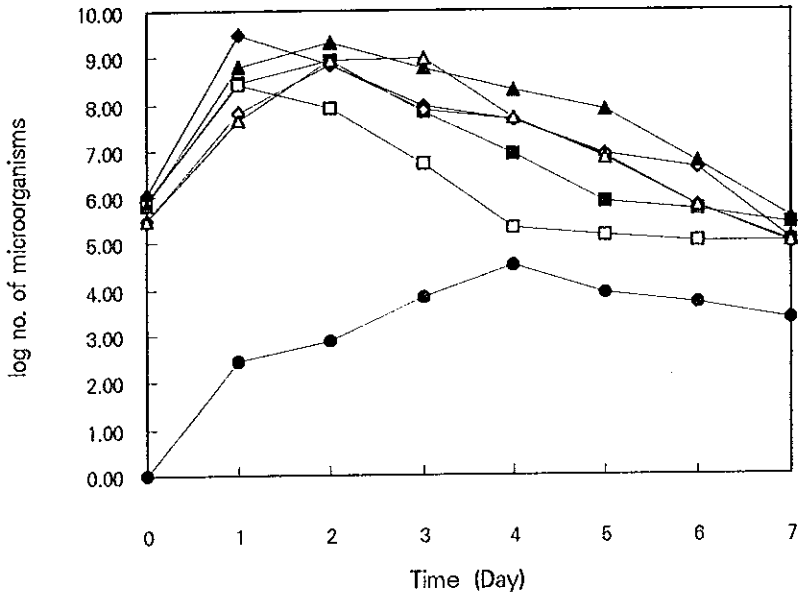
การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร MRS แสดงดังรูป 40 ในชุดการทดลองที่เติม *L. casei* ตอนเริ่มต้นการหมัก มีจุลินทรีย์บนอาหาร MRS ประมาณ $3.70X10^5$ ถึง $3.80X10^5$ CFU ต่อกรัมเมล็ดโกโก้ และมีจุลินทรีย์สูงสุดในวันแรกของการหมัก หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงจนสิ้นสุดการหมัก ส่วนชุดการทดลองที่เติม *L. casei* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีจุลินทรีย์บนอาหาร MRS สูงในวันที่ 2 - 3 ของการหมัก แต่ปริมาณจุลินทรีย์ในระยะดังกล่าวมีค่าต่ำกว่าชุดการทดลองที่เติม *L. casei* ในตอนเริ่มต้นการหมัก ส่วนชุดการทดลองควบคุม และชุดการทดลองที่ไม่เติม *L. casei* ในการหมัก พบว่าในระยะแรกของการหมักตรวจไม่พบจุลินทรีย์บนอาหาร MRS แต่หลังจากนั้นพบจุลินทรีย์บนอาหารดังกล่าวเช่นกัน และมีปริมาณใกล้เคียงกับชุดการทดลองควบคุม โดยมีจุลินทรีย์สูงสุดในวันที่ 4 ของการหมักเป็น $2.50X10^2$ ถึง $6.90X10^2$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิขณะหมักเมล็ดโกโก้ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ แสดงดังรูป 41 ทุกชุดการทดลองมีอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นในระยะแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมักมีอุณหภูมิสูงกว่าชุดการทดลองอื่นและมีค่าใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ในตอนเริ่มต้นแล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24

ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* มีอุณหภูมิสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติม *A. rancen* เพราะชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* นั้นเมื่อมีการให้อากาศแก่กองหมักทำให้เกิดการออกซิไดซ์ของเอทานอลเป็นกรดแอซีติกมีการปล่อยพลังงานออกมามาก ส่วนชุดควบคุมที่ไม่เติมจุลินทรีย์ลงไปมีอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นน้อยกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ และระยะสุดท้ายของการหมักมีอุณหภูมิลดลงเช่นเดียวกับชุดการทดลองอื่น

การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้และในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ แสดงดังรูป 42 ในเมล็ดโกโก้และเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เริ่มต้นมีพีเอชเป็น 6.55 และ 3.85 ตามลำดับ ในชุดการทดลองต่าง ๆ ที่เติม *A. rancen* มีพีเอชในเมล็ดลดต่ำลง เนื่องจากกรดแอซีติกซึ่งแบคทีเรียแอซีติกสร้างขึ้นมานั้นมีความแรงของกรดมากกว่ากรดแลคติกและกรดอินทรีย์อื่น ๆ (Biehl, *et al.*, 1982) เมื่อแพร่เข้าสู่ภายในเมล็ดโกโก้ทำให้เมล็ดโกโก้มีค่าพีเอชลดต่ำลงกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมแบคทีเรียดังกล่าว ส่วนการเติม *S. cerevisiae* ร่วมกับ *L. casei* ทำให้ค่าพีเอชในเมล็ดลดลงไม่มาก ในวันสุดท้ายของการหมักเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมักมีพีเอชสูงสุด เป็น 5.83 ส่วนชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae, L. casei* และ *A. rancen* พร้อมกันในตอนเริ่มต้นการหมักเมล็ดโกโก้มีพีเอชต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ และมีค่าเป็น 5.35 เนื่องจากผลของกรดแอซีติกและกรดแลคติกที่เกิดขึ้นในการหมัก

การเปลี่ยนแปลงพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในชุดการทดลองต่าง ๆ มีค่าไม่แตกต่างกัน แต่ในวันแรกของการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ในตอนเริ่มต้นการหมักแล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากการหมักได้ 24 ชั่วโมง มีพีเอชสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ หลังจากนั้นมีค่าลดลง เนื่องจากในวันแรกของการหมักนั้นมีการเติมเฉพาะยีสต์ลงไป ทำให้กองหมักมีกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ เกิดขึ้นน้อย แต่มีการสร้างแอลกอฮอล์ขึ้นโดยกิจกรรมของยีสต์ หลังจากนั้นเมื่อเติม *A. rancen* ลงไป พีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากแบคทีเรียแอซีติกช่วยให้เกิดการออกซิไดซ์แอลกอฮอล์เป็นกรดแอซีติกได้เร็วขึ้น ทำให้เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีค่าพีเอชลดลงก่อนที่มีค่าเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยในวันที่ 3 ของการหมัก เพราะในระยะดังกล่าวแบคทีเรียที่เจริญในการหมักมีปริมาณลดลง รวมถึงกรดอินทรีย์ที่มีการแพร่เข้าสู่ภายในเมล็ดโกโก้



รูป 37 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร TYGKCP ในการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 7 วัน

(-■-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-□-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

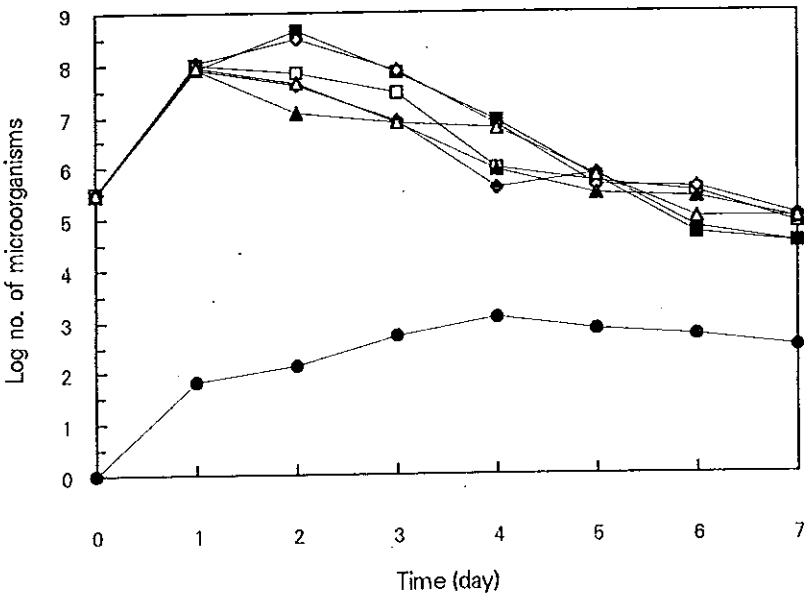
(-◆-) เติม *S. cerevisiae* 5%, *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-◇-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-▲-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-△-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-●-) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใด ๆ ในการหมัก



รูป 38 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร PDA ในการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

(-■-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-□-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

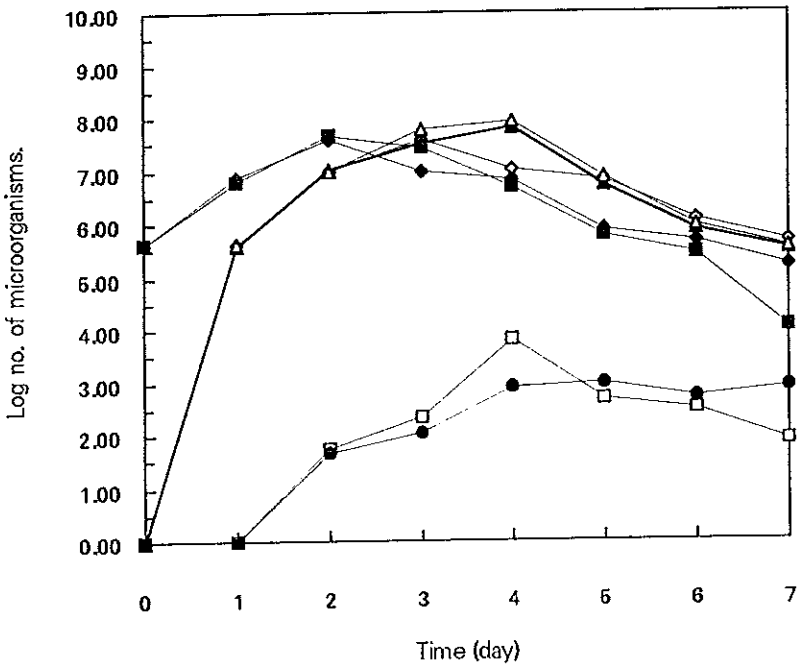
(-◆-) เติม *S. cerevisiae* 5%, *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-◇-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-▲-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-△-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-●-) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใด ๆ ในการหมัก



รูป 39 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร DSM ในการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

(-■-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-□-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

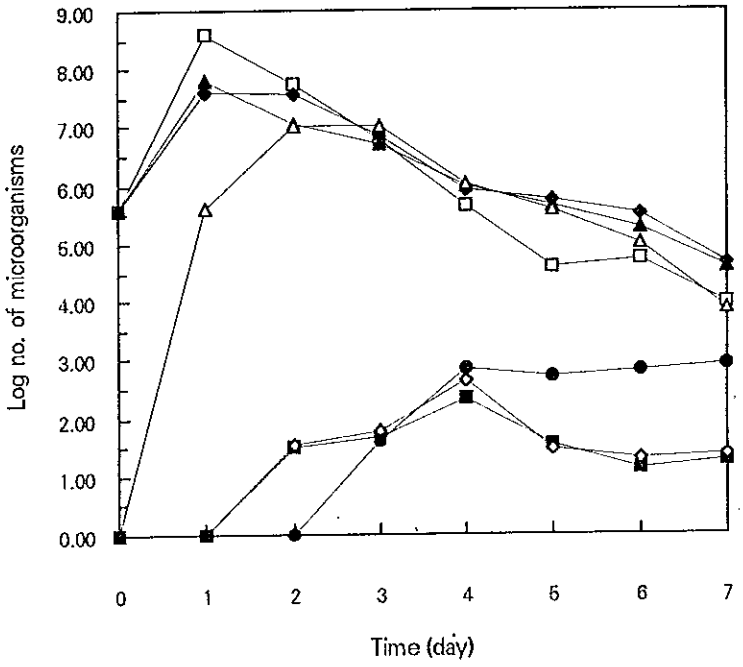
(-◆-) เติม *S. cerevisiae* 5%, *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-◇-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-▲-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-△-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-●-) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใด ๆ ในการหมัก



รูป 40 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร MRS ในการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

(-■-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-□-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-◆-) เติม *S. cerevisiae* 5%, *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-◇-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-▲-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-△-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-●-) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใด ๆ ในการหมัก

การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ ด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แสดงดังรูป 43 ในเมล็ดโกโก้เริ่มต้นมีกรดทั้งหมดเป็นร้อยละ 0.08 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก กรดทั้งหมดมีค่าเพิ่มขึ้นในระยะ 5 วันแรกของการหมัก หลังจากนั้นมีค่าลดลงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการหมัก ส่วนชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมจุลินทรีย์ลงไปมีกรดทั้งหมดต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ส่วนชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae, L. casei* และ *A. rancen* ในตอนเริ่มต้นของการหมักมีกรดทั้งหมดสูงกว่าชุดการทดลองอื่นตลอดการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* ลงไปหลังจากการหมักได้ 24 ชั่งโมง มีกรดทั้งหมดต่ำในระยะแรกของการหมัก แต่เมื่อเติม *A. rancen* แล้วจะมีกรดสูงขึ้น วันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมจุลินทรีย์ลงไปมีกรดทั้งหมดต่ำสุดเป็นร้อยละ 0.31 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ขณะที่ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae L. casei* และ *A. rancen* ในตอนเริ่มต้นการหมักมีกรดทั้งหมดสูงสุดเป็นร้อยละ 0.51 โดยน้ำหนัก และมีค่าใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *L. casei* ในตอนเริ่ม ต้นการหมักที่มีค่าเป็นร้อยละ 0.501 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก

กรดแลคติกในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรียผสมชุดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีการเปลี่ยนแปลงแสดงดังรูป 44 เมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตลอดการหมัก 7 วันกรดแลคติกมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากกรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ที่ไม่ระเหยเมื่อแพร่เข้าสู่ภายในเมล็ดโกโก้แล้วจึงสะสมอยู่ในเมล็ดโกโก้ตลอดไป (Weissberger, *et al.*, 1971) ในระหว่างการหมักพบว่าปริมาณกรดแลคติกในวันแรกของการหมักไม่แตกต่างกันมากนัก หลังจากนั้นกรดแลคติกในชุดการทดลองต่าง ๆ มีค่าเพิ่มสูงขึ้นและแตกต่างกันเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เติม *L. casei* ในการหมักนั้นพบกรดดังกล่าวในปริมาณสูง และกลุ่มที่ไม่เติม *L. casei* มีกรดแลคติกต่ำ ทั้งสองกลุ่มนี้มีกรดแลคติกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) สำหรับชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* และ *L. casei* มีกรดแลคติกต่ำกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติม *A. rancen* เพราะการเติม *A. rancen* ทำให้อัตราการเจริญของแบคทีเรียแลคติกน้อยลง มีการสร้างกรดแลคติกลดลง และเมื่อมีการให้อากาศในระยะต่อมาของการหมักแบคทีเรียแอซีติกสามารถออกซิไดซ์กรดแลคติกได้ด้วย (Carr, *et al.*, 1979) ในวันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นการหมัก แล้วเติม *L. casei* และ *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีกรดแลคติกสูงสุด เป็นร้อยละ 0.11 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก และมีค่าใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *L. casei* ในตอนเริ่มต้นการหมัก ซึ่งมีค่าเป็น

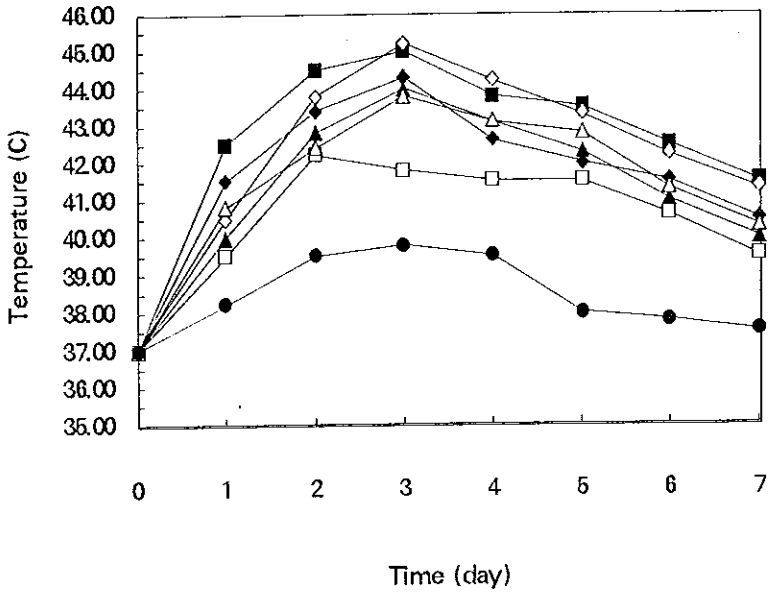
ร้อยละ 0.10 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ส่วนชุดการทดลองควบคุมมีกรดแลคติกต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ และในวันสุดท้ายของการหมักมีค่าเป็น 0.06 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก

การเปลี่ยนแปลงกรดที่ระเหยได้ในเมล็ดโกโก้ที่หมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ แสดงดังรูป 45 ทุกชุดการทดลองมีกรดแอซีติกเพิ่มขึ้นในระยะ 4-5 วันแรกของการหมัก หลังจากนั้นจึงลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก ในวันแรกของการหมักกรดแอซีติกในชุดการทดลองต่าง ๆ มีค่าใกล้เคียงกัน จากนั้นมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* และพบว่าการเติม *A. rancen* ในตอนเริ่มต้นการหมักนั้น เมล็ดโกโก้มีกรดแอซีติกต่ำกว่าการเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง เนื่องจากการเติมแบคทีเรียแอซีติกในตอนแรกของการหมักนั้นแบคทีเรียแอซีติกจะไปลดเวลาการเจริญของยีสต์ลง ทำให้การย่อยสลายน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ไปเป็นแอลกอฮอล์โดยกิจกรรมของยีสต์เกิดขึ้นน้อยลง เมื่อมีการให้อากาศและมีการเติมแบคทีเรียแอซีติกลงไปในตอนหลัง ทำให้เกิดการออกซิไดซ์แอลกอฮอล์เป็นกรดแอซีติกได้น้อย วันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นการหมักและเติม *A. rancen* ตามลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีกรดแอซีติกสูงสุดเป็นร้อยละ 0.17 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก และมีค่าใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae, L. casei* และ *A. rancen* ลงไปพร้อมกันตอนเริ่มต้นการหมัก ซึ่งมีค่าเป็นร้อยละ 0.16 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ส่วนชุดการทดลองควบคุมมีกรดแอซีติกต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ตลอดการหมัก และในวันสุดท้ายของการหมักมีค่าเป็นร้อยละ 0.09 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก

การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ แสดงดังรูป 46 น้ำตาลทั้ง 2 ชนิดในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีค่าเป็นร้อยละ 12.44 และ 0.64 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ทุกชุดการทดลองมีน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดลดลงตลอดการหมักและมีค่าใกล้เคียงกัน ยกเว้นชุดการทดลองควบคุมซึ่งไม่เติมจุลินทรีย์ใด ๆ มีน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดลดลงน้อยที่สุด และชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดในตอนเริ่มต้นการหมักมีน้ำตาลซูโครสลดลงมากที่สุด ขณะที่ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *A. rancen* ตามลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีน้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ลดลงน้อยที่สุด น้ำตาลทั้ง 2 ชนิดในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้วิเคราะห์ได้เพียงวันที่ 3 ของการหมักเท่านั้น หลังจากวันที่ 3 ของการหมักเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ถูกย่อยสลายโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์เกิดเป็นของเหลวขึ้นในกองหมักจนไม่สามารถวิเคราะห์ได้ ในวันที่ 3 ของการหมักชุดการทดลองที่

เติมจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ มีน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ประมาณร้อยละ 0.42 - 0.88 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก และมีน้ำตาลซูโครสประมาณร้อยละ 0.09 - 0.11 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ส่วนชุดการทดลองควบคุมในวันที่ 3 ของการหมักมีน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดในเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นร้อยละ 0.87 และ 0.21 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้จากวันที่ 3 ของการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ แสดงดังตาราง 25

น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ที่หมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ มีการเปลี่ยนแปลง แสดงดังรูป 47 เมล็ดโกโก้เริ่มต้นในการหมักมีน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดเป็นร้อยละ 0.54 และ 2.61 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ในวันแรกของการหมักน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดในชุดการทดลองต่าง ๆ มีค่าลดลงเล็กน้อย หลังจากนั้นน้ำตาลกลูโคสมีค่าสูงขึ้นในทุกชุดการทดลอง โดยชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ในตอนเริ่มต้น มีน้ำตาลกลูโคสสูงกว่าชุดการทดลองอื่นตลอดการหมัก ส่วนน้ำตาลรีดิวซ์ในชุดการทดลองควบคุมมีค่าเพิ่มขึ้นน้อยกว่าชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นในชุดการทดลองต่าง ๆ เป็นผลจากในระยะดังกล่าว เมล็ดโกโก้มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ น้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักจากชุดการทดลองต่าง ๆ แสดงดังตาราง 25 ส่วนน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองต่าง ๆ มีค่าลดลงหลังจากหมักเมล็ดโกโก้ได้ 1 วัน ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *L. casei* ตอนเริ่มต้นการหมักมีน้ำตาลซูโครสลดลงต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นที่เติมจุลินทรีย์ ส่วนชุดการทดลองควบคุมมีน้ำตาลซูโครสลดลงน้อยที่สุดเนื่องจากชุดการทดลองควบคุมนั้นไม่มีการเติมจุลินทรีย์ลงไป ทำให้กองหมักเกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เช่น การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ และการลดลงของพีเอช จากกิจกรรมของจุลินทรีย์น้อยกว่าชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ ปริมาณน้ำตาลซูโครสในชุดการทดลองต่าง ๆ ในวันสุดท้ายของการหมักแสดงดังตาราง 25



รูป 41 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

(-■-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-□-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

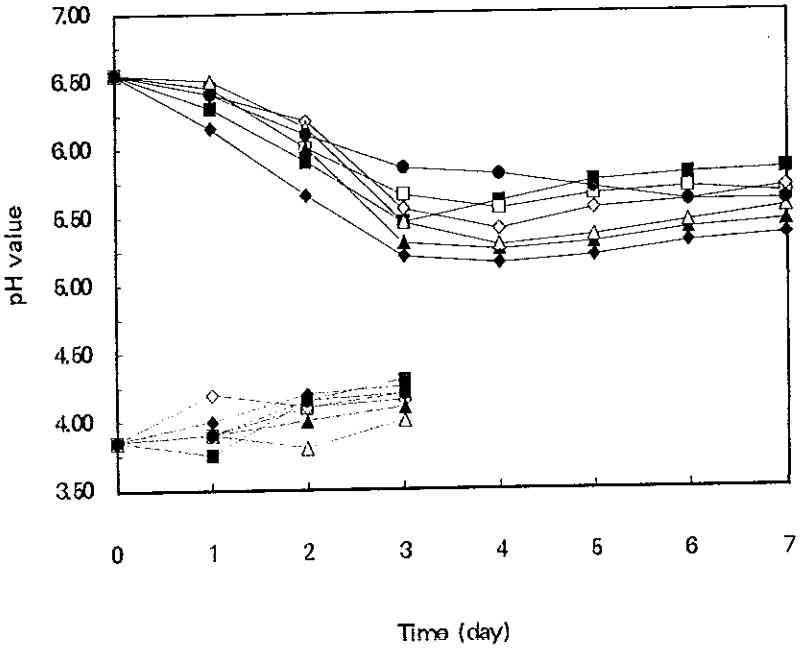
(-◆-) เติม *S. cerevisiae* 5%, *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-◇-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-▲-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-△-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-●-) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใด ๆ ในการหมัก



รูป 42 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ (·····) และเมล็ดโกโก้ (——) ในการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

(-■-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-□-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

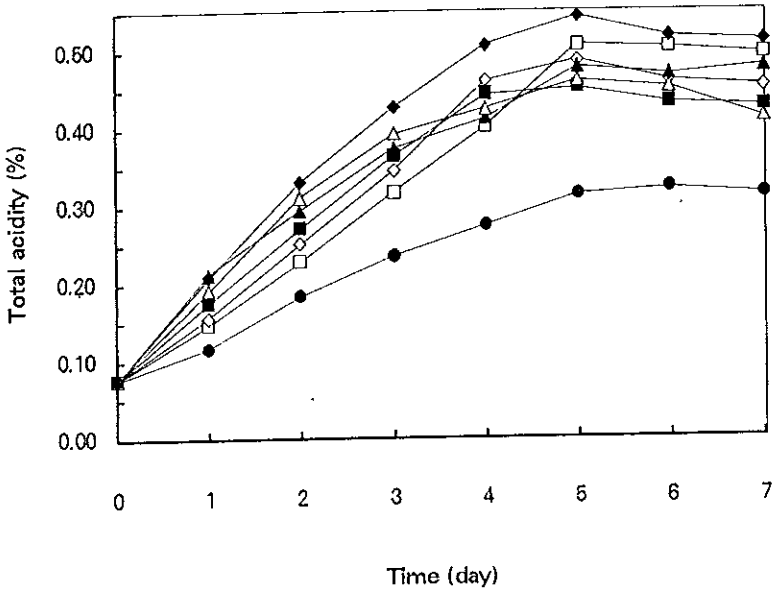
(-◆-) เติม *S. cerevisiae* 5%, *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-◇-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-▲-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-△-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-●-) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใด ๆ ในการหมัก



รูป 43 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

(-■-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-□-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

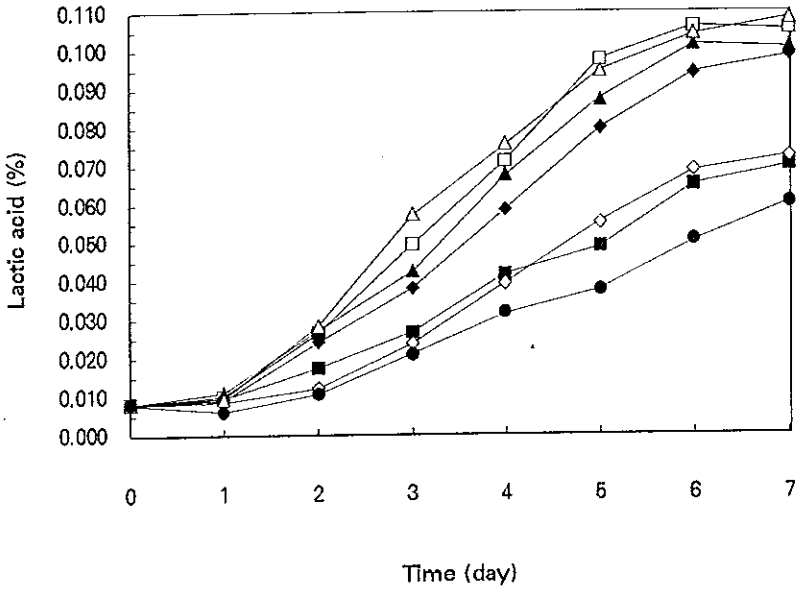
(-◆-) เติม *S. cerevisiae* 5%, *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-◇-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-▲-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-△-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-●-) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใด ๆ ในการหมัก



รูป 44 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

(-■-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-□-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

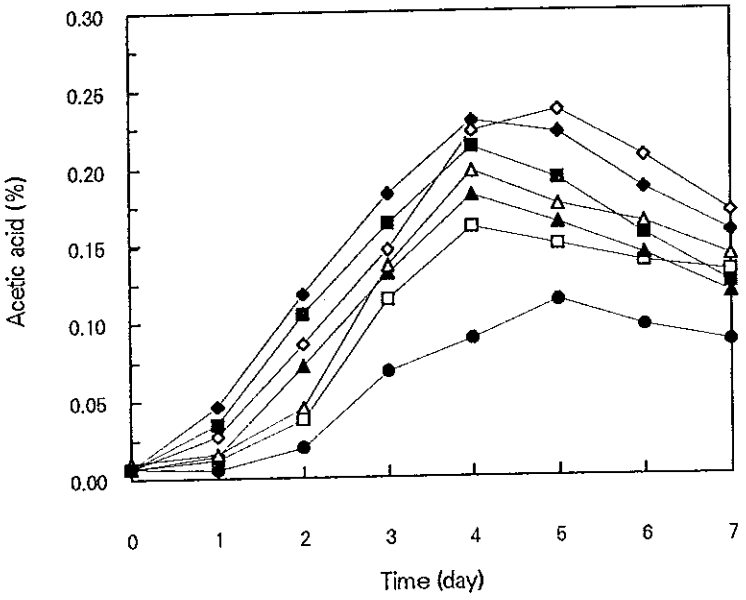
(-◆-) เติม *S. cerevisiae* 5%, *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-◇-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-▲-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-△-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-●-) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใด ๆ ในการหมัก



รูป 45 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดที่ระเหยได้ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

(-■-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-□-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

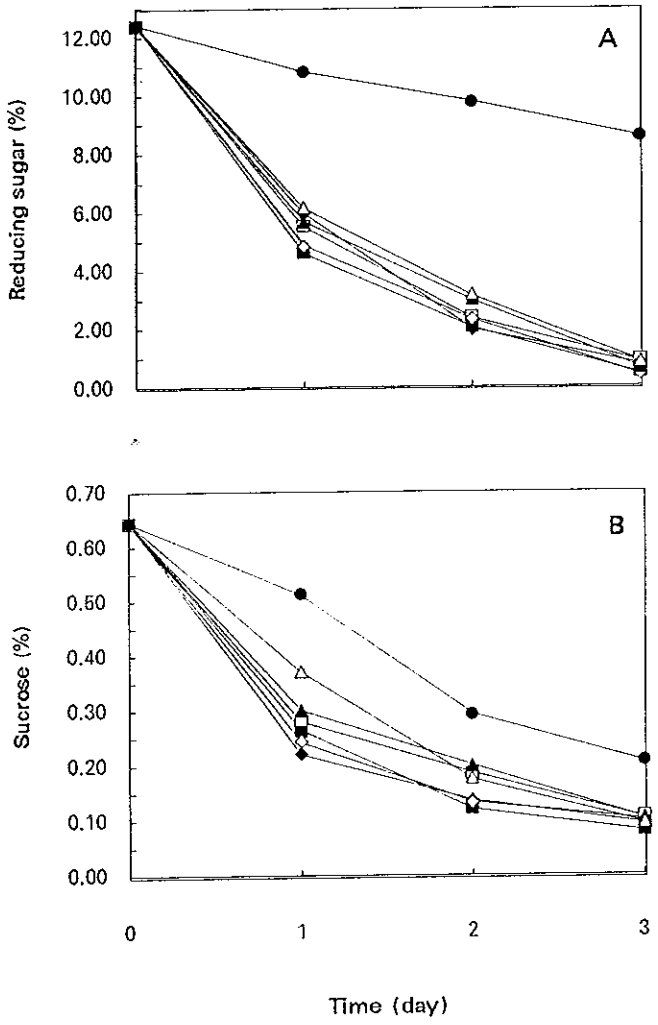
(-◆-) เติม *S. cerevisiae* 5%, *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-◇-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-▲-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-△-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-●-) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใด ๆ ในการหมัก



รูป 46 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (A) และน้ำตาลซูโครส (B) ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

(-■-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-□-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

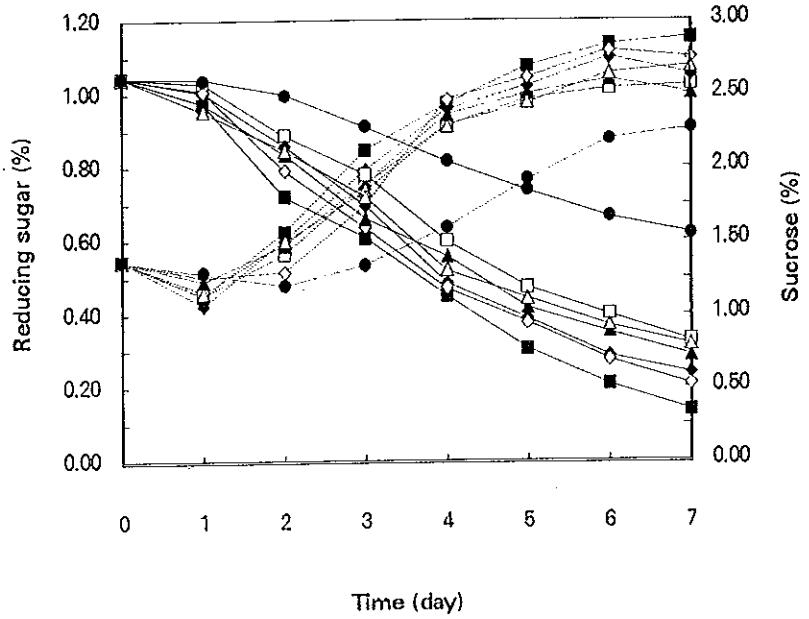
(-◆-) เติม *S. cerevisiae* 5%, *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้น

(-◇-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-▲-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-△-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-●-) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใด ๆ ในการหมัก



รูป 47 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ (·····) และน้ำตาลซูโครส (——) ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

(-■-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-□-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-◆-) เติม *S. cerevisiae* 5%, *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-◇-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-▲-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-△-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-●-) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใด ๆ ในการหมัก

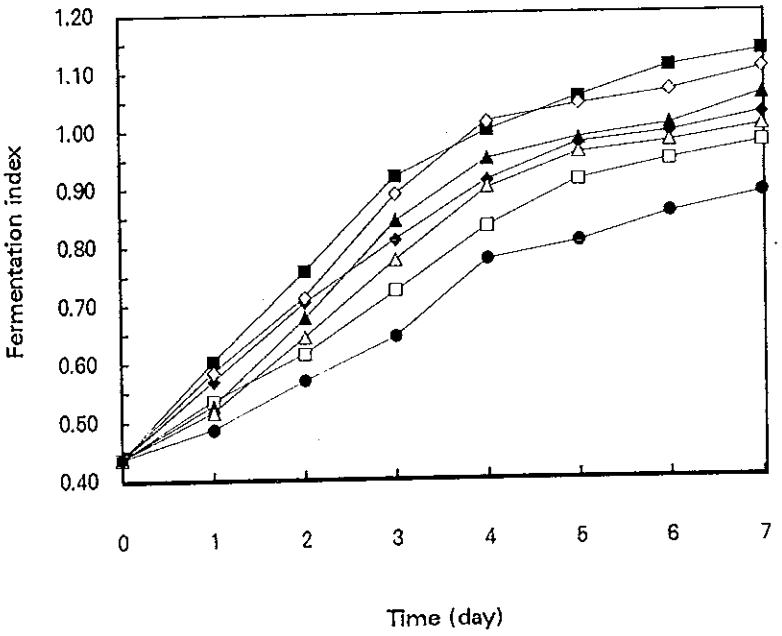
การเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ในระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม แสดงดังรูป 48 ก่อนการหมักเมล็ดโกโก้มีค่าดรรชนีการหมักเป็น 0.44 ระหว่างการหมักมีค่าดรรชนีการหมักเพิ่มขึ้นตลอดการหมัก โดยชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมัก และชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นการหมัก แล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีค่าดรรชนีการหมักใกล้เคียงกันและมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นตลอดการหมัก ส่วนชุดการทดลองควบคุมมีค่าดรรชนีการหมักเพิ่มขึ้นน้อยกว่าชุดการทดลองอื่น เนื่องจากชุดการทดลองควบคุมนั้นไม่เติมจุลินทรีย์ลงไป ทำให้การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในขวดหมักไม่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ ในเมล็ดโกโก้ ในระหว่างการหมัก ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติกมีค่าดรรชนีการหมักสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมแบคทีเรียแอซีติก และชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติกเมล็ดโกโก้มีค่าดรรชนีการหมักใกล้เคียงกับ 1.00 ตั้งแต่วันที่ 4 - 5 ของการหมัก เพราะการเติมแบคทีเรียแอซีติกนั้นทำให้กองหมักมีอุณหภูมิเพิ่มสูง และมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกว่ากรณีที่ไม่เติมแบคทีเรียแอซีติก ส่วนชุดการทดลองที่เติมเฉพาะ *S. cerevisiae* และ *L. casei* ตอนเริ่มต้น มีค่าดรรชนีการหมักที่ใกล้เคียงกับชุดการทดลองควบคุม ค่าดรรชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายจากชุดการทดลองต่าง ๆ แสดงดังตาราง 25

เมื่อนำเมล็ดโกโก้ไปทำแห้งแล้วนำเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้มาผ่าดูสีของเมล็ดโกโก้ (cut test) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตาราง 24 จากค่าร้อยละเฉลี่ยของเมล็ดโกโก้แห้งจากชุดการทดลองต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นการหมักแล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่งโมง มีค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลช็อกโกแลต เป็นร้อยละ 83.13 และมีค่าใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ในตอนเริ่มต้นการหมัก ซึ่งมีค่าเป็นร้อยละ 82.65 ส่วนชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ผสมชุดอื่น ๆ มีค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลต่ำกว่าชุดการทดลองทั้งสองนี้ ชุดการทดลองควบคุมให้ค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลต่ำสุดเป็นร้อยละ 49.38 แต่ให้ค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีม่วงแกมน้ำตาลสูงกว่าชุดการทดลองอื่น

องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมแสดงดังตาราง 25 เมื่อนำเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักไปทำแห้งแล้วมีคุณภาพแสดงดังตาราง 26 ซึ่งเมล็ด

โกโก้แห้งที่ได้มีคุณภาพดี ยกเว้นเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองควบคุมซึ่งมีคุณภาพต่ำ เมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ในตอนเริ่มต้นการหมักแล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากการหมักได้ 24 ชั่วโมง และชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมักให้เมล็ดโกโก้แห้งที่ดีกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ เมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองทั้งสองชุดมีพีเอชเพิ่มขึ้น มีกรดแอซีติกลดต่ำลง และให้ค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้สีน้ำตาลสูง มีปริมาณไขมัน และปริมาณความชื้นใกล้เคียงกับมาตรฐาน

ดังนั้น การศึกษาการใช้เชื้อผสมของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่คัดเลือกในการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการในขวดหมัก สามารถสรุปได้ว่าการใช้ *S. cerevisiae* ปริมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก และ *A. rancen* ปริมาณร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เติมลงไปพร้อมกันในตอนเริ่มต้นการหมัก หรือการเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง ให้เมล็ดโกโก้ที่มีคุณภาพดีกว่าชุดการทดลองที่เติมเชื้อผสมของ *S. cerevisiae, A. rancen* และ *L. casei* ในลักษณะอื่น ๆ



รูป 48 การเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 7 วัน

(-■-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-□-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-◆-) เติม *S. cerevisiae* 5%, *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(-◇-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-▲-) เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-△-) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(-●-) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใด ๆ ในการหมัก

ตาราง 24 การเปลี่ยนแปลง ค่า Cut Test ของเมล็ดโกโก้ จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสม เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ชุดการทดลอง	สีเมล็ดโกโก้แห้ง (ร้อยละ)[1]			
	สีน้ำตาล	สีม่วงแกมน้ำตาล	สีหินชนวน	สีอื่น ๆ
Treatment A	82.65a [2]	16.18bc	1.17bc	0.00c
Treatment B	75.43c	20.48b	2.73b	1.36a
Treatment C	80.13b	18.87b	1.00d	0.00b
Treatment D	83.13a	14.97c	1.90c	0.00c
Treatment E	80.63b	17.98b	1.38c	0.00c
Treatment F	78.57c	18.67b	1.76c	1.00b
Control Treatment	48.38d	45.73a	4.61a	1.28a

1 ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

2 อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

Treatment A เติม *S. cerevisiae* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

Treatment B เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

Treatment C เติม *S. cerevisiae* 5%, *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

Treatment D เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

Treatment E เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

Treatment F เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

Control Treatment ไม่มีการเติมจุลินทรีย์ใด ๆ ในการหมัก

ตาราง 25 องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

องค์ประกอบ[1]	ชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ผสม[3]						
	Treatment A	Treatment B	Treatment C	Treatment D	Treatment E	Treatmemt F	Control
น้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ด (%)[4]	0.45 ± 0.02^{e2}	0.88 ± 0.01^{b}	0.75 ± 0.01^{c}	0.42 ± 0.02^{e}	0.64 ± 0.01^{d}	0.87 ± 0.02^{b}	8.58 ± 0.02^{a}
น้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ด (%)[4]	0.08 ± 0.01^{c}	0.11 ± 0.01^{b}	0.09 ± 0.01^{c}	0.10 ± 0.01^{c}	0.10 ± 0.01^{bc}	0.10 ± 0.01^{b}	0.48 ± 0.01^{a}
น้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ด (%)	1.15 ± 0.01^{a}	1.02 ± 0.01^{bc}	1.05 ± 0.02^{b}	1.10 ± 0.02^{ab}	1.00 ± 0.01^{c}	1.08 ± 0.02^{b}	0.90 ± 0.02^{c}
น้ำตาลซูโครสในเมล็ด (%)	0.34 ± 0.02^{e}	0.82 ± 0.00^{b}	0.59 ± 0.01^{d}	0.52 ± 0.01^{d}	0.72 ± 0.02^{c}	0.79 ± 0.02^{bc}	1.55 ± 0.02^{a}
ดรรชนีการหมัก (OD460/OD530)	1.13 ± 0.01^{a}	0.97 ± 0.01^{e}	1.02 ± 0.01^{c}	1.10 ± 0.02^{ab}	1.06 ± 0.02^{b}	1.01 ± 0.02^{d}	0.89 ± 0.01^{f}
ปริมาณกรดทั้งหมด (% กรดซิตริก)	0.43 ± 0.02^{d}	0.50 ± 0.01^{b}	0.51 ± 0.01^{a}	0.45 ± 0.02^{d}	0.48 ± 0.01^{c}	0.41 ± 0.02^{e}	0.31 ± 0.02^{f}
ปริมาณกรดที่ระเหยได้ (% กรดแอซีติก)	0.12 ± 0.01^{e}	0.13 ± 0.02^{d}	0.16 ± 0.01^{b}	0.17 ± 0.01^{a}	0.12 ± 0.01^{e}	0.14 ± 0.02^{c}	0.09 ± 0.01^{f}
ปริมาณกรดแลคติก (% กรดแลคติก)	0.07 ± 0.01^{d}	0.11 ± 0.01^{b}	0.10 ± 0.01^{c}	0.07 ± 0.01^{d}	0.10 ± 0.01^{b}	0.11 ± 0.01^{a}	0.06 ± 0.01^{e}
ค่าพีเอชในเมล็ดโกโก้	5.85 ± 0.01^{a}	5.65 ± 0.01^{c}	5.35 ± 0.02^{f}	5.70 ± 0.02^{b}	5.45 ± 0.01^{e}	5.55 ± 0.01^{d}	5.60 ± 0.01^{c}

1 ค่าร้อยละโดยน้ำหนักสด ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2 อักษรเหมือนกันในแถวนอนเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

3 ชุดการทดลองต่าง ๆ มีรายละเอียดดังตาราง 24

4 ปริมาณน้ำตาลที่วัดได้ในวันที่ 3 ของการหมัก

ตาราง 26 องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

องค์ประกอบ[1]	ชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ผสม[3]						
	Treatment A	Treatment B	Treatment C	Treatment D	Treatment E	Treatmemt F	Control
น้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ด (%)	1.24 ±0.01^{b2}	1.14 ± 0.01^{c}	1.21 ± 0.02^{b}	1.31 ± 0.02^{a}	1.01 ± 0.02^{d}	1.12 ± 0.01^{e}	1.01 ± 0.01^{d}
น้ำตาลซูโครสในเมล็ด (%)	0.15 ±0.01^{e}	0.60 ± 0.02	0.51 ± 0.02^{c}	0.48 ± 0.01^{d}	0.61 ± 0.02^{b}	0.62 ± 0.01^{ab}	1.34 ± 0.02^{a}
ดรรชนีการหมัก (OD460/OD530)	1.15 ±0.02^{a}	1.02 ± 0.02^{f}	1.10 ± 0.01^{d}	1.10 ± 0.01^{c}	1.11 ± 0.02^{b}	1.06 ± 0.02^{e}	0.99 ± 0.01^{g}
ปริมาณกรดทั้งหมด (% กรดซิตริก)	0.39 ±0.01^{d}	0.48 ± 0.01^{b}	0.49 ± 0.02^{a}	0.46 ± 0.01^{c}	0.45 ± 0.02^{d}	0.38 ± 0.02^{e}	0.48 ± 0.01^{b}
ปริมาณกรดที่ระเหยได้ (% กรดแอซีติก)	0.11 ±0.016^{c}	0.13 ± 0.02^{c}	0.15 ± 0.01^{a}	0.15 ± 0.01^{c}	0.10 ± 0.01^{d}	0.14 ± 0.01^{b}	0.10 ± 0.01^{d}
ปริมาณกรดแลคติก (% กรดแลคติก)	0.08 ±0.01^{d}	0.11 ± 0.01^{b}	0.11 ± 0.01^{c}	0.08 ± 0.01^{d}	0.12 ± 0.02^{b}	0.12 ± 0.01^{a}	0.08 ± 0.01^{d}
ปริมาณความชื้น (%)	7.25 ±0.95^{c}	7.81 ± 0.86^{b}	6.98 ± 1.09^{d}	7.54 ± 0.99^{c}	8.11 ± 1.03^{a}	8.01 ± 0.92^{a}	7.89 ± 0.88^{b}
ค่าพีเอชในเมล็ดโกโก้	5.95 ±0.03^{a}	5.60 ± 0.01^{c}	5.40 ± 0.03^{e}	5.65 ± 0.02^{b}	5.50 ± 0.02^{d}	5.65 ± 0.01^{c}	5.55 ± 0.02^{d}
ปริมาณไขมัน (%)	53.15 ±0.97^{b}	51.89 ± 1.22^{d}	51.76 ± 1.275^{d}	52.83 ± 0.98^{c}	53.91 ± 1.19^{b}	54.16 ± 1.01^{a}	53.47 ± 1.05^{b}

1 ค่าร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2 อักษรเหมือนกันในแถวนอนเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

3 ชุดการทดลองต่าง ๆ มีรายละเอียดดังตาราง 24

บทบาทของเชื้อจุลินทรีย์ผสมต่อการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก

ใช้จุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้จากการทดลองตอนที่ผ่านมาได้แก่การใช้เชื้อผสมของ *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ปริมาณร้อยละ 5 เติมลงในกองหมักพร้อมกันตอนเริ่มต้นการหมัก และการเติม *A. rancen* ลงในกองหมักหลังจากเติม *S. cerevisiae* แล้ว 24 ชั่วโมง โดยเลี้ยงในอาหารเหลวที่เหมาะสม 24 ชั่งโมง แล้วเตรียมสารแขวนลอยของจุลินทรีย์แต่ละชนิดให้มีจุลินทรีย์ประมาณ 10^5 CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นเติมในกองเมล็ดโกโก้ในกล่องไม้ขนาด 34X76X32 เซนติเมตร หมักเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิห้อง และกลับเมล็ดในวันที่ 2 ของการหมัก

การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP แสดงดังรูป 49 พบว่าทุกชุดการทดลองมีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นในระยะแรกของการหมัก เนื่องจากมีเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เป็นแหล่งอาหารแก่การเจริญของจุลินทรีย์ในกองหมัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* พร้อมกันในตอนแรกของการหมักมีจุลินทรีย์ในวันแรกของการหมักเฉลี่ย $7.34X10^5$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกของการหมัก แล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีจุลินทรีย์ในวันแรกของการหมักเฉลี่ย $4.64X10^5$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ชุดการทดลองควบคุมซึ่งไม่เติมจุลินทรีย์ลงไปแต่เกิดการหมักด้วยจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนจากธรรมชาติ มีจุลินทรีย์เริ่มต้นเป็น $2.43X10^4$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ การหมักเมล็ดโกโก้ครั้งนี้ชุดการทดลองควบคุมมีปริมาณจุลินทรีย์สูงกว่ารายงานของ ดวงใจ ช่วยสถิตย์ (2535) ทั้งนี้เนื่องจากเวลาจากขั้นตอนการแกะฝักจนถึงการหมักนั้นแตกต่างกัน ในระหว่างการหมักชุดการทดลองที่เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมมีจุลินทรีย์ในกองหมักสูงสุดในวันแรกของการหมักเป็น $7.62X10^8$ และ $4.00X10^8$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ หลังจากผ่านระยะแรกของการหมักชุดการทดลองต่าง ๆ มีจุลินทรีย์ลดลง ขณะที่ชุดการทดลองควบคุมมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 3 ของการหมักเป็น $3.23X10^7$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้

การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร PDA แสดงดังรูป 50 ตอนเริ่มต้นการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ลงไป มีจุลินทรีย์ประมาณ $4.43X10^5$ ถึง $4.53X10^5$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติม *S. cerevisiae* และทุกชุดการทดลองมีจุลินทรีย์สูงสุดในวันแรกของการหมัก โดยชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมักและชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกของการหมัก แล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีจุลินทรีย์สูงสุดเป็น $5.29X10^8$ และ $5.63X10^8$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ตามลำดับ ส่วน

ชุดการทดลองควบคุมมีจุลินทรีย์บนอาหาร PDA สูงสุดในวันแรกของการหมักเป็น $5.99X10^7$ CFU ต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ซึ่งต่ำกว่าชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ผสม หลังจากนั้นจนสิ้นสุดการหมักทุกชุดการทดลองมีจุลินทรีย์ลดลง และพบว่าชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีจุลินทรีย์สูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติม *S. cerevisiae* ตลอดการหมัก ในวันสุดท้ายของการหมักจุลินทรีย์ของชุดการทดลองต่าง ๆ บนอาหาร PDA มีค่าประมาณ $3.66X10^3$ ถึง $4.34X10^4$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ตลอดการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ลงไป มีจุลินทรีย์บนอาหาร PDA สูงกว่าชุดการทดลองที่เกิดการหมักโดยจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนจากธรรมชาติ

จากผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่าชุดการทดลองควบคุมมีจุลินทรีย์เริ่มต้นบนอาหาร PDA ต่ำกว่ารายงานของ ดวงใจ ช่วยสถิตย์ (2535) และ อรพิน ภูมิภมร และคณะ (2536) แต่มีการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักที่สอดคล้องกัน คือ กองหมักมีจุลินทรีย์บนอาหาร PDA สูงสุดในวันแรกของการหมัก หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงเนื่องจากในวันแรกนั้นกองหมักมีสภาพไร้อากาศ และน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของยีสต์มีปริมาณสูง รวมทั้งพีเอชในเมล็ดโกโก้ยังมีค่าต่ำเหมาะแก่การเจริญของยีสต์ (Wood and Lass, 1985)

การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร MRS ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักแสดงดังรูป 51 ตอนเริ่มต้นการหมักมีจุลินทรีย์บนอาหาร MRS เท่ากับ $2.38X10^4$ ถึง $2.49X10^4$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักนั้นปริมาณจุลินทรีย์บนอาหาร MRS มีค่าสูงสุดในวันแรกของการหมัก และชุดการทดลองควบคุมซึ่งเกิดการหมักตามธรรมชาติมีจุลินทรีย์บนอาหาร MRS สูงกว่าชุดการทดลองที่เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสม โดยชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* พร้อมกันในตอนแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง และชุดการทดลองควบคุม มีปริมาณจุลินทรีย์สูงสุดในวันที่ 1 ของการหมักเป็น $8.22X10^7$, $2.46X10^8$ และ $3.55X10^8$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ตามลำดับ หลังจากนั้นปริมาณจุลินทรีย์ลดลงจนสิ้นสุดการหมัก สอดคล้องกับการทดลองของ Wood (1975) ที่สามารถพบแบคทีเรียแลคติกได้สูงสุดในวันแรกของการหมัก เนื่องจากในวันแรกนั้นกองหมักมีสภาพไร้อากาศซึ่งเหมาะแก่การเจริญของแบคทีเรียกลุ่มนี้ การที่ชุดการทดลองควบคุมพบจุลินทรีย์บนอาหาร MRS ในปริมาณสูงกว่าชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ลงไปเล็กน้อย สาเหตุหนึ่งที่เป็นไปได้ คือ แบคทีเรียแลคติกสามารถหมักน้ำตาลแล้วให้กรดแลคติกได้อย่างรวดเร็วในสภาพที่ไม่มีอากาศ ดังนั้นเมื่อแบคทีเรีย

แลคติกเจริญร่วมกับจุลินทรีย์อื่นทำให้แบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญได้ดีกว่า (พวงพร โชติไกร, 2530)

ปริมาณจุลินทรีย์บนอาหาร DSM ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักมีการเปลี่ยนแปลงดังรูป 52 ในชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมัก มีจุลินทรีย์บนอาหาร DSM เฉลี่ยเท่ากับ $4.14X10^5$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ส่วนชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *A. rancen* ตามลงไปหลักจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีจุลินทรีย์ในตอนเริ่มต้นการหมักใกล้เคียงกับชุดการทดลองควบคุม เป็น $5.08X10^3$ ถึง $5.09X10^3$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับรายงานของ ดวงใจ ช่วยสถิตย์ (2535) แต่มีความแตกต่างจากการศึกษาของ อรพิน ภูมิภมร และคณะ (2563) ซึ่งพบแบคทีเรียแอซีติกในตอนเริ่มต้นการหมักได้สูงสุดเป็น $1.55X10^6$ ถึง $1.54X10^7$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ชุดการทดลองที่เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมลงไปมีจุลินทรีย์เพิ่มสูงขึ้นในระยะแรกของการหมัก มีจุลินทรีย์สูงสุดในวันที่ 3 ของการหมักเป็น $5.08X10^7$ และ $3.50X10^8$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ หลังจากนั้นมีจุลินทรีย์ลดลงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการหมัก ปริมาณจุลินทรีย์ในชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีค่าสูงกว่าการเติม *A. rancen* และ *S. cerevisiae* พร้อมกันในตอนแรกของการหมัก เพราะการเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง นั้นทำให้มีการเพิ่มออกซิเจนลงในกองหมักอันเป็นผลจากการที่ยีสต์ย่อยสลายเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ทำให้อากาศสามารถแพร่เข้าสู่กองหมักได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งมีผลส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแอซีติก ในระยะสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีจุลินทรีย์เป็น $1.12X10^5$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ และชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมัก มีค่าเป็น $6.02X10^4$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ แต่ชุดการทดลองควบคุมมีปริมาณจุลินทรีย์เป็น $3.38X10^5$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของกองหมัก ซึ่งเกิดจากความร้อนที่ได้จากเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ และการเพิ่มขึ้นของเซลล์จุลินทรีย์ (อรพิน ภูมิภมร และคณะ, 2536) ระหว่างหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก เป็นเวลา 4 วัน ด้วยจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือก แสดงดังรูป 53 ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้น มีอุณหภูมิสูงกว่าชุดการทดลองอื่นตลอดการหมัก และมีค่าสูงสุดในวันที่ 2 ของการหมักเป็น 46.5 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับรายงานของไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก และคณะ (2534) ซึ่งหมักเมล็ดโกโก้แบบเดียวกัน พบว่ามีอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะ 2 วันแรกของการหมัก ส่วนชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่ม

ต้นแล้ว เติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีอุณหภูมิสูงสุดในวันที่ 2 ของการหมัก เป็น 46.0 องศาเซลเซียส เนื่องจากชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* นั้นเกิดการออกซิไดซ์ของเอทานอล เป็นกรดแอซีติกเมื่อให้อากาศแก่กองหมัก มีการปล่อยพลังงานออกมาสูง (Forsyth and Quesnel, 1963) ชุดการทดลองควบคุมซึ่งไม่เติมจุลินทรีย์ลงไปมีอุณหภูมิต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น โดยมีค่าสูงสุด ในวันที่ 2 ของการหมักเป็น 43.5 องศาเซลเซียส และระยะสุดท้ายของการหมักมีอุณหภูมิลดลงเช่นเดียวกับชุดการทดลองอื่น ในวันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีอุณหภูมิสูงกว่าชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมัก

การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้และเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสมของ *S. cerevisiae* และ *A. rancen* แสดงดังรูป 54 ในระหว่างการหมักพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของเมล็ดโกโก้อยู่ระหว่าง 6.40 - 5.25 ชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* เมล็ดโกโก้มีค่าพีเอชลดลงต่ำกว่าชุดทดลองที่ไม่เติมจุลินทรีย์ดังกล่าว เนื่องจากกรดแอซีติกที่แบคทีเรียแอซีติกดังกล่าวสร้างขึ้นมีความแรงของกรดมากกว่ากรดแลคติกและกรดอินทรีย์อื่น ๆ เมื่อกรดนี้แพร่เข้าสู่เมล็ดโกโก้ทำให้เมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* มีพีเอชลดลงต่ำกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมแบคทีเรียดังกล่าว หลังจากวันที่ 3 ของการหมัก พบว่า ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมักให้เมล็ดโกโก้ที่มีพีเอชสูงสุดในวันสุดท้ายของการหมักเป็น 5.70 ซึ่งใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นการหมักแล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเป็น 5.55

การเปลี่ยนแปลงพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในการหมักนั้น ในวันแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นการหมัก แล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากการหมักได้ 24 ชั่วโมง มีพีเอชเพิ่มขึ้นสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ แล้วหลังจากนั้นมีค่าลดลง เนื่องจากในวันแรกของการหมักนั้นมีการเติมเฉพาะยีสต์ลงไป ทำให้กองหมักมีการสร้างแอลกอฮอล์ขึ้นโดยกิจกรรมการหมักของยีสต์ หลังจากนั้นเมื่อเติม *A. rancen* ลงไป จะเกิดการออกซิไดซ์แอลกอฮอล์เป็นกรดแอซีติกขึ้น ทำให้เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว ก่อนที่เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยในวันที่ 3 ของการหมัก การที่ในวันที่ 3 ของการหมักเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีพีเอชสูงขึ้น เพราะในระยะดังกล่าวแบคทีเรียที่เจริญในการหมักมีปริมาณลดลง รวมถึงกรด

อินทรีย์ที่ถูกสร้างขึ้นมีการสูญเสียไปพร้อมกับของเหลวที่เกิดขึ้นจากการหมัก และกรดบางชนิดสามารถระเหยออกไปได้

การเปลี่ยนแปลงกรดทั้งหมดในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือก แสดงดังรูป 55 เมล็ดโกโก้เริ่มต้นในการหมักมีกรดทั้งหมดร้อยละ 0.25 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ในระหว่างการหมักนั้นชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมัก มีกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นน้อยที่สุดเป็นร้อยละ 0.95 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ขณะที่ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* แล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่งโมง มีกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นสูงสุดเป็นร้อยละ 1.14 โดยน้ำหนัก และชุดการทดลองควบคุมมีกรดทั้งหมดเป็นร้อยละ 1.13 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก การที่มีปริมาณกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นในระยะแรกของการหมัก เนื่องจากในระยะแรกของการหมักนั้นจุลินทรีย์มีการเจริญ และสร้างกรดอินทรีย์ต่าง ๆ ออกมาสู่กองหมักในปริมาณมาก แต่ในระยะสุดท้ายของการหมักปริมาณกรดในชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ทั้งสองชุดการทดลองมีค่าลดลง ขณะที่ชุดการทดลองควบคุมมีปริมาณกรดค่อนข้างคงที่ในระยะดังกล่าว ปริมาณกรดทั้งหมดในเมล็ดโกโก้จากวันสุดท้ายของการหมักแสดงดังตาราง 28

ปริมาณกรดแลคติกในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือก มีการเปลี่ยนแปลงดังรูป 56 กรดแลคติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นตลอดเวลาการหมัก เมล็ดโกโก้เริ่มต้นในการหมักมีกรดแลคติกประมาณร้อยละ 0.01 - 0.02 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ระหว่างการหมักชุดการทดลองต่าง ๆ มีกรดแลคติกเพิ่มสูงขึ้นในตอนแรกของการหมัก แต่ในระยะสุดท้ายของการหมักกรดแลคติกในชุดการทดลองต่าง ๆ มีค่าลดลงเล็กน้อย และชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมจุลินทรีย์ลงไป มีปริมาณกรดแลคติกสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ส่วนชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ทั้งสองชุดการทดลองมีกรดแลคติกใกล้เคียงกัน โดยชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* พร้อมกันในตอนแรกของการหมักมีกรดแลคติกสูงกว่า ปริมาณกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ที่หมักในกล่องหมักเป็นเวลา 4 วัน แสดงดังตาราง 28

การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดที่ระเหยได้ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักแสดง ดังรูป 57 เมล็ดโกโก้ตอนเริ่มต้นการหมักมีกรดที่ระเหยได้ประมาณร้อยละ 0.04 - 0.05 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ชุดการทดลองควบคุมมีกรดที่ระเหยได้เพิ่มขึ้นรวดเร็วในวันแรกของการหมัก ขณะที่ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* มีกรดที่ระเหยได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในวันแรกของการหมัก เมื่อมีการกลับกองหมักเมล็ดโกโก้ในวันที่ 2 ของการหมัก เมล็ดโกโก้

จากชุดการทดลองที่เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมทั้งสองชุดมีกรดที่ระเหยได้เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองควบคุม ในวันสุดท้ายของการหมักปริมาณกรดที่ระเหยได้ในเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ผสมทั้งสองชุดการทดลองมีกรดที่ระเหยได้ลดลงอีกครั้งหนึ่ง ขณะที่ชุดการทดลองควบคุมมีกรดที่ระเหยได้เพิ่มสูงขึ้นตลอดการหมัก ปริมาณกรดที่ระเหยได้ในเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักในกล่องหมัก เป็นเวลา 4 วัน แสดงดังตาราง 28

การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครส ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือก แสดงดังรูป 58 เมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เป็นร้อยละ 12.18 และ 0.81 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ในระหว่างการหมักน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีการเปลี่ยนแปลงลดลงตลอดการหมัก ในวันสุดท้ายของการหมักน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดถูกย่อยสลายโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์เหลือเพียงเล็กน้อย ชุดการทดลองควบคุมซึ่งไม่เติมจุลินทรีย์ลงไป มีน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดลดลงน้อยกว่าชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ จากผลการทดลองพบว่ายีสต์เจริญได้ดีทำให้เกิดการย่อยสลายน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มากขึ้น ในวันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ และชุดการทดลองควบคุมมีน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 0.10 - 0.52 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก และมีน้ำตาลซูโครสร้อยละ 0.01 - 0.06 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ดังตาราง 28

การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก แสดงดังรูป 59 เมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสเป็นร้อยละ 0.54 และ 2.61 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้เป็นเวลา 4 วัน ในกล่องหมัก น้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้มีปริมาณลดลง โดยชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมักมีน้ำตาลซูโครสลดลงมากที่สุด ส่วนน้ำตาลรีดิวซ์นั้นพบว่าในระยะแรกของการหมักทุกชุดการทดลองมีค่าลดลงเล็กน้อย หลังจากนั้นมีค่าเพิ่มสูงขึ้น โดยชุดการทดลองควบคุมมีน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นน้อยที่สุด ขณะที่ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมัก มีน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นสูงสุด น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นในชุดการทดลองต่าง ๆ เป็นผลจากในระยะดังกล่าวเมล็ดโกโก้มีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมแก่การเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ในเมล็ดโกโก้ ปริมาณน้ำตาลในเมล็ดโกโก้ที่ได้ในวันสุดท้ายของการหมักแสดงดังตาราง 28

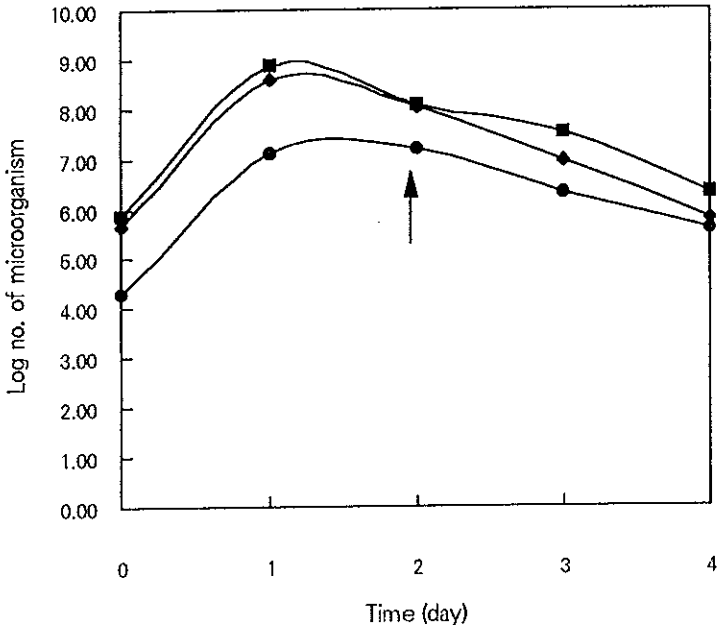
การเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมทั้ง 2 ชุด เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม แสดงดังรูป 60 เมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีค่าดรรชนีการหมักเฉลี่ยเป็น 0.51 ในช่วงแรกของการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมักมีค่าดรรชนีการหมักสูงกว่า ชุดการทดลองอื่น ๆ แต่เมื่อมีการกลับกองหมักในวันที่สองของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกของการหมักแล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีค่าดรรชนีการหมักสูงกว่าชุดการทดลองอื่นตลอดการหมัก ขณะที่ชุดการทดลองควบคุมมีค่าดรรชนีการหมักต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นตลอดการหมัก ในวันสุดท้ายของการหมักค่าดรรชนีการหมักชุดการทดลองที่เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมทั้ง 2 ชุดการทดลองมีค่าดรรชนีการหมักที่ใกล้เคียงกัน จากผลการทดลองที่ได้พบว่าชุดการทดลองที่เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมในการหมักให้เมล็ดโกโก้ที่มีค่าดรรชนีการหมักใกล้เคียงหรือเท่ากับ 1.0 ตั้งแต่วันที่ 3 ของการหมัก ขณะที่ชุดการทดลองควบคุมซึ่งเกิดการหมักตามธรรมชาติมีค่าดรรชนีการหมักใกล้เคียง 1.0 ในวันที่ 4 ของการหมัก แสดงให้เห็นว่าการเติมเชื้อผสมของ *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ในการหมักเมล็ดโกโก้มีผลช่วยลดระยะเวลาการหมักลง มีผลให้กองหมักมีอุณหภูมิสูงขึ้นเร็วกว่า และมีปริมาณกรดในเมล็ดโกโก้จากการหมักต่ำลงด้วย ค่าดรรชนีการ หมักในวันที่ 4 ของการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก แสดงดังตาราง 28

เมื่อนำเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือก และจากชุดการทดลองควบคุม มาผ่าดูความสมบูรณ์ของเมล็ด และดูสีของเมล็ดโกโก้แห้ง (cut test) ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 27 ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมัก ซึ่งมีเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลช็อกโกแลตเป็นร้อยละ 90.50 และมีค่าใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นการหมักแล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่งโมง ซึ่งมีเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลช็อกโกแลตเป็นร้อยละ 89.70 ส่วนชุดการทดลองควบคุมมีเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลต่ำสุดเป็นร้อยละ 64.98 แต่ให้เมล็ดโกโก้แห้งสีม่วงแกมน้ำตาลสูงกว่าชุดการทดลองอื่น

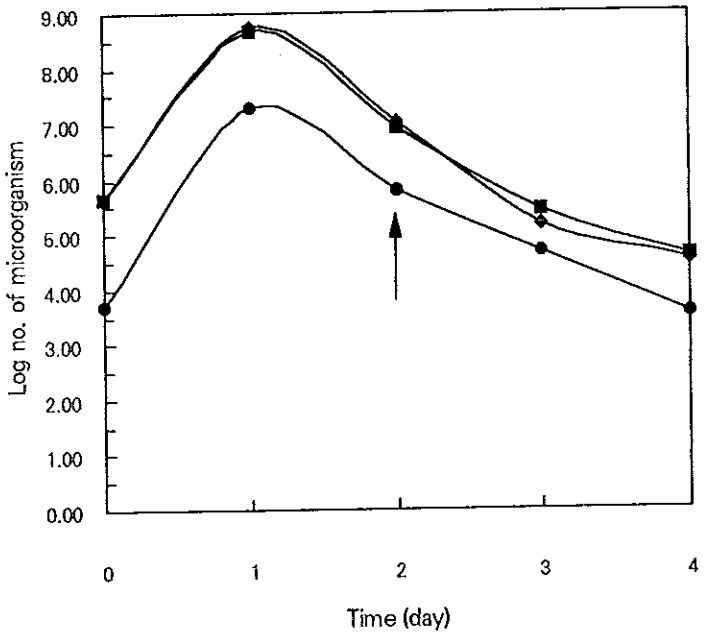
จากผลการทดลองที่ได้ชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ลงไปทั้งสองลักษณะให้เมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลสูงกว่าชุดการทดลองควบคุมที่เกิดการหมักจากจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ค่า cut test ของชุดการทดลองควบคุมนั้นมีค่าสูงกว่ารายงานของ ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก และคณะ (2534) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมีปริมาณจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน ซึ่งมีผลต่อการเพิ่มของ อุณหภูมิ พีเอช และ

กรดต่าง ๆ อันเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการกลับกองหมักที่ไม่เหมาะสมเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ค่า cut test ของเมล็ดโกโก้ต่ำลง (Abdul samah, *et al.*, 1993b)

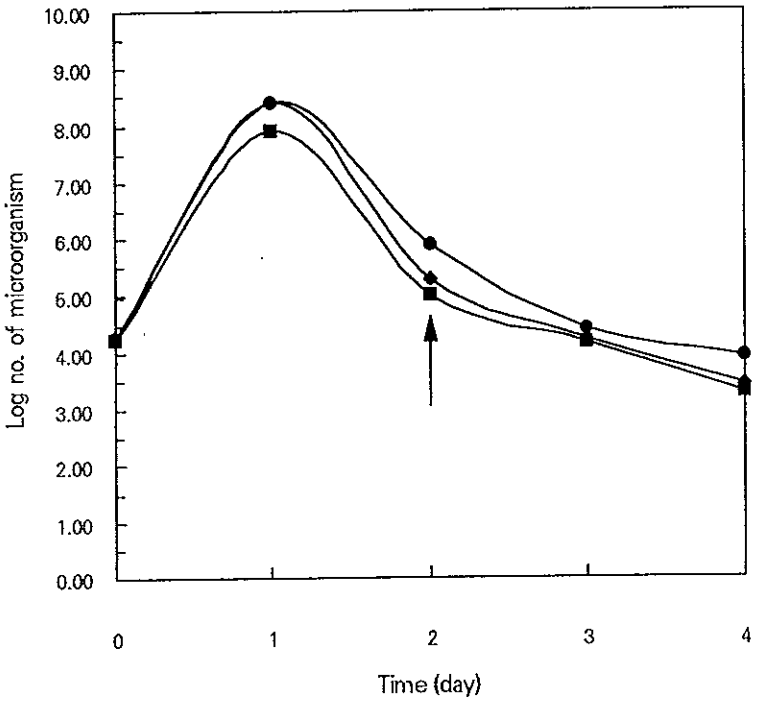
องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักในกล่องหมัก ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน ด้วยจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือก แสดงดังตาราง 28 และเมล็กโกโก้แห้งจากชุดการทดลองต่าง ๆ มีคุณภาพแสดงได้ดังตาราง 29 เมล็ดโกโก้แห้งที่ได้มีคุณภาพดี ซึ่งชุดการทดลองที่เติมเชื้อผสมของ *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ทั้ง 2 ชุดการทดลอง ให้เมล็ดโกโก้แห้งที่มีคุณภาพดีกว่าชุดการทดลองควบคุม เมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองทั้งสองชุดมีค่าพีเอชสูงกว่าชุดการทดลองควบคุม มีกรดแอซีติก และกรดแลคติกต่ำกว่าเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองควบคุม เมล็ดโกโก้ที่หมักมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเมล็ดเร็วกว่าชุดการทดลองควบคุม โดยมีค่าดรรชนีการหมักเพิ่มขึ้นเร็วกว่าชุดการทดลองควบคุม และชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ผสมทั้ง 2 ชุดการทดลอง ให้ร้อยละของเมล็ดโกโก้สีน้ำตาลสูงขึ้น มีปริมาณไขมัน และความชื้นใกล้เคียงกับมาตรฐาน



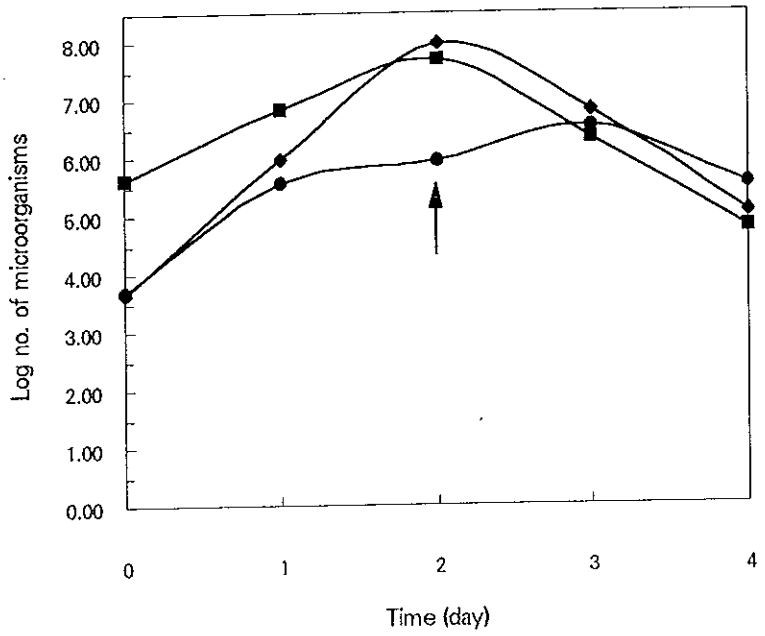
รูป 49 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ ในกล่องหมัก และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก (ศรชี้) ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก (-■-), ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกแล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม(-●-)



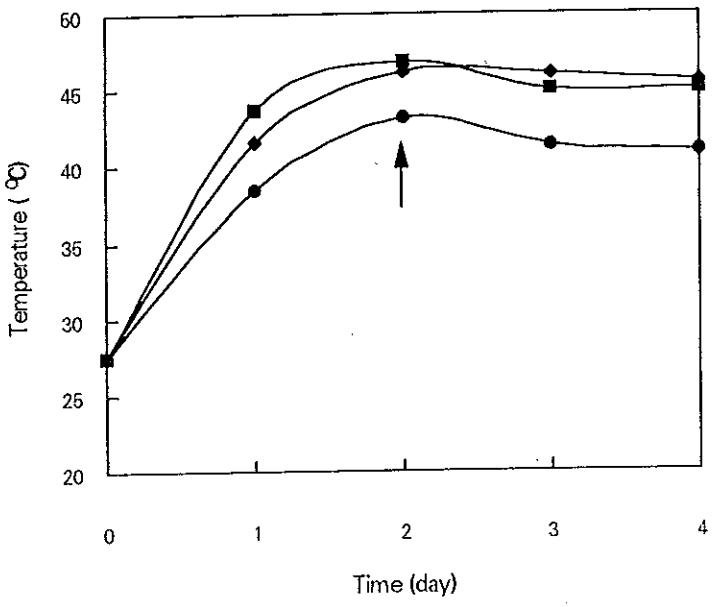
รูป 50 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร PDA ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ ในกล่องหมักและกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก (ศรชี้) ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก (-■-), ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกแล้วเติม *A. rancen* ตามลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-●-)



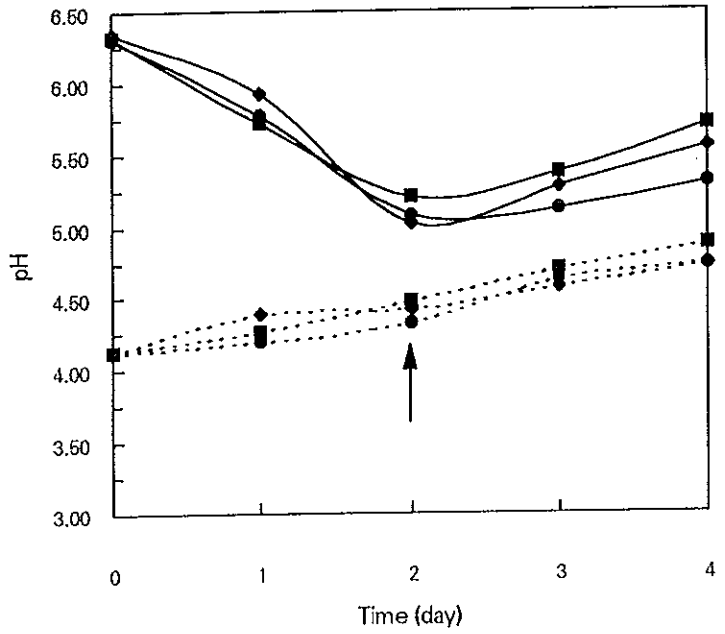
รูป 51 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร MRS ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักและกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก (ศรชี้) ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก (-■-), ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกแล้วเติม *A. rancen* ตามลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-●-)



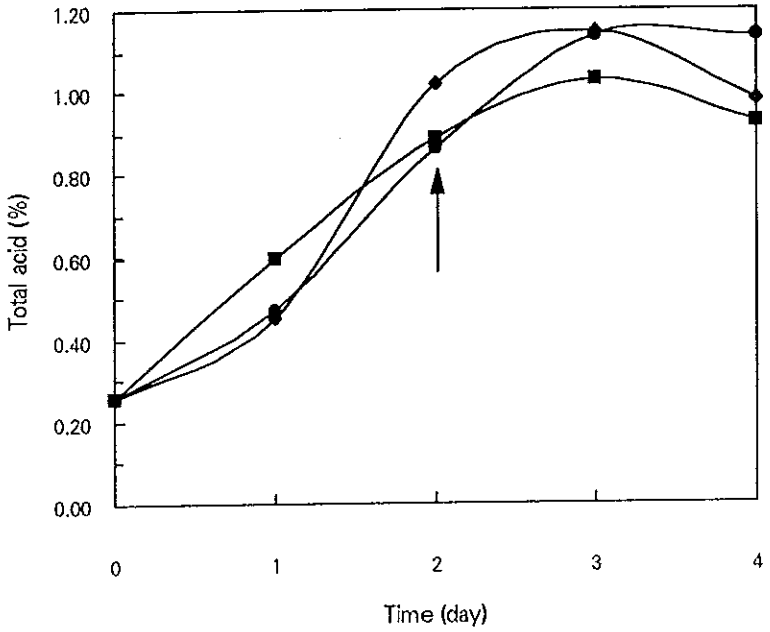
รูป 52 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร DSM ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ ในกล่องหมักและกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก (ศรชี้) ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก (-■-), ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกแล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-●-)



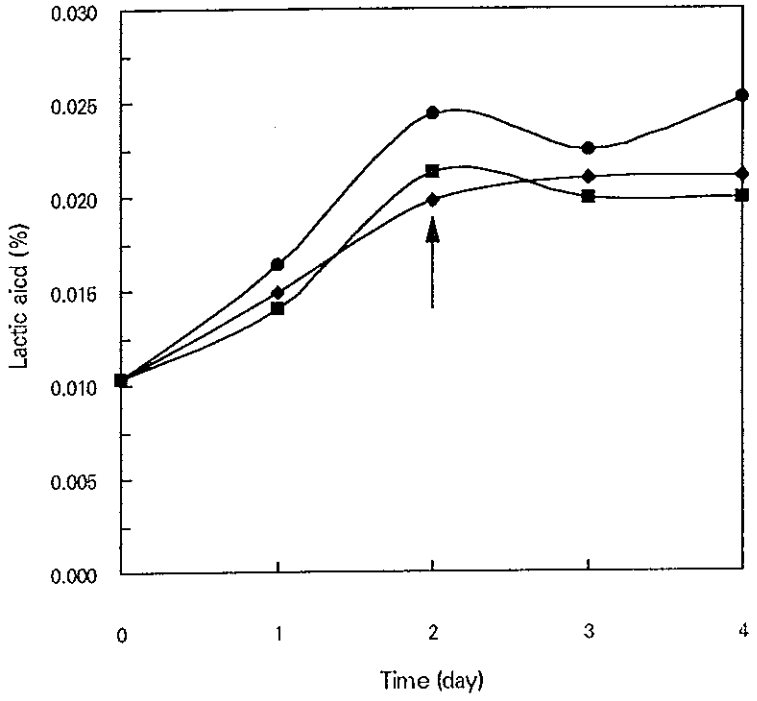
รูป 53 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ ในกล่องหมัก และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก (ศรชี้) ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก (-■-), ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกแล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-●-)



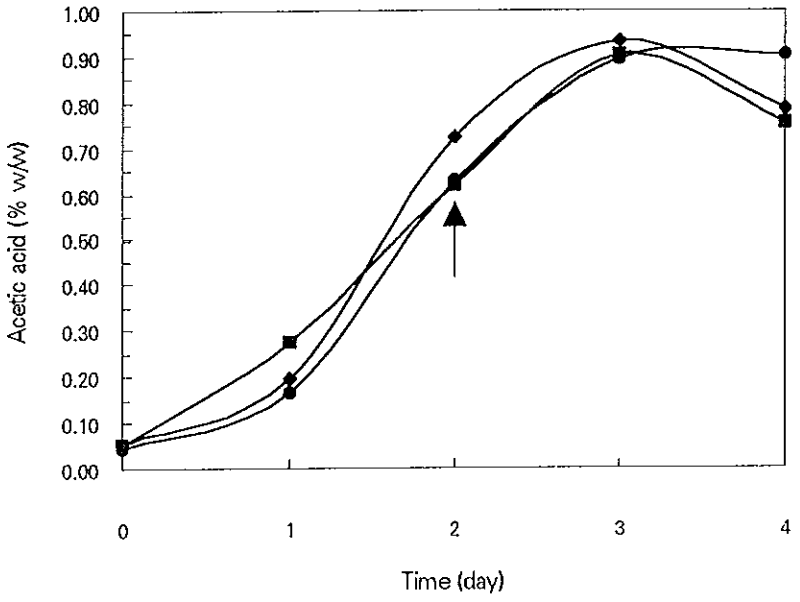
รูป 54 การเปลี่ยนแปลงพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ (·····) และเมล็ดโกโก้ (——) ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก (ศรชี้) ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก (-■-), ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกแล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-●-)



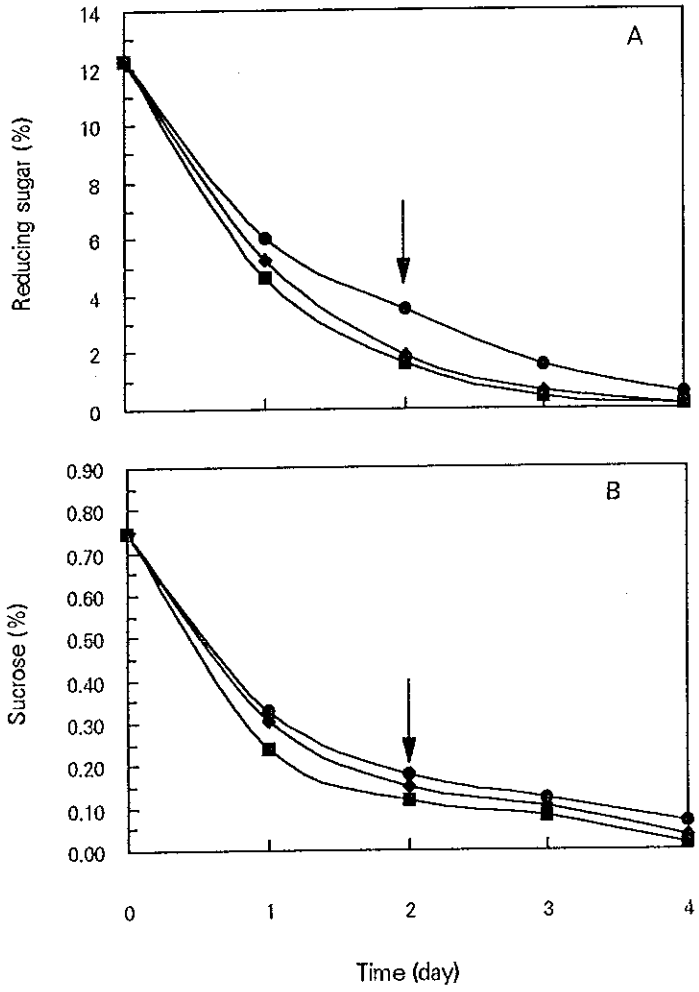
รูป 55 การเปลี่ยนแปลงกรดทั้งหมดในเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักในกล่องหมัก และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก (ศรชี้) ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก (-■-), ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรก แล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-●-)



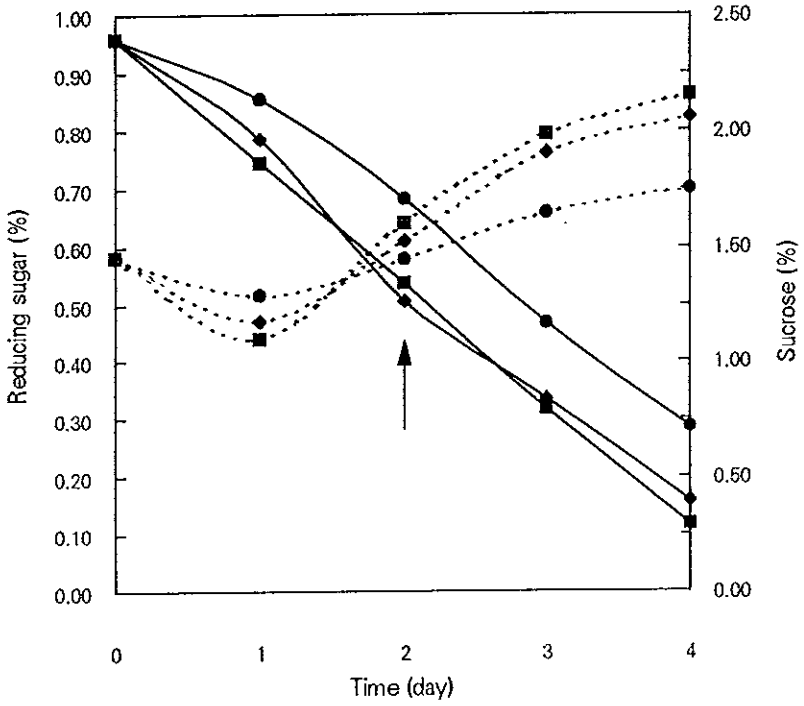
รูป 56 การเปลี่ยนแปลงกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักในกล่องหมัก และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก (ศรชี้) ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก (-■-), ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรก แล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-●-)



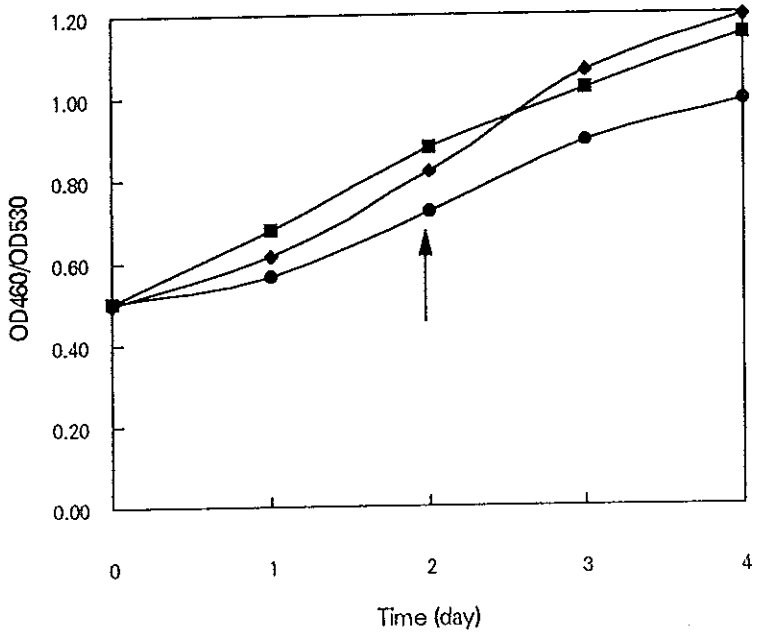
รูป 57 การเปลี่ยนแปลงกรดที่ระเหยได้ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักในกล่องหมัก และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก (ศรชี้) ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก (-■-), ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรก แล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-●-)



รูป 58 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ (A) และน้ำตาลซูโครส (B) ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักในกล่องหมัก และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก (ศรชี้) ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก (-■-), ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกแล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-●-)



รูป 59 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ (·····) และน้ำตาลซูโครส (——) ในเมล็ดโกโก้ จากการหมักในกล่องหมัก และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก (ศรชี้) ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก (-■-), ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกแล้วเติม *A. rancen* ลงไป หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-●-)



รูป 60 การเปลี่ยนแปลงค่าดรรชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก (ศรชี้) ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก (-■-), ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกแล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง (-◆-) และชุดการทดลองควบคุม (-●-)

ตาราง 27 การเปลี่ยนแปลงค่า Cut Test ของเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมในกล่องหมัก เป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

ชุดการทดลอง	สีเมล็ดโกโก้แห้ง (ร้อยละ)[1]			
	สีน้ำตาล	สีม่วงแกมน้ำตาล	สีหินชนวน	สีอื่น ๆ
Treatment A	90.51[a 2]	9.49[b]	0.00[c]	0.00[b]
Treatment B	89.70[a]	8.41[b]	1.89[b]	0.00[b]
Control	64.98[b]	31.79[a]	3.23[a]	0.00[a]

1 ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

2 อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

Treatment A เติม *S. cerevisiae* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

Treatment B เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

Control ไม่เติมจุลินทรีย์ใด ๆ ในการหมัก

ตาราง 28 องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมในกล่องหมัก ที่อุณหภูมิห้อง

องค์ประกอบ[1]	Treatment A	Treatment B	Control
น้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ด (%)[3]	0.11 ± 0.02[a2]	0.15 ± 0.04[b]	0.51 ± 0.07[c]
น้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ด (%)[3]	0.02 ± 0.01[a]	0.04 ± 0.02[b]	0.07 ± 0.02[c]
น้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ด (%)	0.86 ± 0.03[b]	0.83 ± 0.05[b]	0.70 ± 0.03[a]
น้ำตาลซูโครสในเมล็ด (%)	0.31 ± 0.01[a]	0.40 ± 0.02[b]	0.72 ± 0.02[c]
ดรรชนีการหมัก (OD460/OD530)	1.18 ± 0.03[b]	1.18 ± 0.01[b]	1.00 ± 0.03[a]
ปริมาณกรดทั้งหมด (% กรดซิตริก)	0.93 ± 0.04[a]	0.98 ± 0.02[b]	1.14 ± 0.03[b]
ปริมาณกรดที่ระเหยได้ (% กรดแอซีติก)	0.77 ± 0.01[a]	0.78 ± 0.02[a]	0.90 ± 0.02[c]
ปริมาณกรดแลคติก (% กรดแลคติก)	0.02 ± 0.00[a]	0.02 ± 0.00[a]	0.03 ± 0.01[b]
ค่าพีเอชในเมล็ดโกโก้	5.75 ± 0.01[c]	5.55 ± 0.04[b]	5.30 ± 0.03[a]

1 ค่าร้อยละโดยน้ำหนักสด ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2 อักษรเหมือนกันในแถวนอนเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

3 ปริมาณน้ำตาลในวันที่ 4 ของการหมัก

Treatment A เติม *S. cerevisiae* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

Treatment B เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

Control ไม่เติมจุลินทรีย์ใด ๆ ในการหมัก

ตาราง 29 องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้แห้งจากการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมในกล่องหมัก ที่อุณหภูมิห้อง

องค์ประกอบ[1]	Treatment A	Treatment B	Control
น้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ด (%)	1.54 ± 0.05^{c2}	1.43 ± 0.03^{b}	1.14 ± 0.04^{a}
น้ำตาลซูโครสในเมล็ด (%)	0.30 ± 0.02^{a}	0.41 ± 0.03^{b}	0.67 ± 0.03^{c}
ดรรชนีการหมัก (OD460/OD530)	1.20 ± 0.02^{b}	1.16 ± 0.03^{b}	1.04 ± 0.05^{a}
ปริมาณกรดทั้งหมด (% กรดซิตริก)	0.88 ± 0.03^{a}	0.92 ± 0.02^{b}	1.04 ± 0.02^{c}
ปริมาณกรดที่ระเหยได้ (% กรดแอซีติก)	0.46 ± 0.01^{a}	0.48 ± 0.02^{a}	0.55 ± 0.01^{b}
ปริมาณกรดแลคติก (% กรดแลคติก)	0.02 ± 0.00^{a}	0.02 ± 0.00^{b}	0.04 ± 0.01^{b}
ปริมาณความชื้น (%)	7.66± 0.07^{a}	7.92 ± 0.06^{b}	7.98 ± 0.08^{b}
ค่าพีเอชในเมล็ดโกโก้	5.89 ± 0.01^{b}	5.71 ± 0.02^{b}	5.50 ± 0.04^{a}
ปริมาณไขมัน (%)	55.71 ± 0.37^{c}	55.39 ± 0.45^{b}	55.10 ± 0.23^{a}

1 ค่าร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2 อักษรเหมือนกันในแถวนอนเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

Treatment A เติม *S. cerevisiae* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

Treatment B เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

Control ไม่เติมจุลินทรีย์ใด ๆ ในการหมัก

บทที่ 4

สรุป

สรุป

1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาการควบคุมสภาวะการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการโดยการเติมยีสต์ 3 ชนิด คือ *Saccharomyces cerevisiae Candida sorbosa* หรือ *C. sake* ปริมาณร้อยละ 6 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักเมล็ดโกโก้ 500 กรัม ในขวดแก้ว ที่อุณหภูมิห้อง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และในภาชนะหุ้มฉนวนกันความร้อน เป็นเวลา 7 วัน พบว่าในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ ชุดการทดลองที่ใช้ *S. cerevisiae* เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีจุลินทรีย์เจริญบนอาหาร PDA และ TYGKCP เพิ่มขึ้นสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ในระหว่างการหมักชุดการทดลองที่หมักที่ 37 องศาเซลเซียส มีกรดที่ระเหยได้ กรดทั้งหมด และกรดแลคติกต่ำ เมล็ดโกโก้ที่ได้มีค่าดรรชนีการหมัก และมีเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลสูง รวมถึงเมล็ดโกโก้ที่ได้มีค่าพีเอชสูงกว่าเมล็ดโกโก้ที่หมักที่สภาวะอื่น ๆ นอกจากนี้เมล็ดโกโก้ที่หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ถูกย่อยสลายเร็ว ทั้งยังมีน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้สูงกว่าการหมักที่สภาวะอื่น ๆ

2 บทบาทของยีสต์ในการหมักเมล็ดโกโก้

จากการใช้เชื้อยีสต์ 3 ชนิด คือ *S. cerevisiae Candida sorbosa* หรือ *C. sake* เติมลงในการหมักเมล็ดโกโก้ 500 กรัม ปริมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ซึ่งมีเซลล์ยีสต์เริ่มต้นประมาณ $4.33X10^5$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมที่ไม่เติมจุลินทรีย์ลงไปในการหมัก พบว่าชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ในการหมักเมล็ดโกโก้นั้นมีจุลินทรีย์เจริญได้เร็วและมีปริมาณสูงกว่าชุดการทดลองอื่น มีผลทำให้เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ถูกย่อยสลายไปเป็นของเหลวได้เร็วขึ้น ทั้งยังทำให้กองหมักมี

อุณหภูมิสูงกว่าชุดการทดลองที่เติมยีสต์ชนิดอื่น เมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วย *S. erevisiae* มีค่าดรรชนีการหมักสูง มีปริมาณกรดทั้งหมด และกรดที่ระเหยได้ต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น โดยมีค่าเป็นร้อยละ 0.46 และ 0.12 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ส่วนปริมาณกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ที่หมักด้วย *S. erevisiae* นั้นมีค่าใกล้เคียงกับชุดการทดลองควบคุม และมีค่าต่ำกว่าเมล็ดโกโก้ที่หมักด้วยยีสต์ชนิดอื่น โดยมีค่าเป็นร้อยละ 0.07 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก เมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติม *S. erevisiae* มีค่าพีเอชสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ อีกด้วย

เมื่อนำเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักไปทำแห้ง แล้วนำไปหาปริมาณของเมล็ดโกโก้ที่มีสีน้ำตาลช็อกโกแลต ปรากฏว่าเมล็ดโกโก้แห้งจากชุดการทดลองที่เติม *S. erevisiae* ให้ค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้สีน้ำตาลช็อกโกแลตสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ เป็นร้อยละ 77.78 และเมล็ดโกโก้แห้งจากชุดการทดลองดังกล่าว มีน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าพีเอช และค่าดรรชนีการหมักสูงสุด แต่มี น้ำตาลซูโครส กรดทั้งหมด กรดแลคติก และกรดที่ระเหยได้ในเมล็ดน้อยที่สุด ทั้งยังมีปริมาณความชื้น และปริมาณไขมันในเมล็ดโกโก้แห้ง ใกล้เคียงกับเกณฑ์กำหนดมาตรฐานของเมล็ดโกโก้แห้ง

3 บทบาทของแบคทีเรียแลคติกในการหมักเมล็ดโกโก้

แบคทีเรียแลคติก 3 ชนิด ที่ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักเมล็ดโกโก้คือ *Lactobacillus casei* *Leuconostoc mesenteroides* และ *Streptococcus thermophilus* โดยแยกเติมเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียแต่ละชนิดปริมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักเมล็ดโกโก้ แล้วหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน มีจุลินทรีย์ในตอนเริ่มต้นการหมักเป็น $2.95X10^5$ ถึง $3.09X10^5$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม ในชุดการทดลองที่เติม *L. casei* ถึงแม้จะมีปริมาณจุลินทรีย์เจริญไม่สูงที่สุด แต่เมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักมีค่าดรรชนีการหมักและมีพีเอชสูงกว่าชุดการทดลองอื่น เป็น 0.98 และ 5.65 ตามลำดับ ทั้งมีกรดทั้งหมด และกรดที่ระเหยได้ต่ำกว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกอื่น ๆ ซึ่งมีค่าเป็นร้อยละ 0.48 และ 0.19 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ มีกรดแลคติกเป็นร้อยละ 0.08 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ชุดการทดลองที่เติม *L. casei* นั้นเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่น้อยกว่าชุดการทดลองอื่น และมีน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักสูงสุด

เมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากชุดการทดลองที่หมักด้วย *L. casei* ให้ร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลช็อกโกแลตสูงกว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกอื่น ๆ เป็นร้อยละ 59.78 และแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมล็ดโกโก้แห้งจากชุดการทดลองที่เติม *L. casei* มีกรดทั้งหมด กรดที่ระเหยได้ และกรดแลคติก ต่ำกว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกอื่น ๆ มีค่าดรรชนีการหมัก และพีเอชสูงกว่าการเติมแบคทีเรียแลคติกอื่น ทั้งยังมีปริมาณความชื้น และปริมาณไขมันในเมล็ดโกโก้แห้งใกล้เคียงกับเกณฑ์มาตรฐาน

4 บทบาทของแบคทีเรียแอซีติกต่อการหมักเมล็ดโกโก้

แบคทีเรียแอซีติก 3 ชนิด ที่ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการคือ *Acetobacter rancen A. lovaniense* และ *G. oxydan* เมื่อเติมแบคทีเรียแอซีติกแต่ละชนิดลงในการหมักเมล็ดโกโก้ปริมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าขณะเริ่มต้นการหมักมีจุลินทรีย์เป็น $1.53X10^5$ ถึง $2.55X10^5$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* ในการหมัก มีจุลินทรีย์สูงสุดบนอาหาร DSM ในวันที่ 3 ของการหมักเป็น $7.00X10^7$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ เมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วย *A. rancen* มีค่าดรรชนีการหมักเป็น 0.99 มีพีเอชเท่ากับ 5.65 มีน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้เป็นร้อยละ 0.67 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองดังกล่าวถูกย่อยสลายได้เร็ว มีน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เหลือน้อยกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ เมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วย *A. rancen* มีกรดทั้งหมด และกรดที่ระเหยได้น้อยกว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติกชนิดอื่น ซึ่งมีค่าเป็นร้อยละ 0.52 และ 0.18 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ มีกรดแลคติกใกล้เคียงกับชุดการทดลองควบคุม เป็นร้อยละ 0.02 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก

เมื่อนำเมล็ดโกโก้แห้งจากชุดการทดลองต่าง ๆ ที่หมักด้วยแบคทีเรียแอซีติกชนิดต่าง ๆ และชุดการทดลองควบคุมไปหาปริมาณเมล็ดโกโก้แห้งที่มีสีน้ำตาล พบว่าเมล็ดโกโก้ที่หมักด้วย *A. rancen* มีค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้สีน้ำตาลช็อกโกแลตสูงกว่าชุดการทดลองอื่น เป็นร้อยละ 61.11 ขณะที่ชุดการทดลองที่เติม *A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม มีเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลเป็นร้อยละ 50.00, 52.22 และ 42.22 ตามลำดับ นอกจากนี้เมล็ดโกโก้แห้งจากชุดการทดลองที่หมักด้วย *A.rancen* ยังมีค่าดรรชนีการหมัก ค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดสูง แต่มีกรดทั้งหมด กรดที่ระเหยได้ และกรดแลคติกต่ำกว่าชุดการทดลองที่เติม

แบคทีเรียแลคติกอื่น ๆ ทั้งยังมีปริมาณความชื้น และปริมาณไขมันในเมล็ดโกโก้แห้งใกล้เคียงกับเกณฑ์มาตรฐาน

5 บทบาทของเชื้อจุลินทรีย์ผสมต่อการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ

การใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมของ *S. cerevisiae, A. rancen* และ *L. casei* เติมลงในการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในลักษณะที่แตกต่างกัน 6 ลักษณะ เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมจุลินทรีย์ พบว่าชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์มีจุลินทรีย์เริ่มต้นอยู่ในช่วง $3.97X10^5$ ถึง $4.17X10^5$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ขึ้นอยู่กับลักษณะการเติมจุลินทรีย์ ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* พร้อมกันในตอนเริ่มต้นการหมักเมล็ดโกโก้ และชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นการหมัก แล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่งโมง ให้เมล็ดโกโก้ที่ดีกว่าชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ในลักษณะอื่น และดีกว่าชุดการทดลองควบคุม ในระหว่างการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *L. casei* ตอนเริ่มต้นการหมักมีจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP สูงกว่าชุดการทดลองอื่น ยกเว้นในวันแรกของการหมัก เมล็ดโกโก้ที่ได้จากชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก มีค่าดรรชนีการหมักเป็น 1.15 ส่วนชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่งโมง มีค่าดรรชนีการหมักเป็น 1.10 ชุดการทดลองทั้งสองมีพีเอชเท่ากับ 5.83 และ 5.70 ตามลำดับ มีน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้สูงเป็นร้อยละ 1.15 และ 1.10 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองทั้งสองถูกย่อยสลายได้เร็วกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เหลือน้อยกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ มีกรดทั้งหมดน้อยกว่าชุดการทดลองอื่น แต่ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก มีกรดที่ระเหยได้ต่ำสุดเป็นร้อยละ 0.12 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ขณะที่ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นการหมัก แล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีกรดที่ระเหยได้สูงสุดเป็นร้อยละ 0.17 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ชุดการทดลองทั้งสองมีกรดแลคติกใกล้เคียงกับชุดการทดลองควบคุม เป็นร้อยละ 0.07 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก

เมื่อนำมล็ดโกโก้แห้งจากชุดการทดลองต่าง ๆ ที่หมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสมไปหาปริมาณเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาล พบว่าเมล็ดโกโก้ที่หมักด้วย *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ในตอน

เริ่มต้นการหมัก หรือเติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นการหมัก แล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลสูงกว่าชุดการทดลองอื่น คิดเป็นร้อยละ 82.65 และ 83.13 ตามลำดับ นอกจากนี้เมล็ดโกโก้แห้งจากชุดการทดลองทั้งสองยังมีค่าดรรชนีการหมัก ค่าพีเอช น้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดสูง แต่มีกรดทั้งหมด กรดที่ระเหยได้ และกรดแลคติกต่ำ ทั้งยังมีปริมาณความชื้น และปริมาณไขมันในเมล็ดโกโก้แห้งใกล้เคียงกับเกณฑ์มาตรฐาน

6 บทบาทของการใช้จุลินทรีย์ผสมต่อการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก

การใช้จุลิทรีย์ผสมของ *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ปริมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก เติมลงในการหมักเมล็ดโกโก้ 50 กิโลกรัม ในกล่องหมัก ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน โดยมีการเติมจุลินทรีย์ใน 2 ลักษณะคือ เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* พร้อมกันตอนเริ่มต้นการหมัก และการเติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นการหมัก แล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง พบว่าชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ลงไปนั้นมีจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP เป็น $4.62X10^5$ ถึง $7.34X10^5$ CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ส่วนชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมจุลินทรีย์แต่มีจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนจากธรรมชาติมีจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP เป็น $1.09X10^4$ ถึง $3.76X10^4$ CFU ต่อกรัมเมล็ดโกโก้ เมล็ดโกโก้ที่ได้จากชุดการทดลองทั้งสองมีค่าดรรชนีการหมักสูงกว่าชุดการทดลองควบคุม โดยมีค่าเป็น 1.15 - 1.20 ตามลำดับ มีค่าพีเอชเท่ากับ 5.70 มีน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้สูงกว่าชุดการทดลองควบคุม เป็นร้อยละ 0.83 - 0.86 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ย่อยสลายได้เร็วกว่าชุดการทดลองควบคุม มีน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เหลือน้อยกว่าชุดการทดลองควบคุม มีกรดทั้งหมด กรดที่ระเหยได้ และกรดแลคติก น้อยกว่าชุดการทดลองควบคุม

เมล็ดโกโก้แห้งจากชุดการทดลองที่หมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสมของ *S. cerevisiae* และ *A. rancen* เมื่อนำมาหาปริมาณเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาล พบว่าเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นการหมัก แล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง ให้ค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้สีน้ำตาลเป็นร้อยละ 87.13 ส่วนชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมักมีเมล็ดโกโก้สีน้ำตาลเป็นร้อยละ 91.26 เมล็ดโกโก้แห้งจากชุดการทดลองทั้งสองชุดที่เติมจุลินทรีย์มีค่าดรรชนีการหมัก ค่าพีเอช และน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ด สูงกว่าชุดการทดลองควบคุม แต่มีกรดทั้งหมด กรดที่ระเหยได้ และกรดแลคติกต่ำกว่าชุดการทดลอง

ควบคุม ทั้งยังมีปริมาณความชื้น และปริมาณไขมันในเมล็ดโกโก้แห้งใกล้เคียงกับเกณฑ์มาตรฐาน

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้ถึงแม้ผลการวิจัยที่ได้สามารถที่จะนำเอาไปประยุกต์ใช้ในการหมักเมล็ดโกโก้ได้ และก่อให้เกิดความรู้และแนวคิดใหม่ ๆ ขึ้น แต่เพื่อให้งานวิจัยเกิดความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และสามารถนำไปใช้อุตสาหกรรมการผลิตเมล็ดโกโก้แห้ง ตลอดจนอุตสาหกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง ทางผู้วิจัยคิดว่าเรื่องต่าง ๆ ที่ควรจะมีการศึกษาวิจัยต่อไป คือ

1. ศึกษาวิธีการเตรียมเชื้อเริ่มต้นให้ได้ปริมาณมาก ๆ ในระยะเวลาอันสั้นเพื่อเป็นการประหยัดเวลา และสามารถนำไปใช้เติมในการหมักเมล็ดโกโก้ในระดับอุตสาหกรรม
2. ศึกษาความคงตัวของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นที่เตรียม ให้อยู่ในลักษณะที่เก็บไว้ได้นานและสะดวกในการนำไปใช้ เช่น การเตรียมในรูปเชื้อผง หรือลูกแป้ง
3. ศึกษาอัตราส่วนผสมของจุลินทรีย์เริ่มต้นแต่ละชนิด รวมถึงผลกระทบอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นในการหมักเมล็ดโกโก้
4. ศึกษาบทบาทของจุลินทรีย์ที่ใช้เติมในการหมัก ต่อการเปลี่ยนแปลงกลิ่นรสของช็อกโกแลตที่ได้จากเมล็ดโกโก้ ซึ่งหมักด้วยจุลินทรีย์ที่คัดเลือก

เอกสารอ้างอิง

กมลลักษณ์ โตสกุล. 2530. โกโก้ : พืชเศรษฐกิจความหวังใหม่ในแผน ฯ 6. ว. เศรษฐกิจ, ธนาคารกรุงเทพ จำกัด. 20 (1) : 28-36.

กสิกรไทย, ธนาคาร. 2534. โกโก้ : พืชเศรษฐกิจที่น่าสนใจ. สรุปข่าวธุรกิจ (กสิกรไทย) 22 (5) : 3-7.

เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, ศูนย์สถิติการเกษตร. 2533. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2532/33. กรุงเทพฯ.

เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, ศูนย์สถิติการเกษตร. 2534. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2533/34. กรุงเทพฯ.

เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง, กรมส่งเสริมการเกษตร, สำนักงานส่งเสริมการเกษตรภาคใต้. 2535. แนวทางการพัฒนาการเกษตรภาคใต้ พ.ศ.2535. กรุงเทพฯ.

ดวงใจ ช่วยสถิตย์. 2535. การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักโกโก้. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นภา โล่ทอง. 2534. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประพันธ์ บุญกลิ่นขจร, ศรี ปิยะพงศ์, เชิญ ด่าวดัก, โกวิทย์ ยันตศาสตร์, เกรียงศักดิ์ สิริพงศาโรจน์ และ สุมาลัย ศรีกำไลทอง. 2529. เกษตรและอุตสาหกรรมโกโก้. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ.

ผานิต งามกรณาธิการ และ วิทย์ สุวรรณวุธ. 2531. บทบาทของโกโก้ในทศวรรษหน้า. เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่อง พืชเศรษฐกิจยืนต้น, 23-25 พฤศจิกายน 2531. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

พวงพร โชติไกร. 2530. จุลชีววิทยาของอาหารและนม. มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ.

ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก, กนก ติระวัฒน์, ไพศาล วุฒิจำนงค์, พรชัย ศรีไพบูลย์, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล, มนัส ชัยสวัสดิ์, สมชาย สุคนธสิงห์, เสริมศักดิ์ ชื่นใจ และ ปิยนุช นาคะ. 2534. โครงการวิจัยและพัฒนากรรมวิธีแปรรูปเมล็ดโกโก้แห้ง. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.

มงคล ทัศนีย์ทิพากร, ผู้จัดการโครงการโกโก้ บริษัทไทยโทปีอินเตอร์เนชันเนล จำกัด สาขาสุราษฎร์ธานี. 2535. ติดต่อส่วนตัว.

มณฑา ส.รัตนูปถัมภ์. 2531. พืชที่น่าสนใจในภาคใต้ : โกโก้พืชน่าปลูกจริงหรือไม่. ว. เกษตรชาวใต้. 1 (2) : 6-10.

ยอดยิ่ง คงทอง. 2529. ภาวะการค้าต่างประเทศของโกโก้. รายงานเรื่องโกโก้ พืชความหวังใหม่. กรมส่งเสริมการเกษตร, มิถุนายน 2529. 33-35.

วิทย์ สุวรรณวุธ. 2527. การพัฒนาโกโก้ในประเทศไทย. รายงานสัมมนาเรื่อง มะพร้าวและโกโก้, 19-23 กรกฎาคม 2527. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 41-44.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2533. ชีววิทยาของแบคทีเรีย. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

สิริ ชัยเสรี. 2535. การแปรรูปเมล็ดโกโก้. ว. อุตสาหกรรมเกษตร. 3 (2) : 8-13.

สมศักดิ์ วรรณศิริ. 2532. สวนโกโก้. ศูนย์ผลิตตำราเกษตรเพื่อชนบท, กรุงเทพฯ.

หน่วยวิจัยและพัฒนาระบบการทำฟาร์มพัทลุง. 2531. รายงานความก้าวหน้าโครงการนำร่องขยายการผลิตสินค้าเกษตร : โกโก้. ว. เกษตรชาวใต้. 1 (7) : 3-5.

อรพิน ภูมิภมร, ปิยนุช นาคะ และ อัมพล จุลสวัสดิ์. 2536. การหมักโกโก้ : ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ ฟิสิกส์ และเคมี ในระหว่างการหมักโกโก้. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 27 : 303-313.

A.O.A.C. 1990. Official method of analysis of the association of analytical chemists. 15th ed. Association of Official Analytical Chemist, USA.

Abdul Samah, O., Fared Putih, M. and Selamat, J. 1992. Biochemical changes during fermentation of cocoa beans inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* (wild strain). J. Food. Sci. Technol. 29 (6) : 341-343.

Abdul Samah, O., Fared Putih, M. and Selamat, J. and Alimon, H. 1993. Fermentation product in cocoa beans inoculated with *Acetobacter xylinum*. ASEAN Food J. 86 (1) : 22-25.

Abdul Samah, O., Ibrahim, N., Alimon, H. and Abudl Karim, M. I. 1993a. Comparative studies on fermentation products of cocoa beans. World J. Micro. Biotechnol. 9 : 381-382.

Abdul Samah, O., Ibrahim, N., Alimon, H. and Abudl Karim, M. I. 1993b. Short communication : fermentation studies of cocoa beans. World J. Micro. Biotechnol. 9 :603-604.

Abiola, S. S. and Tewe, O. O. 1991. Chemical evaluation of cocoa by-product. Trop. Agric. 68 (4) : 335-336.

American Public Health Association. 1960. Standard method for the examination of dairy products. 11th ed. American Public Health Association, Inc. New York.

Baigrie, B. D. and Rumbelow, S. J. 1987. Investigation of flavour defects in Asian cocoa liquors. J. Sci. Food Agric. 39 : 357-368.

Barber, S. B. and Summerson, W. M. 1941. Analytical of lactic acid in fruits. J. Biol. Chem. 138 : 535.

Berbert, P. R. F. 1979. Contribuicao para o conhecimento dos acucaras componentes da amendoa e do mel de cacau. Rev. Theobroma. 9 : 55-61. cited by Lehrian. D. W. and Patterson, G. R. 1983. Cocoa fermentation. In Biotechnology. (ed. Reed, G. and Rehm, H. J.) vol. 5 Food and Feed Production with Microorganisms (vol. ed. Reed, G.) Wienheim : Verlag Chemie. pp. 531-575.

Biehl, B. and Passern, D. 1982. Proteolysis during fermentation-like incubation of cocoa seeds. J. Sci. Food Agric. 33 : 1280-1290.

Biehl, B., Brunner, E., Passern, D., Quesnel, V. C. and Adomako, D. 1985. Acidification, Proteolysis and flavour potential in fermenting cocoa beans. J. Sci. Food Agric. 36 : 583-598.

Biehl, B., Meyer, B., Crone, G., Pollmann, L. and Said, M. B. 1989. Chemical and physical change in the pulp during ripening and postharvest storage of cocoa pods. J. Sci. Food Agric. 48 : 189-208.

Biehl, B., Meyer, B., Said, M. B. and Samarakoddy, R. J. 1990. Beans Spreading : A method for pulp perconditioning to impair strong nip acidification during cocoa fermentation in Malaysia. J. Sci. Food Agric. 51 : 35-45.

Biehl, B., Passern, D. Quesnel, V. C., and Sagemann, W. 1982. Water uptake by cocoa seeds during fermentation-like incubation. J. Sci. Food Agric. 33 : 1110-1116.

Biehl, B., Passern, D. and Sagemann, W. 1982. Effect of acetic acid on subcellular structure of cocoa bean cotyledons. J. Sci. Food Agric. 33 : 1101-1109.

Biehl, B., Wewetzer, C. and Passern, D. 1982. Vascuolar (storage) protein of cocoa seeds and their degradation during germination and fermentation. J. Sci. Food Agric. 33 : 1291-1304.

Bracco, U., Grailhe, N., Rostagno, W. and Egli, R. H. 1969. Analytical evaluation of cocoa curing in the Ivory Coast. J. Sci. Food Agric. 20 : 713-717.

Carr, J. G., Devies, P. A. and Dougan, J. 1979. Cocoa fermentation in Ghana and Malaysia University of Bristol and Research, Long Ashton, Bristol and Tropical Products Institute, London.

Carr, J. G., Devies, P. A. and Dougan, J. 1980. Cocoa fermentation in Ghana and Malaysia (part 2). University of Bristol and Research, Long Ashton, Bristol and Tropical Products Institute, London.

Carr, J. G. 1982. Cocoa in fermented food. In Economic Microbiology (ed. Rose, A. H.) vol. 7 pp. 275-292, Academic Press, London.

Carr, J. G. 1985. Tes, coffee and cocoa. In Microbiology of Fermented Food (ed. Wood, B. J. B.) vol. 2 pp. 145-152, Elsevier Applied Science, London.

Cerbulis, J. 1954. Sugar in Caracas cocoa beans. Arch. Biochem. Boiphys. 49 : 442-450.

Cerbulis, J. 1955. Carbohydrates in cocoa beans. II. sugar in Caracas cocoa beans. Arch. Biochem. Boiphys. 58 : 406-413.

Chong, C. F., Shepherd, R. and Poon, Y. C. 1978. Mitigation of cocoa bean acidity-fermentary investigations. Proc. Int. Conf. on Cocoa and Coconus, Kuala Lumper, Malaysia. 22- 27.

Cirigliano, M. C. 1982. A selective medium for the isolation and differentiation of *Guconobacter* and *Acetobacter*. J. Food Sci. 47 : 1038-1039.

Coleman, A. A. and Ooraikul, B. 1989. Characteristics of pure culture canola sauce fermentation. J. Food Proc. Preserv. 13 : 245-256.

De Camargo, R. J., Leme, J. and Filho, A. M. 1963. General observation on the microflora of fermenting cocoa beans (*Theobroma cacao.*) in Bahia (Brazil). Food Technol. 17 : 116-118.

Dewitt, K. W. 1957. Nitrogen metabolisim in fermenting cocoa. In A Report on Cocoa Research, 1955-1965, p. 54. The imperial College of Tropical Agriculture. St. Augustine,Trinidad. cited by Lehrian. D. W. and Patterson, G. R. 1983. Cocoa fermentation. In Biotechnology. (ed. Reed, G., and Rehm, H. J.) vol. 5 Food and Feed Production with Microorganisms (vol. ed. Reed, G.) pp. 531-575, Wienheim : Verlag Chemie.

Dougan, J. 1979. A comparative study of the fermentation of Amelonado and Amazon cocoa carried out at the Cocoa Research Institute, Tafo, Ghana, 1979. Cocoa, Chocolate and Confectionery Alliance : London.

Dougan, J. 1980. Methods for the analysis of cocoa pulp and cotyledons. Tropical Product Institute : London.

Dougan, J., Duncan, R. J. E., Jardine. N. J., Robinson, . M., Sammons, P. M. and Woodage, C. 1981. The relationship between oxygen, temperture, acetic acid and lactic acid during cocoa fermentation. Cocoa Chocolate and Confectionery Alliance : London.

Egan, H., Rick, R. S. and Sawyer, R. 1981. Pearson's chemical analytical of food. 8th ed. Edinburgh, Churchill Living stone.

Fogarty, W. M. and Kelly, C. T. 1983. Pectic emzymes. In Microbial Enzymes and Biotechnology. (ed. Forgaty, W. M.) pp. 147-157, London : Applied Science Publishers.

Forsyth, W. G. C., 1952a. Cacao polyphenolic substances 1. Fractionation of the fresh bean. Biochem. J. 51 : 511-516.

Forsyth, W. G. C. 1952b. Cacao polyphenolic substances 2. Changes during fermentation. Biochem. J. 51 : 516-520.

Forsyth, W. G. C. 1955. Cacao polyphenolic substances 3. Separation and estimation on paper chromatograms. Biochem. J. 60 : 108-111.

Forsyth, W. G. C., and Quesnel, V. C., 1957a. Cacao glycosidase and colour changes during fermentation. J. Sci. Food Agric. 8 : 505-509.

Forsyth, W. G. C. and Quesnel, V. C. 1957b. Cacao polyphenolic substances 4. The anthocyanin pigments. Biochem. J. 65 : 177-179.

Forsyth, W. G. C. and Quesnel, V. C. 1963. The mechanism of cacao curing. Adv. Enzymol. 25 : 457-491.

Gauthier, B., Guiraud, J., Vincent, J. C., Porvais, J. P. and Galzy, P. 1977. Comments on yeast flora from the traditional fermentation of cocoa in the Ivory Coast. Revue des Fermentation et dea Industries Alimentaires. 32 (6) : 160- 163. cited by Lehrian. D. W. and Patterson, G. R. 1983. Cocoa fermentation In Biotechnology. (ed. Reed, G., and Rehm, H. J.) vol. 5 Food and Feed Production with Microorganisms (vol. ed. Reed, G.) pp. 531-575, Wienheim : Verlag Chemie.

Gilbert, D. G. 1980. Dispersal of yeasts and bacteria by *Drosophila* in a temperate foraest. ecologia. 46 : 135-137. cited by Lehrian. D. W. and Patterson, G. R. 1983. Cocoa fermentation In Biotechnology. (ed. Reed, G., and Rehm, H. J.) vol. 5 Food and Feed Production with Microorganisms (vol. ed. Reed, G.) pp. 531-575, Wienheim : Verlag Chemie.

Glossop, E. 1983. Cocoa Processing. Tropical Development and Reserch Institute. London. cited by Wood, G. A. R. and Lass, R. A. 1985. Cocoa. 4th ed. Tropical Agriculture Series. Longman, New York.

Gourieva, V. B. and Tserevitinov, O. B. 1979. Method of evaluating the degree of fermentation of cocoa beans. USSR. State Committe on Invention and Discoveries. UDC 663 : 911.13.

Griffiths, L. A. 1957. Detection of the substrate of enzymeic browning in cocoa by a post-chromatographic enzymic technique. Nature. 180 (14) : 1373-1374.

Hancock, B. L. 1949. Quality in Cocoa. Trinidad Rep. Cocoa conf. London. 77-79. cited by Wood, G. A. R. and Lass, R. A. 1985. Cocoa. 4th ed. Tropical Agriculture Series. Longman, New York.

Hansen, A. P. and Keeney, P. G. 1970. Comparison of carbonyl compounds in moldy and non-moldy cocoa beans. J. Food Sci. 35 : 37-40.

Hardy, F. and Rodrigues, G. 1952. Quantitative variations in nitrogenous components of cocoa beans : effect of genetic type and soil type. In A Report on Cocoa Research 1945-1951. pp. 89-91. The Imperal Collage of Tropical Agriculture, St. Augustine Trinidad. cited by Lehrian. D. W. and Patterson, G. R. 1983. Cocoa fermentation In Biotechnology. (ed. Reed, G., and Rehm, H. J.) vol. 5 Food and Feed Production with Microorganisms (vol. ed. Reed, G.) pp. 531-575, Wienheim : Verlag Chemie.

Heath, H. B. 1978. Flavor Technology. Bush Boake Allen, Ltd., A Division of Albrigh & Wilson Ltd. London England. p 212-216.

Howat, G. R., Powell, B. D. and Wood, G. A. R. 1957. Experiments on cocoa fermentation in West Africa. J. Sci. Food Agric. 8(2) : 65-72.

Humphries, E. C. 1939. Changes in fat and theobromine content of the kernel of the cocoa bean during fermentation and drying. Rep. Cocoa Res., Trinidad. 8 : 34-37.

Jinap, S. 1989. Contribution of acids towards flavour development in cocoa beans during processing. Conference on Food Processing-Prelude to the 90's (1989 : Kualalumpur) Proceeding. 34-40.

Jinap, S. and Dimick, P. S. 1991. Effect of roasting on acidic characteristics of cocoa beans. J. Sci. Food Agric. 54 : 317-321.

Jone, K. L. and Jone, S. E. 1984. Fermentation involved in the production of cocoa, coffee and tea. Progress in industrial microbiology vol. 19, modern application of traditional

biotechnologies. (ed. Bushell, M. E.). pp. 411-456. London : Elsevier Applied Science Publishers.

Knapp, 1937. Cocoa Fermentation. In Microbiology of Fermented Foods (ed. Wood, B. J. B.) vol.2. London. Elsevier Applied Science Publishers.

Krieg, N. R. and Hott, J. G. 1986. Bergey's manual of Systematic Bacteriology vol.1. Baltimore : Williams & Wilkins. Co.

Lehrian. D. W. and Patterson, G. R. 1983. Cocoa fermentation. In Biotechnology. (ed. Reed, G., and Rehm, H. J.) vol. 5, Food and Feed Production with Microorganisms (vol. ed. Reed, G.) pp. 531-575, Wienheim : Verlag Chemie.

Lian, H. T. L. 1976. Raw cacao processing : acidity and flavour. In Seminar on Coco-Coconuts, Malysia. 1976. Proceedings, Sanda kan (Malaysia).

Lopez, A. and Quesnel, V. C. 1973. Volatile fatty acid production in cacao fermentation and effect on chocolate flavour. J. Sci. Food Agric. 24 : 319-326.

Lopez, A. S. 1979. Fermentation and organoleptic quality of cocoa as affected by partial removal of pulp juices from the beans prior to curing. Rev. Theobroma. 9 : 25-37. cited by Lehrian. D. W. and Patterson, G. R. 1983. Cocoa fermentation. In Biotechnology. (ed. Reed, G. and Rehm, H. J.) vol. 5 Food and Feed Production with Microorganisms (vol. ed. Reed, G.) pp. 531-575, Wienheim : Verlag Chemie.

Maclean, J. A. R. and Wickens, R. 1952. Small scale fementation of cocoa. Cocoa Conference (1951), London : 116-123.

Maga, J. A. and Sizer, C. E. 1973. The aroma and flavour of cocoa. J. Agric. Food Chem. 21: 22-30.

Maravalhas, N. 1966. Mycological deterioration of cocoa beans during fermentation and storage in Bahia. Rev. Int. Choc. 21 (8) : 375-378.

Maravalhas, N. 1970. Origin of the slaty and compact violet beans on raw cocoa. Rev. Int. Choc. 25 : 242.

Martelli, H. L. and Dittmar, H. F. K.. 1961. Cacao fermentation V. Yeast isolation from cacao beans during the curing process. Appl. Microbiol. 9 : 370-371.

Meyer, B., Biehl, B., Said, M. B. and Samarakoddy, R. J. 1989. Post-harvest pod stroage : A method for pulp preconditioning to impair storage nib acidification during cocoa fermentation in Malaysia. J. Sci. Food Agric. 48 : 285-304.

Niepage, V. N. 1961. Versuche zur fraktionierung und bausteinanalyse der proteine in unfermentierten und fermentierten kakaobohnen. Gordian. 61 (1445) : 101-108. cited by Lehrian. D. W. and Patterson, G. R. 1983. Cocoa fermentation. In Biotechnology. (ed. Reed, G. and Rehm, H. J.) vol. 5 Food and Feed Production with Microorganisms (vol. ed. Reed, G.) pp. 531-575, Wienheim : Verlag Chemie.

Offem, J. O. 1990. Individual variation in the amino acid and chemical composition of defatted cocoa bean meal of three varieties of cocoa (*Theobroma cacao*) from South-eastern Nigeria. J. Sci. Food Agric. 52 : 129-135.

Olaofe, O., Oladeji, E. O. and Ayodeji, O. I. 1987. Metal contents of some cocoa beans produced in Ondo State, Nigera. J. Sci. Food Agric. 41 : 241-244.

Ostovar, K. and Keeney, P. G. 1973. Isolation and characterization of microorganisms involved in the fermentation of Trinidad's cacao beans. J. Food Sci. 38 : 611-617.

Packiyasothy, E. V., Janesz, E. R., Senanayake, U. M., Wijesundara, R. C. and Wickremasingha, P. 1981. Effect of maturity on some chemical components of cocoa. J. Sci. Food Agric. 32 : 873-876.

Passos, F. M. L., Solva, D. O., Lopez, A., Ferreira, C. L. L. F. and Guimaraes, W. V. 1984. Charecterization and distribution of lactic-acid bacteria from traditional cocoa-bean fermentations in Bahia (Brazil). J. Food Sci. 49 (1) : 205-208.

Pettipher, G. L. 1986. An improved method for the extraction and quantitation of anthocyanins in cocoa beans and its use as an index of the degree of fermentation. J. Sci. Food Agric. 37 : 289-296.

Pickenhagen, W. and Dietrich, P. 1975. Identification of the bitter principle of cocoa. Helv. Chem. Acta. 58 : 1078-1086.

Quesnel, V. C. 1965a. Agents inducing the death of cacao seeds during fermentation. J. Sci. Food Agric. 16 : 441-447.

Quesnel, V. C. 1965b. Chloroform-extractable aromatic acid of cocoa. J. Sci. Food Agric. 16 : 596-599.

Quesnel, V. C. 1968. Fractionation and properties of the polymeric leucocyanidin of the seeds of *Theobroma cacao*. Phytochemistry. 7 : 1583-1592

Reineccius, G. A., Andersen, D. A., Kavanagh, T. E. and Keeney, P. G. 1972. Identification and quantification of the free sugars in cocoa beans. J. Agric. Food Chem. 20 : 199-202.

Roelofsen, P. A. 1958. Fermentation, drying and storage of cacao beans. Adv. Food Res. 8 : 25-296.

Rogosa, M. and Sharpe, M. E. 1959. An approach to the classification of the lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. 22 : 329.

Rohan, T. A. 1963a. Precursors of chocolate aroma. J. Sci. Food Agric. 14 : 799-805.

Rohan, T. A. 1963b. Processing of raw cocoa for the market. Food and Agriculture Organization of the United Nation. Rome.

Rohan, T. A. 1964. Precursors of chocolate aroma. A comparative study of fermented and unfermented cocoa beans. J. Food Sci. 29 : 456-459.

Rohan, T. A. and Stewart, T. 1966a. The volatile and non-volatile acids of cocoa beans. Rev. Int. Choc. 19 (11) : 502-506.

Rohan, T. A. and Stewart, T. 1966b. The precursors of chocolate aroma : change in the free amino acid during the roasting of cocoa beans. J. Food Sci. 31 : 202-205.

Rohan, T. A. and Stewart, T. 1967. The precursors of chocolate aroma : change in the free amino acid during fermentation of cocoa beans. J. Food Sci. 32 : 395-398.

Rombouts, J. E. 1952. Observations on the microflora of fermenting coocoa beans in Trinidad. Trinidad Proc. Soc. Appl. Bacteriol. 15. : 103-111.

Said, M. B. and Samarakhody, R. J. 1984. Cocoa fermentation-Effect of surface area, frequency of turning and depth of cocoa masses. International Conference on Cocoa and Coconuts. 1-15. Kualalumper, Malaysia.

Sanchez Vasquez, J. E. 1989. Tentative pratique D'ameliozation de la fermentation du cacao par inoculation directe de microorganismes. *Cafe' Cacao The'*. 33 (3) : 157-164.

Sanchez Vasquez, J. E., Deguenet, G., Guiraud, J. P., Vincent, J. C. and Galzy, P. 1985. A study of the Yeast flora and the effect of pure culture seeding during the fermentation process of cocoa beans. Lebensm.-Wiss. u-Technol. (Zurich). 18 (2) : 69-75.

Sanchez Vasquez, J. E., Guiraud, J. P., and Galzy, P. 1988. Recherche de levures capables de fermenter le cacao par voie triphasique. *Cafe' Cacao The'*. 32 (2) : 141-147.

Schmieder, R. L. and Keeney, P. G. 1980. Characterization and quantification of starch in cocoa beans and chocolate products. J. Food Sci. 45 (3) : 555-557.

Staman, J. R. 1979. The Lactic acid bacteria : microbes of diversity. Food Technol. 1 : 60.

Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L. and Painter, P. R. 1986. The Microbial World. 5th ed. Printice-hall International, Inc. Englewood Cliff. U.S.A.

Tomlins, K. I., David, M. B., Pam, D. and Daniel, A. 1993. Effect of fermentation and drying practices on the chemical and physical profiles of Ghana cocoa. Food Chem. 46 (1993) : 257-263.

Wadsworth, R. V. and Howat, G. R. 1954. Cocoa fermentation. Nature. 28 : 392-394.

Weissberger, W., Kavanagh, T. E. and Keeney, P. G. 1971. Identification and quantitation of serveral nonvolatile organic acid of cocoa beans. J. Food Sci. 36 : 877-897.

Wood, B. J. B. 1985. Microbiology of Fermented Foods. vol. 1. Elsevier Applied Science Publisher, England.

Wood, G. A. R. 1975. Fermentation and drying. Cocoa Growers Bull. 18 : 25-29.

Wood, G. A. R. and Lass, R. A. 1985. Cocoa. 4th ed. Tropical Agriculture Series. Longman. New York.

Zak, D. K., Ostovar, K. and Keeney, P. G. 1972. Implication of *Bacillus subtilis* in the synthesis of tetramethylpyrazine during fermentation of cocoa beans. J. Food Sci. 37 : 967-968.

Zak, D. K. and Keeney, P. G. 1976a. Changes in cocoa proteins during ripening of fruit fermentation and further processing of cocoa beans. J. Agric. Food Chem. 24 (3) : 483-486.

Zak, D. K. and Keeney, P. G. 1976b. Extraction and fractionation of cocoa proteins as applied to serveral varieties of cocoa beans. J. Agric. Food Chem. 24 (3) : 479-482.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก ข้อมูลปฐมภูมิประกอบการวิจัย

ตารางภาคผนวก ก1. ผลผลิตเมล็ดโกโก้โลกระหว่างปีการผลิต 2528 ถึง 2532 แสดงเฉพาะประเทศที่สำคัญ

(หน่วย : พันตัน)

ประเทศ	ปีการผลิต				
	2528	2529	2530	2531	2532
กลุ่มประเทศอัฟริกา					
(รวม)	1,097	1,117	1,1181	1,444	1,384
ไอวอรี่โคสท์	580	611	664	820	750
กานา	219	226	184	289	300
ไนจีเรีย	120	100	150	160	160
แคเมอรูน	119	123	131	124	120
ซีย์ราเลโอน	10	9	9	7	10
โตโก	14	14	11	9	9
อิควอเตอเรียลกินี	9	8	7	7	8
ซาอีร์	5	6	6	6	6
ไลบีเรีย	5	4	4	5	4
กินี	4	4	3	3	4
ประเทศอื่น ๆ	12	12	12	14	13
กลุ่มประเทศอเมริกากลางและอเมริกาเหนือ					
(รวม)	105	115	104	120	125
เม็กซิโก	49	47	41	57	52
สาธารณรัฐโดมินิกัน	35	44	39	41	49
คอสตาริกา	4	5	4	4	5
ไฮติ	5	6	5	5	5

ตารางภาคผนวก ก1. (ต่อ)

(หน่วย : พันตัน)

ประเทศ	ปีการผลิต				
	2528	2529	2530	2531	2532
กัวเตมาลา	2	2	2	2	3
ประเทศอื่น ๆ	10	11	13	11	11
กลุ่มประเทศอเมริกาใต้					
(รวม)	625	618	465	539	567
บราซิล	431	459	329	375	397
เอกัวดอร์	131	90	58	85	94
โคลัมเบีย	43	47	54	54	56
ประเทศอื่น ๆ	20	22	24	25	20
กลุ่มประเทศเอเชีย					
(รวม)	137	183	259	298	338
มาเลเซีย	99	130	190	230	255
อินโดนีเซีย	20	37	50	49	65
ฟิลิปปินส์	5	7	9	9	9
ประเทศอื่น ๆ	13	9	10	10	9
กลุ่มประเทศโอเชียเนีย					
(รวม)	36	36	37	41	53
ปาปัวนิวกินี	32	32	32	36	47
ประเทศอื่น ๆ	4	4	5	5	6
ยอดรวมทั้งโลก	2,000	2,069	2,046	2,442	2,467

ที่มา : สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2534)

ตารางภาคผนวก ก2. ปริมาณการส่งออกเมล็ดโกโก้แห้ง ช็อกโกแลต และผลิตภัณฑ์จากโกโก้ ของประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ.2527- พ.ศ.2533

ปริมาณ : เมตริกตัน

มูลค่า : พันบาท

ปี	2527		2528		2529		2530		2531		2532		2533	
ชนิด	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า
เมล็ดโกโก้แห้ง	20	787	32	1,299	44	2,032	77	2,583	124	3,693	101	2,569	38	864
ช็อกโกแลต	2	80	44	1,175	3	134	3	94	17	876	111	7,277	221	17,011
ผลิตภัณฑ์จากโกโก้	49	1,501	9	602	34	1,133	29	1,136	7	597	173	7,754	870	55,954

ที่มา : สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2533; 2534)

ตารางภาคผนวก ก3. ปริมาณการนำเข้าผลิตภัณฑ์โกโก้ ของประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2529 - พ.ศ. 2533

ปริมาณ : พันกิโลกรัม
มูลค่า : พันบาท

ปี	2529		2530		2531		2532		2533	
ชนิด	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า
เมล็ดโกโก้แห้ง	-	-	-	-	-	-	-	-	1,521.96	50,726
โกโก้เพสต์	5.97	626	11.75	1,210	10.48	1,016	25.67	2,101	30.64	2,607
เนยโกโก้	6.80	989	9.24	1,305	8.51	1,013	13.01	1,572	15.05	1,555
โกโก้ผง	882.55	37,660	1,176.05	45,109	1,828.97	66,559	2,561.01	86,140	3,115.78	99,169
ช็อคโกแลต	487.99	61,635	601.59	92,263	580.95	79,138	912.49	133,987	816.77	100,118
อาหารอื่น ๆ ที่ผสมโกโก้	27.08	2,211	4.26	352	40.04	3,515	361.85	45,602	573.45	97,294
รวม	1,410.39	103,1221	1,802.89	140,599	2,468.95	151,241	3,874.03	6,073,638	6,073.64	351,469

ที่มา : ดัดแปลงจาก กสิกรไทย, ธนาคาร, (2534)

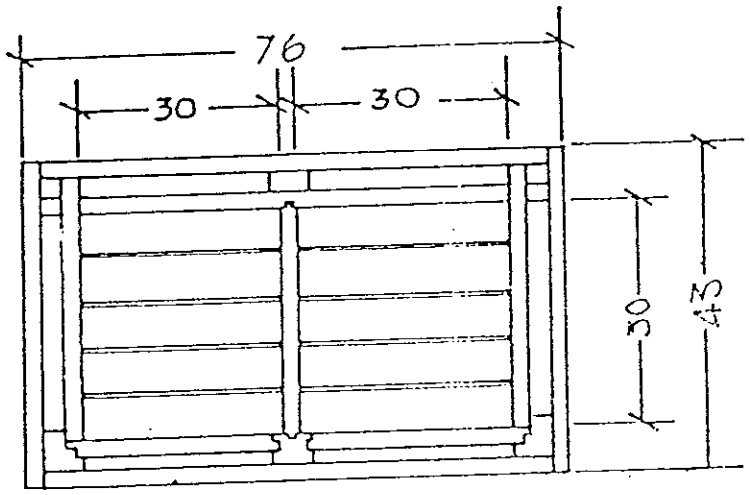
หมายเหตุ : ปี 2532-2533 ตัวเลขเบื้องต้น กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์

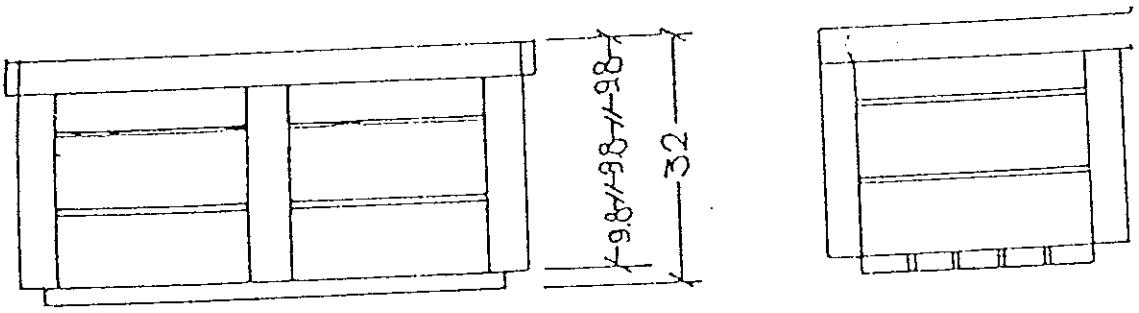
ตารางภาคผนวก ก4. พื้นที่การเพาะปลูกโกโก้ พื้นที่ที่ให้ผลผลิต และผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ ของจังหวัดต่าง ๆ ในภาคใต้ของประเทศไทย ระหว่างปีเพาะปลูก 2531/32 ถึงปี 2533/34.

จังหวัด	พื้นที่การเพาะปลูกโกโก้ (ไร่)			พื้นที่ที่ให้ผลผลิต (ไร่)			ผลผลิตเฉลี่ย (กก./ไร่)		
	2531/32	2532/33	2533/34	2531/32	2532/33	2533/34	2531/32	2532/33	2533/34
กระบี่	1,028	941	1,076	507	403	517	200	200	200
ชุมพร	2,006	1,639	1,618	418	428	446	103	93	87
ตรัง	49	676	661	33	203	445	90	110	104
นครศรีธรรมราช	3,909	3,647	3,451	2,495	1,770	1,434	150	150	150
นราธิวาส	41	61	51	13	46	45	86	95	102
ปัตตานี	-*	-	-	-	-	-	-	-	-
พังงา	492	231	231	295	133	151	60	56	60
พัทลุง	344	344	225	77	77	103	85	85	70
ภูเก็ต	845	832	576	629	747	556	160	168	219
ยะลา	191	139	217	140	130	101	30	102	83
ระนอง	15	70	70	5	10	10	130	130	130
สงขลา	-	-	2,189	-	-	70	-	-	130
สตูล	-	5	5	-	5	5	-	-	-
สุราษฎร์ธานี	2,610	3,203	4,370	943	1,346	2,056	150	150	150

ที่มา : สำนักงานส่งเสริมการเกษตรภาคใต้ (2535)

* = ข้อมูลไม่เพียงพอ





รูปภาคผนวก ก1. ลักษณะ และขนาดของกล่องหมักเมล็ดโกโก้

ที่มา : ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก และคณะ (2534)

ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์เมล็ดโกโก้และเนื้อเยื่อ

1. การหาค่าพีเอช

นำตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร เติมน้ำร้อนปริมาตร 90 มิลลิลิตร อย่างช้า ๆ เขย่า แล้วนำไปกรอง ทำให้เย็นจนอุณหภูมิประมาณ 20 - 25 องศาเซลเซียส วัดค่าพีเอช ด้วยเครื่องวัดพีเอช

2. การหาค่าดรรชนีการหมัก (Fermentation Index) (Gourieva and Tserevitinov, 1979)

สารเคมี

- เมทานอล
- กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น

เตรียมโดยผสม methanol กับ hydrochloric acid ในอัตราส่วน 97:3

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งเมล็ดโกโก้ที่บดแล้ว (ร่อนด้วยตาข่ายขนาด 40 mesh) ปริมาณ 0.5 กรัม ใส่ในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 125 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลายผสมของ methanol กับ hydrochloric acid ที่เตรียมไว้ ลงไป 50 มิลลิลิตร

3. เขย่าขวดรูปกรวยดังกล่าวไปเก็บไว้ในตู้เย็น (8 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 16 - 18 ชั่วโมง

4. นำสารละลายในขวดรูปกรวย มากรองด้วยระบบสูญญากาศ โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

5. สารละลายที่ได้จากการกรอง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 460 และ 530 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Spectronic 21

6. คำนวนค่าดรรชนีการหมัก (Fermentation Index) จากสูตร

$$\text{ค่าดรรชนีการหมัก} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร}}$$

3. **การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครส** (Egan, *et al.*, 1981; A.O.A.C., 1990)

3.1 **การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี** Luff-Schoorl method.

สารเคมี

- anhydrous sodium carbonate
- citric acid monohydrate
- copper II sulphate pentahydrate
- zine acetate dihydrate
- acetic acid
- potassium ferrocyanide trihydrate
- potassium iodine solution 30% w/v
- sulphuric acid solution (3M)
- isopentanol
- sodium thiosulphate solution (0.1M)

การเตรียม สารละลาย Carrez I

เตรียมโดยละลายกรดแอซีติก (acetic acid) ปริมาณ 3 กรัม (ใช้กรดแอซีติกเข้มข้นปริมาตร 2.85 มิลลิลิตร) ในน้ำกลั่นปริมาณเล็กน้อย แล้วเติมสาร zine acetate dihydrate ปริมาณ 21.9 กรัม ลงไปละลาย แล้วปรับปริมาตรสุดท้าย ด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

การเตรียม สารละลาย Carrez II

เตรียมโดยทำการละลาย potassium ferrocyanide trihydrate ปริมาณ 10.6 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

การเตรียม Luff-Schoorl Reagent

1. ละลาย anhydrous sodium carbonate 143.8 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรขนาด 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้จนเย็น จึงเติมสารละลายที่เตรียมจากข้อ 2

2. ละลายกรด citric acid monohydrate ปริมาณ 50 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมลงไปในสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 1 พร้อมกับเขย่าให้ทั่ว (ขณะเติมต้องค่อย ๆ เติมลงไป เพราะมีฟองกาซเกิดขึ้น)

3. เมื่อสารละลายไม่มีฟองก๊าซเกิดแล้ว เติม Copper II sulphate penta hydrate 25 กรัม (ซึ่งละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรก่อน) ลงไปในสารละลาย

4. ปรับปริมาตรของผสมภายในขวด และผสมให้เข้ากัน

5. ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน แล้วกรองเอาตะกอนที่เกิดขึ้นออก

6. สารละลายที่ได้จะต้องมีความเข้มข้นของสารที่แน่นอนคือ Copper II มีความเข้มข้น 0.1 โมล และ sodium carbornate มีความเข้มข้น 1 โมล

วิธีการทำ Standardize สาร Luff-Schoorl Reagent

1. ใช้สารละลาย reagent ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมด้วยโพตัสเซียมไอโอไดด์ (KI) 3 กรัม และสารละลายกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

2. ไตเตรตด้วยสารละลาย Sodium thiosulphate ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์ (ความเข้มข้นร้อยละ 0.50) เมื่อสิ้นสุดการไตเตรตควรใช้ Sodium thiosulphate ประมาณ 25 มิลลิลิตร

3. ใช้ reagent 10 มิลลิลิตร มาทำให้เจือจางเป็น 100 มิลลิลิตร

4. เติมสาร reagent ที่เจือจางแล้วในข้อ 3 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCL) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

5. นำไปวางในอ่างน้ำเดือด (boiling waterbath) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6. ทำให้เย็นลง และปรับปริมาตรให้เท่าเดิมด้วยน้ำกลั่น

7. นำไปไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.10 นอร์มอล โดยมี phenolphthalein เป็นอินดิเคเตอร์ ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ ควรอยู่ในช่วง 5.5 - 6.5 มิลลิลิตร

8. ไตเตรตสาร reagent ที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCL) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยใช้ phenolphthalein เป็นอินดิเคเตอร์ ปริมาตรของกรดที่ใช้ในการไตเตรตควรจะเท่ากับ 6.0 - 7.5 มิลลิลิตร

9. ค่าพีเอชของสาร reagent ควรประมาณ 9.3 - 9.4

<u>วิธีการวิเคราะห์</u>

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน (ประมาณ 15 - 20 กรัม) ใส่ในขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. เติมน้ำร้อนลงไป 150 มิลลิลิตร ทำการเขย่า เพื่อทำการสกัดเอาสารที่ละลายน้ำออก

3. ทำสารละลายให้ใส ด้วยการเติมสารละลาย Carrez I ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วตามด้วยการเติมสารละลาย Carrez II อีก 5 มิลลิลิตร

4. เขย่าและปรับปริมาตรผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกส่วนของของเหลวออกมาโดยการ กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1)

5. นำส่วนของเหลวได้มาเจือจาง จนกระทั่งตัวอย่างสารละลายที่เจือจาง 25 มิลลิลิตร นั้นมีปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ 15 - 60 มิลลิกรัม

6. ใส่สารละลาย Luff-Schoorl reagent ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ ขนาด 300 มิลลิลิตร (conical flask)

7. เติมสารละลายตัวอย่างที่เจือจางไว้ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงไป

8. ใส่ anti-foam chip หรือเม็ดแก้วกันกระแทกลงไปในฟลาสก์ 2 - 3 อัน

9. ทำการ reflux โดยปรับอุณหภูมิให้สารละลายเดือดเป็นเวลา 2 - 3 นาที แล้วลดอุณหภูมิของการ reflux ลง ปล่อยทิ้งไว้ให้เดือดเบา ๆ อีก 10 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที

10. เติมสารละลายโพตัสเซี่ยมไอโอไดด์ (KI) (30 % w/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วค่อย ๆ เติมด้วย 25 มิลลิลิตร ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3 โมลาร์ อาจเติม isopentanol ลงไป 2 - 3 หยด เพื่อป้องกันการเกิดฟอง

11. เมื่อไม่มีฟองเกิดขึ้นแล้ว นำไปไตเตรตกับสารละลาย sodium thiosulphate ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ จนกระทั่งสารละลายไม่มีสี จึงเติมน้ำแป้ง (ความเข้มข้นร้อยละ 0.50 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก) ลงไป 2 - 3 มิลลิลิตร แล้วไตเตรตต่อจนกระทั่งสารละลายไม่มีสี ปริมาตรที่ได้เท่ากับ X มิลลิลิตร

12. ไตเตรตสารละลาย blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่างแล้วปฏิบัติเช่นเดียวกับสารละลายตัวอย่าง ปริมาตรที่ได้เท่ากับ Y มิลลิลิตร

13. เมื่อนำปริมาตร Y-X จะเป็นปริมาณของสาร copper II ที่ถูกรีดิวซ์ด้วยน้ำตาลในสารตัวอย่าง ซึ่งสามารถเปิดเทียบค่าได้จากตารางภาคผนวก ข1

14. คำนวนค่าร้อยละของน้ำตาลกลูโคส (ในรูปของน้ำตาลอินเวอท)

3.2 การหาปริมาณน้ำตาลซูโครสด้วยวิธี Luff-Schoorl

การหาปริมาณน้ำตาลซูโครสในสารตัวอย่างที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ปรากฏอยู่ด้วยโดยวิธีการไตเตรต ปริมาณผลต่างของการไตเตรตสารละลายก่อนและหลังการย่อยสลาย (inversion) น้ำตาลซูโครสด้วยกรด จะแสดงค่าปริมาณน้ำตาลซูโครสที่มีอยู่ในตัวอย่างนั้น ๆ

<u>การย่อยสลายน้ำตาลซูโครสด้วยกรด (Inversion)</u> (A.O.A.C., 1990)

<u>วิธีการย่อยสายน้ำตาล</u>

1. นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 4 ของการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มา 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1:1 (โดยปริมาตรต่อปริมาตร ในน้ำกลั่น) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปผสม

3. นำขวดปรับปริมาตรไปวางในอ่างน้ำ (Water bath) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. เอาออกมาวางไว้ให้เย็น แล้วเติม phenophthalein indicator ลงไป 2 - 5 หยด

5. ไตเตรตกับสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 6 นอร์มอล เมื่อใกล้ถึงจุดยุติ เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล ลงไปปริมาณเล็กน้อย เขย่าขวดจนกระทั่งสีแดงของสารละลายหายไป

6. ทำการเจือจาง และปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วเขย่าเพื่อให้เกิดการผสมกัน

<u>วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส</u>

1. นำสารละลายที่เตรียมได้จากก่อน และหลังการย่อยน้ำตาลด้วยกรด มาเจือจางให้มี น้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 15 - 60 มิลลิกรัมต่อ 25 มิลลิลิตร ของสารตัวอย่าง

2. ใส่สารละลาย Luff-Schoorl reagent ลงในฟลาสก์ (conical flask) ขนาด 300 มิลลิลิตร 2 ใบ ปริมาตรใบละ 25 มิลลิลิตร

3. เติมสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงไป โดยในฟลาสก์ใบแรกเติมสารละลายตัวอย่างก่อนการย่อยสลายด้วยกรด และใบหลังเติมสารละลายตัวอย่างที่ได้หลังจากการย่อยสลายด้วยกรด

4. ใส่ anti-foam chip หรือเม็ดแก้วกันกระแทกลงในฟลาสก์

5. reflux โดยปรับอุณหภูมิให้สารละลายเดือด เป็นเวลาประมาณ 2-3 นาที แล้วลดอุณหภูมิของการ reflux ลง ทิ้งไว้อีก 10 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที

6. เติมสารละลายโพตัสเซียมไอโอไดด์ (KI) (30 % w/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงไป แล้วค่อย ๆ เติมด้วย 25 มิลลิลิตร ของสารละลายกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น 3 โมลาร์ อาจเติมสาร isopentanol ลงไป 2 - 3 หยด เพื่อป้องกันการเกิดฟอง

7. เมื่อไม่มีฟองเกิดขึ้นแล้ว ไตเตรตกับสารละลาย sodium thiosulphate ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนกระทั่งสารละลายไม่มีสี จึงเติมน้ำแป้ง (ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก) ลงไป 2 - 3 มิลลิลิตร แล้วไตเตรตต่อจนกระทั่งสารละลายไม่มีสี ปริมาตรที่ได้เท่ากับ X มิลลิลิตร

8. ไตเตรตสารละลาย blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง แล้วปฏิบัติเช่นเดียว กับสารละลายตัวอย่าง ปริมาตรที่ได้เท่ากับ Y มิลลิลิตร

9. เมื่อนำปริมาตร Y-X จะเป็นปริมาณของสาร copper II ที่ถูกรีดิวซ์ ด้วยน้ำตาลในสารตัวอย่าง ซึ่งสามารถเปิดเทียบค่าได้จากตารางภาคผนวก ข1

10. คำนวนหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ร้อยละน้ำตาลรีดิวซ์) ในรูปน้ำตาลอินเวอรท ที่ไตเตรตได้จากสารละลาย ทั้งก่อนและหลังการย่อยสลายน้ำตาลในสารละลายตัวอย่างด้วยกรด

11. คำนวนหาปริมาณน้ำตาลซูโครสในตัวอย่าง เมื่อกำหนดให้

BI คือค่าร้อยละของน้ำตาลรีดิวซ์ ก่อนการย่อยสลายน้ำตาลด้วยกรดในรูปของน้ำตาลอินเวอรท (Invert sugars)

TI คือค่าร้อยละของน้ำตาลรีดิวซ์ หลังการย่อยสลายน้ำตาลด้วยกรดในรูปของน้ำตาลอินเวอรท

ปริมาณน้ำตาลซูโครสคำนวนได้จากสูตร

ร้อยละน้ำตาลซูโครสในตัวอย่าง = (TI - BI) X 0.95

4. **การหาปริมาณไขมัน** (A.O.A.C., 1990)

การหาปริมาณของไขมันใช้วิธี Soxhlet apparatus โดยมี petrolium ether เป็นตัวสกัด ไม่ใช้ diethyl ether เพราะจะไปทำลาย Threobromine และ Caffeine ในตัวอย่าง

<u>สารเคมีและอุปกรณ์</u>

- ชุดสกัดไขมันประกอบด้วย ขวดใส่ตัวทำละลาย ซอคเลต (soxhlet) เครื่องควบแน่น (condenser) และเตาให้ความร้อน
- หลอดใส่ตัวอย่าง (extraction thimble)
- ปิโตรเลียมอีเทอร์

<u>วิธีการวิเคราะห์</u>

1. อบขวดกลมที่ใช้สำหรับหาปริมาณไขมัน ที่มีขนาด 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้า ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2. ชั่งสารตัวอย่าง บนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ถ้าเป็นตัวอย่างสารที่มีไขมันมากให้ชั่ง 1 - 2 กรัม แต่หากเป็นตัวอย่างที่มีไขมันน้อยให้ชั่ง 3 - 5 กรัม ห่อให้มิดชิด แล้วใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยใยแก้วหรือ สำลีเพื่อให้สารตัวทำละลายมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ

3. นำหลอดตัวอย่างใส่ลงใน Soxhlet

4. เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroliumehter) ลงในขวดหาปริมาณไขมันประมาณ 150 มิลลิลิตร แล้ววางลงบนเตา

5. ประกอบชุดอุปกรณ์สกัดไขมัน พร้อมกับเปิดอุปกรณ์ควบแน่น และ เปิดสวิตช์ไฟให้ความร้อน

6. ใช้เวลาในการสกัดไขมันนานประมาณ 14 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของสารตัวทำละลาย กลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่น ด้วยอัตราเร็ว 150 หยดต่อนาที

7. เมื่อครบ 14 ชั่วโมง นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจาก soxhlet และกลั่นเก็บสารตัวทำละลาย จนเหลือสารในขวดกลมเพียงเล็กน้อย

8. นำขวดหาไขมันที่ได้ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 - 90 องศาเซลเซียส จนแห้ง ใช้เวลาประมาณ 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

9. ชั่งน้ำหนัก และอบซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1 - 3 มิลลิกรัม

10. คำนวนหาปริมาณไขมันในตัวอย่างจากสูตร

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{100 \times \text{น้ำหนักไขมันหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

5. การหาปริมาณกรดแลคติกโดยการวัดสี (Barber and Summerson, 1941)

<u>หลักการ</u>

กรดแลคติกเมื่อต้มกับกรดซัลฟูริก จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูป acetaldehyde หลังจากนั้น acetaldehyde จะทำปฏิกิริยากับ p-hydroxybiphenyl เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของสีขึ้น ส่วน

copper (Cu) และ calcium (Ca) จะเติมเพื่อกำจัดสารรบกวนอื่น ๆ ที่ปนเปื้อน ปฏิกิริยาดังกล่าวนี้จะเป็นตามกฎของ Beers เมื่อกรดแลคติกมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารเคมี

- Sulphuric acid A.R. grade
- ผง Calcium hydroxide (A.R. grade)
- Colour reagent เตรียมโดยละลาย 1.5 กรัมของ p-hydroxybiphenyl ในสารละลาย 0.5 % NaOH ปริมาณ 100 มิลลิลิตร
- สารละลาย Copper sulphate ความเข้มข้นร้อยละ 4 และความเข้มข้นร้อยละ 20 (ใช้ สาร Copper sulphate pentahydrate)
- สารละลายมาตรฐาน เตรียมโดย เติมสาร Lithium lactate ปริมาณ 213 มิลลิกรัม ใน น้ำกลั่นปริมาณเล็กน้อย แล้วเติมด้วยกรดซัลฟูริก 0.5 มิลลิลิตร ทำสารละลายให้เจือจางเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ปริมาณของกรดแลคติกสุดท้ายจะมีค่า 40 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างโกโก้ผง 10 กรัม ใส่ในบิกเกอร์ เติมน้ำกลั่นลงไป 50 มิลลิลิตร ปิดฝาต้มให้เดือดนานประมาณ 30 นาที
2. กรองของผสมผ่านกระดาษกรอง (Whatman No.1) ด้วยเครื่องกรองสูญญากาศ
3. เจือจางสารละลายตัวอย่าง ให้มีปริมาณกรดแลคติกอยู่ในช่วง 10 - 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ในวันที่ 0 - 2 ของการหมักไม่ต้องเจือจาง ตั้งแต่วันที่ 3 เป็นต้นไป ทำการเจือจาง 5 เท่า)
4. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 20 X 180 มิลลิเมตร
5. เติมสารละลาย Copper sulphate ($CuSO_4$) ความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 มิลลิลิตร
6. เติมผง Calcium hydroxide ($Ca(OH)_2$) ลงไป 1 กรัม และเขย่าอย่างแรง ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปเหวี่ยงแยก

7. ปิเปตสารละลายส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 20 X 18 มิลลิเมตร

8. เติมสารละลาย Copper sulphate ($CuSO_4$) ความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงไป

9. เขย่า พร้อมกับเติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4) ปริมาณ 6 มิลลิลิตร ลงไป และเขย่าอีกครั้ง

10. วางในเครื่องอังน้ำเดือดเป็นเวลา 7 นาที แล้วทำให้เย็นจนอุณหภูมิลดลงถึง 20 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำแข็ง

11. เติมสาร colour reagent ลงไป 0.1 มิลลิลิตร

12. เขย่าและตั้งไว้ใน water bath อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

13. นำมาเขย่าแล้วตั้งไว้ใน waterbath อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอีกไม่น้อยกว่า 15 นาที แล้วนำหลอดไปวางในน้ำเดือดนาน 1.5 นาที เพื่อละลายตะกอน

14. ทำให้เย็นโดยผ่านน้ำก๊อก แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (สีที่ปรากฏจะมีความคงตัวในระยะเวลาสั้น ๆ)

15. เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย Lithium lactate

16. เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานแล้วคำนวนปริมาณกรดแลคติก

6. การหาปริมาณกรดทั้งหมด (A.O.A.C., 1990)

<u>สารเคมี</u>

- สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล
- Phenolphthalein indicator

<u>วิธีการวิเคราะห์</u>

1. นำตัวอย่างเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้หรือเมล็ดโกโก้มา 5 กรัม เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

2. ผสมให้เข้ากันโดยการปั่นด้วยเครื่องปั่นผสม (mixer) หรือ homoginizer เป็นเวลา 5 นาที อาจต้องกรองเอาตะกอนออกหากมีตะกอนมาก

3. ไตเตรตสารละลาย กับสารละลายมาตรฐาน Sodium hydroxide (NaOH) เข้มข้น 0.1 นอร์มอล หาจุดยุติ มี Phenolphthalein เป็นอินดิเคเตอร์

4. คำนานปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริก จากสูตร

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริก (\%)} = \frac{\text{ไตเตอร์} \times N \times 64 \times 100}{\text{มิลลิลิตรของสารตัวอย่าง} \times 100}$$

7. การหาปริมาณของกรดที่ระเหยได้ (A.O.A.C., 1990)

สารเคมี

- สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.01 นอร์มอล
- Phenolphthalein indicator

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างโกโก้ผงมา 10 กรัม กลั่นด้วยไอน้ำ ให้ได้ปริมาตรของของเหลวที่รองรับได้ 250 มิลลิลิตร

2. ทำการไตเตรตของเหลวที่ได้จากการกลั่นในข้อ 1 ด้วยสารละลายมาตรฐาน Sodium hydroxide (NaOH) เข้มข้น 0.01 นอร์มอล โดยใช้ Phenolphthalein เป็นอินดิเคเตอร์

3. คำนวนปริมาณกรดที่ระเหยได้ในรูปของกรดอะซีติก

1 มิลลิลิตรของ 0.1 N NaOH = 0.0060 กรัมกรดอะซีติก

8. การทำ Cut Test (ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก และคณะ, 2536; Wood and Lass, 1985)

วิธีการ

สุ่มตัวอย่างเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการหมักและการทำแห้งแล้วมา 30 เมล็ด ใช้มีดผ่าตามยาว ของเมล็ด (ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) แล้วแบ่งกลุ่มเมล็ดโกโก้แห้งที่ผ่าแล้ว ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

1. เมล็ดที่ผ่านการหมักอย่างสมบูรณ์ (Fully Fermented Beans) : สีภายในของเมล็ดโกโก้จะมีสีน้ำตาล (10PR3/1,2)
2. เมล็ดที่มีสีน้ำตาลบางส่วน และมีสีม่วงบางส่วน (Partly brown, Partly purple) : ลักษณะของเมล็ดโกโก้บางส่วนมีสีน้ำตาลและมีสีม่วงกระจายเป็นจุด ๆ
3. เมล็ดที่ผ่านการหมักไม่สมบูรณ์ (Slaty) : เมล็ดมีสีหินชนวน
4. เมล็ดที่มีสีอื่น ๆ และเมล็ดที่ถูกทำลายโดยแมลง

10. การหาปริมาณความชื้น (A.O.A.C., 1990)

ใช้การอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 100 ± 5 องศาเซลเซียส ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก จนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่

วิธีการวิเคราะห์

1. นำภาชนะอลูมิเนียมพร้อมฝาปิด ไปอบในตู้อบ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 - 2 ชั่งโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ประมาณครึ่งชั่วโมง ชั่งน้ำหนักของภาชนะพร้อมฝา (W_1)
2. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน (0.5 กรัม) ใส่ลงในภาชนะที่ชั่งน้ำหนักแล้ว เกลี่ยให้เนื้อสารกระจาย ปิดฝาและชั่งน้ำหนักอีกครั้ง (W_2)
3. นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส โดยให้ฝาภาชนะปิดไว้บางส่วน อบทิ้งไว้ข้ามคืน (ประมาณ 16 - 18 ชั่วโมง)
4. นำภาชนะดังกล่าวออกจากตู้อบ ปิดฝา แล้วนำไปใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้จนเย็น ชั่งน้ำหนักอีกครั้ง (W_3)
5. คำนวนร้อยละของความชื้นในสารตัวอย่าง $= \dfrac{(W_1-W_2) - (W_3-W_1)}{(W_2-W_1)}$

W_1 น้ำหนักภาชนะอลูมิเนียม (กรัม)

W_2 น้ำหนักภาชนะอลูมิเนียมรวมกับน้ำหนักสารตัวอย่างที่ไม่ผ่านการอบ (กรัม)

W_3 น้ำหนักภาชนะอลูมิเนียมรวมกับน้ำหนักตัวอย่างที่ผ่านการอบ (กรัม)

ตารางภาคผนวก ข1 ค่า Thiosulphate equivalents ในการหาปริมาณน้ำตาลซูโครส และน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Luff-Schoorl method

$Na_2S_2O_3$ 0.1M (ml.)	Glucose, Fructose, Invert sugar (mg.)
1	2.4
2	4.8
3	7.2
4	9.7
5	1.2
6	14.7
7	17.2
8	19.8
9	22.4
10	25.0
11	27.6
12	30.3
13	33.0
14	35.7
15	38.5
16	41.5
17	44.2
18	47.1
19	50.0
20	53.0
21	56.0
22	59.1
23	62.2

ที่มา : ดัดแปลงจาก Egan , *et al.* (1981) และ A.O.A.C., (1990)

ภาคผนวก ค อาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ และการตรวจนับจุลินทรีย์ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ และวิธีการเตรียม

1.1 อาหาร TYGKCP (Ostovar and Keeney, 1973)

ประกอบด้วย

K_2HPO_4	1.00	กรัม
$CaCO_3$	1.00	กรัม
ทริปโตน	5.00	กรัม
ยีสต์สกัด	5.00	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	1.00	กรัม
เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้	10.00	กรัม
ผงวุ้น	20.00	กรัม*

* ใช้เติมในกรณีที่เตรียมเป็นอาหารแข็ง

วิธีการ

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือด และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหาร MRS (Rogosa and Sharpe, 1959)

ประกอบด้วย

K_2HPO_4	2.00	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.20	กรัม
$MnSO_4.4H_2O$	0.05	กรัม
$CH_3COONa.3H_2O$	5.00	กรัม
$(NH_4)_3C_6H_5O_7$	2.00	กรัม
เปปโตน	10.00	กรัม
ยีสต์สกัด	4.00	กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส	20.00	กรัม
ผงวุ้น	17.00	กรัม*

* ใช้เติมในกรณีที่เตรียมเป็นอาหารแข็ง

วิธีการ

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น เติม Bromocresol purple ร้อยละ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชใช้เป็น 6.2 ด้วยกรดเกลือร้อยละ 10 แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือดและนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 อาหาร DSM (Cirigloano, 1982)

ประกอบด้วย

KH_2PO_4	1.00	กรัม
$MnSO_4.H_2O$	0.02	กรัม
Calsium lactate	15.00	กรัม
D-sorbitol	1.00	กรัม
D-mannitol	2.00	กรัม
Bromocresol purple (Difco)	0.03	กรัม
Cycloheximide	0.004	กรัม
Sodium desoxycholate (Difco)	0.10	กรัม
หรือ Brilliant green (Difco)	29.50	ไมโครกรัม
โปรติโอสเปปโตน	10.00	กรัม
ยีสต์สกัด	3.00	กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส	1.00	กรัม
ผงวุ้น	15.00	กรัม*

* ใช้เติมในกรณีที่เตรียมเป็นอาหารแข็ง

วิธีการ

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น ยกเว้น cycloheximide ต้องละลายในแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 แล้วเติมลงในอาหารก่อนทำการฆ่าเชื้อ ปรับค่าพีเอชเป็น 4.2 - 4.4 ด้วยกรดเกลือร้อยละ 10 เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.4 อาหาร Acetobacter agar

ประกอบด้วย

$(NH_4)_2SO_4$	1.00	กรัม
เปปโตน	3.00	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	18.00	กรัม
ยีสต์สกัด	2.00	กรัม
สารละลาย A	5.00	มิลลิลิตร
สารละลาย B	5.00	มิลลิลิตร
ผงวุ้น	17.00	กรัม*

* ใช้เติมในกรณีที่เตรียมเป็นอาหารแข็ง

สารละลาย A

K_2HPO_4	50.00	กรัม
KH_2PO_4	50.00	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500.0 มิลลิลิตร

สารละลาย B

$MgSO_4.7H_2O$	1.00	กรัม
NaCl	1.00	กรัม
$FeSO_4$	1.00	กรัม
$MnSO_4.4H_2O$	1.00	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	500.00	มิลลิลิตร

วิธีการ

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นำไปต้มให้วุ้นละลาย แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.5 อาหาร PDA

ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200.00	กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส	20.00	กรัม
ผงวุ้น	15.00	กรัม

วิธีการ

นำมันฝรั่งมาล้างน้ำให้สะอาด ปอกเปลือกออกให้หมด หั่นมันฝรั่งออกเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจตุรัสขนาดประมาณ 6 มิลลิเมตร โดยพยายายให้มีขนาดเท่า ๆ กัน ชั่งน้ำหนักมา 200 กรัม ต้มมันฝรั่งในน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร จนกระทั่งมันฝรั่งสุก กรองด้วยผ้าขาวบาง ของเหลวที่ได้นำมาเติมน้ำตาลเดกซ์โทรสและผงวุ้น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปต้มจนวุ้นละลาย แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. การตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก โดยเฉพาะยีสต์ แบคทีเรียอะซีติก และแบคทีเรียแลคติก

2.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างเมล็ดโกโก้ปริมาณ 25 กรัม ใส่ในขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร ภายในบรรจุน้ำเปปโตนร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เขย่าให้เข้ากัน ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 ข้างต้นมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำเปปโตนร้อยละ 0.1 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเพื่อให้ตัวอย่างเจือจางเป็น 1:100 เท่า ทำเช่นเดียวกันต่อไปจนได้ตัวอย่างโกโก้ที่เจือจางเป็น 1:1,000, 1:10,000, 1:100,000 และ 1:1,000,000 ตามลำดับ

2.2 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธี standard plate count (American Public Health Association; 1960)

2.2.1 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่เหมาะสม 3 ระดับ (จากข้อ 2.1) ระดับละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ทำระดับละ 3 จาน เทอาหาร TYGKCP agar ที่หลอมเหลวและอุ่นลงไปประมาณจานละ 15 มิลลิลิตร หมุนจานให้ตัวอย่างกระจายไปทั่ว โดยขยับจานไปมา 5 ครั้ง แล้วขยับไปมาตั้งฉากกับแนวเดิมอีก 5 ครั้ง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารเพาะเชื้อแข็งตัวพลิกกลับจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 - 72 ชั่วโมง

2.2.2 การนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด คัดเลือกจานที่มีจุลินทรีย์เจริญอยู่ระหว่าง 30 - 300 โคโลนี หาผลเฉลี่ยคิดเป็นจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมของตัวอย่าง

2.3 การตรวจนับจำนวนยีสต์

2.3.1 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่เหมาะสม 3 ระดับ (จากข้อ 2.1) ระดับละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ทำระดับละ 3 จาน เทอาหาร PDA agar ที่หลอมเหลวและอุ่น (เติม Oxytetracycline ร้อยละ 0.1) ลงไปจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร หมุนจานให้ตัวอย่างกระจายไปทั่ว ๆ โดยขยับจานไปมา 5 ครั้ง แล้วขยับไปมาตั้งฉากกับแนวเดิมอีก 5 ครั้ง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารเพาะเชื้อแข็งตัวพลิกกลับจานเพาะเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 - 72 ชั่วโมง

2.3.2 การนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด คัดเลือกจานที่มีจุลินทรีย์เจริญอยู่ระหว่าง 30 - 300 โคโลนี หาผลเฉลี่ยคิดเป็นจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมของตัวอย่าง

2.4 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแอซีติก

2.4.1 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่เหมาะสม 3 ระดับ (จากข้อ 2.1) ระดับละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ทำระดับละ 3 จาน เทอาหาร DSM agar ที่หลอมเหลวและอุ่นลงไปประมาณจานละ 15 มิลลิลิตร หมุนจานให้ตัวอย่างกระจายไปทั่วโดยขยับจานไปมา 5 ครั้ง แล้วขยับไปมาตั้งฉากกับแนวเดิมอีก 5 ครั้ง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารเพาะเชื้อแข็งตัว พลิกกลับจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 - 72 ชั่วโมง

2.4.2 การนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด คัดเลือกจานที่มีจุลินทรีย์เจริญอยู่ระหว่าง 30 - 300 โคโลนี หาผลเฉลี่ยคิดเป็นจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมของตัวอย่าง

2.5 การนับจำนวนแบคทีเรียแลคติก

2.5.1 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่เหมาะสม 3 ระดับ (จากข้อ 2.1) ระดับละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ทำระดับละ 3 จาน เทอาหาร MRS agar ที่หลอมเหลวและอุ่นลงไปประมาณจานละ 15 มิลลิลิตร หมุนจานให้ตัวอย่างกระจายไปทั่วโดยขยับจานไปมา 5 ครั้ง แล้วขยับไปมาตั้งฉากกับแนวเดิมอีก 5 ครั้ง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารเพาะเชื้อแข็งตัว พลิกกลับจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 - 72 ชั่วโมง

2.5.2 การนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด คัดเลือกจานที่มีจุลินทรีย์เจริญอยู่ระหว่าง 30 - 300 โคโลนี หาผลเฉลี่ยคิดเป็นจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมของตัวอย่าง

ภาคผนวก ง ตารางข้อมูลด้านจุลินทรีย์ของการวิจัย

ตารางภาคผนวก ง1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร PDA ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยยีสต์ ที่สภาวะต่าง ๆ

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณจุลินทรีย์ (CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้)		
	เติม *S. cerevisiae* 5%	เติม *C. sorbosa* 5%	เติม *C. sake* 5%
		หมักที่อุณหภูมิห้อง	
0	$7.24X10^5$ *	$6.46X10^5$	$7.94X10^5$
1	$6.76X10^6$	$3.72X10^6$	$2.69X10^6$
2	$5.62X10^7$	$1.41X10^7$	$1.25X10^7$
3	$1.82X10^6$	$1.74X10^6$	$1.51X10^6$
4	$9.33X10^5$	$5.50X10^5$	$6.46X10^5$
5	$4.37X10^5$	$3.39X10^5$	$3.02X10^5$
6	$1.51X10^5$	$1.91X10^5$	$1.51X10^5$
7	$1.29X10^5$	$1.48X10^5$	$1.38X10^5$
		หมักในภาชนะหุ้มฉนวน	
0	$7.08X10^5$	$6.92X10^5$	$7.76X10^6$
1	$3.02X10^7$	$1.51X10^7$	$1.58X10^7$
2	$1.51X10^7$	$8.71X10^7$	$1.10X10^7$
3	$6.92X10^6$	$5.16X10^6$	$6.46X10^6$
4	$1.48X10^6$	$1.34X10^6$	$1.62X10^6$
5	$5.75X10^5$	$6.61X10^5$	$7.41X10^5$
6	$2.95X10^5$	$2.34X10^5$	$2.41X10^5$
7	$1.58X10^5$	$1.62X10^5$	$1.45X10^5$

ตารางภาคผนวก ง1 (ต่อ)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณจุลินทรีย์ (CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้)		
	เติม *S. cerevisiae* 5%	เติม *C. sorbosa* 5%	เติม *C. sake* 5%
	หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส		
0	$6.61X10^5$	$6.92X10^5$	$7.08X10^5$
1	$2.95X10^9$	$1.02X10^9$	$9.12X10^9$
2	$3.89X10^8$	$5.13X10^8$	$4.17X10^8$
3	$2.90X10^7$	$2.82X10^7$	$3.31X10^7$
4	$6.92X10^5$	$1.86X10^6$	$2.04X10^6$
5	$2.04X10^5$	$2.88X10^5$	$4.68X10^5$
6	$1.48X10^5$	$2.63X10^5$	$4.90X10^5$
7	$6.03X10^4$	$1.58X10^5$	$1.35X10^5$

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

ตารางภาคผนวก ง2. การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร TYGKCP ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยยีสต์ ที่สภาวะต่าง ๆ

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณจุลินทรีย์ (CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้)		
	เติม *S. cerevisiae* 5%	เติม *C. sorbosa* 5%	เติม *C. sake* 5%
	หมักที่อุณหภูมิห้อง		
0	$7.76X10^5$ *	$7.41X10^5$	$7.41X10^5$
1	$7.94X10^6$	$3.39X10^6$	$3.02X10^6$
2	$6.03X10^7$	$1.55X10^7$	$1.38X10^7$
3	$2.34X10^6$	$1.91X10^6$	$1.62X10^6$
4	$8.91X10^5$	$5.01X10^5$	$6.31X10^5$
5	$3.98X10^5$	$3.23X10^5$	$3.16X10^5$
6	$1.74X10^5$	$1.95X10^5$	$1.48X10^5$
7	$1.35X10^5$	$1.58X10^5$	$1.29X10^5$
	หมักในภาชนะหุ้มฉนวน		
0	$6.46X10^5$	$7.41X10^5$	$7.24X10^5$
1	$3.16X10^7$	$1.55X10^7$	$1.74X10^7$
2	$1.62X10^7$	$9.55X10^6$	$1.20X10^7$
3	$6.46X10^6$	$6.03X10^6$	$7.08X10^6$
4	$1.41X10^6$	$1.70X10^6$	$1.74X10^6$
5	$6.17X10^5$	$6.92X10^5$	$7.08X10^5$
6	$3.24X10^5$	$2.34X10^5$	$2.34X10^5$
7	$1.70X10^5$	$1.66X10^5$	$1.51X10^5$
	หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส		
0	$6.76X10^5$	$7.08X10^5$	$7.76X10^5$
1	$3.09X10^9$	$1.10X10^9$	$9.55X10^9$
2	$4.07X10^8$	$5.75X10^8$	$4.79X10^8$
3	$2.00X10^7$	$2.88X10^7$	$3.89X10^7$

ตารางภาคผนวก ง2 (ต่อ)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณจุลินทรีย์ (CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้)		
	เติม *S. cerevisiae* 5%	เติม *C. sorbosa* 5%	เติม *C. sake* 5%
4	$6.61X10^5$	$1.78X10^6$	$2.45X10^6$
5	$2.19X10^5$	$3.02X10^5$	$5.13X10^5$
6	$1.45X10^5$	$2.95X10^5$	$5.01X10^5$
7	$5.62X10^4$	$1.51X10^5$	$1.51X10^5$

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

ตารางภาคผนวก ง3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร PDA และ TYGKCP ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยยีสต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณจุลินทรีย์ (CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้)			
	S. cerevisiae 5%	*C. sorbosa* 5%	*C. sake* 5%	Control
	การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร PDA			
0	$1.34X10^5$ *	$1.39X10^5$	$1.43X10^5$	0.00
1	$3.39X10^9$	$1.35X10^9$	$1.26X10^9$	0.00
2	$4.68X10^8$	$1.51X10^9$	$7.41X10^8$	$3.16X10^1$
3	$2.24X10^7$	$7.24X10^7$	$4.47X10^7$	$7.94X10^1$
4	$8.51X10^5$	$1.74X10^6$	$2.82X10^6$	$3.24X10^2$
5	$3.24X10^5$	$6.46X10^5$	$4.37X10^5$	$5.75X10^2$
6	$1.62X10^5$	$3.55X10^5$	$6.46X10^5$	$7.08X10^3$
7	$7.08X10^4$	$2.63X10^5$	$1.62X10^5$	$4.68X10^3$
	การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP			
0	$1.31X10^5$	$1.43X10^5$	$1.38X10^5$	0.00
1	$3.89X10^9$	$1.44X10^9$	$1.10X10^9$	0.00
2	$4.37X10^8$	$1.64X10^9$	$8.71X10^8$	$3.98X10^1$
3	$8.77X10^7$	$6.97X10^7$	$4.84X10^7$	$1.02X10^2$
4	$7.41X10^6$	$1.94X10^6$	$2.60X10^6$	$3.77X10^2$
5	$7.08X10^5$	$6.11X10^5$	$4.54X10^5$	$7.50X10^2$
6	$2.21X10^5$	$4.01X10^5$	$7.41X10^5$	$6.52X10^3$
7	$6.11X10^4$	$3.06X10^5$	$1.51X10^5$	$5.13X10^3$

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

ตารางภาคผนวก ง4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร MRS และ TYGKCP ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยแบคทีเรียแลคติก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณจุลินทรีย์ (CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้)			
	L. casei 5%	*Leu. mesenteroides* 5%	*Strep. thermophilus* 5%	Control
	การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร MRS			
0	$2.97X10^5$ *	$2.74X10^5$	$3.06X10^5$	0.00
1	$1.74X10^7$	$3.89X10^7$	$5.22X10^7$	0.00
2	$1.63X10^8$	$3.72X10^8$	$5.37X10^8$	0.00
3	$1.38X10^6$	$2.81X10^6$	$1.32X10^7$	$1.00X10^1$
4	$1.20X10^5$	$2.88X10^5$	$6.46X10^5$	$4.70X10^1$
5	$5.75X10^4$	$9.12X10^4$	$1.48X10^5$	$1.45X10^2$
6	$2.40X10^4$	$5.37X10^4$	$8.32X10^4$	$3.74X10^2$
7	$1.12X10^4$	$3.02X10^4$	$5.37X10^4$	$9.44X10^2$
	การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP			
0	$2.84X10^5$	$2.69X10^5$	$3.17X10^5$	0.00
1	$1.97X10^7$	$5.02X10^7$	$5.02X10^7$	0.00
2	$1.73X10^8$	$4.07X10^8$	$5.01X10^8$	0.00
3	$1.70X10^6$	$3.72X10^6$	$1.62X10^7$	$1.10X10^1$
4	$1.35X10^5$	$3.24X10^5$	$8.32X10^5$	$6.04X10^1$
5	$7.94X10^4$	$1.10X10^5$	$1.51X10^5$	$1.37X10^2$
6	$3.16X10^4$	$6.92X10^4$	$1.10X10^5$	$4.71X10^2$
7	$1.32X10^4$	$3.39X10^4$	$6.17X10^4$	$9.46X10^2$

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

ตารางภาคผนวก ง5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร DSM และ TYGKCP ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยแบคทีเรียแอซีติก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณจุลินทรีย์ (CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้)			
	A. rancen 5%	*A. lovaniense* 5%	*G. oxydan* 5%	Control
	การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร DSM			
0	$1.59X10^5$ *	$2.33X10^5$	$2.41X10^5$	0.00
1	$1.04X10^6$	$1.03X10^6$	$2.62X10^6$	0.00
2	$1.64X10^7$	$7.82X10^6$	$3.30X10^7$	$1.05X10^1$
3	$7.00X10^7$	$4.25X10^7$	$1.04X10^7$	$3.82X10^1$
4	$2.84X10^6$	$5.42X10^6$	$2.20X10^6$	$3.93X10^2$
5	$1.03X10^6$	$7.87X10^5$	$2.41X10^6$	$1.85X10^3$
6	$1.77X10^5$	$7.46X10^5$	$9.46X10^5$	$9.35X10^3$
7	$1.36X10^5$	$2.23X10^5$	$4.72X10^5$	$1.27X10^4$
	การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP			
0	$1.53X10^5$	$2.47X10^5$	$2.55X10^5$	0.00
1	$9.40X10^5$	$9.71X10^5$	$2.48X10^6$	0.00
2	$2.21X10^7$	$8.04X10^6$	$3.93X10^7$	$1.10X10^1$
3	$7.31X10^7$	$4.32X10^7$	$1.03X10^7$	$3.54X10^1$
4	$2.69X10^6$	$4.90X10^6$	$2.37X10^6$	$6.24X10^2$
5	$1.37X10^6$	$1.00X10^6$	$3.13X10^6$	$2.40X10^3$
6	$1.77X10^5$	$6.97X10^5$	$8.83X10^5$	$1.03X10^4$
7	$1.60X10^5$	$2.59X10^5$	$4.92X10^5$	$1.85X10^4$

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

ตารางภาคผนวก ง6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร PDA ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ ในห้องปฏิบัติการ ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณจุลินทรีย์ (CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้)						
	treatment A	treatment B	treatment C	treatment D	treatment E	treatment F	Control
0	$3.20X10^5$ *	$3.17X10^5$	$3.10X10^5$	$3.23X10^5$	$3.06X10^5$	$3.30X10^5$	0.00
1	$8.53X10^7$	$9.73X10^7$	$7.97X10^7$	$1.05X10^8$	$7.90X10^7$	$8.93X10^7$	$6.86X10^1$
2	$4.53X10^8$	$6.90X10^7$	$4.00X10^7$	$3.01X10^8$	$1.19X10^7$	$4.23X10^7$	$1.42X10^2$
3	$6.80X10^7$	$2.79X10^7$	$8.10X10^6$	$7.24X10^7$	$7.13X10^6$	$7.30X10^6$	$5.10X10^2$
4	$7.80X10^6$	$9.03X10^5$	$3.85X10^6$	$6.56X10^6$	$8.86X10^5$	$5.76X10^6$	$1.12X10^3$
5	$5.83X10^5$	$5.06X10^5$	$7.13X10^5$	$4.33X10^5$	$3.00X10^5$	$6.37X10^5$	$6.60X10^2$
6	$4.86X10^4$	$3.29X10^5$	$6.50X10^4$	$3.83X10^5$	$2.56X10^5$	$9.97X10^4$	$5.03X10^2$
7	$3.03X10^4$	$7.89X10^4$	$3.19X10^4$	$1.11X10^5$	$9.13X10^4$	$1.04X10^5$	$3.10X10^2$

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

รายละเอียดชุดการทดลองแสดงรายละเอียดดังหน้าที่ 216

รายละเอียดชุดการทดลองต่าง ๆ แสดงดังนี้ (ประกอบตารางภาคผนวก ง6 - ง9)

Treatment A	เติม *S. cerevisiae* 5% และ *A. rancen* 5% พร้อมกันในตอนเริ่มต้นการหมัก
Treatment B	เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% พร้อมกันในตอนเริ่มต้นการหมัก
Treatment C	เติม *S. cerevisiae* 5%, *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% พร้อมกันในตอนเริ่มต้นการหมัก
Treatment D	เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นการหมัก แล้วเติม *A. rancen* 5% ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง
Treatment E	เติม *S. cerevisiae* 5% และ *L. casei* 5% ในตอนเริ่มต้นการหมัก แล้วเติม *A. rancen* 5% ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง
Treatment F	เติม *S. cerevisiae* 5% ในตอนเริ่มต้นการหมัก แล้วเติม *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง
Control treatment	ไม่เติมจุลินทรีย์ใด ๆ ลงในขวดหมัก

ตารางภาคผนวก ง7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร MRS ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ ในห้องปฏิบัติการ ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณจุลินทรีย์ (CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้)						
	treatment A	treatment B	treatment C	treatment D	treatment E	treatment F	Control
0	0.00*	$3.76X10^5$	$3.70X10^5$	0.00	$3.76X10^5$	0.00	0.00
1	0.00	$3.87X10^8$	$3.90X10^7$	0.00	$6.43X10^7$	$4.00X10^5$	0.00
2	$3.13X10^1$	$5.22X10^7$	$3.80X10^7$	$3.53X10^1$	$1.08X10^7$	$1.03X10^7$	0.00
3	$4.63X10^1$	$5.93X10^6$	$7.13X10^6$	$6.23X10^1$	$5.00X10^6$	$1.02X10^7$	$3.92X10^1$
4	$2.20X10^2$	$4.35X10^5$	$8.60X10^5$	$4.30X10^1$	$9.57X10^5$	$1.04X10^6$	$6.93X10^3$
5	$3.40X10^1$	$3.96X10^4$	$5.76X10^5$	$2.93X10^1$	$4.53X10^5$	$3.86X10^5$	$5.13X10^2$
6	$1.40X10^1$	$5.10X10^4$	$3.35X10^5$	$2.07X10^1$	$1.93X10^5$	$9.63X10^4$	$6.20X10^2$
7	$1.87X10^1$	$9.16X10^3$	$4.46X10^4$	$2.33X10^1$	$3.83X10^4$	$7.09X10^3$	$8.10X10^2$

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

รายละเอียดชุดการทดลองแสดงรายละเอียดดังหน้าที่ 216

ตารางภาคผนวก ง8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร DSM ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ ในห้องปฏิบัติการ ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม

ระยะเวลาการหมัก	ปริมาณจุลินทรีย์ (CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้)						
(วัน)	treatment A	treatment B	treatment C	treatment D	treatment E	treatment F	Control
0	$4.10X10^5$ *	0.00	$4.07X10^5$	0.00	0.00	0.00	0.00
1	$6.30X10^6$	0.00	$7.23X10^6$	$4.17X10^5$	$3.97X10^5$	$4.13X10^5$	0.00
2	$4.57X10^7$	$5.65X10^1$	$3.93X10^7$	$9.86X10^6$	$1.04X10^7$	$9.37X10^6$	$4.76X10^1$
3	$2.63X10^7$	$2.19X10^2$	$9.53X10^6$	$4.00X10^7$	$3.23X10^7$	$5.75X10^7$	$1.14X10^2$
4	$4.90X10^6$	$6.56X10^3$	$7.06X10^6$	$1.02X10^7$	$6.50X10^7$	$8.51X10^7$	$7.90X10^3$
5	$6.13X10^5$	$4.63X10^2$	$7.93X10^5$	$7.00X10^6$	$5.13X10^6$	$7.46X10^6$	$9.60X10^2$
6	$2.63X10^5$	$3.03X10^2$	$4.53X10^5$	$1.20X10^6$	$7.72X10^5$	$9.57X10^5$	$5.33X10^2$
7	$1.12X10^4$	$7.90X10^1$	$1.59X10^5$	$4.59X10^5$	$3.16X10^5$	$3.60X10^5$	$8.00X10^2$

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

รายละเอียดชุดการทดลองแสดงรายละเอียดดังหน้าที่ 216

ตารางภาคผนวก ง9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร TYGKCP ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ ในห้องปฏิบัติการ ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณจุลินทรีย์ (CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้)						
	treatment A	treatment B	treatment C	treatment D	treatment E	treatment F	Control
0	$7.25X10^5$ *	$8.73X10^5$	$1.09X10^5$	$3.23X10^5$	$7.07X10^5$	$3.23X10^5$	0.00
1	$2.88X10^8$	$2.66X10^8$	$3.20X10^9$	$6.70X10^7$	$6.46X10^8$	$4.33X10^7$	$2.79X10^2$
2	$8.91X10^8$	$7.83X10^7$	$6.96X10^8$	$6.93X10^8$	$2.16X10^9$	$8.13X10^8$	$7.16X10^2$
3	$6.76X10^7$	$5.00X10^6$	$8.87X10^7$	$7.03X10^7$	$5.93X10^8$	$9.36X10^8$	$6.90X10^3$
4	$8.33X10^6$	$2.03X10^5$	$4.56X10^7$	$4.23X10^7$	$2.00X10^8$	$4.76X10^7$	$3.07X10^4$
5	$7.60X10^5$	$1.36X10^5$	$7.56X10^6$	$7.90X10^6$	$7.43X10^7$	$6.96X10^6$	$8.33X10^3$
6	$5.03X10^5$	$1.02X10^5$	$6.13X10^5$	$3.90X10^6$	$5.66X10^6$	$6.30X10^5$	$5.15X10^3$
7	$2.54X10^5$	$1.00X10^5$	$9.10X10^4$	$1.11X10^5$	$3.52X10^5$	$1.02X10^5$	$2.23X10^3$

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

รายละเอียดชุดการทดลองแสดงรายละเอียดดังหน้าที่ 216

ตารางภาคผนวก ง10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร TYGKCP ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมของ *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ในกล่องหมัก เป็นเวลา 4 วัน และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก เปรียบเทียบกับการหมักที่ไม่เติมจุลินทรีย์

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณจุลินทรีย์ (CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้)		
	Treatment A	Treatment B	Treatment C
0	$7.34X10^5$ *	$4.64X10^5$	$2.43X10^4$
1	$7.62X10^8$	$4.00X10^8$	$6.13X10^6$
2	$2.22X10^8$	$1.06X10^8$	$3.23X10^7$
3	$3.50X10^7$	$9.35X10^6$	$4.13X10^6$
4	$2.17X10^6$	$6.08X10^5$	$3.68X10^5$

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

Treatment A เติม *S. cerevisiae* 5% และ *A. rancen* 5% พร้อมกันในตอนเริ่มต้นการหมัก

Treatment B เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นการหมัก แล้วเติม *A. rancen* 5% ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

Treatment C เป็นการหมักตามธรรมชาติ ไม่เติมจุลินทรีย์ลงไปในการหมัก

ตารางภาคผนวก ง11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร PDA ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมของ *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ในกล่องหมัก เป็นเวลา 4 วัน และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก เปรียบเทียบกับการหมักที่ไม่เติมจุลินทรีย์

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณจุลินทรีย์ (CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้)		
	Treatment A	Treatment B	Treatment C
0	$4.53X10^5$ *	$4.43X10^5$	$5.10X10^3$
1	$5.29X10^8$	$5.63X10^8$	$5.99X10^7$
2	$8.80X10^6$	$1.88X10^7$	$6.60X10^5$
3	$8.90X10^5$	$2.81X10^5$	$5.49X10^4$
4	$4.34X10^4$	$3.47X10^4$	$3.66X10^3$

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

Treatment A เติม *S. cerevisiae* 5% และ *A. rancen* 5% พร้อมกันในตอนเริ่มต้นการหมัก

Treatment B เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นการหมัก แล้วเติม *A. rancen* 5% ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

Treatment C เป็นการหมักตามธรรมชาติ ไม่เติมจุลินทรีย์ลงไปในการหมัก

ตารางภาคผนวก ง12 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร MRS ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมของ *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ในกล่องหมัก เป็นเวลา 4 วัน และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก เปรียบเทียบกับการหมักที่ไม่เติมจุลินทรีย์

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณจุลินทรีย์ (CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้)		
	Treatment A	Treatment B	Treatment C
0	$2.38X10^4$ *	$2.49X10^4$	$2.40X10^4$
1	$8.22X10^7$	$2.46X10^8$	$3.55X10^8$
2	$1.60X10^5$	$3.40X10^5$	$7.75X10^5$
3	$3.04X10^4$	$2.29X10^4$	$3.79X10^4$
4	$3.13X10^3$	$4.08X10^3$	$9.02X10^3$

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

Treatment A เติม *S. cerevisiae* 5% และ *A. rancen* 5% พร้อมกันในตอนเริ่มต้นการหมัก

Treatment B เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นการหมัก แล้วเติม *A. rancen* 5% ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

Treatment C เป็นการหมักตามธรรมชาติ ไม่เติมจุลินทรีย์ลงไปในการหมัก

ตารางภาคผนวก ง13 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร DSM ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมของ *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ในกล่องหมัก เป็นเวลา 4 วัน และกลับกองหมักในวันที่ 2 ของการหมัก เปรียบเทียบกับการหมักที่ไม่เติมจุลินทรีย์

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณจุลินทรีย์ (CFUต่อกรัมเมล็ดโกโก้)		
	Treatment A	Treatment B	Treatment C
0	$4.14X10^5$ *	$5.08X10^3$	$5.09X10^3$
1	$7.16X10^6$	$9.53X10^5$	$3.77X10^5$
2	$5.08X10^7$	$3.50X10^8$	$9.18X10^6$
3	$2.94X10^6$	$7.06X10^6$	$3.33X10^6$
4	$6.02X10^4$	$1.12X10^5$	$3.38X10^5$

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

Treatment A เติม *S. cerevisiae* 5% และ *A. rancen* 5% พร้อมกันในตอนเริ่มต้นการหมัก

Treatment B เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นการหมัก แล้วเติม *A. rancen* 5% ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

Treatment C เป็นการหมักตามธรรมชาติ ไม่เติมจุลินทรีย์ลงไปในการหมัก

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นายนิยม กำลังดี

วัน เดือน ปีเกิด 22 กรกฎาคม พ.ศ. 2510

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2533

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนสำนักงานคณะกรรมการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (STDB) ปี พ.ศ.2533 - พ.ศ.2535