รายงานโครงการวิจัย

เรื่อง

การเตรียมเชื้อเริ่มต้นเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการหมักโกโก้

Preparation of Starter Cultures for Industrial Fermenttation of Cocoa

I. การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

Microbial Changes during Cocoa Bean Fermentation

II บทบาทของจุลินทรีย์ที่เติมต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้หมัก

Roles of Inoculated Microorganisms on Quality of Fermented Cocoa Bean

โดย

ผศ.ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล

รศ.ดร.กนกอร อินทราพิเชษฐ์

รศ.ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์

ผศ.เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล

คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

มีนาคม 2541

Order Key 10890

BIB Key 149 2541

สงข
เลขหมู่ TP640 S6A 2541 ก.1

เลขทะเบียน

29 มี.ค. 2541

a: coco7.doc 1

โครงการวิจัย : การเตรียมเชื้อเริ่มต้นเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการหมักโกโก้

I. การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

อรัญ หันพงศ์กิตติกูล[1], กนกอร อินทราพิเชษฐ[2], พูนสุข ประเสริฐสรรพ์[1] และ เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกูล[1]

1. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ 90110
2. สำนักวิชาเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา 30000

บทคัดย่อ

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ โดยทำการหมักในเข่งผลไม้เป็นเวลา 7 วัน มีการกลับเมล็ดโดยการถ่ายเข่งทุก 2 วัน ทำการหมัก 2 ครั้ง ในสถานที่ต่างกัน พบว่าในการหมักชุดที่หนึ่ง ก่อนการหมักเมล็ดโกโก้มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด 1.40×10^{3} โคโลนีต่อกรัม ยีสต์ 2.11×10^{5} โคโลนีต่อกรัม แบคทีเรียแอซีติก 2.85×10^{3} โคโลนีต่อกรัม และแบคทีเรียแลคติก 1.85×10^{3} โคโลนีต่อกรัม ภายหลังการหมักหนึ่งวันจุลินทรีย์เหล่านี้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อการหมักสิ้นสุดมีปริมาณจุลินทรีย์ 1.44×10^{8}-1.46×10^{9} โคโลนีต่อกรัม ยีสต์ 1.00×10^{2}-1.30×10^{3} โคโลนีต่อกรัม แบคทีเรียแอซิก 2.70×10^{7}-1.00×10^{8} โคโลนีต่อกรัม และแบคทีเรียแลคติก 2.68×10^{6}-2.38×10^{7} โคโลนีต่อกรัม การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ทั้งหมดพบว่ามียีสต์ แบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งและรูปทรงกลม และแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง ยีสต์ที่พบปริมาณมากคือ *Candida sorbosa* และ *Candida krusei* การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียแอซีติกและแบคทีเรียแลคติกในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้แปรผันตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยชนิดของแบคทีเรียแอซีติกที่พบ ปริมาณสูงมี *Acetobacter lovaniense* และ *Acetobacter rancens* สำหรับชนิดของแบคทีเรียแลคติก ที่พบปริมาณสูงมี *Lactobacillus casei, Streptococcus thermophilus, Streptococcus lactis* และ *Leuconostoc mesenteroides.*

ในการหมักชุดที่สอง ก่อนการหมักเมล็ดโกโก้มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด 2.21×10^{2} โคโลนีต่อกรัม และมีแบคทีเรียแลคติก 1.39×10^{5} โคโลนีต่อกรัม แต่ไม่พบยีสต์และแบคทีเรียแอซีติก จุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลคติกมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเหมือนกัน โดยมีปริมาณสูงสุดหลังจากหมักได้หนึ่งวันคือ 2.69×10^{8}-2.24×10^{9} โคโลนีต่อกรัมและ 1.07-3.08×10^{8} โคโลนีต่อกรัม แต่แบคทีเรียแอซีติกมีปริมาณสูงสุดหลังจากหมักได้สามวัน คือ 1.69×10^{6}-1.11×10^{7} โคโลนีต่อกรัม ยีสต์ที่พบปริมาณสูงคือ *Saccharomyces cerevisiae* และแบคทีเรียแอซีติกที่พบปริมาณสูงมี *Acetobacter rancens* สำหรับแบคทีเรียแลคติกที่พบปริมาณสูงมี *Leuconostoc mesenteroides*

Project : Preparation of Starter Cultures for Industrial Fermentation of Cocoa

I. Microbial Changes during Cocoa Bean Fermentation

Aran H-Kittikun[1], Kanokorn Intrapichet[2], Poonsuk Prasertsan[1] and Saowaluck Jitbunjedkul[1]

1. Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Hat Yai 90110

2. School of Food Technology, Suranaree University of Technology, NakornRatchasima 30000

Abstract

Cocoa beans were fermented in bamboo basket for seven days and the beans were stirred every two days. Two batches of beans kept at different places were studied. The first batch of cocoa beans had an initial total microbial count of $1.40x10^3$ CFU/g, a yeast count of $2.11x10^5$ CFU/g, an acetic acid bacteria count of $2.85x10^3$ CFU/g and a lactic acid bacteria count of $1.85x10^3$ CFU/g. All the counts sharply increased after the first day of fermentation and slightly decreased later. At the end of the fermentation period a total microbial count of $1.44x10^8$-$1.46x10^9$ CFU/g, a yeast count of $1.00x10^2$-$1.30x10^3$ CFU/g, and an acetic acid bacteria count of $2.70x10^7$-$1.00x10^8$ CFU/g, and a lactic acid bacteria count of $2.68x10^6$-$2.38x10^7$ CFU/g were observed in the fermented cocoa beans. Gram stain and microscopic examination showed that the microorganisms found during cocoa bean fermentation were gram positive cococcus and rod shaped bacteria, gram negative rod shaped bacteria and yeast. It was observed that *Candida sorbosa* and *Candida krusei* were the predominant yeasts. The changes in the amounts of acetic acid bacteria and lactic acid bacteria followed the same pattern as the change in total microbial count during fermentation. The predominant acetic acid bacteria present in cocoa beans during fermentation were *Acetobacter lovaniense* and *Acetobacter rancens* while the predominant lactic acid bacteria were *Lactobacillus casei, Streptococcus thermophilus, Streptococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides.*

In the second batch, the cocoa beans had an initial total microbial count of $2.21x10^2$ CFU/g and a lactic acid bacteria count of $1.39x10^5$ CFU/g while yeast and acetic acid bacteria were not observed. The change in the amount of lactic acid bacteria followed the same pattern as the change in total microbial count during fermentation. The total microbial count and the lactic acid bacteria count were at their highest after one day of fermentation with $2.69x10^8$-$2.24x10^9$ CFU/g and 1.07-$3.08x10^8$ CFU/g, respectively. The yeast count was at its highest after one day of fermentation with 3.04x10-2.16x10 CFU/g but the acetic acid bacteria count was at the highest after three days of fermentation with $1.69x10^6$-$1.11x10^7$ CFU/g. The predominant yeast in the cocoa beans during fermentation was *Saccharomyces cerevisiae* while the predominanted acetic acid bacteria and lactic acid bacteria and bacteria and lactic acid bacteria were *Acetobacter rancens* and *Leuconostoc mesenteroides,* respectively.

โครงการวิจัย : การเตรียมเชื้อเริ่มต้นเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการหมักโกโก้

II. บทบาทของจุลินทรีย์ที่เติมต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้หมัก

อรัญ หันพงศ์กิตติกูล[1], กนกอร อินทรพิเชษฐ[2] พูนสุข ประเสริฐสรรพ์[1], และ เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล[1]

1. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์ 90110

2. สำนักวิชาเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา 30000

บทคัดย่อ

ยีสต์ แบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแอซีติก เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการหมักเมล็ดโกโก้ การทดลองในห้องปฏิบัติการ จึงใช้ยีสต์ 3 ชนิด คือ *Saccharomyces cerevisiae, Candida sorbosa* และ *C. sake* เป็นจุลินทรีย์เริ่มต้นในการหมักเมล็ดโกโก้ 500 กรัม ในขวดแก้ว ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7วันพบว่า *S. cerevisiae* มีคุณสมบัติเหมาะสมในการหมักเมล็ดโกโก้มากที่สุด สามารถเจริญในกองหมักได้รวดเร็ว โดยมีจุลินทรีย์สูงสุดหลังจากหมักได้หนึ่งวันเป็น 3.26×10^9 โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ และให้อุณหภูมิของกองหมักเป็น 45.6 องศาเซลเซียส เมล็ดโกโก้ที่ได้มีค่าดัชนีการหมักเป็น 1.16 มีกรดทั้งหมด กรดแลกติก และกรดที่ระเหยได้ ร้อยละ 0.48 0.07 และ 0.12 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ และเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้มีสีน้ำตาล (10PR3/1,2) สูงสุดร้อยละ 78

ในการหมักเมล็ดโกโก้โดยใช้แบคทีเรียแลคติก 3 ชนิด คือ *Lactobacillus casei, Leuconostoc mesenteroides* และ *Streptococcus thermophilus* เป็นจุลินทรีย์เริ่มต้นในการหมักพบว่า *L.casei* มีคุณสมบัติเหมาะสมในการหมักมากที่สุด มีจุลินทรีย์เจริญได้ช้ากว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกอื่นๆ โดยมีจุลินทรีย์สูงสุดในหนึ่งวันหลังการหมักเป็น 1.74×10^7 โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ เมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักมีค่าดัชนีการหมักเป็น 0.98 มีกรดทั้งหมด กรดแลคติกและกรดที่ระเหยได้เป็นร้อยละ 0.48 0.08 และ 0.19โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ และเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้มีสีน้ำตาลสูงสุดร้อยละ 60

การหมักเมล็ดโกโก้โดยใช้จุลินทรีย์เริ่มต้นเป็นแบคทีเรียแอซีติก 3 ชนิด ได้แก่ *Acetobacter rancen, A. lovaniense* และ *Gluconobacter oxydan* พบว่า *A. rancen* มีความเหมาะสมในการหมักมากที่สุด โดยเจริญในกองหมักได้ดีกว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติกชนิดอื่นๆ และมีจุลินทรีย์สูงสุดในวันที่ 3 ของการหมักเป็น 7.00×10^7 โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ เมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักมีค่าดัชนีการหมักเป็น 0.99 มีกรดทั้งหมด กรดแลคติกและกรดที่ระเหยได้เป็นร้อยละ 0.52

0.02 และ 0.18 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ และเมล็ดโกโก้แห้งสีที่ได้มีน้ำตาลสูงสุดเป็นร้อยละ 60

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 โดยทั้งสองชุดการทดลองให้เมล็ดโกโก้ที่มีค่าดัชนีการหมักเป็น 1.13 และ 1.40 มีน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้เป็นร้อยละ 1.15 และ 1.20 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ มีกรดทั้งหมดและกรดที่ระเหยได้ต่ำ มีกรดแลคติกใกล้เคียงกับชุดการทดลองควบคุม ชุดการทดลองทั้งสองให้เมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลเป็นร้อยละ 82 และ 83 ตามลำดับ การใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมทั้งสองลักษณะดังกล่าวเติมในการหมักเมล็ดโกโก้ 50 กก. ในกล่องหมักที่หมักตามวิธีการหมักแบบพัฒนา ก็ให้ผลการทดลองเหมือนในขวดแก้ว โดยชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ทั้ง 2 แบบให้เมล็ดโกโก้ที่มีคุณภาพดีกว่าชุดการทดลองควบคุมซึ่งหมักโดยจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนจากธรรมชาติ และให้เมล็ดโกโก้แห้งที่มีสีน้ำตาลสูงเป็นร้อยละ 91 และ 90 ตามลำดับ

Project : Preparation of Starter Cultures for Industrial Fermentation of Cocoa
II. Roles of Inoculated Microorganisms on Quality of Fermented Cocoa Bean

Aran H-Kittikun[1], Kanok-orn Inthrapichet[2],Poonsuk Prasertsan[1], and Saowaluck Jitbunjerdkul[1].
1. Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Hat Yai 90110
2. School of food Technology, Suranaree University of Technology, Nakornratchasima 30000

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 seven days at 37 C with yeast, *Saccharomyces cerevsiae, Candida sorbosa* or *Candida sake* as starter culture (5% v/w) it was observed that *S. cerevisiae* produced the best results for cocoa fermentation. After one day of fermentation the yeast count was at the highest of 3.26×10^9 CFU/g while the temperature of the mass was 45.6°C. *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 a fermentation index of 1.16 and 78% of dry beans showed chocolate color (10PR3/1,2) in the cut tes.

When lactic acid bacteria, *Lactobacillus casei, Leuconostoc mesenteroides* or *Streptococcus thermophilus* were used as an inoculum *L.casei* was the best starter culture for cocoa fermentation. Although the lactic acid bacteria count was less than the other, after one day the count was 1.74x10 CFU/g. 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 a fermentation index of 0.98, and 60% of the dry beans showed chocolate color in the cut test.

When acetic acid bacteria *Acetobacter rancen, A.lovaniense* or *Gluconobacter oxydan* was used as starter culture *A. rancen* the culture for cocoa fermentation. The maximal growth was 7.00x10 CFU/g. 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 showed chocolate color in the cut test.

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 beginning or inoculated *S. cerevisiae* at the beginning followed by *A. rancen* after 24 hours provided cocoa beans with a higher fermentation index and lower concentration of total acid, lactic acid, and volatile acid compared to 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. After fermentation the dry beans fermented with *S. cerevisiae* and *A. rancen* in both conditions showed the cut test with 91% and 90% of chocolate color, respectively.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	I, III
Abstract	II, V
กิตติกรรมประกาศ	VI
สารบัญ	VII
สารบัญตาราง	X
สารบัญรูป	XII
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	3
ตรวจเอกสาร	4
1. พันธุ์โกโก้	5
2. กระบวนการหมักเมล็ดโกโก้	6
3. ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเมล็ดโกโก้	7
4. การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้	11
5. การใช้เชื้อเริ่มต้นในการหมักเมล็ดโกโก้	16
6. องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้และการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในระหว่างการหมัก	18
7. การทำแห้งและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีระหว่างการทำแห้ง	26
วัสดุอุปกรณ์	28
วัสดุ	28
1. ผลโกโก้	28
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ	28
3. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์	29
อุปกรณ์	29
1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	29
2. อุปกรณ์อื่น ๆ	30

	หน้า
ตอนที่ 1 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้	31
วิธีการ 1. สถานที่และเวลาที่ทำการหมักเมล็ดโกโก้	31
2. การหมักเมล็ดโกโก้	31
3. การเก็บตัวอย่าง	31
4. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดโกโก้จากการหมักชุดที่สอง	32
5. การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก	32
6. การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์	33
ผลการทดลองและวิจารณ์ตอนที่ 1	36
1. การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ทั้งหมดระหว่างการหมัก	36
2. คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ที่พบระหว่างการหมัก	40
3. การเปลี่ยนแปลงของยีสต์ระหว่างการหมัก	40
4. ชนิดของยีสต์ที่พบระหว่างการหมัก	44
5. การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียแอซิติกระหว่างการหมัก	48
6. ชนิดของแบคทีเรียแอซิติกที่พบระหว่างการหมัก	51
7. การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียแลคติกระหว่างการหมัก	51
8. ชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่พบระหว่างการหมัก	55
ตอนที่ 2 บทบาทของจุลินทรีย์ที่เติมต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้หมัก	60
วิธีการ 1. การเตรียมวัตถุดิบ : เมล็ดโกโก้	60
2. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์	60
3. การหมักเมล็ดโกโก้โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเดี่ยว	60
4. การหมักเมล็ดโกโก้โดยใช้เชื้อเริ่มต้นผสม	62
5. การหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักโดยใชเชื้อเริ่มต้นผสม	63
6. การวิเคราะห์	63
ผลการทดลองและวิจารณ์ตอนที่ 2	65
1. บทบาทของยีสต์ในการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ	62
2. บทบาทของแบคทีเรียแลคติกในการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ	72
3. บทบาทของแบคทีเรียแอซีติกในการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ	85
4. บทบาทของเชื้อเริ่มต้นผสมต่อการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัตการ	93
5. บทบาทของเชื้อเริ่มต้นผสมต่อการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก	110

หน้า

4. สรุป 125
สรุปตอนที่ 1 125
สรุปตอนที่ 2 127
เอกสารอ้างอิง 130
ผลงานที่ตีพิมพ์เผยแพร่ 139

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	ชนิดของยีสต์ที่แยกได้จากการหมักเมล็ดโกโก้	13
ตารางที่ 2	องค์ประกอบต่าง ๆ ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้สด	19
ตารางที่ 3	องค์ประกอบของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในเมล็ดโกโก้ที่ไม่ผ่านการอบแห้ง	21
ตารางที่ 4	องค์ประกอบของกรดอะมิโนในส่วนสกัดโปรตีนจากเมล็ดโกโก้	23
ตารางที่ 5	ชนิดของกรดที่ให้กลิ่นหอมที่พบในเมล็ดโกโก้	25
ตารางที่ 6	คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ที่พบระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ชุดที่หนึ่ง	41
ตารางที่ 7	คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ที่พบระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ชุดที่สอง	42
ตารางที่ 8	คุณภาพด้าน Cut Test ของเมล็ดโกโก้แห้งจากการหมักเมล็ดโกโก้ชุดที่สอง	56
ตารางที่ 9	การเปลี่ยนแปลงค่า Cut Test ของเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์ที่คัดเลือก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	73
ตารางที่ 10	องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักด้วยยีสต์ที่คัดเลือกที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	74
ตารางที่ 11	การเปลี่ยนแปลงค่า Cut Test ของเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	83
ตารางที่ 12	องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักด้วยแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	84
ตารางที่ 13	การเปลี่ยนแปลงค่า Cut Test ของเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียแอซีติก ที่คัดเลือก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	94
ตารางที่ 14	องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักด้วยแบคทีเรียแอซีติกที่คัดเลือก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	95
ตารางที่ 15	การเปลี่ยนแปลงค่า Cut Test ของเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	107
ตารางที่ 16	องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	108

หน้า

ตารางที่ 17	องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	109
ตารางที่ 18	การเปลี่ยนแปลงค่า Cut Test ของเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมในกล่องหมัก ที่อุณหภูมิห้อง	121
ตารางที่ 19	องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมในกล่องหมัก ที่อุณหภูมิห้อง	123
ตารางที่ 20	องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมในกล่องหมัก ที่อุณหภูมิห้อง	124

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1	การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้	37
รูปที่ 2	การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของกองหมักระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้	38
รูปที่ 3	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณกรดทั้งหมด (กรดซิตริก) ของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักชุดที่สอง	39
รูปที่ 4	การเปลี่ยนแปลงปริมาณยีสต์ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้	43
รูปที่ 5	การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส) ของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักชุดที่สอง	45
รูปที่ 6	ปริมาณและชนิดของยีสต์ที่แยกได้จากกองหมักเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักชุดที่หนึ่ง	46
รูปที่ 7	ปริมาณและชนิดของยีสต์ที่แยกได้จากกองหมักเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักชุดที่สอง	47
รูปที่ 8	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแอซีติกระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้	49
รูปที่ 9	การเปลี่ยนแปลงกรดที่ระเหยได้ (กรดแอซีติก) และกรดแลคติกของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักชุดที่สอง	50
รูปที่ 10	ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียแอซีติกที่แยกได้จากกองหมักเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักชุดที่หนึ่ง	52
รูปที่ 11	ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียแอซีติกที่แยกได้จากกองหมักเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักชุดที่สอง	53
รูปที่ 12	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลคติกระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้	54
รูปที่ 13	ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากกองหมักเมล็ดโกโก้ระหว่างกรุหมักชุดที่หนึ่ง	57
รูปที่ 14	ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากกองหมักเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักชุดที่สอง	58
รูปที่ 15	การเปลี่ยนแปลงดัชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักชุดที่สอง	59
รูปที่ 16	การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร PDA (A) และ TYGKCP (B) ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *S. cereviseae*, *C. sorbosa* หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	66

หน้า

รูปที่ 17	การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดและเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae, C. sorbosa* หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	67
รูปที่ 18	การเปลี่ยนแปลงกรดทั้งหมด กรดแลคติ ก และกรดที่ระเหยได้ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae, C. sorbosa* หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	69
รูปที่ 19	การเปลี่ยนแปลงดัชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae C. sorbosa* หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	71
รูปที่ 20	การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร MRS และ TYGKCP ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *L. casei, Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	76
รูปที่ 21	การเปลี่ยนแปลงอณหภูมิและพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดและเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *L. casei, Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	77
รูปที่ 22	การเปลี่ยนแปลงกรดทั้งหมด กรดแลคติก และกรดที่ระเหยได้ ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *L. casei, Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	79
รูปที่ 23	การเปลี่ยนแปลงดัชนีการหมัก ของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *L. casei, Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	82
รูปที่ 24	การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร DSM และ TYGKCP ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *A. rancen, A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	86
รูปที่ 25	การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดและเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *A. rancen, A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	88
รูปที่ 26	การเปลี่ยนแปลงกรดทั้งหมด กรดแลคติก และกรดที่ระเหยได้ ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *A. rancen, A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	90

หน้า

รูปที่ 27 การเปลี่ยนแปลงดัชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *A. rancen, A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 92

รูปที่ 28 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP PDA DSM และ MRS ในการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 97

รูปที่ 29 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมและพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดและเมล็ดโกโก้ระหว่าง การหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 99

รูปที่ 30 การเปลี่ยนแปลงกรดทั้งหมด กรดแลคติ กและกรดที่ระเหยได้ ในเมล็ดโกโก ระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 101

รูปที่ 31 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่าง การหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 103

รูปที่ 32 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ระหว่างการ หมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 104

รูปที่ 33 การเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีการหมักในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ ผสมชุดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 106

รูปที่ 34 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP PDA MRS และ DSM ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมในกล่องหมัก 111

รูปที่ 35 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดและเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมในกล่องหมัก 113

รูปที่ 36 การเปลี่ยนแปลงกรดทั้งหมด กรดแลคติกและกรดที่ระเหยได้ ในเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมในกล่องหมัก 115

รูปที่ 37 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมในกล่องหมัก 117

รูปที่ 38 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ระหว่าง การหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมในกล่องหมัก 119

รูปที่ 39 การเปลี่ยนแปลงดัชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมในกล่องหมัก 120

บทนำ

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

ประเทศไทยมีความต้องการผลิตภัณฑ์โกโก้เพิ่มสูงขึ้นทุกปี มีการนำเข้าทั้งในรูปเมล็ดโกโก้แห้งและผลิตภัณฑ์จากโกโก้ ช่วง 5 ปีที่ผ่านมาประเทศไทยมีการนำเข้าเพิ่มขึ้นในอัตราเฉลี่ยร้อยละ 60.2 ต่อปี (กสิกรไทย, 2534) ผลิตภัณฑ์ที่นำเข้าได้แก่ โกโก้เพสต์ ไขมันโกโก้ โกโก้ชนิดไม่หวาน ช็อกโกแลต และอาหารอื่น ๆ ที่ผสมโกโก้ ส่วนเมล็ดโกโก้แห้งมีการนำเข้าในปี พ.ศ. 2527 เท่านั้น หลังจากนั้นไม่มีการนำเข้าเมล็ดโกโก้แห้งอีก ขณะเดียวกันสามารถส่งออกเมล็ดโกโก้แห้งไปยังต่างประเทศตั้งแต่ปี พ.ศ. 2525 เป็นต้นมา ซึ่งมีปริมาณและมูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ กระทั่งในปี พ.ศ. 2532 มีการส่งออกเมล็ดโกโก้แห้งสูงถึง 10.1.43 ตัน เป็นมูลค่า 2.569 ล้านบาท นอกจากนี้ยังส่งออกในรูปของผลิตภัณฑ์โกโก้ เช่น ช็อกโกแลต ผงโกโก้ และอาหารปรุงแต่งอื่น ๆ ที่มีโกโก้ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร 2534) ตลาดส่งออกเมล็ดโกโก้และผลิตภัณฑ์โกโก้ที่สำคัญได้แก่ มาเลเซีย สิงคโปร์ ลาว ฮ่องกง และเวียดนาม (ยอดยิ่ง คงทอง, 2529; มณฑา ส.รัตนนูปถัมภ์, 2531)

โกโก้เป็นพืชเศรษฐกิจที่ได้รับการส่งเสริมและสนับสนุนจากรัฐบาลโดยมีเป้าหมายทั้งการพัฒนาการปลูกและการผลิตอย่างครบวงจร การส่งเสริมการปลูกโกโก้เริ่มขึ้นเมื่อ พ.ศ. 2522 ในจังหวัดกระบี่ ชุมพร และนครศรีธรรมราช (วิทย์ สุวรรณวุธ, 2527) การปลูกโกโก้นั้นทำได้สองลักษณะคือ ปลูกแบบพืชเดี่ยว และปลูกเป็นพืชแซมระหว่างพืชอื่น เช่น มะพร้าว ยางพารา และปาล์มน้ำมัน โดยทั่วไปเกษตรกรนิยมปลูกเป็นเป็นพืชแซมในสวนมะพร้าวมากที่สุด เพื่อเป็นการเสริมรายได้ให้แก่เจ้าของสวนมะพร้าว นอกจากนั้นการปลูกโกโก้ในสวนมะพร้าวยังมีผลให้มะพร้าวออกลูกดกขึ้น (มณฑา ส.รัตนนูปถัมภ์, 2531) ทั้งยังสามารถทดแทนการนำเข้าเมล็ดโกโก้ และผลิตภัณฑ์โกโก้ และเป็นแนวทางการส่งออกในอนาคต (กมลลักษณ์ โตสกุล, 2530; กสิกรไทย, 2534; วิทย์ สุวรรณวุธ, 2527) ในปัจจุบันประเทศไทยมีการปลูกโกโก้ในภาคใต้ ภาคตะวันออก และภาคกลางบางจังหวัด (สมศักดิ์ วรรณศิริ, 2532)

กรรมวิธีการผลิตเมล็ดโกโก้แห้งนั้นมีขั้นตอนที่สำคัญ คือ การหมักเมล็ดโกโก้ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเมล็ดโกโก้สด โดยเฉพาะสีและกลิ่นรส และขั้นตอนการอบแห้งเมล็ดโกโก้

ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้นั้น จะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกของเมล็ดโกโก้ คือเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ มีสีชมพูหรือสีขาว ต่อมาเมื่อเมล็ดโกโก้เกิดการหมักจะมีสีคล้ำขึ้น และเมือกจะหายไป การเปลี่ยนแปลงนี้เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ พร้อมกับมีการเปลี่ยนแปลงภายในเมล็ดโดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก และค่าพีเอชในเมล็ดโกโก้ที่เหมาะสม ทำให้เกิดกลิ่นรสช็อกโกแลตขึ้น (Wood, 1975)

การหมักโกโก้เป็นขั้นตอนที่สำคัญในการแปรรูปเมล็ดโกโก้ที่มีผลต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้ง และกลิ่นรสช็อกโกแลตในผลิตภัณฑ์สุดท้าย ซึ่งขึ้นกับขบวนการในการบ่มและการหมักเมล็ดโกโก้ (Forsyth and Quesnel, 1963) การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษาบทบาทของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในระหว่างการหมักที่มีผลต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้ ทำให้ทราบถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่มีบทบาทอย่างแท้จริงในขบวนการหมัก ซึ่งเป็นข้อมูลเบื้องต้น และเป็นแนวทางในการปรับปรุงกระบวนการผลิตโกโก้ให้ได้เมล็ดโกโก้แห้งที่มีคุณภาพดี และสม่ำเสมอ

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์และเคมีในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้
2. แยกและจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรียแลคติก แบคทีเรียแอซีติก และยีสต์
3. ศึกษาการใช้เชื้อเริ่มต้นที่คัดเลือกจากยีสต์ แบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแอซีติกต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์และทางเคมีของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักในขวดแก้ว
4. ศึกษาการใช้เชื้อเริ่มต้นที่คัดเลือกในกลุ่มของ ยีสต์ แบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแอซีติก ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์และทางเคมีของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักในกล่องหมัก โดยวิธีการหมักแบบพัฒนา
5. ศึกษาคุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่คัดเลือก

ตรวจเอกสาร

โกโก้เป็นพืชยืนต้นเจริญเติบโตได้ดีในภูมิอากาศเขตร้อนและชุ่มชื้น ระหว่างละติจูดที่ 20 องศาเหนือ ถึง 20 องศาใต้ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมระหว่าง 24 ถึง 29 องศาเซลเซียส ปกติโกโก้ต้องการปริมาณฝนตกสม่ำเสมอตลอดทั้งปี โกโก้เป็นพืชที่ไม่ต้องการแสงแดดมาก ส่วนใหญ่ต้องการร่มเงาจากพืชอื่น ดินที่เหมาะสมต่อการปลูกควรเป็นดินร่วนปนทรายมีอินทรียวัตถุมาก มีค่าพีเอชประมาณ 5.5-7.0 โกโก้เริ่มให้ผลเมื่ออายุได้ 2-3 ปี แต่ให้ผลิตสูงสุดในช่วง 8-15 ปี ผลโกโก้มีลักษณะคล้ายผลมะละกอ ดอกและฝักโกโก้ออกที่บริเวณตาของลำต้นและกิ่งแก่ ระยะเวลาตั้งแต่ออกดอกจนถึงผลสุกใช้เวลา 5-6 เดือน ผลโกโก้บางพันธุ์มีผิวเรียบ บางพันธุ์มีผิวขรุขระ ผลอ่อนมีสีเขียวแดง เมื่อแก่มีสีเหลืองอมชมพู ผลหนึ่ง ๆ มีเมล็ดอยู่ประมาณ 30-45 เมล็ดขึ้นกับพันธุ์โกโก้ (สมศักดิ์ วรรณศิริ, 2532; สิริ ชัยเสรี, 2535)

แหล่งปลูกโกโก้ในประเทศไทยที่สำคัญคือ ภาคใต้ของประเทศ นอกจากนั้นมีการปลูกในแถบชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก และภาคกลางอีกด้วย แต่ปัจจุบันการปลูกโกโก้เป็นพืชแซมในสวนมะพร้าวยังไม่ได้รับการจูงใจที่เพียงพอเนื่องจากมีผลตอบแทนต่ำ เมื่อเทียบกับการปลูกกาแฟ ยางพารา หรือปาล์มน้ำมัน ทำให้ผลผลิตโกโก้ภายในประเทศมีไม่เพียงพอกับความต้องการ แต่ละปียังต้องนำเข้าผลิตภัณฑ์โกโก้จากต่างประเทศเป็นมูลค่าสูง

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

เมล็ดโกโก้แห้งที่ได้ส่งเข้าสู่โรงงาน เพื่อแปรรูปเป็นโกโก้ผง โกโก้เหลว และช็อกโกแลต ผลผลิตที่ได้นี้ต่อไปถูกนำไปเป็นส่วนผสมหรือใช้ทำเป็นเครื่องดื่ม ขนมขบเคี้ยว ช็อกโกแลต ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตไอศครีมและผลิตภัณฑ์เบเกอรี จำพวกคุกกี้และเค้ก ผสมในลูกอมและลูกกวาดต่าง ๆ และใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง เช่นน้ำหอม ลิปสติก ใช้ผสมในอุตสาหกรรมบุหรี่และอุตสาหกรรมผลิตยาเป็นต้น (ผานิต งามกรณาธิการและวิทย์ สุวรรณวุธ, 2531; หน่วยวิจัยและพัฒนาการทำฟาร์มพัทลุง, 2531) นอกจากนั้นเปลือกโกโก้ยังใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ได้อีกด้วยเพราะมีปริมาณมาก มีแร่ธาตุสูง และมีปริมาณสารทรีโอโบรมีนต่ำ (Abiola and Tewe, 1991)

1. พันธุ์โกโก้

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

1.1 พันธุ์คริโอโล (Criollo)

เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตต่ำ ไม่มีความต้านทานต่อโรคและแมลง ผลมีสีแดงหรือสีเหลือง เปลือกผลบาง ผิวขรุขระ ก้นผลแหลม ผลยาว เมล็ดมีขนาดใหญ่มีสีขาว หรือ สีม่วงอ่อน มีกลิ่นและรสชาติที่เหมาะสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมผลิตช็อกโกแลต

1.2 พันธุ์ฟอรัสเทอโร (Forastero) มีด้วยกัน 2 กลุ่มใหญ่ คือ

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

ข. กลุ่ม อัปเปอร์ อเมซอน (Upper Amazon) เป็นพันธุ์ที่เจริญเติบโตได้รวดเร็วและให้ผลผลิตสูง ทนทานต่อโรคและแมลงบางชนิด กลายพันธุ์ได้ง่าย เพราะเป็นพันธุ์ที่ไม่สามารถผสมตัวเองได้ ผลเมื่อสุกมีสีเหลือง เมล็ดมีขนาดเล็กสีม่วง ขนาดของผลใกล้เคียงกับพันธุ์เวสแอฟริกัน อมีโลนาโด

1.3 พันธุ์ตรินิตาริโอ (Trinitario)

เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตช้า ผลและเมล็ดมีขนาดใหญ่ ก้นผลแหลม มีความต้านทานต่อโรคและแมลง เมล็ดมีคุณภาพสูงกว่าพันธุ์อมีโลนาโด แต่ให้ผลผลิตต่ำกว่า เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์คริโอโลกับพันธุ์ แอฟริกันอมีโลนาโด 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) ฝักโกโก้ที่เก็บมาจากต้นต้องนำมาผ่าแกะเอาเมล็ดออกจากฝักแล้วทำการหมัก เพื่อให้เกิดสารตั้งต้นของกลิ่นรสช็อกโกแลต ก่อนนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จากโกโก้ต่อไป (Wood and Lass, 1985)

2. กระบวนการหมักเมล็ดโกโก้

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

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

2.1 การบ่มบนแท่นตากแห้ง (Curing on Drying Platforms)

วิธีนี้ใช้กันมากในประเทศแถบแอฟริกา เช่น เอควาดอร์ โดยแกะเมล็ดโกโก้ออกจากเปลือกแล้วนำไปวางกองบนแท่นที่ใช้สำหรับตากแห้ง ในตอนกลางวันเกลี่ยเมล็ดโกโก้ให้กระจายเพื่อตากเมล็ด พอถึงกลางคืนทำการรวบรวมเมล็ดให้เป็นกองไว้อย่างเดิม (Lehrian and Patterson, 1983) แต่เมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักโดยวิธีนี้มีคุณภาพต่ำ (Rohan, 1963)

2.2 การหมักเมล็ดในเข่ง (Basket Fermentation)

เป็นวิธีการหมักที่ใช้กันมากในกลุ่มผู้ปลูกโกโก้รายย่อย โดยนำเมล็ดโกโก้ที่แกะออกจากฝักใส่ลงไปในเข่งที่รองรอบด้วยใบตองสด ขนาดบรรจุต่อเข่งมีตั้งแต่ 20 กิโลกรัม จนถึง 200 กิโลกรัมต่อเข่ง ปิดทับผิวหน้าเมล็ดโกโก้ในเข่งด้วยใบตองสด 2-3 ชั้น ระหว่างการหมัก 5-7 วันนั้น ทำการผสมกลับกองหมักเมล็ดโกโก้ด้วยการถ่ายลงเข่งใบอื่นเป็นระยะทุก ๆ 1 หรือ 2 วัน เมื่อครบกำหนดจึงนำเอาเมล็ดโกโก้ไปทำแห้ง (Wood and Lass, 1985) สำหรับชาวสวนโกโก้ในประเทศไทย พบว่าร้อยละ 78 ของเกษตรกร ใช้เข่งเป็นภาชนะบรรจุในการหมัก โดยทำการหมัก เป็นเวลา 5-7 วัน มีการกลับเมล็ดที่หมักทุก 2 วัน (ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก และคณะ, 2534)

2.3 การหมักกองสูงบนพื้น (Heap Fermentation)

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

2.4 การหมักในกล่องหรือลังไม้ (Box Fermentation)

การหมักแบบนี้ใช้กันในสวนขนาดใหญ่หรือในโรงงานรับซื้อเมล็ดโกโก้สด (มงคล ทัศนีย์ทิพากร, 2536) อย่างไรก็ตามระยะหลัง ได้มีการปรับปรุงขนาดของกล่องหมักให้เล็กลง เพื่อให้เหมาะสมกับสวนขนาดเล็ก 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 ภูมิภมร และคณะ, 2536)

2.5 การหมักในกะบะไม้หรือถาดไม้ (Tray Fermentation)

การหมักเมล็ดโกโก้ด้วยกะบะหรือถาดได้คิดค้นขึ้นเพื่อแก้ปัญหาจากการหมักโดยวิธีอื่นที่เมล็ดโกโก้ที่บริเวณตรงกลางกองหมักเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลช้ากว่าบริเวณผิวหน้าของกองหมัก เมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักโดยวิธีนี้มีคุณภาพสูงและยังเหมาะสมกับเมล็ดโกโก้ปริมาณน้อย ๆ อีกด้วย กะบะที่ใช้หมักมีหลายชนิด เช่น ขนาด 91x60x10 เซนติเมตร การหมักแต่ละครั้งต้องวางถาดหรือกะบะที่หมักซ้อนกันอย่างน้อย 8-12 ชั้น แล้วปิดทับถาดใบบนสุดด้วยใบตองหรือกระสอบป่านเพื่อให้เกิดความร้อนขึ้น การหมักกระทำโดยนำเมล็ดโกโก้ที่แกะจากฝักแล้วใส่ลงในกะบะไม้ที่เจาะรูด้านล่าง วางทิ้งไว้ 1 คืน ให้ของเหลวไหลออกมา วันที่สองจึงเอากะบะมาวางเรียงซ้อนแล้วคลุมทับกะบะด้วยใบตอง หรือกระสอบป่าน หรือถุงพลาสติก การให้อากาศแก่กองหมักทำโดยการย้ายกะบะที่อยู่บริเวณตรงกลางขึ้นไว้ด้านบนหรือลงไปไว้ด้านล่างสลับกับกะบะที่อยู่ด้านบนหรือด้านล่างที่นำมาไว้ตรงกลาง ระยะเวลาในการหมักประมาณ 4-7 วัน ขณะหมักหากเกิดกรดมากเกินไป แก้ไขได้โดยการเพิ่มความถี่ในการสลับเปลี่ยนกะบะให้มากขึ้น เมื่อหมักครบกำหนดแล้วจึงนำเมล็ดโกโก้ไปตากแห้งต่อไป (Lehrian and Patterson, 1983)

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเมล็ดโกโก้

ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการหมักเมล็ดโกโก้มีดังต่อไปนี้

3.1 ระยะเวลาในการหมัก

เวลาในการหมักเมล็ดโกโก้อยู่ในช่วง 2-12 วัน ซึ่งระยะเวลาที่แตกต่างกันนี้ขึ้นกับภูมิประเทศ ฤดูกาล สถานที่ ปริมาณของเมล็ดโกโก้ กรรมวิธีในการหมัก และพันธุ์ของโกโก้

(Roelofsen, 1958; Rohan, 1963) เช่นพันธุ์ครีโอโลซึ่งมีเมล็ดขนาดใหญ่ค่อนข้างกลม และมีสีขาว หรือพันธุ์ลูกผสมระหว่างเฟอรัสเตอโรกับครีโอโลที่มีเมล็ดเป็นสีม่วงจางหรือเป็นสีขาว ใช้เวลาในการหมักประมาณ 2-4 วัน หากเป็นเมล็ดพันธุ์เฟอรัสเตอโร ซึ่งมีขนาดเล็กแบน และมีสีม่วงจะใช้เวลาหมักประมาณ 4-12 วัน (Roelofsen, 1958)

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

Wood และ Lass (1985) พบว่าหากหมักเมล็ดโกโก้นานเกินไปทำให้แบคทีเรียกลุ่มย่อยสลายโปรตีนในสภาพไร้อากาศ (putrefactive bacteria) เจริญได้ มีผลให้เกิดกลิ่นรสของซ็อกโกแลตน้อยลง แต่หากระยะเวลาในการหมักสั้นเกินไปเมล็ดโกโก้ที่ได้มีสีม่วง และมีรสฝาดหรือขม

3.2 การให้อากาศแก่กองหมัก

การให้อากาศแก่กองหมักเมล็ดโกโก้มีผลให้เกิดการออกซิไดซ์ของเอทานอลที่สร้างขึ้นโดยยีสต์ในช่วงแรกของการหมักในสภาพไร้อากาศไปเป็นกรดแอซีติก ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาสั้น ๆ มีผลให้เกิดการสลายส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นของเหลว (Lehrian and Patterson, 1983)

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

Carr และคณะ (1979) ศึกษาการหมักเมล็ดโกโก้ สรุปว่าการให้อากาศแก่กองหมักมีอิทธิพลอย่างมากต่อการสร้างกรดแลคติก คือ ในระยะแรกของการหมัก เมื่อเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เกิดการพองตัวจะไปจำกัดช่องว่างภายในกองหมัก ทำให้อากาศแพร่เข้าไปได้น้อย ในสภาวะดังกล่าวกองหมักมีค่ารีดอกซ์โพเทนเชียลต่ำ กระบวนการสร้างกรดแลคติกผ่านวิถีไกลโคไลซีสเกิดขึ้นได้ มีผลให้แบคทีเรียแลคติกเจริญได้ดีกว่ายีสต์ แต่ถ้าภายในกองหมักมีอากาศจะทำให้ค่ารีดอกซ์โพเทนเชียลสูง ยีสต์สามารถเจริญได้ดีกว่า และทำให้เกิดการหมักได้เป็นแอลกอฮอล์

การให้อากาศในระยะหลังของการหมักช่วยให้การเกิดออกซิเดชันของกรดแอซีติกเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (Carr, *et al;* 1979) นอกจากนั้นการกดทับเมล็ดโกโก้ก่อนการหมักเพื่อขจัดของเหลวในเยื่อหุ้มเมล็ดออกไป หรือการให้อากาศตั้งแต่ตอนเริ่มต้นการหมักสามารถลดความเป็นกรดของเมล็ดลงได้อีกด้วย (Chong, *et al.*, 1978)

Biehl และคณะ (1990) ทดลองนำเมล็ดโกโก้มาผึ่งแดดหรืออบด้วยความร้อนก่อนการหมัก พบว่าสามารถช่วยลดความเป็นกรดของเมล็ดลงได้ ทั้งยังช่วยลดปริมาณเยื่อหุ้มเมล็ด และน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดลง เมื่อนำเมล็ดโกโก้ไปหมักทำให้กองหมักมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเร็วกว่าปกติ เพราะกองหมักในช่วงแรกไม่มีสภาพไร้อากาศ ทั้งยังช่วยลดปริมาณกรดแอซีติก ทำให้เมล็ดโกโก้มีความเป็นกรดลดลง

3.3 ขนาดของกองหมักและปริมาณของเมล็ดโกโก้ที่ใช้หมัก

ปริมาณเมล็ดโกโก้ที่ใช้หมักมีผลต่ออัตราการให้อากาศแก่กองหมัก หากกองหมักมีขนาดใหญ่บริเวณผิวหน้าของกองหมักมีการถ่ายเทอากาศดีกว่า เป็นผลให้อุณหภูมิบริเวณผิวหน้าของกองหมักเพิ่มขึ้นเร็วกว่าบริเวณกลางกองหมัก ถ้ากองหมักมีขนาดเล็กมากทำให้อากาศสามารถแพร่เข้าสู่กองหมักได้ดีกว่า ความร้อนที่เกิดจากการเพิ่มกิจกรรมของจุลินทรีย์จะแพร่ออกจากกองหมักได้ง่าย (Lehrian and Patterson, 1983) การหมักเมล็ดโกโก้ปริมาณน้อย ๆ ให้ได้ผลดี คือ ควรกลับกองหมักให้น้อยครั้งและควรทำฉนวนหุ้มภาชนะหมักเพื่อลดการสูญเสียความร้อน (ประพันธ์ บุญกลิ่นขจร และคณะ, 2529; Glossop, 1983) Rohan (1963) กล่าวว่าในการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยกล่องหมัก ความลึกของกองหมักไม่ควรเกิน 90 เซนติเมตร หากลึกมากไปทำให้บริเวณกองกลางหมักไม่เกิดการหมักหรือเกิดขึ้นได้น้อย การเพิ่มขึ้นของความร้อนในกองหมักนั้นพบว่าหากมีการเพิ่มอย่างช้า ๆ ให้เมล็ดโกโก้แห้งที่มีกลิ่นรสช็อกโกแลตดีกว่าการที่ความร้อนของกองหมักเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Biehl, *et al.*, 1985)

3.4 การกลับกองหมักหรือการคนเมล็ดโกโก้ที่หมัก

การกลับกองหมักเป็นวิธีการผสมเมล็ดโกโก้ให้สัมผัสกับอากาศ และช่วยให้อากาศแพร่เข้าสู่ภายในกองหมักได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนั้นยังทำให้กองหมักมีการผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ป้องกันการจับกันเป็นก้อนของเมล็ดโกโก้ และป้องกันการเกิดเชื้อราบริเวณผิวหรือมุมอับของกองหมัก วิธีการในการกลับกองหมักแต่ละช่วงเวลาในการกลับกองหมักนั้นแตกต่างกันไปขึ้นกับวิธีการหมักเมล็ดโกโก้ 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 และคณะ (1981) ศึกษาผลของการกลับกองต่อการให้อากาศ โดยการวัดปริมาณออกซิเจนในกองหมักผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การกลับกองหมักในช่วง 3 วันแรกของการหมัก มีผลต่อการเพิ่มของออกซิเจนในกองหมัก การกลับกองหมักทุกวันไม่จำเป็นในการเพิ่มออกซิเจนแก่กองหมัก และยังทำให้อุณหภูมิของกองหมักลดลงอีกด้วย ซึ่งทำให้อัตราการเกิดเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์

3.5 ความล่าช้าระหว่างการเก็บเกี่ยวและการแกะฝักโกโก้

การเก็บฝักโกโก้ไว้ก่อนการหมักมีผลต่อการหมักคือ ทำให้อุณหภูมิของกองหมักเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Rohan, 1963; Wood and Lass, 1985) เพราะการเก็บฝักโกโก้ไว้ทำให้มีการสูญเสียความชื้น ช่วยให้อากาศแพร่เข้าไปภายในกองหมักได้ง่ายขึ้น ทั้งยังช่วยลดปริมาณน้ำและของแข็งในเมล็ดโกโก้ลง ซึ่งเป็นผลจากการระเหย และ กระบวนการออกซิเดชันของน้ำตาลกลูโคส (Biehl et al; 1989) และทำให้เวลาในการหมักลดลง (Lehrian and Patterson, 1983) Dougan (1980) พบว่าการเก็บฝักโกโก้ก่อนการหมัก ทำให้การสร้างกรดและการแพร่ของกรดเข้าไปในเมล็ดโกโก้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยกรดแอซีติกในเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากผลโกโก้ทั้งที่ผ่านการเก็บฝักไว้ 1 สัปดาห์ และไม่ผ่านการเก็บไว้มีค่าไม่แตกต่างกัน แต่ปรากฏว่าปริมาณกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการเก็บฝักโกโก้ไว้ก่อนการหมัก 1 สัปดาห์ มีค่าสูงกว่าเมล็ดโกโก้ที่ไม่ได้เก็บฝักไว้ก่อนการหมัก

Berbert (1979) และ Biehl และคณะ (1989) กล่าวว่าการเก็บฝักโกโก้ไว้ก่อนทำการหมักเป็นสาเหตุให้เกิดการสูญเสียน้ำตาลซูโครสจากปฏิกิริยาอินเวอชัน (inversion) ได้สูงถึงร้อยละ 25 ของน้ำตาลซูโครสในเมล็ด ทั้งยังมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ เป็นผลให้เมล็ดแห้งลง แต่มีรายงานของนักวิจัยหลายท่านที่กล่าวว่าคุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากการเก็บฝักโกโก้ไว้ก่อนการหมัก และเมล็ดโกโก้ที่ไม่ผ่านการเก็บฝักไว้ก่อนนั้นไม่มีความแตกต่างกัน (Howat, *et al.*, 1957; Chong, *et al.*, 1978) รีย์ต่ำ Lopez (1979) รายงานว่าการแยกเอาเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้บางส่วนออก ก่อนทำการหมักมีผลให้เวลาในการหมักสั้นลง ทำให้อุณหภูมิของกองหมักเพิ่มขึ้นเร็วกว่า และปริมาณกรดที่ระเหยได้ในเมล็ดโกโก้ที่แยกเอาเยื่อหุ้มเมล็ดออกบางส่วนมีค่าสูงกว่าชุดควบคุมเล็กน้อย ส่วนค่าพีเอช ของเมล็ดโกโก้ที่แยกเอาเยื่อหุ้มเมล็ดออกบางส่วนนั้น มีค่าสูงกว่าชุดควบคุม ซึ่งหมายถึงว่ามีการสร้างกรดชนิดอื่นที่ไม่ใช่กรดแอซีติก เช่น กรดแลคติก

Abdul Samah และคณะ (1993) ได้เปรียบเทียบการหมักเมล็ดโกโก้ที่ได้จากฝักแก่เต็มที่เปรียบเทียบกับฝักโกโก้ที่ยังไม่แก่เต็มที่ ในกล่องหมักเป็นเวลา 6 วัน พบว่าเมล็ดโกโก้จากฝักที่แก่จัด มีกรดแอซีติกสูงกว่า (15.70 มิลลิกรัมต่อเมล็ดโกโก้ และ 11.00 มิลลิกรัมต่อเมล็ดโกโก้ ตามลำดับ) และให้ค่า cut test ของเมล็ดสีน้ำตาลเป็นร้อยละ 40 ขณะที่เมล็ดจากฝักที่ไม่แก่เต็มที่มีค่าเพียงร้อยละ 27 และระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้จากฝักที่ไม่แก่เต็มที่จะมีเชื้อราที่สร้างเส้นใยเจริญมากกว่าเมล็ดโกโก้ที่แก่เต็มที่

3.6 การตายของเมล็ดโกโก้

ในระหว่างที่ทำการหมัก เมื่อเมล็ดโกโก้สูญเสียการงอกทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ไปกระตุ้นให้มีการรวมตัวกันของสารตั้งต้นและเอนไซม์ต่าง ๆ ในเมล็ดโกโก้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่เป็นสารตั้งต้นของกลิ่นรสช็อกโกแลตขึ้น ในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการหมัก เมล็ดโกโก้สร้างเอทานอลและกรดแอซีติกขึ้น มีปริมาณสูงถึงร้อยละ 3.5 และร้อยละ 0.4 ตามลำดับ (Wadsworth and Howet, 1954) ซึ่งเป็นระดับที่สามารถทำลายการงอกของเมล็ดโกโก้ได้ และการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิของการหมักนั้นมีผลทำลายการงอกของเมล็ดน้อยกว่าการเพิ่มขึ้นของเอทานอลและกรดแอซีติกในขณะหมักเมล็ดโกโก้ (Jinap, 1989; Quesnel, 1965a; Roelofsen,, 1958) แต่อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นถึง 45-50 องศาเซลเซียสสามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดโกโก้ที่หมักได้เช่นกัน (Carr, 1985)

Lopez และคณะ (1979) กล่าวว่าใบเลี้ยงของเมล็ดโกโก้ เป็นแหล่งสารประกอบคาร์บอนที่สำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเมล็ดโกโก้ ที่เปลี่ยนเป็น เอทานอล กรดแอซีติก และน้ำตาล บางชนิดเมื่อเมล็ดตายลง นอกจากนี้น้ำที่อยู่ในเมล็ดในของโกโก้จะเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 35 ในขณะเก็บเกี่ยว เป็นร้อยละ 40 หลังจากที่เมล็ดสูญเสียการงอก

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

4. การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

4.1 แหล่งของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในธรรมชาติ

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

มีกลุ่มนักวิจัยหลายท่านได้ศึกษาและจำแนกกลุ่มของจุลินทรีย์ที่พบในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ ซึ่งพบว่า ยีสต์ แบคทีเรียแลคติกและแบคทีเรียแอซีติก มีบทบาทสำคัญต่อการหมักเมล็ดโกโก้ (Carr, 1982; 1985; Ostovar and Keeney, 1973; Passos, *et al:* 1984; Rombuots, 1952)

แหล่งปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในการหมัก เช่น มาจากมือคนงาน จากกล่องหมักเก่า ๆ จากเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ และเปลือกโกโกแห้ง หรือจากมีดที่ใช้ผ่าฝักโกโก้ (Ostovar and Keeney, 1973) มีรายงานว่ายีสต์บางชนิดมีการปนเปื้อนมาจากใบและดอกของโกโก้ (Lehrian and Patterson, 1983) จุลินทรีย์แต่ละชนิดที่พบในการหมักนั้นมีปริมาณแตกต่างกันไป แต่เมื่อแกะฝักโกโก้ออกยีสต์มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว De Camargo และคณะ (1963) รายงานว่าปริมาณของจุลินทรีย์เริ่มต้นของการหมักเมล็ดโกโก้มีประมาณ $1.5x10^9$ เซลล์ต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการปฏิบัติต่อเมล็ดโกโก้ก่อนการหมัก Ostovar และ Keeney (1973) พบว่าจุลินทรีย์เริ่มต้นในการหมักเมล็ดโกโก้มีประมาณ $2.3x10^5$ เซลล์ต่อกรัมเมล็ดโกโก้ และจุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวของฝักโกโก้ส่วนใหญ่เป็น *Micrococcus luteus* และจุลินทรีย์ที่แยกได้จากมือคนงานเป็นพวก *Echerichia coli, Aerobacter aerogenes, Bacillus megaterium* และยีสต์

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

4.2 ยีสต์

ยีสต์เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่พบได้มากที่สุดในช่วงระยะ 1-2 วันแรกของการหมัก กระบวนการหมักของยีสต์มีการใช้น้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้อย่างรวดเร็วนอกจากได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอทานอลแล้ว ยังได้กรด เอสเทอร์ กลีเซอรอล และสารประกอบอัลดีไฮด์อีกด้วย ยีสต์มีการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเพกตินออกมาย่อยสลายเยื่อหุ้มเมล็ดเกิดเป็นของเหลว กระบวนการเมตาบอลิซึมของยีสต์เกิดกรด ซิตริก ทำให้พีเอชของเมล็ดโกโก้ลดลงเป็นประมาณ 4.0 (Roelofsen, 1958)

สภาวะการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ของการหมักเมล็ดโกโก้ อันได้แก่ การกวนหรือการให้อากาศ ค่าพีเอชของกองหมัก ความเข้มข้นของเอทานอล และปริมาณสารตั้งต้นในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เป็นปัจจัยที่ส่งเสริมให้ยีสต์แต่ละชนิดเจริญได้ในการหมักแต่ละครั้งแตกต่างกันไป ยีสต์ชนิดต่าง ๆ ที่พบได้ในการหมักเมล็ดโกโก้แสดงดังตาราง 1

ยีสต์ที่พบในการหมักเมล็ดโกโก้นั้นไม่ได้เจริญพร้อมกัน แต่จะเจริญตามกันขึ้นอยู่กับสภาวะ ความเหมาะสมกับยีสต์แต่ละชนิด ขึ้นอยู่กับการกลับกองหมักเมล็ดโกโก้ ยีสต์บางกลุ่ม เช่น *Saccharomyces* spp. เจริญได้ดีเมื่อมีน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้สูง และมีความเข้มข้นออกซิเจนในระดับต่ำ แต่ในทางตรงกันข้าม *Candida krusei* เจริญได้ดีในสภาพที่มีอากาศ และใช้เอทานอลเป็น

แหล่งคาร์บอนได้ (Lehrian and Patterson, 1983) ยีสต์ที่เจริญในที่ที่มีอุณหภูมิสูงเป็นกลุ่มที่เจริญได้ดีในสภาวะที่ความร้อนของกองหมักสูงสุด ขณะที่ยีสต์ที่เจริญในช่วงอุณหภูมิปกติเจริญได้ดีและมีมากในช่วงแรกของการหมัก ซึ่งพบได้บริเวณกลางกองหมักช้ากว่าบริเวณผิวกองหมัก

ตาราง 1 ชนิดของยีสต์ที่แยกได้จากการหมักเมล็ดโกโก้

ยีสต์ที่พบ	เอกสารอ้างอิง	ยีสต์ที่พบ	เอกสารอ้างอิง
Candida sp.	(1) , (2)	*P. fermentans*	(2) , (5) , (6)
C. catenulata	(6)	*P membranaefaciens*	(2), (5), (6)
C. krusei	(2) , (6)	*Rhodotorula* sp.	(1)
C. mycoderma	(2)	*Saccharomyces* sp.	(2) , (6)
C. parapsilosis	(2)	*S. carlsbergensis*	(2)
C. sake	(7)	*S. cerevisiae*	(2)
C. sorbosa	(7)	*S. cerevisiae* var.	(6)
C. tropicalis		*ellipsoideus*	
Debrayomyces sp.	(7)	*S. chevalieri*	(3)
Endomycopsis javanensis	(1)	*S. rosei*	(5)
Geotrichum candidum	(4)	*Schizosaccharomyces* sp.	(1)
Hanseniaspors sp.	(2) , (4)	*S. pombe*	(6)
Hansenula sp.	(1)	*Trichosporon cutaneum*	(5)
H. anomala	(1)	*T. pullulans*	(6)
Kloeckera sp.	(5) , (6)	*Torulopsis* sp.	(1) , (2)
K. apiculata	(1)	*T. candida*	(3) , (4)
Pichia sp.	(2), (5), (6)	*T. castellii*	(3)
P. farinosa	(1)	*T. holmii*	(3)
	(6)	*T. rosei*	(6)

ที่มา : (1) Carr และคณะ (1979)

(2) De Carmago และคณะ (1963)

(3) Gauthier และคณะ (1977) อ้างโดย Lehrian, และ Patterson, (1983)

(4) Maravalhas (1966)

(5) Martelli และ Dettmar (1961)

(6) Rombouts (1952)

Carr และคณะ (1979) 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-ไค-และไตร-กาแลคทูโรนิก (Fogarty and Kelly, 1983)

อรพิน ภูมิภมร และคณะ (2536) ศึกษาการหมักเมล็ดโกโก้ในเข่งหมัก และในลังไม้เป็นเวลา 6 วัน โดยกลับกองหมักวันละครั้งในระยะสองวันแรกของการหมัก พบว่ายีสต์ที่เจริญในกองหมักเมล็ดโกโก้เป็นกลุ่มที่เจริญได้ในช่องอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic yeasts) ซึ่งจะพบได้ในปริมาณมากในช่วงแรกของการหมัก ประมาณ $1.60x10^{6}$ CFU ต่อกรัมเมล็ดโกโก้หลังจากนั้นยีสต์จะมีปริมาณลดลง

4.3 แบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกสามารถพบได้ตลอดการหมักมีทั้งกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเตตีฟซึ่งเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดแลคติกด้วยวิถีไกลโคลิซีส และกลุ่มเฮทโทโรเฟอร์เมนเตตีฟซึ่งเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดแลคติก เอทานอล กรดแอซีติก และคาร์บอนไดออกไซด์ แบคทีเรียแลคติกเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มไมโคร แอโรไฟล์ (microaerophile)เจริญได้ดีในสภาพที่มีความเข้มข้นออกซิเจนต่ำหรือมีออกซิเจนอยู่แต่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูง ซึ่งสภาวะดังกล่าวนี้เกิดขึ้นในช่วงที่เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์และยุบตัวลง รวมทั้งยีสต์มีปริมาณลดลงด้วย แบคทีเรียแลคติกพบได้สูงในวันแรกของการหมัก เนื่องจากกองหมักมีสภาพไร้อากาศ (Passos, *et al.*, 1984; Wood, and Lass, 1985) แบคทีเรียแลคติกที่พบในการหมักเมล็ดโกโก้ส่วนใหญ่อยู่ในสกุลแลคโตบาซิลลัส อันได้แก่ *Lactobacillus lactis, L. bulgaricus, L. acidophilus, L. casei, L. plantarum, L. fermentum, L. fermenti,* นอกจากนี้พบ *Leu. mesenteroides* และในช่วงสุดท้ายของการหมักมีแบคทีเรียกลุ่ม Streptococcaceae เจริญได้ในปริมาณสูง (Lehrian and Patterson, 1983)

4.4 แบคทีเรียแอซีติก

แบคทีเรียแอซีติกเจริญได้รวดเร็วและมีปริมาณมากที่สุด เมื่อเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เกิดการย่อยสลาย และมีการให้อากาศเพียงพอ โดยเฉพาะหลังจากที่ยีสต์กับแบคทีเรียแลคติกมีจำนวนลดลง แบคทีเรียแอซีติกมี 2 สกุล คือ สกุล *Gluconobacter* ซึ่งสามารถออกซิไดซ์เอทานอล เป็นกรดแอซีติกได้ แต่ไม่สามารถออกซิไดซ์กรดแอซีติกไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ และสกุล *Acetobacter* ซึ่งสามารถใช้น้ำตาลเฮกโซส และกลีเซอรอลได้ที่พีเอช 4.5-7.0 สามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดแอซีติกและกรดแอซีติก ถูกออกซิไดซ์ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ (Krieg and Hott,1986) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียแอซีติกกลุ่มนี้ประมาณ 30 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 5-42 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.5-6.3 และเจริญได้ตั้งแต่พีเอช 4.0-7.0 (Lehrian and Patterson, 1983) ส่วน อรพิน ภูมิภมร และคณะ (2536) พบว่าแบคทีเรียที่

ผลิตกรดแอซีติกเป็นกลุ่มที่เจริญในช่วงอุณหภูมิปานกลางเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเป็นพวก low mesophilic bacteria ส่วนกลุ่มที่เป็น high mesophilic bacteria คือเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส นั้นมีน้อย

Carr และคณะ (1980) แยก *Acetobacter rancen, A. xylinum* และ *A. ascendens* จากการหมักเมล็ดโกโก้ในประเทศกานา และแยก *A. rancen, A. xylinum, A. lovaniensis* ได้จากการหมักเมล็ดโกโก้ในประเทศมาเลเซีย แบคทีเรีย *A. rancen* และ *A. ascendens* มีคุณสมบัติที่สามารถออกซิไดซ์เอทานอลและสารแลคเตตได้ (Stanier, *et al.*, 1986) และจากการศึกษาพบ *Gluconobacte oxydan* ในกองหมักเมล็ดโกโก้ในระยะแรกของการหมักเท่านั้น (Carr, *et al.*, 1980)

Ostovar และ Keeney (1973) แยก *A. aceti* และ *A. suboxydans* ได้จากการหมักเมล็ดโกโก้แบบกล่องหมัก นอกจากนั้นยังแยก *A. roseum* ได้จากการหมักเมล็ดโกโก้เช่นกัน แต่จุลินทรีย์นี้ไม่สามารถออกซิไดซ์กรดแอซีติกได้ แบคทีเรียแอซีติกสามารถพบได้ตลอดเวลาการหมักเมล็ดโกโก้ (Roelofsen, 1958) การเจริญของแบคทีเรียแอซีติกทำให้อุณหภูมิของกองหมักสูงขึ้นถึงประมาณ 50 องศาเซลเซียส หรือมากกว่านั้น มีการสร้างกรดต่าง ๆ ขึ้น เป็นสาเหตุทำให้เมล็ดโกโก้ตายและมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาเคมีในเมล็ดโกโก้ เกิดสารตั้งต้นก่อให้เกิดกลิ่นรสช็อกโกแลตขึ้นมา (Wood and Lass, 1985)

4.5 จุลินทรีย์อื่น ๆ

ในระยะสุดท้ายของการหมักเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นและอุณหภูมิลดลง หรือในขณะทำแห้ง 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 เนื่องจากไปเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดซ์กรดแอซีติกและกรดแลคติก (Ostovar and Keeney, 1973) นอกจากนี้ยังพบ *Zymomonas mobilis* ได้ในสภาวะที่เมล็ดโกโก้มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง (Carr, *et al.*, 1979) สำหรับจุลินทรีย์กลุ่ม *Actinomyces* หากเจริญในกองหมักจะทำให้เมล็ดโกโก้เกิดการเน่าเสียระหว่างการหมัก และเป็นสาเหตุให้เกิดกลิ่นเหม็นอับ และมีรสชาติที่ผิดปกติ (De Carmago, *et al.*, 1963)

นอกจากนี้ยังอาจพบรากลุ่มที่สร้างเส้นใยได้ในกองหมักเมล็ดโกโก้ซึ่งทำให้เกิดการเสื่อมเสียต่อเมล็ดโกโก้ Roelofsen (1958) ได้ให้ข้อสังเกตถึงราที่พบในกองหมักว่าสามารถย่อยสลายส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดและเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ (shell) และมีผลต่อการเกิดกลิ่นรสที่ผิดปกติของเมล็ดโกโก้ ปัจจัยสำคัญที่เป็นตัวกำหนดชนิดและปริมาณของเชื้อราที่พบในกองหมักได้แก่ ช่วงฤดูกาล ลักษณะอุณหภูมิ และการเก็บรักษาฝักโกโก้

5. การใช้เชื้อเริ่มต้นในการหมักเมล็ดโกโก้

ปกติแล้วในกองหมักเมล็ดโกโก้มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถเจริญได้ แต่มีจุลินทรีย์น้อยชนิดที่มีบทบาทอย่างแท้จริงในการหมัก จุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่พบอาจเป็นจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่ไม่มีผลต่อการหมักซึ่งในกระบวนการหมักไม่สามารถขจัดออกได้ (นภา โล่ทอง, 2534) มีการศึกษาต่าง ๆ พยายามคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการหมักเมล็ดโกโก้ แล้วทำการเติมจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้กลับลงไปในการหมักเมล็ดโกโก้เพื่อพัฒนาคุณภาพของเมล็ดโกโก้ ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีการศึกษาทางด้านนี้มากที่สุด การเติมยีสต์ลงไปในการหมักเมล็ดโกโก้ครั้งแรก ๆ ทำเพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรียแอซีติก หรือเพิ่มระยะการเจริญของยีสต์ให้นานขึ้น โดยอาจเติมในรูปของยีสต์บริสุทธิ์หรือเชื้อผสมลงไป 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 48 ชั่วโมง แล้วบ่มต่อที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าในตอนสุดท้ายเมล็ดบวมขึ้น และมีของเหลวสีน้ำตาลอยู่ภายใน เนื้อเมล็ดมีสีม่วงจาง เมื่อนำไปอบแห้งแบบเดียวกับชุดแรก เมล็ดแห้งที่ได้ไม่จับแน่นกับผนังหุ้มเมล็ดและมีสีน้ำตาลเข้ม เมล็ดโกโก้ทั้ง 2 ชุดการทดลองเมื่อทำเป็นช็อกโกแลตให้กลิ่นรสช็อกโกแลตที่ไม่แตกต่างกัน Roelofsen (1958) ศึกษาการหมักเมล็ดโกโก้ในประเทศกานา โดยเติมผงเชื้อยีสต์ *Zygosaccharomyces marxianus* (Hensen), *S. fragrans* (Beijerinck) และ *S. cerevisiae* (Hensen) ซึ่งเป็นยีสต์ที่แยกได้จากการหมักเมล็ดโกโก้และสามารถย่อยสลายเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ได้ พบว่ายีสต์ทั้ง 2 ชนิดสามารถย่อยสลายเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ 1,000 กิโลกรัม ซึ่งมีปริมาณของยีสต์อยู่เท่ากับ $4.0x10^6$ เซลล์ต่อเมล็ดโกโก้ 1 เมล็ด ในขณะที่จุลินทรีย์อื่นมีปริมาณเพียง $2.0x10^6$ เซลล์ต่อเมล็ดโกโก้ 1 เมล็ด การหมักโดยการเติมยีสต์นั้นทำให้อุณหภูมิของการหมักเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ช่วงเวลาที่ยีสต์เจริญเป็นกลุ่มเด่นนานขึ้นและเยื่อหุ้มเมล็ดถูกย่อยสลายได้ดีกว่าปกติ อย่างไรก็ตาม หลังจากหมักได้ 2 วันแล้วองค์ประกอบของจุลินทรีย์ก็กลับเข้าสู่สภาพปกติอีก และเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้ไม่มีความแตกต่างจากชุดการหมักที่ไม่มีการเติมเชื้อ เว้นแต่ผนังหุ้มเมล็ดนั้นมีสีแดงกว่าปกติ

Sanchez และคณะ (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* เมื่อทดสอบการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสของช็อกโกแลตที่ได้ด้วยวิธี triangle tests พบว่าทั้งสองชุดการทดลองมีคุณภาพดีกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมจุลินทรีย์ อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนชุดการทดลองที่เติม *K. fargilis* ให้ผลิตภัณฑ์โกโก้ที่ไม่ดี และจุลินทรีย์ชนิดนี้ถูกปนเปื้อนได้ง่าย ช็อกโกแลตที่ได้มีคุณภาพทางประสาทสัมผัสต่ำกว่าชุดควบคุม

Sanchez และคณะ (1985) 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* สามารถใช้ในการหมักและให้เมล็ดโกโก้มีคุณภาพดีเช่นกัน แต่ *Candida norvegensis* นั้นจะสูญเสียประสิทธิภาพการหมักในสภาพที่มีอากาศ เช่นเดียวกับ *Brettanomyces* spp. 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 เมื่อเทียบกับชุดทดลองทั้งหมดในวันที่ 3 ของการหมัก การเติม *Brettanomyces claussenii* C-Y-31-2-2 ในระยะแรกของการหมักมีแนวโน้มให้เมล็ดโกโก้ที่มีคุณภาพดี แต่ไม่ช่วยลดเวลาการหมักลง และไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแอซีติกทั้งสองชุดการทดลองให้ช็อกโกแลตที่มีความแตกต่างจากชุดควบคุมในชุดแรกถึงแม้ให้เมล็ดโกโก้ที่มีคุณภาพใกล้เคียงกับชุด

ควบคุม แต่ช็อกโกแลตที่ได้มีความเป็นกรด และมีรสขมมากกว่าชุดควบคุม ทำให้การยอมรับทางประสาทสัมผัสต่ำกว่าช็อกโกแลตจากชุดควบคุม ส่วนช็อกโกแลตที่ได้จากชุดที่สองนั้นมีคุณภาพการยอมต่างจากชุดควบคุมแต่มีคุณภาพดีกว่าชุดการทดลองแรก ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องจากในขณะหมักกองหมักชุดที่ 2 มีอุณหภูมิสูงสุดในช่วง 2 วันแรกของการหมัก และมีความเป็นกรดสูงสุดในวันที่ 3 ของการหมัก

Abdul Samah และคณะ (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 และคณะ (1993) ศึกษาการเติม *Acetobacter xylinum* ในการหมักเมล็ดโกโก้ เปรียบเทียบกับการหมักตามปกติ ใช้เชื้อเริ่มต้นประมาณ $1x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ฉีดพ่นลงบนเมล็ดโกโก้ 10 กิโลกรัม บ่มเป็นเวลา 6 วัน พบว่าเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียมีค่าพีเอชต่ำกว่าชุดควบคุมตลอดการหมัก และเมล็ดโกโก้จากชุดที่เติมแบคทีเรียแอซีติกมีปริมาณกรดแอซีติกสูงกว่า ทั้งยังมีกลิ่นรสต่ำกว่าชุดควบคุม

6. องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ และการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในระหว่างการหมัก

การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้นั้น มีทั้งการเปลี่ยนแปลงในเยื่อหุ้มเมล็ดซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงภายนอก และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในเมล็ดโกโก้ เป็นผลให้เอนไซม์ต่าง ๆ ในเมล็ดโกโก้เกิดกิจกรรมขึ้น มีการสร้างสารต่างๆ ที่เป็นสารตั้งต้นของกลิ่นรสช็อกโกแลตขึ้นมา

6.1 การเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้

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

Quesnel(1968)กล่าวว่าการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในกองหมักเมล็ดโกโก้นั้นมีความสัมพันธ์กับความเป็นกรดและการเพิ่มขึ้นของพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้สดมีพีเอชประมาณ 3.5-4.0 ตลอดการหมักพีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 5.0-6.5 เป็นผลจากปัจจัย 2 ประการ ประการแรกคือ มีการสร้างกรดแลคติก และกรดแอซีติกขึ้นมา ซึ่งมีความแรงของการแตกตัวน้อยกว่ากรดซิตริก ทั้งยังเกิดการออกซิไดซ์ขึ้นกับกรดซิตริก และประการที่สองคือการให้อากาศแก่กองหมักทำให้เกิดการออกซิไดซ์ของ กรดแลคติกและกรดแอซีติกขึ้นตามมา

Packiyasothy และคณะ (1981) พบว่าเมล็ดโกโก้ที่เก็บเกี่ยวก่อนระยะเวลากำหนด อายุประมาณ 45 วัน เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้จะมีสีน้ำตาลอิสระอยู่น้อย เมื่อนำมาหมักจะเกิดเอทานอลต่ำกว่าเมล็ดโกโก้ที่สุกเต็มที่ นอกจากนั้นฝักโกโก้ที่แก่เต็มที่มีปริมาณสารเพกตินในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ต่ำลงด้วย

ตาราง 2 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)

6.2 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของเมล็ดโกโก้

6.2.1 น้ำตาล

Cerbulis (1955) ใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นกระดาษจำแนกชนิดของน้ำตาลในเมล็ดโกโก้ออกได้เป็น ดี-ฟรุกโตส ดี-กลูโคส ดี-กาแลคโตส ซูโครส ราฟฟีโนส สตาไครโอส มีลิไบโอสเมโนไตรโอส และน้ำตาลอื่น ๆ ที่ไม่สามารถจำแนกได้อีก 3 ชนิด ส่วนในเมล็ดโกโก้ที่ผ่าน

การอบแห้งแล้วนั้นพบว่ามี กลีเซอรอล อิโนซีทอล และโพลิแซคคาไรด์เพนทีโอส คือ verbascotetraose และ verbascoe การอบแห้งเมล็ดโกโก้ทำให้ปริมาณน้ำตาลอิสระในเมล็ดโกโก้ลดลง (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 และคณะ (1972) ศึกษาและรายงานชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่พบในเมล็ดโกโก้และเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ ดังตาราง 3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชนิดของน้ำตาลที่พบในเมล็ดโกโก้สายพันธุ์ต่าง ๆ นั้นไม่แตกต่างกัน แต่อัตราส่วนน้ำตาลที่พบจะแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ที่เห็นชัดเจนคือ อัตราส่วนของน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส เมล็ดโกโก้สายพันธุ์จากบราซิลมีอัตราส่วนน้ำตาลฟรุกโตส ต่อน้ำตาลกลูโคสเป็น 16:1 เมล็ดโกโก้สายพันธุ์จากกานามีอัตราส่วนน้ำตาลฟรุกโตสต่อน้ำตาลกลูโคสเป็น 7:1 สายพันธุ์จากอาร์ริบามีอัตราส่วนต่ำกว่า 2:1 และสายพันธุ์จาก Sanchez มีค่าอัตราส่วนเป็น 1:1 ซึ่งปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความแตกต่างของอัตราส่วนดังกล่าวคือ กิจกรรมของจุลินทรีย์ที่มีในการหมัก เมล็ดโกโก้สดที่เก็บมาจากต้นใหม่ ๆ พบว่ามีน้ำตาลซูโครสเพียงชนิดเดียวที่มีปริมาณมาก ในระหว่างการหมัก น้ำตาลซูโครสถูกย่อยสลายเป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตสอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 3 วันแรกของการหมัก

ตาราง 3 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
น้ำตาลชนิดอื่น ๆ	0.9	1.2	2.1	0.5
น้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด	40.3	38.2	65.4	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 และคณะ (1972)

1 = เมล็ดโกโก้ที่ไม่ผ่านการหมัก

2 = เมล็ดโกโก้ที่ผ่านการหมักในระยะสั้น ๆ (2-3 วัน)

3 = เมล็ดโกโก้ที่ผ่านการหมักอย่างสมบูรณ์

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

6.2.2 โพลิแซคคาไรด์

Rohan (1963) รายงานการศึกษาปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ต่าง ๆ ในเมล็ดโกโก้แห้งจากแอฟริกาตะวันตกที่ไม่ผ่านการหมัก พบว่ามีแป้งร้อยละ 6.10 เพกตินร้อยละ 2.25 เซลลูโลสร้อยละ 1.92 เพนโตแซนร้อยละ 1.27 และเยื่อเมือกและกัมร้อยละ 0.38

Schmieder และ Keeney (1980) ศึกษาปริมาณและคุณลักษณะของแป้งในเมล็ดโกโก้พบว่ามีอยู่ประมาณร้อยละ 4.50-7.00 และระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้แบบกล่องหมักเป็นเวลา 6 วัน ในประเทศบราซิล พบว่าแป้งในเมล็ดโกโก้เพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ Lehrian และ Patterson (1983) กล่าวว่าในระหว่างการหมักไม่พบการเปลี่ยนแปลงของแป้งในเมล็ดโกโก้ และแป้งในเมล็ดโกโก้ประกอบด้วยอะไมโลสร้อยละ 36 และอะไมโลเพกตินร้อยละ 64

6.2.3 โปรตีน

Hardy และ Rodriguse (1952) ศึกษาปริมาณของสารประกอบไนโตรเจนในเมล็ดโกโก้พันธุ์คริโอโล และพันธุ์เฟอเรสเตอร์ที่ไม่ผ่านการหมัก พบว่า พันธุ์เฟอเรสเตอร์โรมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสูงกว่าพันธุ์คริโอโล แต่การที่เมล็ดโกโก้มีปริมาณโปรตีนสูงนั้นต้องใช้เวลาในการหมักนานกว่าพันธุ์ที่มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่า นอกจากนี้ต้นโกโก้ที่มีอายุอ่อนจะให้เมล็ดโกโก้ที่มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดสูงกว่าเมล็ดโกโก้จากต้นที่มีอายุมากกว่า (Offem, 1990)

Dewitt (1957) แยกสารประกอบไนโตรเจนในเมล็ดโกโก้สด โดยการสกัดด้วยเอทานอล สามารถแยกออกได้เป็นส่วนของสารละลายที่ได้ในเอทานอล และส่วนที่ไม่ละลายในเอทานอล ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าในเมล็ดโกโก้นั้นประกอบด้วยปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และเปปไทด์อยู่น้อย องค์ประกอบของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ในส่วนสกัดโปรตีนจากเมล็ดโกโก้สด แสดงดังตาราง 4

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในส่วนสกัดโปรตีนจากเมล็ดโกโก้

กรดอะมิโน	มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อเมล็ด	กรดอะมิโน	มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อเมล็ด
กรดแอสพาติก	1.63	ไธโรซีน	0.63
กรดกลูตามิก	2.28	ซีสติอีน	0.07
ไกลซีน	1.43	เมไธโอนีน	0.05
อาลานีน	0.84	โปรลีน	0.71
วาลีน	0.43	ทริปโตเฟน	0.18
ลิวซีน	0.67	ฮีสติดีน	0.24
ไอโซลิวซีน	0.25	ไลซีน	1.36
ซีรีน	0.93	อาร์จินีน	2.82
ทรีโอนีน	0.72	แอมโมเนีย	4.36
เฟนิลอาลานีน	0.68		

ที่มา : Dewitt (1957)

การเปลี่ยนแปลงโปรตีนในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้นั้นพบว่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงสองวันแรกของการหมัก ทั้งนี้เพราะว่าไนโตรเจนจากส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ด มีการเคลื่อนย้ายเข้าสู่ภายในเมล็ด หลังจากนั้นปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมดลดลงในอัตราที่เกือบคงที่ตลอดการหมัก การย่อยสลายโปรตีนนั้นเกิดขึ้นหลังจากเริ่มต้นการหมักต่อไปจนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก การลดลงของโปรตีนสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และเปปไทด์ (Dewitt, 1957; Roelofsen, 1958) แต่เมล็ดโกโก้ที่มีปริมาณกรดอะมิโนหรือเปปไทด์สูงไม่ได้เป็นปัจจัยสำคัญในการทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดีกับเมล็ดโกโก้ (Biehl, *et al.*, 1985)

Niepage (1961) พบว่าโปรตีนทั้งหมดในเมล็ดโกโก้ที่ไม่ผ่านการหมักประกอบด้วยอัลบูมินร้อยละ 8.2 โกลบูลินร้อยละ 2.1 โปรลามีนร้อยละ 4.7 กลูทีนร้อยละ 16.3 และองค์ประกอบที่ไม่ละลายอีกร้อยละ 69.6 ส่วนเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการหมักแล้วมีอัลบูมินร้อยละ 16.4 โกลบูลินร้อยละ 1.2 โปรลามีนร้อยละ 7.7 กลูทีลินร้อยละ 32.3 และองค์ประกอบที่ไม่ละลายอีกร้อยละ 42.5 แต่รายงานครั้งนี้ไม่ได้คำนึงถึงการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโพลิฟีนอลกับโปรตีน ซึ่งปริมาณกรดอะมิโนจำนวนมากในองค์ประกอบที่ไม่ละลายน้ำนั้นเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของโปรตีนกับสารเพกตินในระหว่างที่มีการย่อยสลายโปรตีน

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

6.2.4 ไขมัน

ปริมาณไขมันในเมล็ดโกโก้มีอยู่มากกว่าร้อยละ 50 โดยน้ำหนักเมล็ดโกโก้แห้ง (Lehrian and Patterson, 1983) ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันที่สำคัญคือ กรดปาล์มิติก กรดสเตียริก และกรดโอลีอิก นอกจากนี้ยังประกอบด้วยกรดไขมันชนิดอื่น ๆ ในปริมาณต่ำ คือ กรดไมริสติก กรดลิโนลีอิก กรดลิโนลีนิก กรดอราไคดิก ซึ่งในไขมันโกโก้นั้นมีสารไตรกลีเซอไรด์อยู่ประมาณร้อยละ 98 Packiyasothy และคณะ (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)

6.2.5 กรดอินทรีย์

กรดอินทรีย์ที่ระเหยได้และระเหยไม่ได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสารอาหารในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ขณะหมักโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ หลังจากนั้นกรดจึงแพร่เข้าไปยังส่วนเมล็ดโกโก้ ทำให้ค่าพีเอชของเมล็ดลดลง (Jinap, 1989) Rohan และ Stewart (1966) ศึกษากรดที่ระเหยได้ และกรดที่ไม่ระเหยในเมล็ดโกโก้โดยใช้ตัวอย่างเมล็ดโกโก้แห้งจากแหล่งต่าง ๆ 8 แหล่ง พบว่ากรดแอซีติกเป็นกรดระเหยได้ทั้งหมดอยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 1.04-5.25 ปริมาณกรดที่ไม่ระเหยมีค่าโดยเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 1.26 และมีช่วงอยู่ระหว่างร้อยละ 1.04-5.25 ซึ่งมีกรดซิตริกอยู่มากที่สุด นอกจากนั้นมีกรดตาร์ตาริกกรด แลคติก และกรดฟอสฟอริกอยู่ในปริมาณเล็กน้อย

Weissberger และคณะ (1971) ศึกษากรดอินทรีย์ที่ไม่ระเหยในเมล็ดโกโก้แห้ง จากแหล่งต่าง ๆ พบว่ามีกรดอินทรีย์ 7 ชนิด ได้แก่ กรดแลคติก กรดออกซาลิก กรดซัคซินิก กรดมาลิก กรดตาร์ตาริก

และกรดซิตริก และกรดอนินทรีย์ 1 ชนิด คือ กรดฟอสฟอริก ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์แต่ละชนิดแปรเปลี่ยนไปตามแหล่งที่มาของเมล็ดโกโก้ การเปลี่ยนแปลงนี้เป็นผลจากความแตกต่างของกระบวนการจัดการหลังการเก็บผลโกโก้ที่แตกต่างกันไปในแต่ละภูมิภาค

Lopez และ Quesnel (1973) ศึกษากรดที่ระเหยได้ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักเป็นเวลา 8 วัน ที่สภาวะต่าง ๆ กัน พบว่าในฤดูฝนซึ่งเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีความชื้นสูงทำให้เกิดการจำกัดการไหลผ่านของอากาศในกองหมัก เกิดการสร้างกรดอินทรีย์ที่ระเหยได้น้อยกว่าการหมักในช่วงที่เป็นฤดูแล้ง กรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ถูกสร้างขึ้นในช่วงแรกของการหมักจนถึงขั้นตอนการทำแห้ง การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเอทานอลและกรดแอซีติกในเมล็ดโกโก้เกิดขึ้นหลังการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอทานอล และกรดแอซีติกในเยื่อหุ้มเมล็ด กรดแอซีติกในเยื่อหุ้มเมล็ดซึมผ่านเข้าสู่เมล็ดโกโก้ทำให้เมล็ดโกโก้ตาย ซึ่งมีผลต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้ (Biehl, *et al.*, 1982; Roelofsen, 1958) การหมักเมล็ดโกโก้หากหยุดลงในขณะที่มีความเข้มข้นของกรดแอซีติกสูงก็ไม่มีผลต่อปริมาณกรดแอซีติกในเมล็ดโกโก้มาก หากรีบนำเมล็ดโกโก้ที่ได้ไปทำแห้งโดยทันทีช็อกโกแลตที่เตรียมจากเมล็ดโกโก้ที่มีปริมาณกรดสูงนั้นมีคุณสมบัติของกลิ่นรสช็อกโกแลตต่ำลง แต่การที่เมล็ดโกโก้มีกรดสูงไม่ได้เป็นปัจจัยสำคัญในการสร้างกลิ่นรสที่ดีของเมล็ดโกโก้ (Biehl, *et al.*, 1958)

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

ตาราง 5 ชนิดของกรดที่ให้กลิ่นหอมที่พบในเมล็ดโกโก้

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

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

7. การทำแห้งและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีระหว่างการทำแห้ง

เมล็ดโกโก้หลังจากที่หมักครบตามเวลาแล้วถูกนำไปทำแห้งด้วยวิธีการตากแดดโดยตรง หรือใช้ตู้อบแห้ง การทำแห้งทำให้ความชื้นในเมล็ดลดลง ปริมาณกรดที่ระเหยได้ลดลง ก่อให้เกิดการออก ซิเดชั่นของสารตั้งต้นของกลิ่นรสช็อกโกแลต และมีผลต่อการพัฒนาของกรดแลคติก ซึ่งหากความชื้นในเมล็ดลดลงในอัตราที่ช้าเกินไปทำให้กรดแลคติกเกิดได้ดี นอกจากนั้นการทำแห้งยังยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนเมล็ดโกโก้ได้ด้วย เพื่อให้ได้เมล็ดโกโก้แห้งที่มีคุณภาพและสามารถเก็บไว้ได้นานควรมีความชื้นสุดท้ายในเมล็ดโกโก้ไม่เกินร้อยละ 7 ทั้งยังป้องกันการเสื่อมเสียของเมล็ดจากแมลงได้ด้วย

Rohan (1963) แบ่งวิธีการอบแห้เมล็ดโกโก้เป็นสองวิธีคือการอบแห้งแบบธรรมชาติโดยใช้แสงอาทิตย์ และการอบแห้งแบบเทียม (artificial drying) หรือการอบแห้งด้วยตู้อบ โดยทั่วไปการทำแห้งเมล็ดโกโก้เกษตรกรนิยมใช้วิธีการตากแดดบนถาดไม้ บนกระสอบป่าน หรือบนวัสดุพื้นเรียบซึ่งทำได้ง่าย และประหยัดค่าใช้จ่าย แต่วิธีนี้สามารถให้ผลดีต่อเมื่อมีปริมาณ และระยะเวลาของแสงแดดนานเพียงพอ (Lehrian and Patterson, 1983) การทำแห้งโดยแสงอาทิตย์ใช้เวลาประมาณ 6 วัน ในที่ที่มีอากาศแห้งและใช้เวลานานถึง 3 สัปดาห์ในที่ที่มีอากาศชื้น ส่วนการทำแห้งเมล็ดโกโก้โดยการอบแห้งด้วยความร้อนจากแหล่งอื่น ซึ่งสามารถใช้ได้ดีกรณีที่มีเมล็ดโกโก้มาก ๆ และในฤดูฝนหรือช่วงที่อากาศมีความชื้นสูง แต่ Carr และคณะ (1979) กล่าวว่าวิธีการทำแห้งทั้งสองวิธีที่กล่าวมานั้นให้คุณภาพของเมล็ดโกโก้ที่ไม่แตกต่างกัน ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิกและคณะ (2534) ได้เปรียบเทียบวิธีการอบแห้งเมล็ดโกโก้ โดยการอบแห้งแบบ 2 ระยะ คือ อบแห้งด้วยแสงอาทิตย์โดยตรงจนมีความชื้นร้อยละ 20-25 แล้วนำมาอบต่อด้วยตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนเมล็ดโกโก้มีความชื้นร้อยละ 7 พบว่าเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการอบแห้งแบบ 2 ระยะมีคุณภาพที่ดีกว่าในด้านปริมาณกรด สีของเมล็ดโกโก้แห้ง และลักษณะทางกายภาพ

ในขณะทำแห้งมีการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญคือ การเกิดสีน้ำตาลของเมล็ดโกโก้อันเป็นสีเฉพาะของช็อกโกแลตขึ้น ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้ขณะทำแห้งคือ อัตราของการทำแห้ง การทำแห้งที่มีอัตราระเหยอย่างรวดเร็วโดยใช้อากาศร้อนปานกลาง (65 องศาเซลเซียส) ไหลผ่านในตอนแรกของการอบแห้งนั้นให้ผลที่ดีกว่า เพราะทำให้ความชื้นที่ผิวหน้าของกองเมล็ดโกโก้ที่อบระเหยได้โดยไม่ทำให้เนื้อเมล็ดโกโก้เกิดการหดตัวหรือมีรอยย่น ผลอันนี้ทำให้ออกซิเจนซึมผ่านผนังหุ้มเมล็ดได้ ในช่วงสุดท้ายของการอบแห้งเมื่อมีการให้อากาศที่มีอุณหภูมิสูงขึ้นกว่าเดิม (80 องศาเซลเซียส) โดยให้อัตราไหลผ่านของอากาศต่ำกว่าตอนแรกจะช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนสีของเมล็ดเป็นสีน้ำตาลขึ้น และทำให้ผนังหุ้มเมล็ดเกาะติดกับผิวเมล็ดน้อยลงด้วย คุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้งมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ปริมาณกรด สี ความชื้น ปริมาณเมล็ดที่มีเชื้อรา และน้ำหนักของเมล็ดแห้งต่อ 100 เมล็ด โดยเฉพาะกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้แห้ง เพราะกรดชนิดนี้ไม่สามารถขจัดออก

ได้ในขั้นตอนต่อ ๆ ไป ต่างกับกรดที่ระเหยได้ซึ่งสามารถขจัดออกได้ในการทำแห้งและการผลิตผลิตภัณฑ์ตอนสุดท้าย (Wood and Lass, 1985)

Tomlims *et al.*, (1993) พบว่าสายพันธุ์ของโกโก้ ระยะเวลาในการเก็บฝักโกโก้ และวิธีการหมักเมล็ดโกโก้ มีผลต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้ทั้งด้านเคมีและกายภาพ ในระหว่างการหมัก แต่วิธีการทำแห้งทั้งแบบใช้แสงแดดโดยตรงและการอบแห้งแบบเทียม ให้คุณภาพของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้ไม่แตกต่างกันเมื่อใช้วิธีการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดโกโก้ที่ง่าย และทำได้สะดวก โดยอาศัยพื้นฐานการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลของเมล็ดโกโก้ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก กระบวนการเกิดสีน้ำตาลในเมล็ดโกโก้นั้นเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนและกรดอะมิโน (Rohan and Stewart, 1966b) รวมถึงการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารโพลิฟีนอลในเมล็ดกับอากาศในสภาพที่มีกรดแอซีติกและอากาศอยู่ (Sanchez, *et al.*, 1985)

นอกจากนี้มีรายงานถึงการใช้การเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก เช่น ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณคาเทชิน (catechin) และปริมาณคาร์โบไฮเดรตในเมล็ด เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงสภาวะและคุณภาพของเมล็ดโกโก้ที่หมักอีกด้วย (Bracco, *et al.*, 1969) โดยเมล็ดโกโก้สดมีค่าดัชนีไนโตรเจน คาเทชิน และคาร์โบไฮเดรตเป็น 30, 1.70 และ 0.25 ขณะที่เมล็ดโกโก้หมักที่ผ่านการอบแห้งมีค่าดัชนีเหล่านี้เป็น 23, 0.23 และ 1.66 ตามลำดับ

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. มีเมล็ดที่ถูกแมลงเจาะเมล็ดลีบ และเมล็ดเสียรวมกันไม่เกินร้อยละ 3
9. ไขมันในเมล็ดโกโก้แห้งไม่ต่ำกว่าร้อยละ 55 โดยน้ำหนัก

วัสดุ อุปกรณ์

วัสดุ

1. ผลโกโก้

ใช้ผลโกโก้สดจากสวนแปลงทดลองของศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร และจากสวนของนายจบ ปานดำ ตำบลสระแก้ว อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช ซึ่งเป็นพันธุ์โกโก้ที่ได้จากกรมส่งเสริมการเกษตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหารที่ใช้สำหรับการเก็บและการเลี้ยงเชื้อ

2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ TYGKCP (Ostovar and Keeney, 1973)

- สำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้งหมด

2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS (Rogosa and Sharpe; 1959)

- สำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก

2.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ DSM (Cirigliano, 1982)

- สำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแอซีติก

2.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

- สำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์

2.1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA)

2.1.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ Acetobacter agar (AA)

2.2 อาหารที่ใช้ในการทดสอบ

2.2.1 อาหารฮอยเยอร์

2.2.2 อาหารทดสอบการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอทานอล

2.2.3 อาหารทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากกลูโคส

2.2.4 อาหารทดสอบการสร้างไดไฮดรอกซีอะซีโตนจากกลีเซอรอล

2.4.5 อาหารทดสอบการออกซิเดชันและเฟอร์เมนเตชัน

2.2.6 อาหารทดสอบการหมักแบบโฮโมแลคติกเฟอร์เมนเตทีฟ และ เฮทโทโรแลคติกเฟอร์เมนเตทีฟ

2.2.7 อาหารทดสอบการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีน

2.2.8 อาหารทดสอบการสร้างเดกซ์แตรน

2.2.9 อาหาร 2% glucose-yeast extract-peptone agar (GYP)

2.2.10 อาหารทดสอบการสร้างสปอร์ของยีสต์

2.2.11 อาหารทดสอบการใช้ยูเรีย

3. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์

สารเคมี และวิธีการเตรียมที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.1 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด

3.2 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก

3.3 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดระเหยได้

3.4 สารเคมีที่ใช้วิเคราะหปริมาณน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลรีดิวซ์

3.5 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาค่าดรรชนีการหมัก

อุปกรณ์

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1.1 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb

1.2 เครื่องแยกเหวี่ยง ชนิดปรับอุณหภูมิได้ Model H-103 NR Series ของบริษัท Kokusan Ensinri Co; Ltd.

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

1.4 เครื่องปั่นละเอียด (Homoginizer) Model AM-8 ของบริษัท Nihonseiki Kaisha Ltd. และ เครื่องปั่นผสม (Waring blender)

1.5 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius

1.6 เครื่องเขย่า (Orbital mixer) ของบริษัท Denley

1.7 ตู้บ่มเชื้อ และตู้อบไฟฟ้า ของบริษัท Memmert.

1.8 ชุดวิเคราะห์หาไขมัน โดยวิธี Soxhlet apparatus Model ME. ของบริษัท Electrothermal Co; Ltd.

1.9 ชุดเครื่องวิเคราะห์หากรดที่ระเหยได้

1.10 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิของบริษัท Memmert.

1.11 ชุดเครื่องมือวิเคราะห์น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปน้ำตาลกลูโคส

1.12 หม้อนึ่งความดัน

1.13 ตู้เขี่ยเชื้อ (Larminar air flow cabinet) และอุปกรณ์เขี่ยเชื้อ

1.14 ตู้อบแห้งแบบกระแสลมเป่า

2. อุปกรณ์อื่น ๆ

2.1 เครื่องแก้ว

2.2 ชุดเขี่ยเชื้อ

2.3 เข่งผลไม้ขนาด 57x57x44 เซนติเมตร

2.4 กล่องไม้ขนาด 34x76x32 เซนติเมตร (กล่องคู่)

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

ตอนที่ 1 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

วิธีการ

1. สถานที่และเวลาที่ทำการหมักเมล็ดโกโก้

ท~

ชุมพร ทำการหมักเมล็ดโกโก้ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร จังหวัดชุมพร เมื่อวันที่ 1 พฤศจิกายน 2533 และชุดที่สองใช้ผลโกโก้จากสวนของเกษตรกร อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช ทำการหมักที่ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เมื่อวันที่ 15 พฤศจิกายน 2534

2. การหมักเมล็ดโกโก้

ใช้วิธีการหมักแบบดั้งเดิม โดยเก็บผลโกโก้ที่แก่เต็มที่มาผ่าเปลือกออกทันทีในวันนั้นและแกะเมล็ดที่อยู่ในผลออกจากไส้เมล็ดที่ยึดติดกัน ให้เมล็ดกระจายออกจากกัน โดยแยกเมล็ดที่เสียและเป็นราทิ้ง นำเมล็ดโกโก้สดมาใส่ในเข่งที่สานด้วยไม้ไผ่ขนาด 57x57x44 เซนติเมตร บรรจุเมล็ดโกโก้สดได้ 75 กิโลกรัม โดยเมล็ดในเข่งผลไม้มีความสูง 40 เซนติเมตร ใช้ใบตองสดรองด้านล่างและด้านข้าง สำหรับใบตองที่รองด้านล่างเจาะรูเพื่อให้ของเหลวที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักไหลออกมาได้สะดวก ด้านบนใช้ใบตองสดปิดทับ 2-3 ชั้น ทิ้งไว้ 2 วัน จากนั้นถ่ายเมล็ดโกโก้สดจากเข่งแรกไปสู่เข่งที่สอง ซึ่งรองใบตองสดเช่นเดียวกับเข่งแรก ทิ้งไว้ 2 วัน และทำการถ่ายเข่งจากเข่งที่สองกลับมาสู่ใบแรกอีกครั้งและทิ้งไว้อีก 2 วัน เมื่อครบ 7 วัน ก็นำเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการหมักแล้วมาตากแดด เกลี่ยเมล็ดให้กระจายทั่วกัน หมั่นกลับเมล็ดอยู่เสมอ ตากแดดนาน 2-3 วัน

3. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 ของการหมัก โดยเก็บบริเวณตอนบน (ต่ำจากระดับบนสุด 5 เซนติเมตร) ตอนกลาง (ต่ำจากระดับบนสุด 20 เซนติเมตร) และล่างสุดของกองหมัก (ต่ำจากระดับบนสุด 35 เซนติเมตร) นำตัวอย่างมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ พร้อมทั้งวัดอุณหภูมิของกองหมักทั้งสามระดับก่อนการเก็บตัวอย่าง

4. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดโกโก้ จากการหมักชุดที่สอง

4.1 ความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้พีเอชมิเตอร์

4.2 กรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริก โดยการไตเตรตกับสารละลายด่างมาตรฐาน 0.1 นอร์มัล (Rangana, 1977)

4.3 กรดแลคติก ตามวิธีของ Barber และ Summerson (1941)

4.4 กรดระเหยได้ในรูปกรดแอซีติก ตามวิธีของ A.O.A.C. (1984)

4.5 น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปน้ำตาลกลูโคส ตามวิธีของ Luff-Schoorl (Egan, *et al;* 1981)

4.6 ดรรชนีการหมัก (Fermentation Index) ตามวิธีของ Gourieva และ Tserevitinov (1979)

4.7 Cut Test ตามวิธีของ Wood และ Lass (1985)

5. การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก

โดยเฉพาะแบคทีเรียแลคติก แบคทีเรียแอซีติก และยีสต์

5.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ ชั่งตัวอย่างเมล็ดโกโก้ 50 กรัม ใส่ในขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร ภายในบรรจุน้ำเปปโตนร้อยละ 0.1 ปริมาณ 450 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเขย่าให้เข้ากัน แล้วทำ serial dilution จนได้ความเจือจาง $1x10^{-6}$

5.2 ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดตามวิธี standard plate count (American Public Health Association, 1960) ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม 3 ระดับ (จากข้อ 5.1) ระดับละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อทำระดับละ 4 จาน เทอาหาร TYGKCP agar ที่หลอมเหลวและอุ่นประมาณ 15 มิลลิลิตรลงไป หมุนจานให้ตัวอย่างอาหารกระจายไปทั่ว ๆ โดยขยับจานไปมา 5 ครั้ง แล้วขยับไปมาตั้งฉากกับแนวเดิม 5 ครั้ง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารเพาะเชื้อแข็งตัว พลิกกลับจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และสุ่มเก็บโคโลนีจากจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนี 30-300 โคโลนี ขีด (streak) บนจานอาหาร NA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วเก็บไว้ในหลอดอาหาร NA เพื่อใช้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการติดสีแกรม

5.3 การตรวจนับจำนวนยีสต์ ทำเช่นเดียวกับข้อ 5.2 แต่ใช้อาหาร PDA ที่เติม oxytetracycline ร้อยละ 0.1 เมื่อแยกได้ยีสต์บริสุทธิ์แล้ว เก็บในหลอดอาหาร PDA

5.4 การตรวจนับแบคทีเรียแอซีติก ทำเช่นเดียวกับข้อ 5.2 แต่ใช้อาหาร DSM เมื่อแยกได้แบคทีเรียแล้วเก็บในหลอดอาหาร AA

6. การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์

6.1 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของยีสต์ (Kreger-van Rij, 1984) โดยศึกษาคุณสมบัติดังนี้

นำเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มาทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ดังนี้

6.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ศึกษาสัณฐานวิทยาของ vegetative cell ในอาหาร 2% glucose-yeast extract-peptone agar ความสามารถในการสร้าง pseudomycelium และ true mycelium โดยการทำ slide culture บนอาหาร corn meal agar (Difco) ตรวจดูได้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400-1000 เท่า

6.1.2 ลักษณะการสืบพันธุ์โดยอาศัยเพศ นำยีสต์เลี้ยงบนจานอาหาร sportulating medium บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน นำมาตรวจดูการสร้าง ascospore และรูปร่างของ ascospore โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

6.1.3 ความสามารถในการใช้แหล่งอาหารคาร์บอนในสภาพไร้อากาศ โดยใช้น้ำตาล 7 ชนิดคือ เดกซ์โตรส, กาแลกโตส, แลกโตส, มอลโตส, ราฟฟิโนส, ซูโครส และ ทรีฮาโลส โดยใช้ปริมาณร้อยละ 1 ยกเว้น ราฟฟิโนส ใช้ร้อยละ 2 ในอาหาร base for yeast fermentation บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูปริมาณของแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดดักแก๊สที่ใส่ไว้ในอาหาร

6.1.4 ความสามารถในการใช้แหล่งอาหารคาร์บอนในสภาพมีอากาศ โดยใช้แหล่งอาหารคาร์บอน 12 ชนิดคือ เดกซ์โตรส, ดูซิทอล, มอลโตส, ซูโครส, แลกโตส กาแลกโตส, เมลลิไบโอส, เซลโลไบโอส, อินโนซิทอล, ไซโลส, ราฟฟิโนส และ ทรีฮาโลส ซึ่งใช้ yeast nitrogen base (Difco) เป็น basal medium และนำแผ่น disc ที่จุ่มน้ำตาลแต่ละชนิด (ความเข้มข้นร้อยละ 10) วางบนอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 25-27 ^{o}ซ นาน 24-48 ชั่วโมง ผลบวกแสดงโดยมีเชื้อเจริญรอบแผ่น disc

6.1.5 ความสามารถในการใช้ยูเรีย เขี่ยเชื้อลงบนอาหารทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1-3 วัน ผลบวกแสดงโดยอาหารจะเปลี่ยนสีจากเหลืองอ่อนเป็นแดง

6.2 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของแบคทีเรียแอซีติก (Gibbs and Shapton, 1981) นำเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงจากอาหารเลี้ยงเชื้อ AA มาทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ดังนี้

6.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตรวจสอบการติดสีแกรม ศึกษารูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์

6.2.2 การสร้างเอนไซม์คาตาเลส หยด H_2O_2 ร้อยละ 3 ลงบนโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารวุ้น ถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นแสดงว่ามีเอนไซม์คาตาเลส

6.2.3 การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอทานอล เลี้ยงเชื้อบนอาหารทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 28 ผลบวกแสดงโดยอาหารจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีเขียว

6.2.4 ความสามารถในการเจริญบนอาหารฮอยเยอร์ เลี้ยงเชื้อบนอาหารฮอยเยอร์ บ่มเชื้อที่อุณ ภูมิห้องเป็นเวลา 1-14 วัน ผลบวกแสดงโดยสีของอาหารจะขุ่นขึ้น

6.2.5 ความสามารถในการสร้างกรดจากกลูโคส เลี้ยงเชื้อบนอาหารทดสอบการออกซิเดชันและเ อร์เมนเตชัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ผลบวกแสดงโดยเกิดบริเวณใส รอบการเจริญ ของเชื้อ

6.2.6 ความสามารถในการสร้างไดไฮดรอกซีอะซิโตนจากกลีเซอรอล เลี้ยงเชื้อบนอาหารทดสอ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลบวกแสดงโดย เมื่อหยดสารละลายเฟลลิ่ง (Fehling) ลง นเชื้อ จะเกิดวงสีแดงอิฐรอบโคโลนีของเชื้อ

6.2.7 ความสามารถในการสร้างเซลลูโลส เลี้ยงเชื้อบนอาหารทดสอบบ่มที่อุณหภูมิห้อง การ ร้างเซลลูโลสสามารถตรวจสอบได้โดยนำเชื้อที่เจริญที่ผิวหน้าอาหาร มาย้อมด้วยลูกอลไอโอดีน ugol's iodine) และ กรดซัลฟุริก 60% บริเวณที่มีเซลลูโลสจะมีสีน้ำเงินใส

6.2.8 ความสามารถในการสร้างเม็ดสีสีน้ำตาล เลี้ยงเชื้อบนอาหารทดสอบ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ผลบวกแสดงโดยอาหารทดสอบจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

6.3 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของแบคทีเรียแลคติก (Sharpe and Fryer, 1966; Krieg and Hott, 1986)

นำเ วอายุ 24 ชั่วโมงจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS มาทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ดังนี้

6.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตรวจสอบการติดสีแกรม รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ กกล้องจุลทรรศน์

6.3.2 การสร้างเอนไซม์คาตาเลส (ตาม 6.2.2)

6.3.3 การทดสอบออกซิเดชันและเฟอร์เมนเตชัน ตามวิธีของ Hugh และ Leifson (1953) เลี้ยง อและนำมาใส่ลงในอาหารทดสอบ (ภาคผนวก ข หมายเลข 18) 2 หลอด หลอดหนึ่งปิดทับด้วยพ าฟินที่ฆ่าเชื้อแล้ว อีกหลอดอยู่ในสภาพปกติ บ่มที่อุณหภูมิห้อง และตรวจผลทุกวันจนครบ 7 น จุลินทรีย์ที่เป็นเฟอร์เมนเตทีฟ สามารถสร้างกรดซึ่งเกิดจากการหมักกลูโคสทั้งในสภาพที่มีออ ซิเจนและไร้ออกซิเจน ในขณะที่จุลินทรีย์ที่เป็นออกซิเดทีฟ การสร้างกรดจะเกิดขึ้นได้เฉพาะในสภ ะที่มีออกซิเจนเท่านั้น

6.3.4 การหมักแบบโฮโมแลคติกเฟอร์เมนเตทีฟ และ เฮทโทโรแลคติกเฟอร์เมนเตทีฟ ตามวิธีของ (ibson และ Abd-el-Malek (1945) เลี้ยงเชื้อและนำมาใส่ในอาหารทดสอบ เทวุ้นเข้มข้นร้อยละ 3 ลง ปปิดผิวหน้าให้หนาประมาณ 1 เซนติเมตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และตรวจผลทุกวัน

จนครบ 7 วัน แบคทีเรียที่หมักแบบเฮทโทโรเฟอร์เมนเตทีฟจะให้แก๊สและดันวุ้นที่ปิดทับผิวหน้าขึ้นมา ส่วนพวกหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ วุ้นจะมีลักษณะปกติ

6.3.5 การเจริญที่อุณหภูมิ 15 และ 45°ซ เขี่ยเชื้อลงในอาหาร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 15 และ 45°ซ โดยตรวจผลทุกวันจนครบ 7 วัน สังเกตการเจริญจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงแดงเป็นสีเหลือง

6.3.6 การเจริญที่พีเอช 9.2 และ 9.6 เขี่ยเชื้อลงบนอาหาร MRS ที่ปรับพีเอช 9.2 และ 9.6 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงแดงเป็นสีเหลือง

6.3.7 การสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีน เขี่ยเชื้อลงบนอาหารทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-7 วัน ผลบวกแสดงโดยเมื่อหยดสารละลายเนสเลอร์ (Nessler' reagent) ลงบนเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลซึ่งแสดงว่ามีการสร้างแอมโมเนียเกิดขึ้น

6.3.8 การสร้างเดกซ์แตรน เขี่ยเชื้อ ลงบนอาหารทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-14 วัน ผลบวกแสดงโดยเชื้อที่เจริญขึ้นมาจะสร้างเมือกบนอาหารทดสอบ

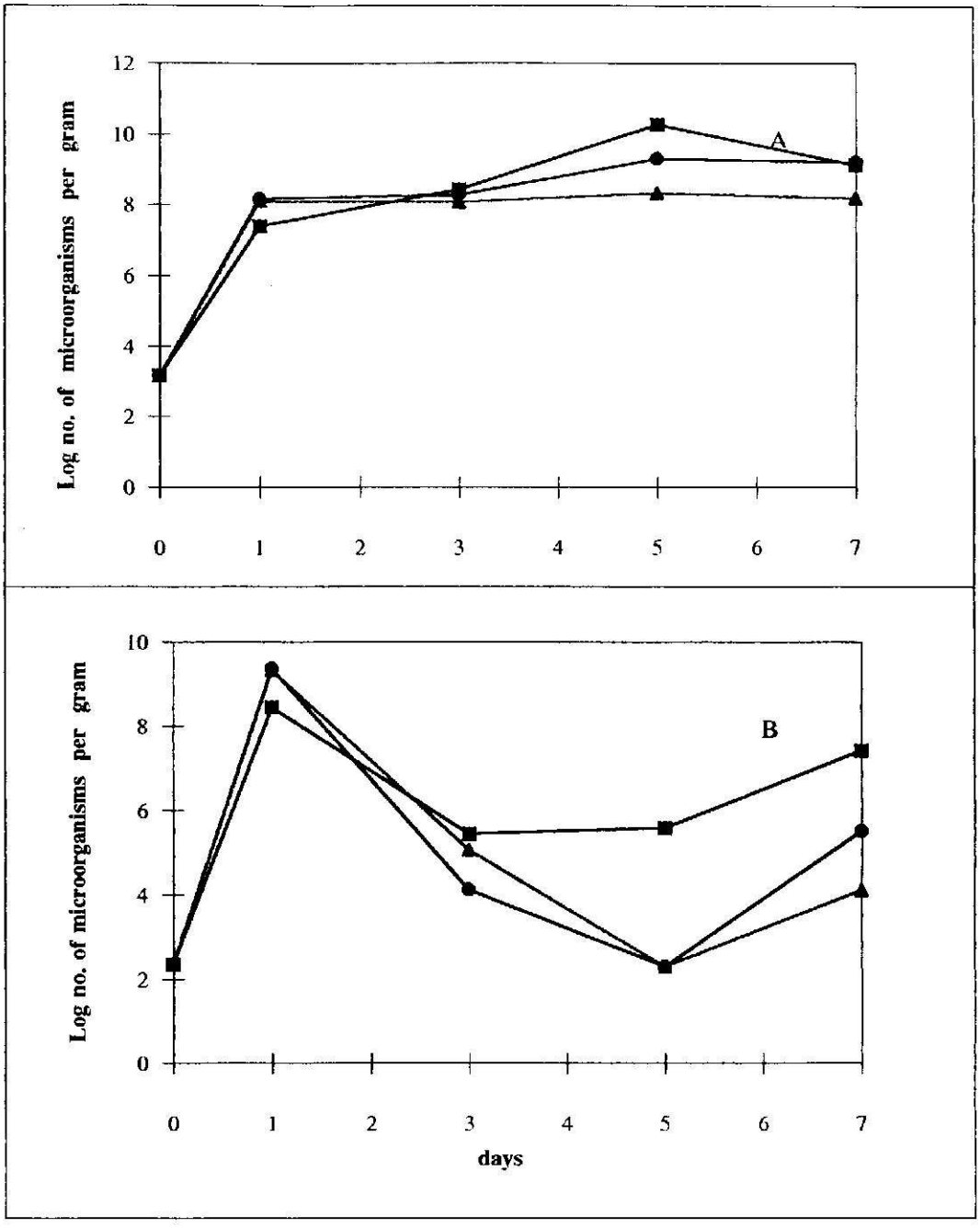
6.3.9 ความสามารถในการใช้สารคาร์โบไฮเดรตบางชนิด แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่ทดสอบคือ อะราบิโนส, ฟรุคโตส, กาแลคโตส, มอลโตส, แมนนิทอล ราฟฟิโนส, แรมโนส, ซาลิซิน, ซูโครส และ ไซโลส โดยใช้ปริมาณร้อยละ 1 ในอาหาร MRS (ไม่เติมน้ำตาลกลูโคส) เขี่ยเชื้อที่จะทดสอบลงในหลอดอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลทุกวันจนครบ 7 วัน ผลบวกแสดงโดยเชื้อมีการเจริญและเปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงแดงเป็นสีเหลือง

ผลการทดลองและวิจารณ์ตอนที่ 1

1. การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ทั้งหมดระหว่างการหมัก

ผลการศึกษาปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นในการหมักเมล็ดโกโก้ชุดที่หนึ่ง พบจุลินทรีย์ทั้งหมด $1.40x10^3$ โคโลนีต่อกรัม สำหรับการหมักชุดที่สองพบจุลินทรีย์เริ่มต้น $2.21x10^2$ โคโลนีต่อกรัม ขณะที่ Rombouts (1952) พบว่าปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น $2.30x10^5$ เซลล์ต่อกรัม และ De Camargo และคณะ (1963) พบจุลินทรีย์เริ่มต้น $1.50x10^9$ เซลล์ต่อกรัม ปริมาณจุลินทรีย์ที่พบในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้จะแตกต่างกันเนื่องจากสาเหตุหลายประการ เช่น การปะปนของจุลินทรีย์จากผิวของฝักโกโก้ ภาชนะที่ใช้หมัก ใบตองสด มีด รวมทั้งมือของคนที่ทำการหมัก (Ostovar and Keeney, 1973) ซึ่งในการทดลองนี้ได้ทำการหมักเมล็ดโกโก้ชุดที่หนึ่งที่ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร ในโรงเรือนที่ใช้สำหรับหมักเมล็ดโกโก้โดยเฉพาะ เก็บผลโกโก้จากต้นและทิ้งไว้ 1 วันก่อนที่จะนำมาหมักเพื่อรวบรวมผลโกโก้ให้มีปริมาณมากพอที่จะทำการหมัก ใช้คนงาน 4-5 คน ช่วยปอกและแกะเมล็ดออกจากผล โดยการใช้มีดหรือทุบด้วยท่อนไม้ จึงเป็นไปได้ว่ามีการปะปนของจุลินทรีย์จากการหมักชุดก่อนที่ หลงเหลืออยู่ตามมีดและอากาศบริเวณโรงหมัก สำหรับการหมักชุดที่สองทำการหมักในโรงเรือนของภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร เก็บผลโกโก้จากต้นและนำมาหมักในวันเดียวกัน ใช้คน 2-3 คน ช่วยปอกและแกะเมล็ดออกจากผลและคัดเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์เท่านั้นมาหมัก จึงทำให้การปะปนของจุลินทรีย์น้อยกว่าการหมักชุดแรก

สำหรับการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดระหว่างการหมัก พบว่าในการหมักชุดที่หนึ่ง ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดจากทั้งสามระดับของกองหมักเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันแรกและค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนสูงสุดในวันที่ห้า โดยมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงสุดอยู่ในช่วง $1.98x10^8$-$1.78x10^{10}$ โคโลนีต่อกรัม ดังแสดงในรูปที่ 1 A และวันสุดท้ายของการหมักมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง $1.44x10^8$-$1.46x10^9$ โคโลนีต่อกรัม ขณะที่การหมักชุดที่สองพบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงสุดในวันแรกของการหมัก คือ $2.69x10^8$-$2.24x10^9$ โคโลนีต่อกรัม (ดังแสดงในรูปที่ 1 B หลังจากนั้นจะค่อยๆ ลดลงจนถึงวันที่ห้าซึ่งพบว่ามีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดต่ำสุดโดยเฉพาะบริเวณบนและกลางของกองหมัก โดยมีปริมาณเท่ากันคือ $2.00x10^2$ โคโลนีต่อกรัม วันสุดท้ายของการหมักปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง $1.30x10^4$-$2.58x10^7$ โคโลนีต่อกรัม ซึ่งการที่ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นในช่วงห้าวันแรกของการหมักชุดที่หนึ่ง อาจเนื่องมาจากในช่วงของการหมักมีอุณหภูมิไม่สูงพอที่จะทำลายจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ได้ โดยพบว่าหลังการหมักสามวัน กองหมักมีอุณหภูมิสูงสุดเพียง 42°ซ ส่วนในการหมักชุดที่สองมีอุณหภูมิเฉลี่ยระหว่างการหมักสูงกว่าการหมักชุดแรกโดยมีอุณหภูมิสูงสุด 48°ซ ดังแสดงในรูปที่ 2 จึงทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลงและมีปริมาณต่ำสุดในวันที่ห้าของการหมัก นอกจากนี้ในการหมักชุดที่สองยังมีปริมาณกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 1.79 ดังแสดงในรูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในการหมักชุดที่สองสอดคล้องกับ



รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

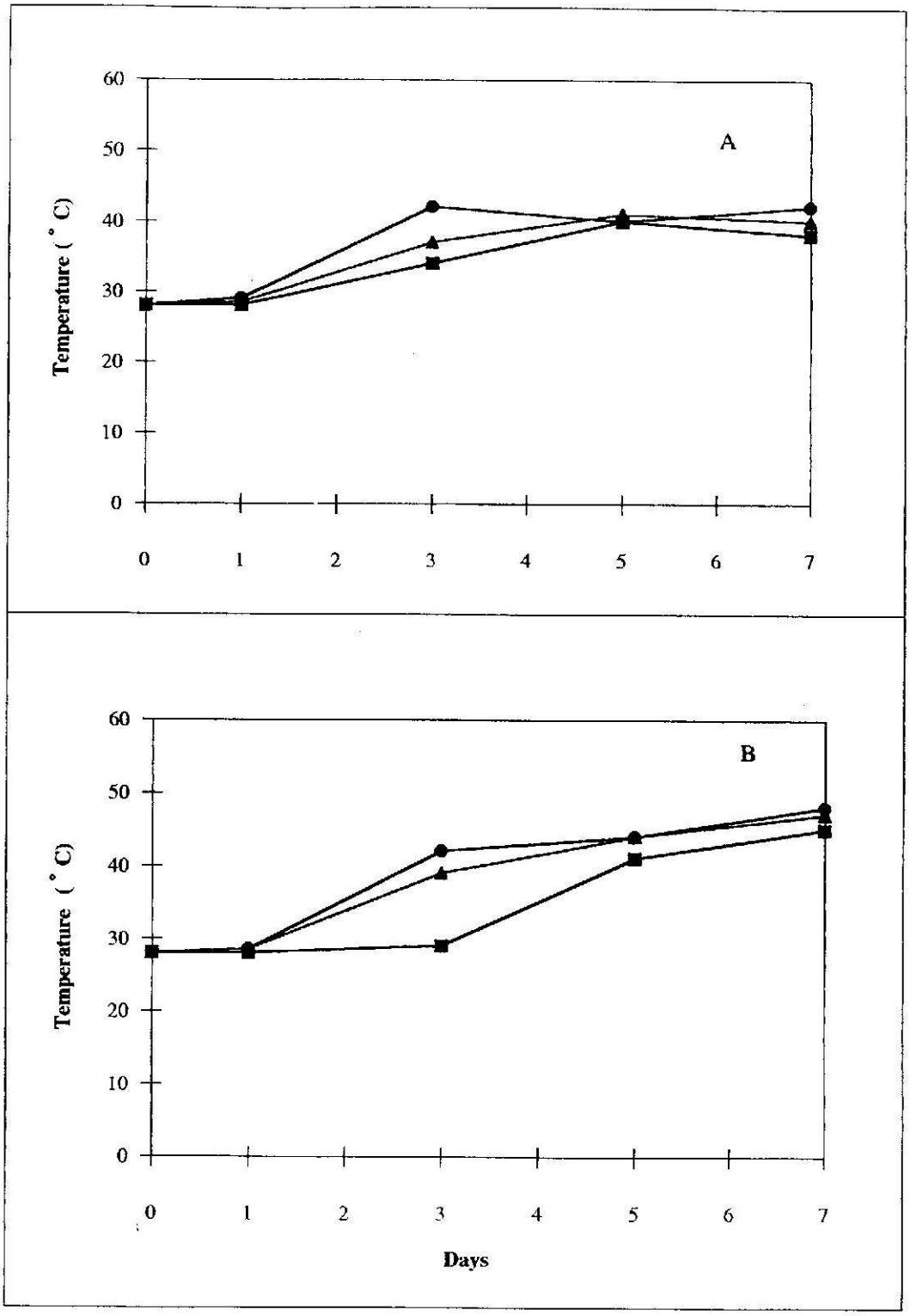
บน

กลาง

ล่าง

A การหมักชุดที่หนึ่ง

B การหมักชุดที่สอง



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของกองหมักระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

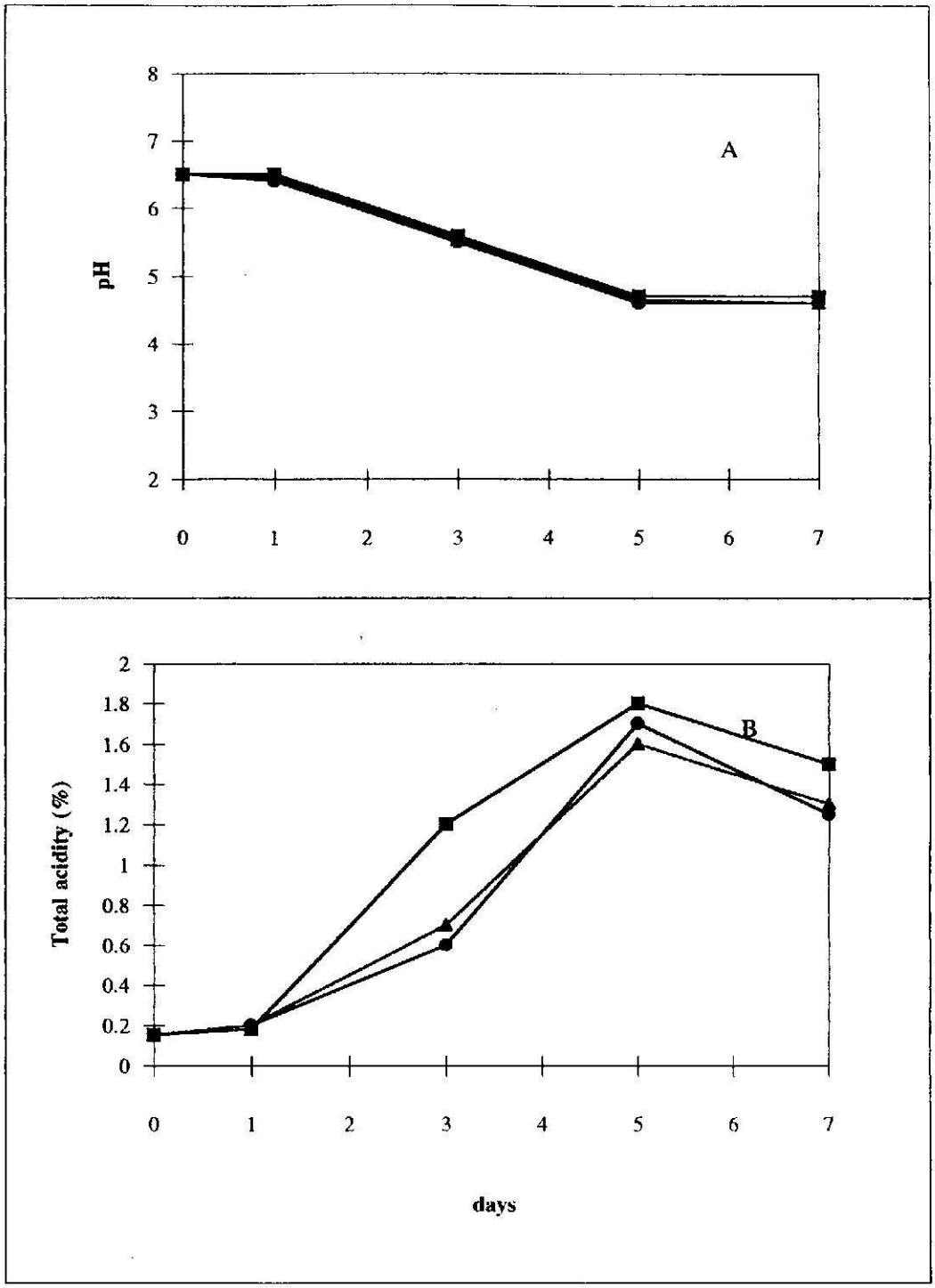
A การหมักชุดที่หนึ่ง

B การหมักชุดที่สอง

บน

กลาง

ล่าง



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณกรดทั้งหมด (กรดซิตริก) ของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักชุดที่สอง

—●— บน —▲— กลาง —■— ล่าง

บริเวณล่าง

การทดลองของ Ostovar และ Keeney (1973) ซึ่งทำการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องไม้ขนาด 3x3x2 เมตร หมักเป็นเวลา 7 วัน และถ่ายเมล็ดทุก 2 วัน พบว่าภายหลังการหมักหนึ่งวันกองหมักมีปริมาณจุลินทรีย์สูงสุดโดยเฉพาะด้านล่างของกองหมัก หลังจากนั้นทั้งกองหมักจะมีปริมาณจุลินทรีย์ลดลงจากการหมักทั้งสองชุด พบว่าบริเวณล่างของกองหมักมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงกว่าบริเวณบนและกลางของกองหมักและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทุกระยะเวลาการหมัก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ เยื่อหุ้มเมล็ดจะถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์บางชนิด กลายเป็นของเหลวและไหลลงบริเวณล่างของกองหมัก (Wood and Lass, 1985) สารอาหารส่วนใหญ่ที่มีในบริเวณล่างมักอยู่ในรูปโมเลกุลเล็กๆ ซึ่ง จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถนำไปใช้ได้

2. คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ที่พบระหว่างการหมัก

ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากอาหาร TYGKCP สามารถจำแนกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ ยีสต์ แบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง แบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งและรูปทรงกลม ซึ่งแสดงดังตารางที่ 6 และ 7 โดยในการหมักชุดที่หนึ่งพบจุลินทรีย์ทั้งสี่กลุ่มตลอดระยะเวลาการหมัก ส่วนการหมักชุดที่สองในระยะเริ่มต้นของการหมักตรวจพบเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกรูปทรงกลมเท่านั้น และในการหมักเมล็ดโกโก้ทั้งสองชุดพบว่า หลังจากหมักได้หนึ่งวัน พบยีสต์เป็นส่วนใหญ่ รองลงมาเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปทรงกลม แบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง และแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง ตามลำดับ หลังจากนั้นจำนวนของยีสต์จะลดลง

3. การเปลี่ยนแปลงของยีสต์ระหว่างการหมัก

ผลการตรวจนับปริมาณของยีสต์ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้พบว่าในการหมักชุดที่หนึ่ง ตัวอย่างจากทั้งสามระดับของกองหมักมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของยีสต์แปรผันตามปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยเริ่มต้นมียีสต์ $2.11x10^5$ โคโลนีต่อกรัม เมื่อหมักได้หนึ่งวันกองหมักมีปริมาณยีสต์สูงสุดอยู่ในช่วง$1.12x10^8$-$1.64x10^8$ โคโลนีต่อกรัมแต่ระยะสุดท้ายของการหมักยีสต์ มีปริมาณลดลง ดังแสดงในรูปที่ 4 A สำหรับการหมักชุดที่สองระยะเริ่มต้นการหมักพบยีสต์ในปริมาณน้อยมาก แต่การเปลี่ยนแปลงของยีสต์ระหว่างการหมักก็เหมือนกับในการหมักชุดที่หนึ่งโดยอยู่ในช่วง $3.04x10^5$-$2.16x10^7$ โคโลนีต่อกรัม แล้วจำนวนยีสต์จะค่อย ๆ ลดลงจนวันสุดท้ายของการหมักซึ่งพบยีสต์อยู่ในช่วง $1.00x10^2$-$1.30x10^3$ โคโลนีต่อกรัม ดังแสดงในรูปที่ 4 B

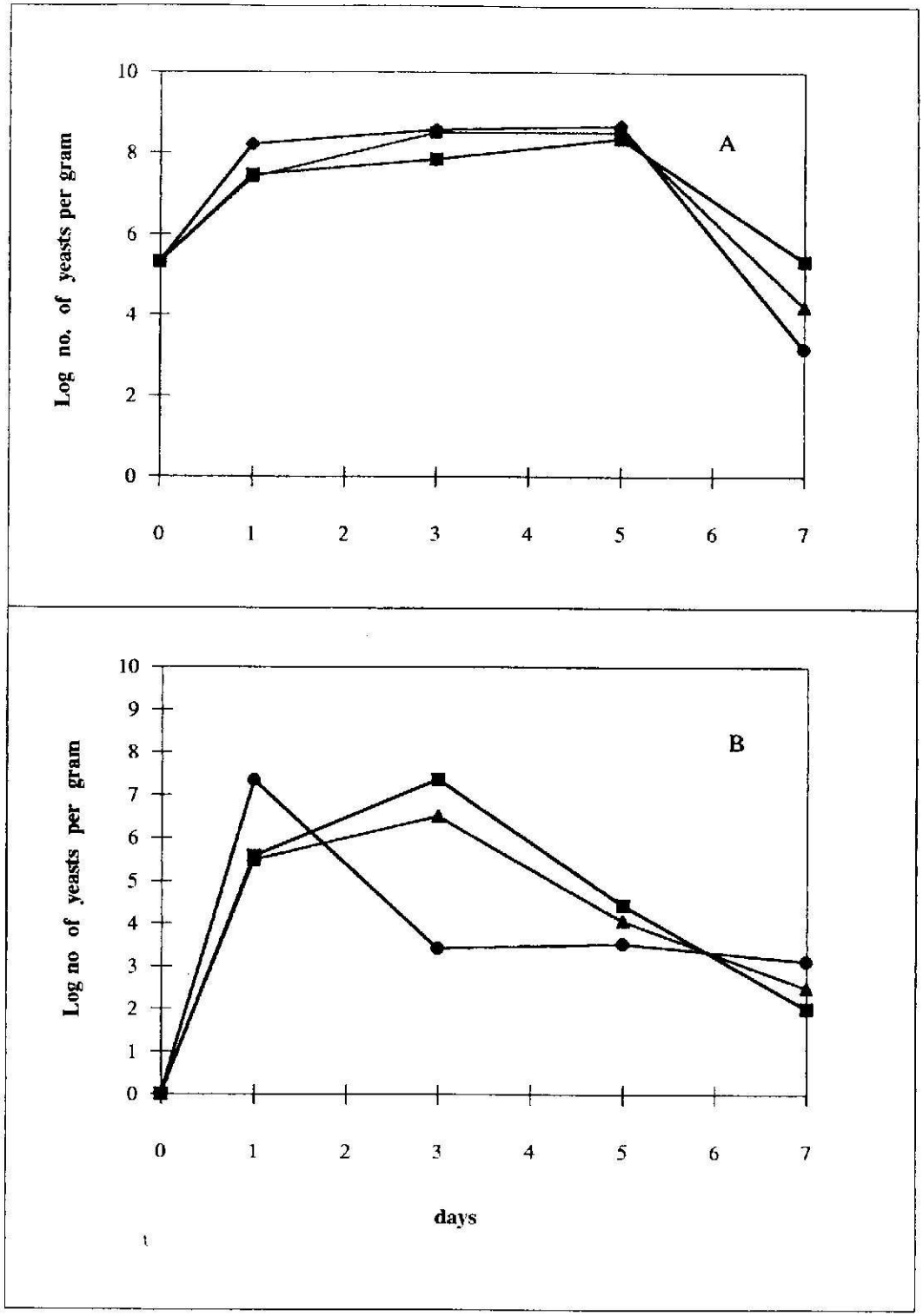
ในการหมักเมล็ดโกโก้ทั้งสองชุด พบว่าตัวอย่างจากทั้งสามระดับของกองหมักมีปริมาณของยีสต์เพิ่มสูงมากในวันที่หนึ่ง การที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากในวันแรกของการหมักเกิดสภาพไร้อากาศและน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของยีสต์มีปริมาณสูง รวมทั้งความเป็นกรด-ด่างในเยื่อหุ้มเมล็ดมี พีเอชเป็นกรดคือ 4.5-5.0 (Wood and Lass, 1985) ซึ่งเหมาะต่อการเจริญของยีสต์ ยีสต์เจริญและใช้น้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ในเยื่อหุ้มเมล็ดและเมล็ดโกโก้ (Rohan, 1963) เป็นแหล่งพลังงานและเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตส ซึ่งน้ำตาลเหล่านี้

ตารางที่ 6 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ที่พบระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ชุดที่หนึ่ง (อาหาร TYGKCP)

	จำนวนโคโลนีที่พบจาก 10 โคโลนี			
	รูปร่างทรงกลม แกรมบวก	รูปร่างแท่ง แกรมบวก	รูปร่างแท่ง แกรมลบ	ยีสต์
0 วัน				
บน	3	3	1	3
กลาง	2	3	2	3
ล่าง	2	3	2	3
1 วัน				
บน	1	2	2	5
กลาง	3	1	2	4
ล่าง	3	1	2	4
3 วัน				
บน	0	0	4	6
กลาง	1	4	2	3
ล่าง	1	4	2	3
5 วัน				
บน	2	1	3	4
กลาง	2	1	2	5
ล่าง	2	1	3	4
7 วัน				
บน	2	2	4	2
กลาง	3	1	4	2
ล่าง	2	2	5	1

ตารางที่ 7 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ที่พบระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ชุดที่สอง (อาหาร TYGKCP)

จำนวนโคโลนีที่พบจาก 10 โคโลนี				
ระยะเวลาการหมัก	รูปร่างทรงกลมแกรมบวก	รูปร่างแท่งแกรมบวก	รูปร่างแท่งแกรมลบ	ยีสต์
0 วัน				
บน	8	1	0	1
กลาง	10	0	0	0
ล่าง	10	0	0	0
1 วัน				
บน	2	1	2	5
กลาง	3	1	1	5
ล่าง	2	0	2	6
3 วัน				
บน	2	1	4	3
กลาง	1	1	5	3
ล่าง	1	1	5	3
5 วัน				
บน	3	1	3	3
กลาง	3	2	3	2
ล่าง	4	1	2	3
7 วัน				
บน	4	1	3	2
กลาง	5	1	3	1
ล่าง	4	1	2	3



รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณยีสต์ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

บน

กลาง

ล่าง

A การหมักชุดที่หนึ่ง

B การหมักชุดที่สอง

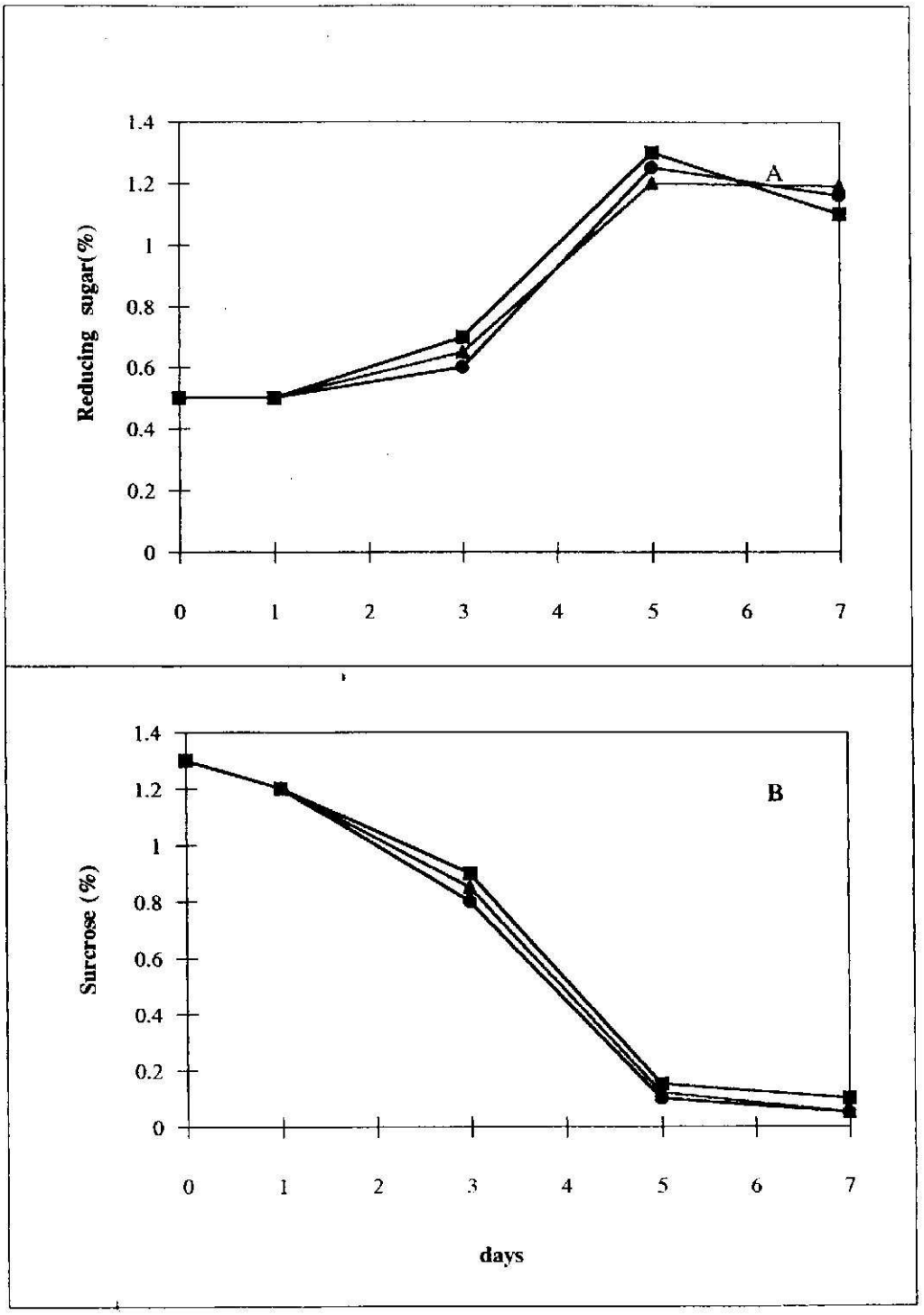
จะถูกเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ (Rombouts, 1952) ดังนั้นปริมาณน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้จึงลดลง ดังแสดงในรูปที่ 5 ระยะสุดท้ายของการหมักตัวอย่างจากทั้งสามระดับของกองหมักมีปริมาณยีสต์ลดลง ขณะเดียวกันก็มีแบคทีเรียแอซีติกเพิ่มปริมาณขึ้น ทำให้อัตราการใช้และอัตราการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นแอลกอฮอล์ลดลง มีผลให้การสะสมปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเมล็ดเพิ่มขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปน้ำตาลกลูโคสแสดงดังรูปที่ 5 โดยเมล็ดโกโก้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดหลังจากหมักได้ห้าวัน การที่ปริมาณยีสต์ลดลงอาจเนื่องมาจากแบคทีเรียแลคติกและแบคทีเรียแอซีติกผลิตกรดต่างๆ และทำให้อุณหภูมิในกองหมักสูงขึ้นซึ่งไม่เหมาะต่อการเจริญของยีสต์ จากการศึกษาของ Defiguireds และ Spittstoesser (1979) พบว่ายีสต์ทนอุณหภูมิ 48-60 °ซ ได้ไม่เกิน 50 นาที

นอกจากนี้พบว่า ปริมาณยีสต์เริ่มต้นของการหมักชุดที่หนึ่งมีมากกว่าการหมักชุดที่สอง อาจเป็นเพราะในการหมักชุดที่หนึ่งทำการหมักในโรงเรือนที่หมักเมล็ดโกโก้โดยเฉพาะ ซึ่งที่ตั้งของโรงหมักอยู่ใกล้สวนโกโก้ จึงมีจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักปะปนกัน และมีการนำเข่งผลไม้ซึ่งเคยผ่านการหมักเมล็ดโกโก้มาแล้วมาใช้หมัก จึงมีเชื้อยีสต์ที่หลงเหลือจากการหมักชุดก่อนจะติดอยู่ตามขอบเข่ง เมื่อนำมาหมักเมล็ดโกโก้จุลินทรีย์เหล่านี้ก็จะปะปนในการหมักชุดต่อไป

4. ชนิดของยีสต์ที่พบระหว่างการหมัก

จากการแยกยีสต์จากตัวอย่างเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมัก และนำยีสต์ที่ได้มาจัดจำแนกตามวิธีของ Kreger-Van Rij (1984) โดยมีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการสืบพันธุ์โดยอาศัยเพศ ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ และความสามารถในการใช้ยูเรีย สามารถจำแนกยีสต์ได้ดังนี้ ในการหมักชุดที่หนึ่งพบยีสต์ 2 ชนิดคือ *Candida sorbosa* และ *C. krusei* สำหรับการหมักชุดที่สองพบยีสต์ 3 ชนิด คือ *C. sake, C. tropicalis* และ *Saccharomyces cerevisiae*

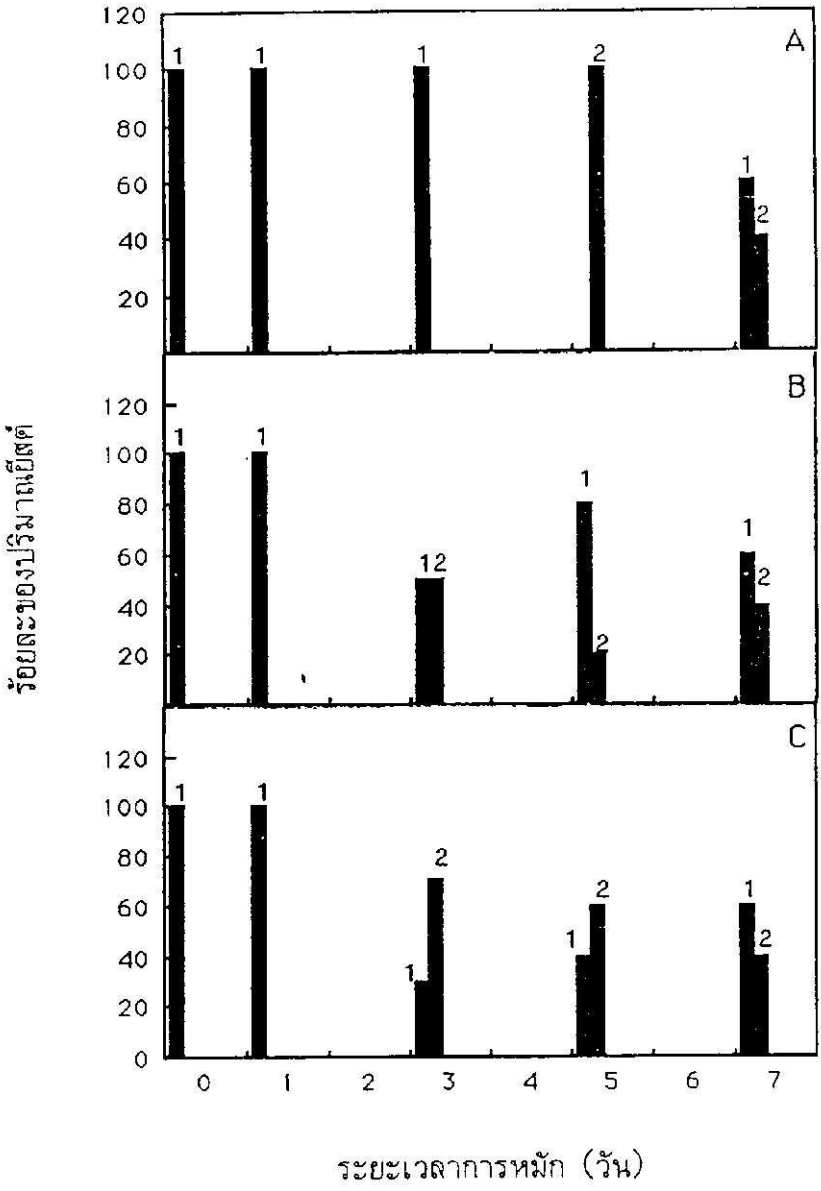
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทั้งชนิดและปริมาณของยีสต์ ในการหมักชุดแรกพบว่า ในระยะแรกของการหมัก (1-3 วัน) ตัวอย่างจากทั้งสามระดับของกองหมัก พบ *C. sorbosa* ร้อยละ 30 ถึงร้อยละ 100 ระยะสุดท้ายของการหมัก (5-7 วัน) พบ *C. sorbosa* และ *C. krusei* ในปริมาณใกล้เคียงกันดังแสดงในรูปที่ 6 สำหรับการหมักชุดที่สองพบว่าตลอดระยะเวลาการหมัก ตัวอย่างจากทั้งสามระดับของกองหมักส่วนใหญ่พบ *S. cerevisiae* ดังแสดงในรูปที่ 7 ขณะที่ Carr และคณะ (1979, 1981) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ พบยีสต์ *Hansenula spp; Kloeckera spp; Torulopsis spp; Saccharomyces spp; Candida spp; Pichia spp; Shizosaccharomyces spp; Saccharomycopsis spp; Rhodotourla spp; Debaryomyces spp.* และ *Hansenospora spp.*



รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส) ของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักชุดที่สอง

—●— บน —▲— กลาง —■— ล่าง

บริเวณล่าง



รูปที่ 6 ปริมาณและชนิดของยีสต์ที่แยกได้จากกองหมักเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักชุดที่หนึ่ง

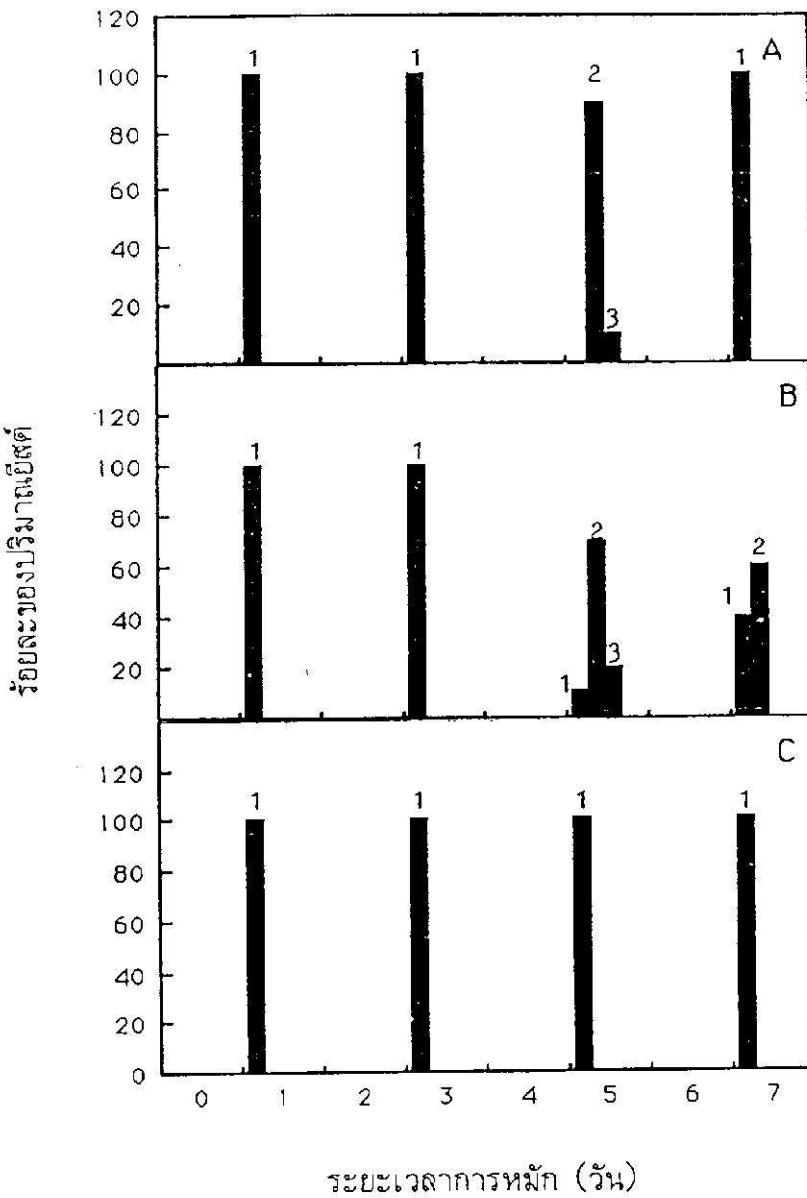
1-*Candida sorbosa*

2-*Candida krusei*

A บริเวณบน

B บริเวณกลาง

C บริเวณล่าง



รูปที่ 7 ปริมาณและชนิดของยีสต์ที่แยกได้จากกองหมักเมล็ดโกโกระหว่างการหมักชุดที่สอง

1-Saccharomyces cerevisiae A บริเวณบน

2-Candida sake B บริเวณกลาง

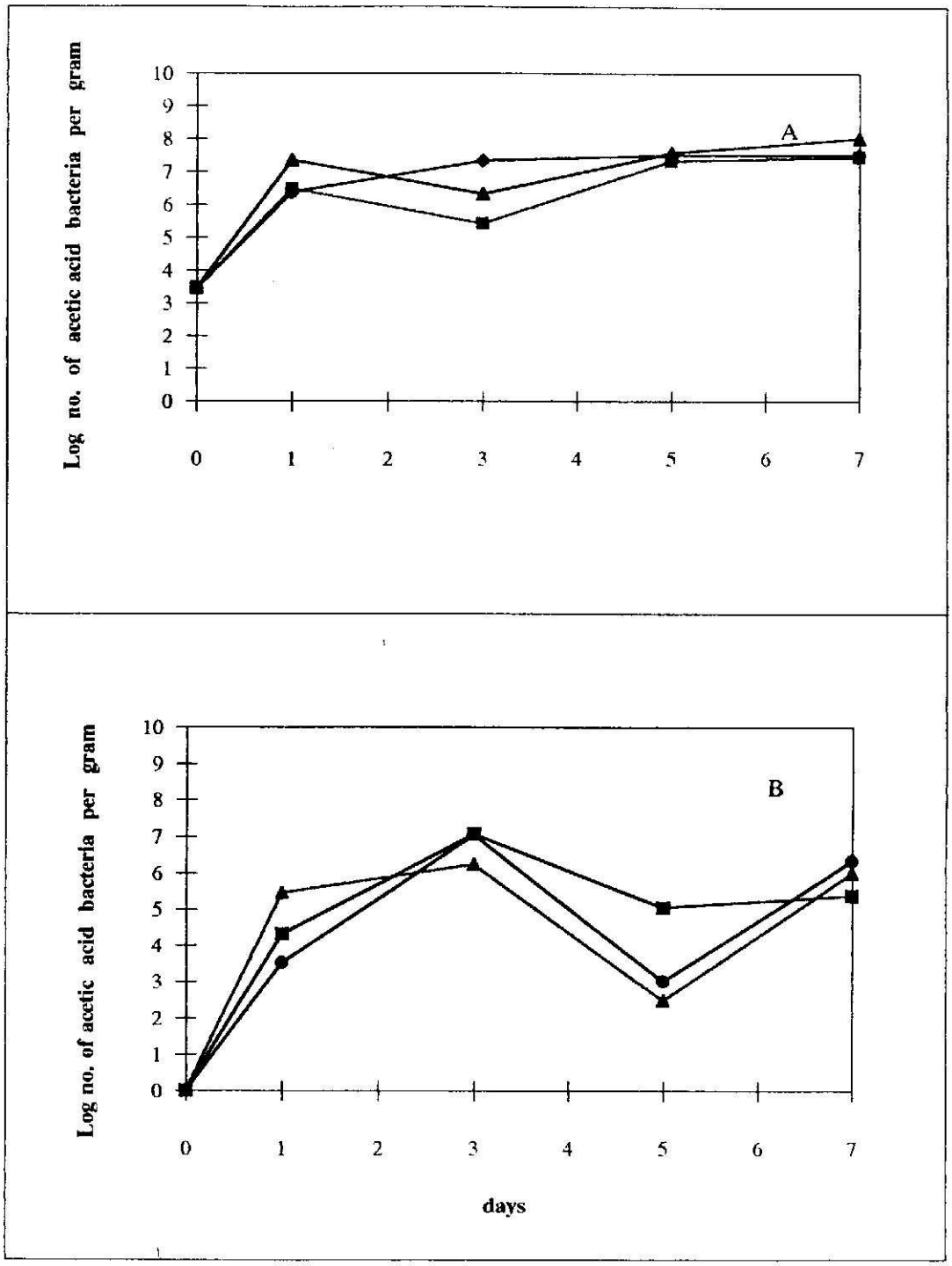
3-Candida tropicalis C บริเวณล่าง

5. การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียแอซีติกระหว่างการหมัก

ผลจากการหมักเมล็ดโกโก้ชุดที่หนึ่งพบแบคทีเรียแอซีติกตลอดระยะเวลาการหมักดังแสดงในรูปที่ 8 A และปริมาณแบคทีเรียแอซีติกเปลี่ยนแปลงโดยแปรผันตามปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ระยะเริ่มต้นของการหมักมีแบคทีเรียแอซีติก $2.85x10^3$ โคโลนีต่อกรัม หลังจากหมักได้หนึ่งวัน ปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มนี้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงน้อยมากและในวันสุดท้ายของการหมักยังพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ในปริมาณค่อนข้างสูงบริเวณด้านบนของกองหมักและบริเวณด้านล่างของกองหมัก มีแบคทีเรียแอซีติก $2.70x10^7$ และ $1.00x10^8$ โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าการหมักเมล็ดโกโก้ชุดที่หนึ่งอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นระหว่างการหมักไม่สูงพอที่จะทำลายแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้สำหรับการหมักชุดที่สองก่อนการหมักตรวจไม่พบแบคทีเรียแอซีติก แต่เมื่อหมักได้หนึ่งวันตัวอย่างจากทั้งสามระดับของกองหมักมีปริมาณของแบคทีเรียแอซีติกเพิ่มสูงขึ้นและมีปริมาณสูงสุดในวันที่สาม โดยเฉพาะบริเวณล่างสุดพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ $1.11x10^7$ โคโลนีต่อกรัม หลังจากนั้นจะลดลง วันสุดท้ายของการหมักพบอยู่ในช่วง $2.35x10^5$-$2.10x10^6$ โคโลนีต่อกรัม ดังแสดงในรูปที่ 8 B ผลการทดลองที่ได้ขัดแย้งกับผลการทดลองของ Ostovar และ Keeney (1973) ซึ่งพบแบคทีเรียแอซีติกน้อยมากในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ ทั้งนี้เพราะในระหว่างการหมักอุณหภูมิในกองหมักเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว วันที่หกพบว่าอุณหภูมิสูงอยู่ในช่วง 47-52°ซ แต่ในการหมักชุดที่สองหลังจากหมักได้ห้าวันกองหมักมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 43-48°ซ

การหมักชุดที่สองมีปริมาณแบคทีเรียแอซีติกสูงสุดในวันที่สามของการหมัก ซึ่งมีความสัมพันธ์กับพีเอชและปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริก ดังแสดงในรูปที่ 3 และปริมาณกรดระเหยได้ในรูปกรดแอซีติกดังแสดงในรูปที่ 9 โดยพบว่าเมื่อปริมาณแบคทีเรียแอซีติกเพิ่มขึ้น จะมีการสร้างกรดแอซีติกสูงขึ้นด้วย หลังจากหมักได้ห้าวันเมล็ดโกโก้มีปริมาณกรดแอซีติกสูงสุด โดยที่เมล็ดโกโก้จากบริเวณกลาง และล่างของกองหมักมีปริมาณกรดแอซีติกร้อยละ 0.88, 0.88 และ 1.08 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Dougen (1980) ซึ่งพบว่าช่วงแรกของการหมักมีการสร้างกรดแอซีติกในเมล็ดโกโก้ การสร้างกรดจะเพิ่มขึ้นภายหลังการหมักสามวัน และในวันที่ห้าปริมาณกรดแอซีติกมีปริมาณสูงสุด หลังจากนั้นจะลดลง ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริกจะสูงสุดในวันที่ห้าเช่นกัน โดยพบว่าเมล็ดโกโก้จากบริเวณบน กลาง และล่างของกองหมักมีปริมาณกรดทั้งหมดร้อยละ 1.51, 1.78 และ 1.79 ตามลำดับ สำหรับพีเอชบริเวณบนบริเวณกลาง และล่างของกองหมักมีค่าเป็น 4.50, 4.51 และ 4.45 ตามลำดับ

ในการหมักชุดที่หนึ่งตัวอย่างจากบริเวณล่างของกองหมักมีปริมาณแบคทีเรียแอซีติกสูงกว่าตัวอย่างจากบริเวณบนและกลางของกองหมัก และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทุกระยะเวลาของการหมัก ส่วนในการหมักชุดที่สอง ตัวอย่างจากบริเวณล่างของกองหมักมีแบคทีเรียแอซีติกสูงกว่าตัวอย่างจากบริเวณบนและกลางของกองหมัก และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 3, 5 และ 7



รูปที่ 8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแอซีติกระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

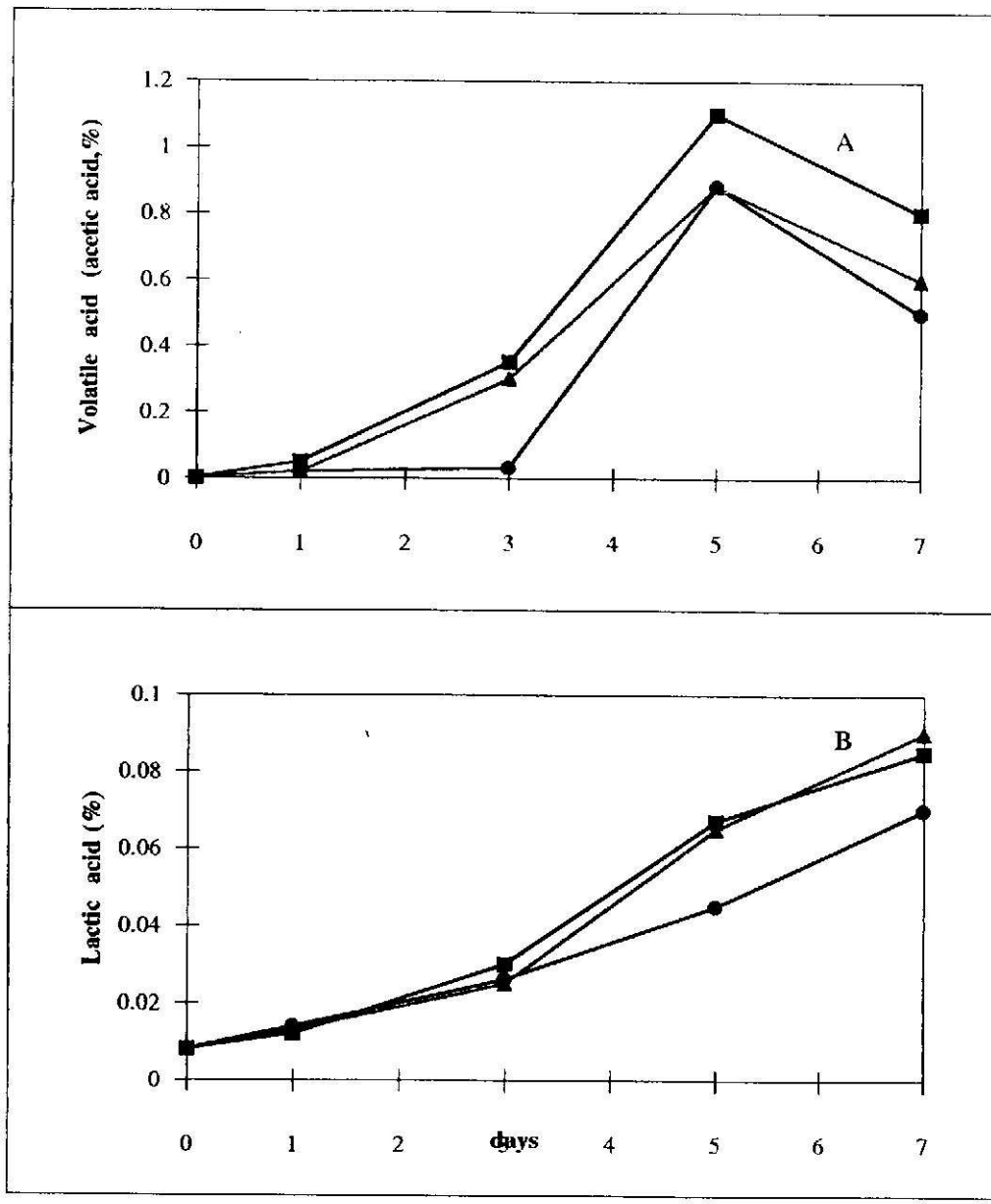
บน

กลาง

ล่าง

A การหมักชุดที่หนึ่ง

B การหมักชุดที่สอง



รูปที่ 9 การเปลี่ยนแปลงกรดระเหยได้ (กรดแอซีติก) และกรดแลคติกของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักชุดที่สอง

—●— บน —▲— กลาง —■— ล่าง

บริเวณล่าง

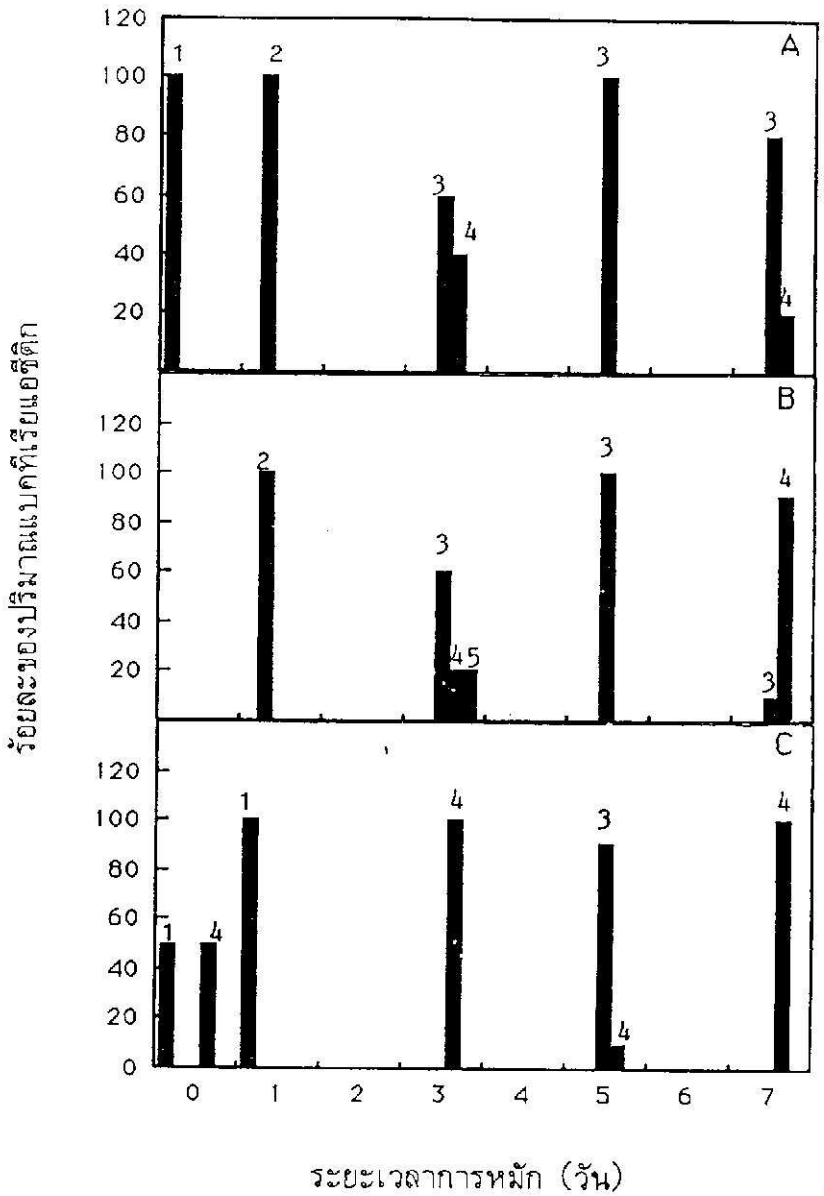
6. ชนิดของแบคทีเรียแอซีติกที่พบระหว่างการหมัก

จากการแยกจุลินทรีย์พวกแบคทีเรียแอซีติกจากการหมักเมล็ดโกโก้ทั้งสองชุด และนำจุลินทรีย์ที่ได้มาจำแนกตามหลักของ Gibbs และ Shapton (1968), Krieg และ Hott (1986) พบว่าในการหมักเมล็ดโกโก้ชุดที่หนึ่งพบ *Gluconobacter oxydans* แต่ในการหมักชุดที่สองไม่พบแบคทีเรียในกลุ่มนี้ สำหรับแบคทีเรียแอซีติกตระกูล *Acetobacter* นั้น ในการหมักชุดที่หนึ่งพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ 4 ชนิดคือ *A. ascendens, A. lovaniense, A. rancens* และ *A. mesoxydans* แต่ในการหมักชุดที่สองพบแบคทีเรียในกลุ่มนี้ 2 ชนิดคือ *A. lovaniense* และ *A. rancens*

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทั้งชนิดและปริมาณของแบคทีเรียแอซีติก ในการหมักเมล็ดโกโก้ชุดที่หนึ่ง ระยะเริ่มต้นการหมักพบ *G. oxydans* จากตัวอย่างที่เก็บจากบริเวณบนและล่างของกองหมัก ต่อมาพบ *A. ascendens, A. rancens* และ *A. lovaniense* และ *Acetobacter rancens* ปะปนกันในปริมาณสูง ดังแสดงในรูปที่ 10 สำหรับการหมักชุดที่สองพบว่าช่วงแรกของการหมักตัวอย่างจากทั้งสามระดับของกองหมักมี *A. rancens* ร้อยละ 70 ถึงร้อยละ 100 และระยะสุดท้ายของการหมักพบ *A. rancens* ร้อยละ 80 ถึงร้อยละ 100 ดังแสดงในรูปที่ 11 Carr (1985) รายงานการหมักเมล็ดโกโก้ในประเทศมาเลเซียและแอฟริกาพบแบคทีเรียแอซีติก เช่น *A. rancens, A. xylinum, A. ascendens, A. lovaniense* และ *G. oxydans* Ostovar และ Keeney (1973) พบแบคทีเรียแอซีติกระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ คือ *A. roseus, A. aceti* และ *A. suboxydans*

7. การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียแลคติกระหว่างการหมัก

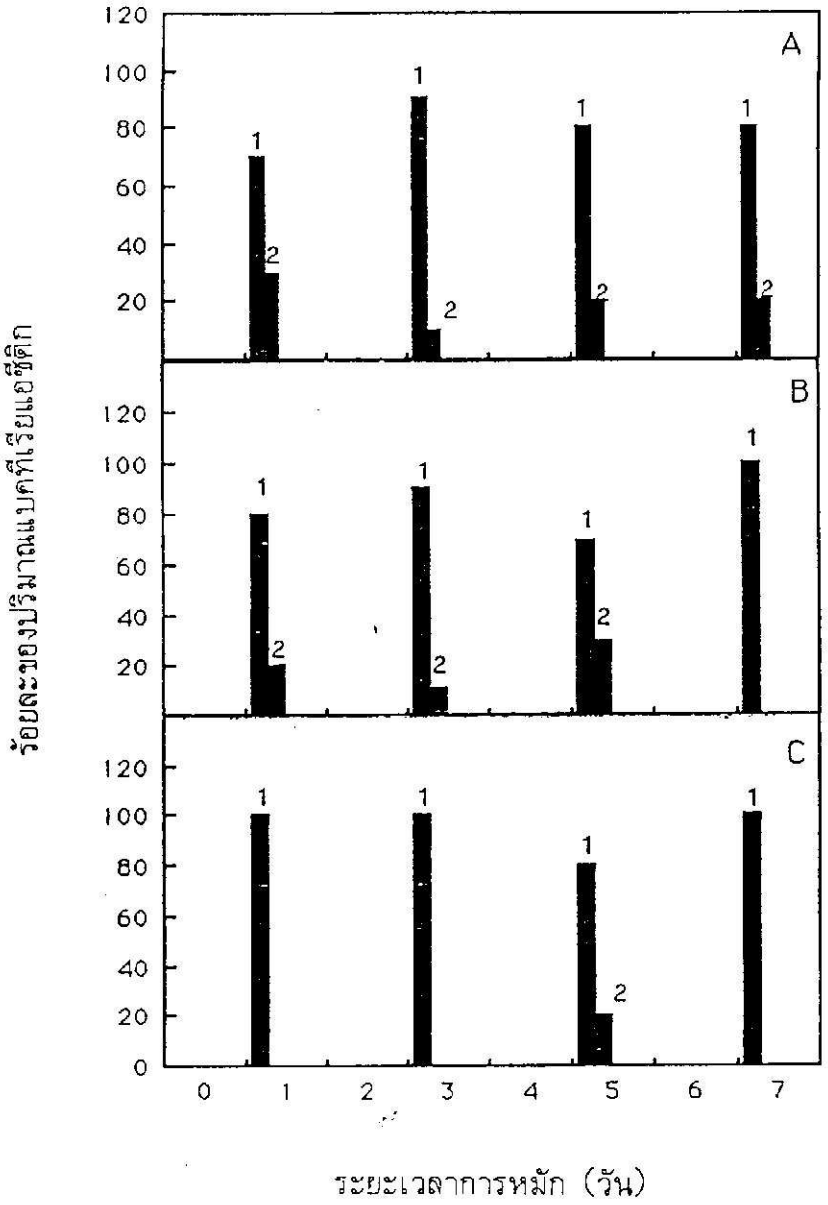
ผลการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียแลคติกในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ทั้งสองชุดดังแสดงในรูปที่ 12 A ในการหมักชุดแรกเมล็ดโกโก้มีปริมาณแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นคือ $1.8x10^3$ โคโลนีต่อกรัม ส่วนใหญ่มักจะปะปนมาจากผิวของฝักโกโก้ รวมทั้งเครื่องมือเครื่องใช้ระหว่างการหมัก (Ostovar and Keeney, 1973) และมีปริมาณเพิ่มขึ้นทั้งสามระดับของกองหมักจนถึงวันที่ห้าซึ่งจะพบแบคทีเรียแลคติก สูงสุด โดยเฉพาะบริเวณล่างมี $2.8x10^7$ โคโลนีต่อกรัม หลังจากนั้นจะลดลงจนถึงวันสุดท้ายของการหมัก มีปริมาณแบคทีเรียอยู่ในช่วง $2.68x10^6$-$2.38x10^7$ โคโลนีต่อกรัม ส่วนการหมักชุดที่สองเมล็ดโกโก้มีปริมาณแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้น $1.39x10^5$ โคโลนีต่อกรัม หลังจากหมักได้หนึ่งวันพบว่า ตัวอย่างจากทั้งสามระดับของกองหมักมีปริมาณแบคทีเรียแลคติกสูงสุดอยู่ในช่วง $1.07x10^8$-$3.08x10^8$ โคโลนีต่อกรัม ดังแสดงในรูปที่ 12 B ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wood (1975) พบว่าแบคทีเรียแลคติกเป็นจุลินทรีย์ที่พบมากในวันแรกของการหมัก และพบตลอดระยะเวลาการหมัก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในวันแรกของการหมักจะเกิดสภาพไร้อากาศซึ่งเหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ หลังจากนั้นค่อย ๆ ลดลง จนถึงวันที่ห้าพบว่ามีปริมารแบคทีเรียแลคติกต่ำสุดโดยพบอยู่ในช่วง $3.00x10^2$-$1.07x10^5$ โคโลนีต่อกรัม เนื่องมาจากการกลับเมล็ดโดยการถ่ายเข่ง ซึ่งเป็นการให้อากาศแก่กองหมัก ทำให้ปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มนี้ลดลง (Wood and Lass, 1985)



รูปที่ 10 ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียแอซีติกที่แยกได้จากกองหมักเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักชุดที่หนึ่ง

1-Gluconobacter oxydans
2-Acetobacter ascendens
3-Acetobacter lovaniense
4-Acetobacter rancens
5-Acetobacter mesoxydans

A บริเวณบน
B บริเวณกลาง
C บริเวณล่าง



รูปที่ 11 ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียแอซีติกที่แยกได้จากกองหมักเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักชุดที่สอง

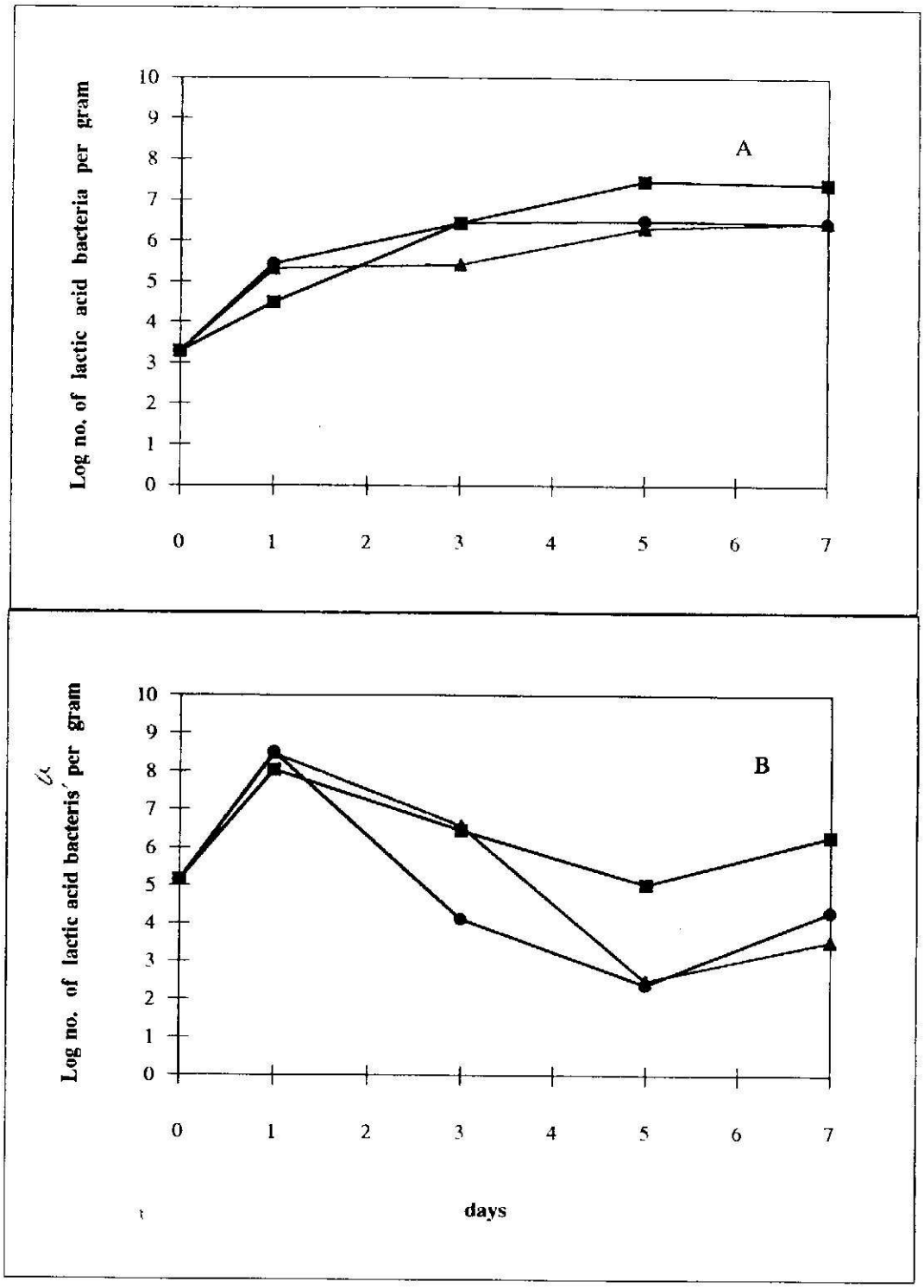
1-Acetobacter rancens

2-Acetobacter lovaniense

A บริเวณบน

B บริเวณกลาง

C บริเวณล่าง



รูปที่ 12 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลคติกระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

บน

กลาง

ล่าง

A การหมักชุดที่หนึ่ง

B การหมักชุดที่สอง

จากการหมักชุดที่สอง ถึงแม้ปริมาณแบคทีเรียแลคติกจะลดลงภายหลังการหมักได้หนึ่งวัน แต่พบว่าปริมาณกรดแลคติกยังคงเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก โดยวันสุดท้ายของการหมักพบว่าตัวอย่างจากบริเวณบน บริเวณกลาง และบริเวณล่างของกองหมักมีปริมาณกรดแลคติกร้อยละ 0.071, 0.087 และ 0.085 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 9 อาจเนื่องมาจาก กรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ที่ระเหยไม่ได้ ดังนั้นเมื่อแบคทีเรียแลคติกผลิตกรดแลคติกออกมาระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ จึงทำให้มีการสะสมกรดแลคติกในเมล็ด นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์อีกหลายชนิดที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้ (Frazier and Westhoff, 1988) จึงทำให้ปริมาณกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก

นอกจากนี้พบว่าบริเวณล่างของกองหมักมีปริมาณแบคทีเรียแลคติกสูงกว่าบริเวณบนและกลางของกองหมัก และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 5 และ 7 เนื่องมาจากแบคทีเรียแลคติกเป็นพวก facultative anaerobe ซึ่งบริเวณตอนล่างของกองหมักมีสภาพที่เหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรียพวกนี้

8. ชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่พบระหว่างการหมัก

ผลการแยกแบคทีเรียแลคติกจากการหมักเมล็ดโกโก้ทั้งสองชุด และนำจุลินทรีย์ที่ได้มาจำแนกตามหลักของ Sharpe และ Fryer (1966), Krieg และ Hott (1986) สามารถจำแนกแบคทีเรียแลคติกได้ 3 ตระกูล คือ *Streptococcus* , *Lactobacillus* และ *Leuconostoc*

แบคทีเรียแลคติก ตระกูล *Streptococcus* ที่พบระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในการหมักชุดที่หนึ่งมี 4 ชนิดคือ *S. thermophilus, S. lactis, S. mitis* และ *S. faecium* สำหรับการหมักชุดที่สองพบ *S. thermophilus* และ *S. mitis* เหมือนกับการหมักชุดแรก และยังพบ *S. zooepidemicus* และ *S. equi* ด้วย

แบคทีเรียแลคติก ตระกูล *Leuconostoc* ที่พบระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในการหมักชุดที่หนึ่งมี 2 ชนิดคือ *Leu. dextranicum* และ *Leu. mesenteroides* แต่ในการหมักชุดที่สองพบเฉพาะ *Leu. mesenteroides*

แบคทีเรียแลคติก ตระกูล *Lactobacillus* ที่พบระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในการหมักชุดที่หนึ่งมี 2 ชนิด คือ *L. plantarum* และ *L. casei* สำหรับการหมักชุดที่สองพบเฉพาะ *L. plantarum* เท่านั้น

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทั้งชนิดและปริมาณของแบคทีเรียแลคติกในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ทั้ง 2 ชุด พบว่าในการหมักชุดที่หนึ่ง ช่วงแรกของการหมัก เมล็ดโกโก้จากทั้งสามระดับของกองหมักส่วนใหญ่พบ *L. casei, S. lactis* และ *L. mesenteroides* โดยเฉพาะในวันที่สาม พบ

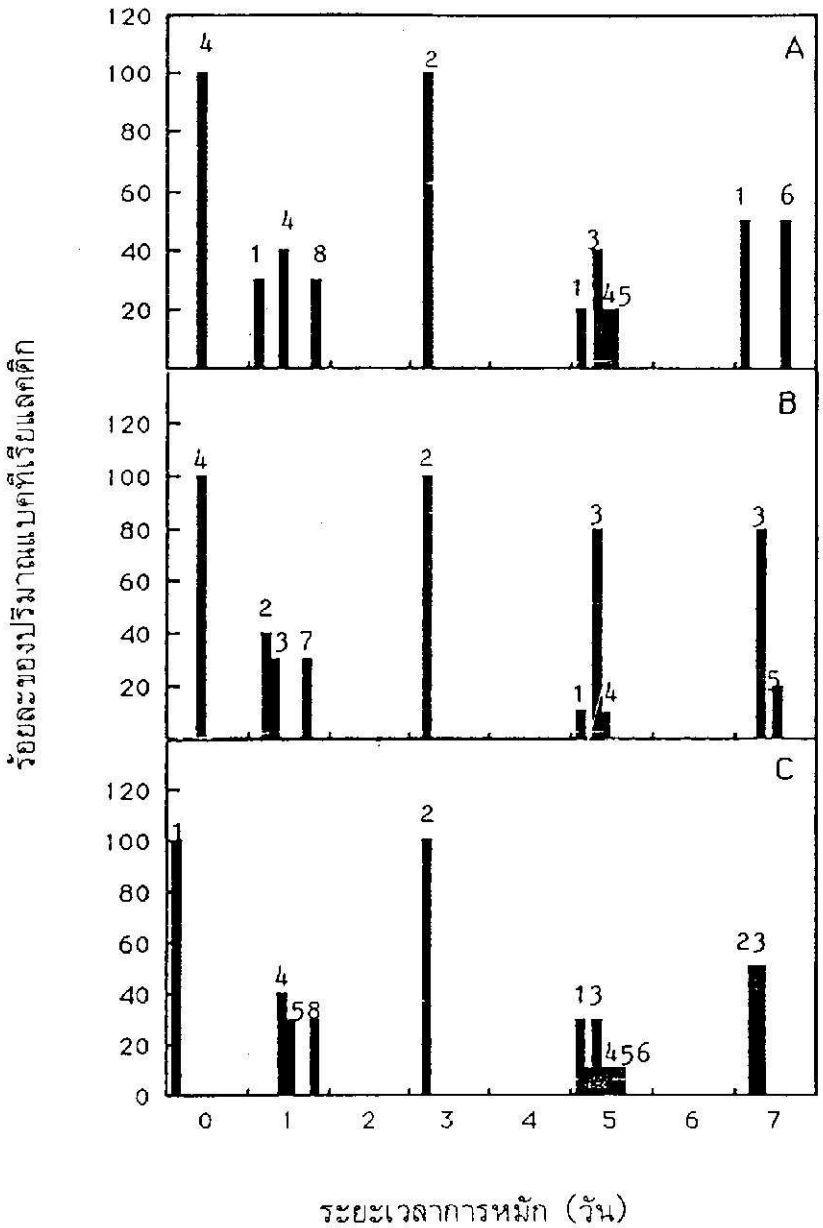
เฉพาะ *L. casei* และในระยะสุดท้ายของการหมัก พบ *S. thermophilus, S. lactis* และ *S. mitis* เป็นส่วนใหญ่ดังแสดงในรูปที่ 13

สำหรับการหมักชุดที่สอง พบว่าภายหลังการหมักหนึ่งวันตัวอย่างจากทั้งสามระดับของกองหมักส่วนใหญ่พบ *Leu. mesenteroides* ตลอดระยะเวลาการหมักโดยเฉพาะวันที่ห้าพบอยู่ในช่วงร้อยละ 80-100 แต่ระยะสุดท้ายของการหมักโดยเฉพาะบริเวณตอนบนและตอนกลางของกองหมักพบ *S. thermophilus* ร้อยละ 90-100 สำหรับตอนล่างของกองหมักพบ *S. thermophilus* และ *S. lactis* มีปริมาณใกล้เคียงกัน ดังแสดงในรูปที่ 14 ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Ostovar และ Keeney (1973) ซึ่งพบแบคทีเรียแลคติกตลอดระยะเวลาการหมักเช่นกัน โดยในช่วงแรกของการหมักส่วนใหญ่พบ *L. fermenti, L. plantarum, L. lactis* และ *Leu. mesenteroides* ในระยะสุดท้ายของการหมักส่วนใหญ่พบ *L. bulgaricus, L. acidophilus, L. lactis* และ *S. thermophilus* ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นจุลินทรีย์ที่ทนความร้อนได้ดี

จากการทดลองพบว่าชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่พบระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ทั้งสองชุดแตกต่างกัน น่าจะเป็นผลมาจากสภาพแวดล้อมที่หมักต่างกันดังได้กล่าวมาแล้ว เมล็ดโกโก้ที่ได้หลังการหมักชุดที่สองมีค่าดรรชนีการหมักประมาณ 1 ซึ่งหมายถึงระดับของการหมักที่ได้ที่ (Wood and Lass, 1985) ดังแสดงในรูปที่ 15 และเมื่อนำไปตากแดดให้แห้ง ตรวจดูสีของเมล็ดโกโก้แห้งด้วยวิธี Cut-Test พบว่าเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักชุดที่สองมีคุณภาพด้านสีเป็นที่ยอมรับได้ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 คุณภาพด้าน cut test ของเมล็ดโกโก้แห้งจากการหมักชุดที่สอง

ลักษณะสีเมล็ดโกโก้แห้ง	ร้อยละ		
	บน	กลาง	ล่าง
เมล็ดสีน้ำตาล	93.51	91.0	92.0
เมล็ดสีน้ำตาลปนม่วง	2.5	5.5	4.0
เมล็ดสีม่วง	3.5	2.0	2.0
เมล็ดสีน้ำตาลหรือสีหินชนวน	0.5	1.5	2.0



รูปที่ 13 ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากกองหมักเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักชุดที่หนึ่ง

1-Lactobacillus plantarum

2-Lactobacillus casei

3-Streptococcus thermophilus

4-Streptococcus lactis

5-Streptococcus mitis

6-Streptococcus faecium

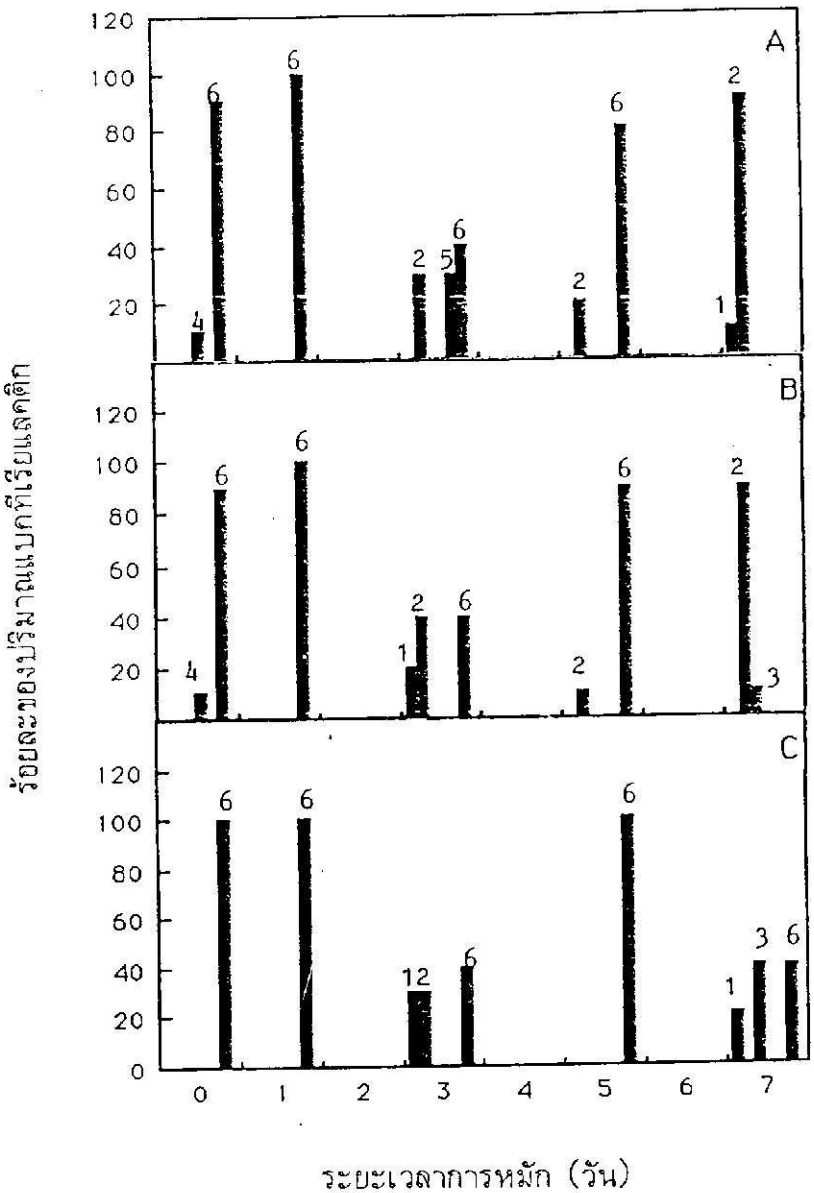
7-Leuconostoc dextranicum

8-Leuconostoc mesenteroides

A บริเวณบน

B บริเวณกลาง

C บริเวณล่าง



รูปที่ 14 ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากกองหมักเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักชุดที่สอง

1-Lactobacillus plantarum

2-Streptdcoccus thermophilus

3-Streptococcus zooepidemicus

4-Streptococcus equi

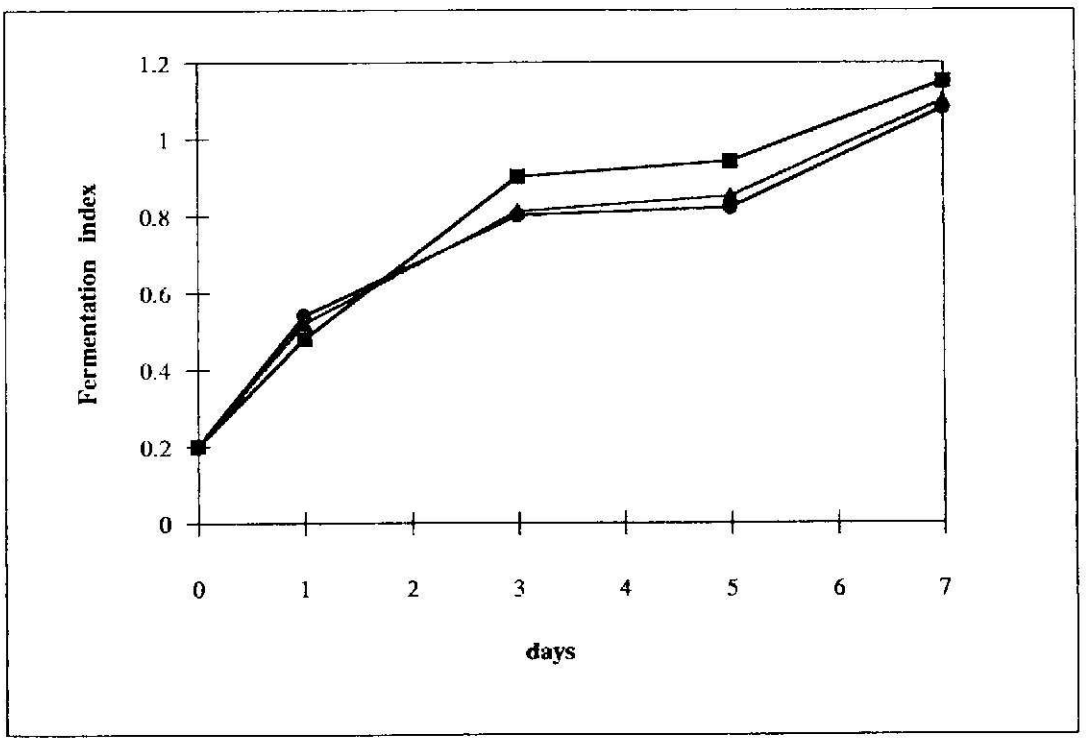
5-Lactobacillus mesenteroides

6-Leuconostoc mesenteroides

A บริเวณบน

B บริเวณกลาง

C บริเวณล่าง



รูปที่ 15 การเปลี่ยนแปลงดัชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักชุดที่สอง

ตอนที่ 2 บทบาทของจุลินทรีย์ที่เติมต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้หมัก

วิธีการ

1. การเตรียมวัตถุดิบ : เมล็ดโกโก้

นำผลโกโก้พันธุ์สุกได้ที่จากสวนของเกษตรกร บ่มไว้ในกระสอบป่านเป็นเวลา 3 วัน แล้วทำความสะอาดผลโกโก้โดยล้างด้วยน้ำคลอรีนเข้มข้น 200 ppm และผึ่งให้แห้ง ทำการผ่าเปลือกแกะเมล็ดโกโก้สดทั้งหมดออกภายในตู้เขี่ยเชื้อด้วยความระมัดระวัง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ นำเมล็ดโกโก้ใส่ขวดฝาเกลียวขนาด 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 ทั้งยีสต์ และแบคทีเรียจากหลอดอาหารแข็งที่เก็บเชื้อไว้ ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหาร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการแยกเชื้อออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 7000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อสองครั้ง แล้วเตรียมเป็นสารแขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์สำหรับใช้เติมลงในการหมักเมล็ดโกโก้

3. การหมักเมล็ดโกโก้โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเดี่ยว

3.1 บทบาทของยีสต์ในการหมักเมล็ดโกโก้

ใช้ยีสต์แต่ละพันธุ์ที่คัดเลือกได้คือ *S. cerevisiae*, *C. sorbosa* และ *C. sake* และเพาะเลี้ยงตามการทดลองข้อ 2 เติมลงในขวดฝาเกลียวที่มีเมล็ดโกโก้สด 500 กรัม ภายใต้เทคนิคปลอดเชื้อ ใช้เชื้อเริ่มต้นประมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก (โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาว

คลื่น 540 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.5 (Coleman and Ooraikul, 1989) ซึ่งมีเซลล์ยีสต์ประมาณ 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตรลงไป ทำการทดลองแบบสุ่มตลอด สำหรับชุดควบคุมไม่มีการเติมเชื้อเริ่มต้น แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ และทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ระหว่างการหมักมีการกำจัดของเหลวที่เกิดจากกระบวนการหมักภายในขวดหมักออกทิ้งด้วยปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำการวัดอุณหภูมิ และสุ่มตัวอย่างแต่ละชุดการทดลองที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน นำมาวิเคราะห์ทางเคมีและทางจุลินทรีย์ คือ ค่าพีเอช ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดซิตริก กรดแลคติก กรดระเหยได้ในรูปกรดแอซีติก น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปน้ำตาลกลูโคส ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ตรวจนับยีสต์ และ วัดค่าดัชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ นำเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมัก 7 วัน ไปทำแห้งด้วยแสงแดดร่วมกับการอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน กลับเมล็ดทุก ๆ 5 ชั่วโมง จนความชื้นของเมล็ดลดลงเหลือประมาณร้อยละ 7-9 แล้วสุ่มตัวอย่างเมล็ดโกโก้แห้งมาวิเคราะห์ ปริมาณน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลรีดิวซ กรดทั้งหมด กรดที่ระเหยได้ กรดแลคติก ค่าพีเอช ค่าดัชนีการหมัก ปริมาณไขมัน ปริมาณความชื้น และหาค่า Cut Test แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้ภายในกลุ่ม เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ยีสต์ที่เหมาะสมมากที่สุดเพียงสายพันธุ์เดียว สำหรับใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

3.2 บทบาทของแบคทีเรียแลคติกในการหมักเมล็ดโกโก้

ทำการทดลองและตรวจผลเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.1 แต่ใช้แบคทีเรียแลคติกแต่ละสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ คือ *L. casei*, *Leu. mesenteroides* และ *S. thermophilus* เป็นเชื้อเริ่มต้นแทน โดยมี ค่าการดูดกลืนแสงท660 นาโนเมตร เป็น 0.25 ซึ่งมีเซลล์จุลินทรีย์ประมาณ 10^5 โคโลนี ต่อมิลลิลิตรลงไป และตรวจนับแบคทีเรียแลคติกแทนการตรวจนับยีสต์แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้ภายในกลุ่ม เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่เหมาะสมมากที่สุดมาเพียงสายพันธุ์เดียว สำหรับใช้การทดลองขั้นตอนต่อไป

3.3 บทบาทของแบคทีเรียแอซีติกในการหมักเมล็ดโกโก้

ทำการทดลองและตรวจผลเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.1 แต่ใช้แบคทีเรียแอซีติกแต่ละสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ คือ *A. rancen*, *A..ovaniense* และ *G. oxydan* เป็นเชื้อเริ่มต้นแทน โดยมี ค่าการดูดกลืนแสงที่660 นาโมเมตร/เป็น 0.25 ซึ่งมีเซลล์จุลินทรีย์ประมาณ 10^5 โคโลนี ต่อมิลลิลิตรลงไป และตรวจนับแบคทีเรียแอซีติกแทนการตรวจนับยีสต์แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้ภายในกลุ่ม เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียแอซีติกที่เหมาะสมมากที่สุดมาเพียงสายพันธุ์เดียว สำหรับใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

4 การหมักเมล็ดโกโก้โดยใช้เชื้อเริ่มต้นผสมในขวด

การหมักด้วยจุลินทรีย์หลายชนิดจะใช้ยีสต์ แบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแอซีติกที่คัดเลือกได้ในการทดลองข้อ 3.1-3.3 เติมลงในขวดฝาเกลียวที่มีเมล็ดโกโก้ 500 กรัม โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ และหมักเมล็ดโกโก้ที่สภาวะตามข้อ 3. ในขั้นตอนนี้ทำการศึกษาถึงชนิดจุลินทรีย์ที่ใช้เติมในลักษณะต่าง ๆ กันคือ (เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์)

4.1 ใช้จุลินทรีย์ที่คัดเลือกเติมลงไปพร้อมกันในตอนเริ่มต้นการหมัก

โดยใช้เชื้อเริ่มต้นแต่ละสายพันธุ์ปริมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ แล้วหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งมีชุดการทดลอง ดังนี้

4.1.1 เติมยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1 แบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 และแบคทีเรียแอซีติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3 ลงไปพร้อมกัน

4.1.2 เติมเฉพาะยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1 และแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ลงไปพร้อมกันในการหมัก

4.1.3 เติมเฉพาะยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1 และแบคทีเรียแอซีติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3 ลงไปพร้อมกันในการหมัก

4.2 ใช้จุลินทรีย์ที่คัดเลือกเติมในระยะการหมักที่ต่าง ๆ กัน

โดยอ้างอิงการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ และใช้เชื้อเริ่มต้นแต่ละสายพันธุ์ปริมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ ซึ่งมีชุดการทดลอง ดังนี้

4.2.1 เติมยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1 ตอนเริ่มต้นการหมัก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเติมแบคทีเรียแอซีติก์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3 ลงไป

4.2.2 เติมยีสต์และแบคทีเรียแลคติก ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1 และ 3.2 ลงไปตอนเริ่มต้นการหมัก หมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมแบคทีเรียแอซีติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3 ลงไป

4.2.3 เติมยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1 ลงไปตอนเริ่มต้นการหมัก หมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมแบคทีเรียแลคติกและแบคทีเรียแอซีติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 และ 3.3 ลงไปพร้อมกัน

ทำการหมักจนครบ 7 วัน ระหว่างการหมักทำการวัดอุณหภูมิ และเก็บตัวอย่างแต่ละชุดการทดลองที่เวลา 0,1,2,3,4,5,6 และ 7 วัน เพื่อตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและทางจุลินทรีย์เช่นเดียวกันกับการทดลองในข้อ 3.1

4.3 เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการทดลองข้อ 4.1 และ 4.2

โดยการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติของปริมาณกรดแลคติก ค่าดัชนีการหมัก กรดทั้งหมด กรดที่ระเหยได้ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมัก และค่า Cut Test ของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากการหมัก เพื่อหาความแตกต่างของชุดการทดลอง แล้วคัดเลือกชุดการทดลองที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

5. การหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักโดยใช้เชื้อเริ่มต้นผสม

ใช้จุลินทรีย์และสภาวะการหมักที่คัดเลือกได้จากการทดลองในตอนที่ 4.3 เติมลงในกองเมล็ดโกโก้ที่เตรียมไว้สำหรับหมัก ซึ่งบรรจุอยู่ในกล่องหมักขนาด 34x76x32 เซนติเมตร โดยทดลองหมักเมล็ดโกโก้ทั้งหมด 2 ครั้งในแต่ละครั้งใช้เชื้อเริ่มต้นปริมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก และหมักด้วยวิธีการหมักแบบพัฒนาตามวิธีของ ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก และคณะ (2534) สำหรับชุดควบคุมทำการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักโดยไม่ได้เติมเชื้อเริ่มต้น การทดลองทั้งหมดทำที่ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร ทำการวัดอุณหภูมิ และสุ่มตัวอย่างเมล็ดโกโก้หมักที่เวลา 0,1,2,3 และ 4 วัน วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์ของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมัก ตามข้อ 3.1

เมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักในวันสุดท้าย นำไปทำแห้งด้วยแสงแดดจนมีความชื้นลดลงเหลือประมาณร้อยละ 20-25 แล้วโกโก้ไปอบต่อด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส กลับเมล็ดทุก 3 ชั่วโมง จนเมล็ดโกโก้ที่อบมีความชื้นลดลงเหลือประมาณร้อยละ 7-9 โดยน้ำหนัก เปรียบเทียบผลการทดลองกับชุดการหมักควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อเริ่มต้น

6. การวิเคราะห์

6.1 การวิเคราะห์ทางเคมี

- วัดค่าความเป็นกรดด่าง ทั้งในส่วนเมล็ดและเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้
- วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปร้อยละกรดซิตริก (A.O.A.C; 1990)
- วิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก (Barber and Summerson, 1941)
- วิเคราะห์ปริมาณกรดที่ระเหยได้ในรูปร้อยละกรดแอซีติก (A.O.A.C; 1990)
- วิเคราะห์ปริมาณของน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Luff-Schoorl (A.O.A.C; 1990; Egan, *et al.*, 1981) ทั้งในส่วนเมล็ดและเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้
- วิเคราะห์ปริมาณไขมันในเมล็ดโกโก้แห้ง (A.O.A.C; 1990)
- วิเคราะห์ความชื้นในเมล็ดโกโก้แห้ง (A.O.A.C; 1990)

6.2. ตรวจสอบสี และความสมบูรณ์ของเมล็ดโกโก้แห้ง ด้วยวิธี Cut Test ใช้เมล็ดโกโก้แห้ง 30 เมล็ด ผ่าเป็นสองซีก แล้วเทียบสีของเมล็ดกับสมุดเทียบสี Munsell โดยแบ่งสีออกเป็นสีน้ำตาลช็อกโกแลต (10Pr3/1 หรือ 2) สีม่วงแกมน้ำตาล สีหินชนวน และสีอื่น ๆ แล้วคิดเป็นร้อยละของเมล็ดสีต่าง ๆ

6.3. หาค่าดัชนีการหมัก (Fermentation Index) ของเมล็ดโกโก้ขณะหมัก (Gourieva and Tserevitinov, 1979)

6.4 การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ ตรวจนับจุลินทรีย์ โดยวิธี Standard Plate Count Technique (American Public Health Association, 1960) ดังนี้

- ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด บนอาหาร TYGKCP Agar
- ตรวจนับจำนวนยีสต์ บนอาหาร PDA
- ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลคติก บนอาหาร MRS Agar
- ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแอซีติก บนอาหาร DSM Agar

6.5. การวิเคราะห์ความสัมพันธุ์ของผลการทดลองในเชิงสถิติ วิเคราะห์ความสัมพันธุ์จากผลการทดลองที่ได้ทั้งทางกายภาพและทางเคมีกับชนิดหรือกลุ่มของจุลินทรีย์ ที่ใช้ในการหมักเมล็ดโกโก้แต่ละชุดการทดลองในเชิงสถิติ (เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง) โดยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Rang Test) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Irristate Version 91 (1991)

ผลการทดลองและวิจารณ์ตอนที่ 2

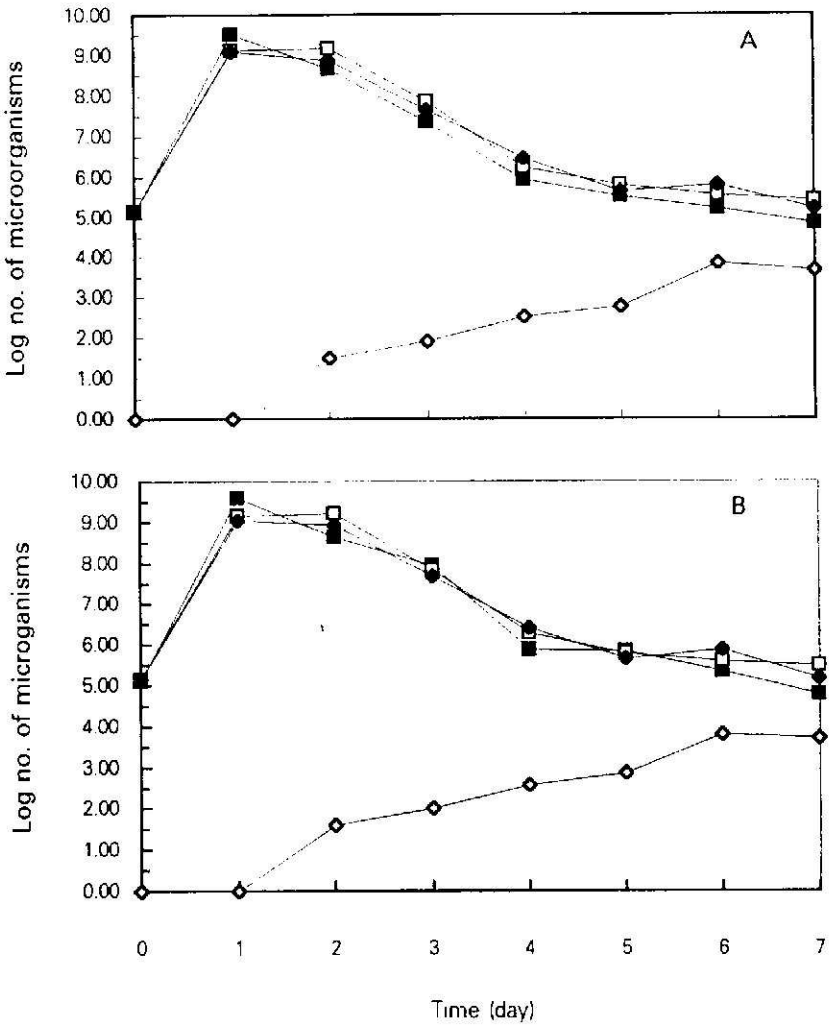
1. บทบาทของยีสต์ในการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาในขั้นตอนนี้ใช้ยีสต์ 3 ชนิดซึ่งพบในปริมาณมากจากการหมักเมล็ดโกโก้ตามธรรมชาติ คือ *S. cerevisiae*, *C. sorbosa* และ *C. sake* เป็นเชื้อเริ่มต้นเติมลงในการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ พบว่ามีจุลินทรีย์ประมาณ 4.33×10^5 โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ของชุดการทดลองที่เติมยีสต์และชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมยีสต์เริ่มต้น แสดงดังรูป 16

สำหรับชุดการทดลองที่เติมยีสต์นั้น การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร PDA มีค่าใกล้เคียงกับการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP ปริมาณจุลินทรีย์ในกองหมักเพิ่มขึ้นรวดเร็วใน 2 วันแรกของการหมัก หลังจากนั้นค่อย ๆ ลดลงจนสิ้นสุดการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นรวดเร็ว และมีค่าสูงสุดในวันแรกของการหมักทั้งบนอาหาร PDA และ TYGKCP เป็น 3.26×10^9 โคโลนีและ 3.80×10^9 โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ตามลำดับ สำหรับชุดการทดลองที่เติม *C. sorbosa* หรือ *C. sake* มีจุลินทรีย์สูงสุดในวันที่ 2 ของการหมัก เนื่องจากยีสต์กลุ่ม *Saccharomyces* spp. เจริญได้ดีในสภาพที่มีน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้สูง และมีความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำ แต่ยีสต์กลุ่ม *Candida* spp. นั้นเจริญได้ดีในที่ที่มีอากาศและสามารถใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Lehrain and Patterson, 1983) ในวันสุดท้ายของการหมักมีจุลินทรีย์ประมาณ $1.59\text{-}3.16 \times 10^5$ โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ชุดการทดลองควบคุมนั้นในวันแรกของการหมักตรวจไม่พบจุลินทรีย์บนอาหารทั้ง 2 ชนิด หลังจากนั้นจุลินทรีย์มีปริมาณเพิ่มขึ้นโดยมีจุลินทรีย์ในอาหาร PDA สูงสุดในวันที่ 6 ของการหมักเป็น 7.41×10^3 โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ และในวันสุดท้ายของการหมักมีจุลินทรีย์บนอาหาร PDA ประมาณ 4.68×10^3 โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ การเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในชุดการทดลองควบคุม ทั้งที่ตอนแรกของการหมักตรวจไม่พบจุลินทรีย์ แสดงว่าเมล็ดโกโก้เริ่มต้นนั้นปราศจากจุลินทรีย์ แต่มีการปนเปื้อนจากแหล่งภายนอกในภายหลัง เช่น จุลินทรีย์ที่ปะปนในอากาศ (Ostovar and Keeney, 1973)

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

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยยีสต์ทั้ง 3 ชนิด แสดงดังรูป 17 ในระยะแรกของการหมักทุกชุดการทดลองมีอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น และมีค่าสูงสุดในวันที่ 2 ของ



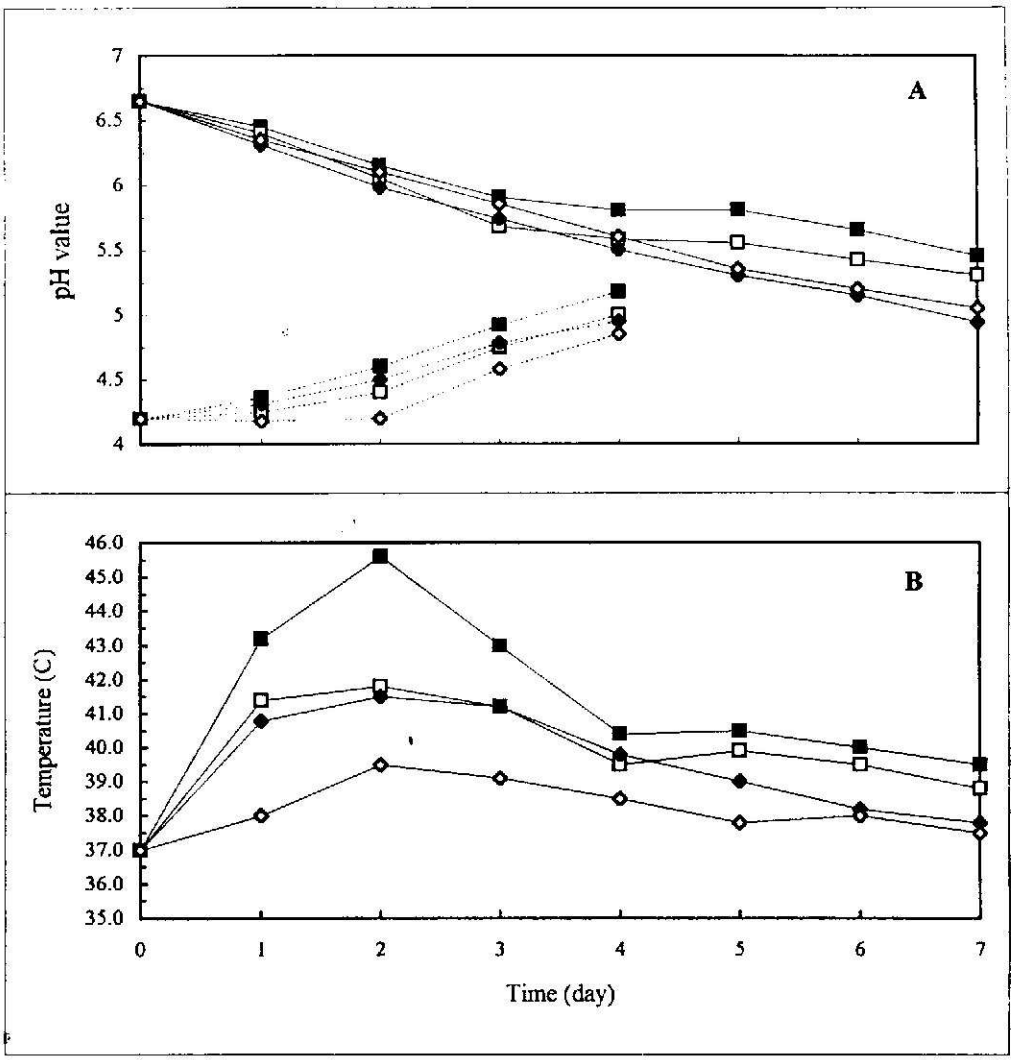
รูปที่ 16 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร PDA (A) และ TYGKCP (B) ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *S. cereviseae, C. sorbosa* หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

S. cerevisiae

C. sorba

C. sake

ชุดการทดลองควบคุม



รูปที่ 17 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดและเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae, C. sorbosa* หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

S. cerevisiae

C. sorba

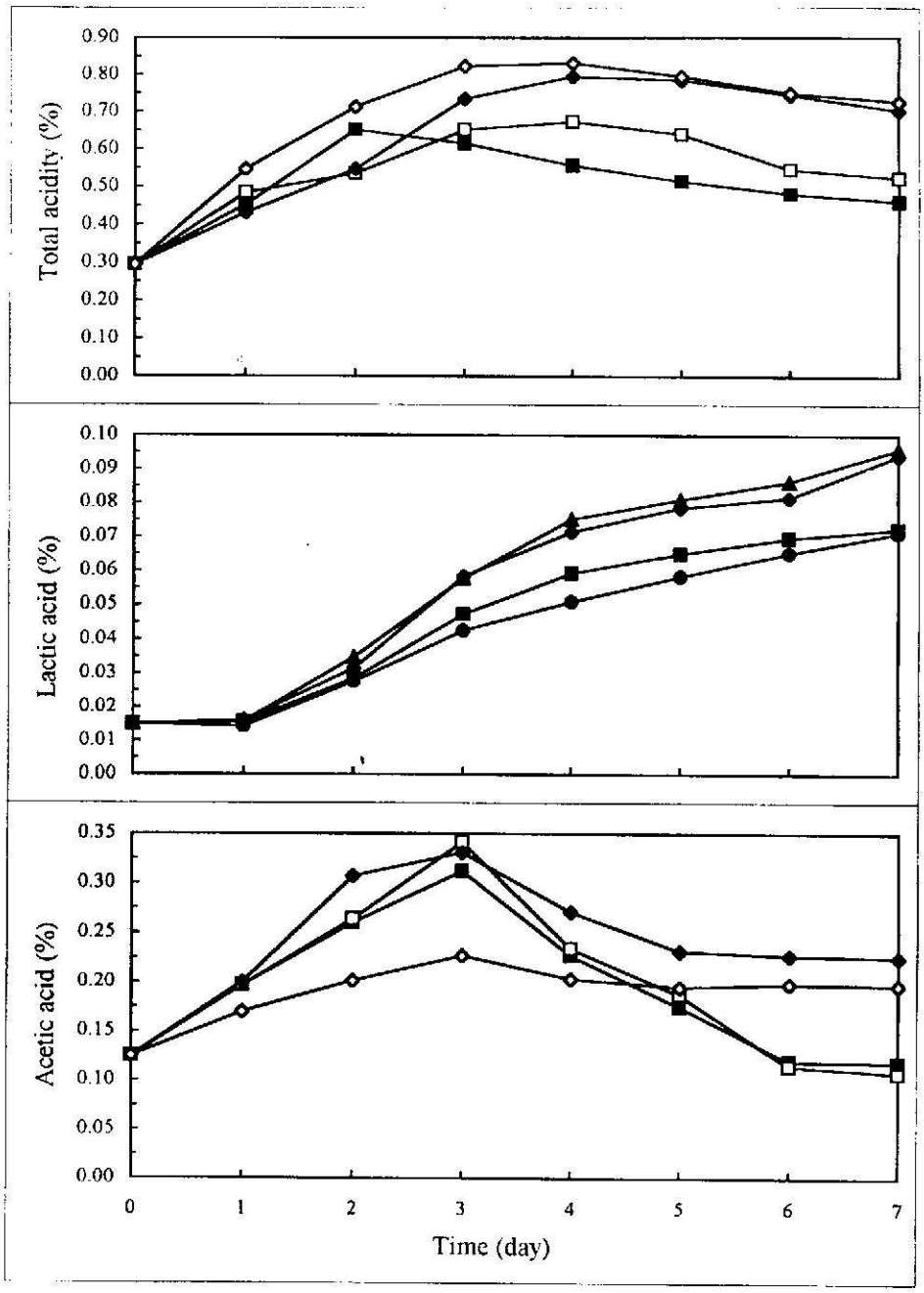
C. sake

ชุดการทดลองควบคุม

การหมัก หลังจากนั้นมีค่าลดลงจนสิ้นสุดการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีอุณหภูมิสูงกว่าชุดการทดลองอื่น โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 2 ของการหมักเป็น 45.6 องศาเซลเซียสขณะที่ชุดการทดลองที่เติม *C. sorbosa* หรือ *C. sake* และชุดควบคุมมีอุณหภูมิสูงสุดเป็น 41.8, 41.5 และ 39.5 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีจุลินทรีย์เจริญจำนวนมาก ทำให้มีเมตาบอลิซึมของสารอาหารโดยเฉพาะน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์โดยกระบวนการหมักได้ดี ทำให้มีความร้อนเกิดขึ้นจากขบวนการดังกล่าวมากกว่าชุดการทดลองอื่น อุณหภูมิของกองหมักเมล็ดโกโก้ที่เพิ่มขึ้นนี้มีผลยับยั้งและทำลายการเจริญของยีสต์ที่มีอยู่ ทำให้ยีสต์ลดลงในระยะสุดท้ายของการหมัก สาเหตุที่อุณหภูมิของกองหมักลดลงในระยะหลังของการหมักเนื่องจากจุลินทรีย์ใช้สารอาหารในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้หมดไป ดังนั้นความร้อนที่เกิดขึ้นจากขบวนการเมตาบอลิซึมของน้ำตาลและขบวนการออกซิเดชันของเอทานอลจึงมีปริมาณจำกัด รวมถึงการหมักเมล็ดโกโก้ในภาชนะขนาดเล็กซึ่งมวลเมล็ดโกโก้มีน้อย ทำให้มีการสูญเสียความร้อนได้เร็ว (Glossop, 1983)

การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดและเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยยีสต์ 3 ชนิด แสดงดังรูป 17 เมล็ดโกโก้และเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.65 และ 4.20 ตามลำดับ เมื่อเวลาการหมักเพิ่มขึ้นพีเอชของเมล็ดโกโก้มีค่าลดลงขณะที่พีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดมีค่าสูงขึ้น ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีค่าพีเอชในเมล็ดโกโก้ลดลงต่ำสุดและแตกต่างจากชุดการทดลองอื่น ส่วนชุดการทดลองที่เติม *C. sorbosa* หรือ *C. sake* มีค่าพีเอชของเมล็ดโกโก้ที่ใกล้เคียงกัน การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้นั้นวัดได้เพียงวันที่ 4 ของการหมัก เนื่องจากเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์เปลี่ยนไปเป็นของเหลวที่เกิดขึ้นจากการหมัก ค่าพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีค่าสูง เป็นผลให้ความเป็นกรดในเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองดังกล่าวมีค่าต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้มีค่าพีเอชในเมล็ดลดลงเนื่องจากมียีสต์และจุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญและสร้างกรดแลคติก กรดที่ระเหยได้ รวมทั้งกรดชนิดอื่น ๆ ขึ้น จากสารตั้งต้นในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เพื่อการเจริญและเกิดขบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ (อรพิน ภูมิภมร และคณะ, 2536) และเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในเมล็ดโกโก้อีกด้วย ทำให้เมล็ดโกโก้มีค่าพีเอชต่ำลงภายหลังการหมัก

การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมด ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยยีสต์ทั้ง 3 ชนิด แสดงดังรูป 18 ในตอนเริ่มต้นการหมัก เมล็ดโกโก้มีกรดทั้งหมดร้อยละ 0.29 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นน้อยที่สุด โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 2 ของการหมัก ขณะที่ชุดการทดลองอื่น ๆ มีปริมาณกรดเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 4 ของการหมักแล้วมีค่าลดลงจนสิ้นสุดการหมัก วันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae*, *C. sorbosa*, หรือ *C. sake* มีกรดทั้งหมดเป็นร้อยละ 0.46, 0.53 และ 0.71 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ



รูปที่ 18 การเปลี่ยนแปลงกรดทั้งหมด กรดแลคติก และกรดที่ระเหยได้ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae, C. sorbosa* หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

S. cerevisiae

C. sorba

C. sake

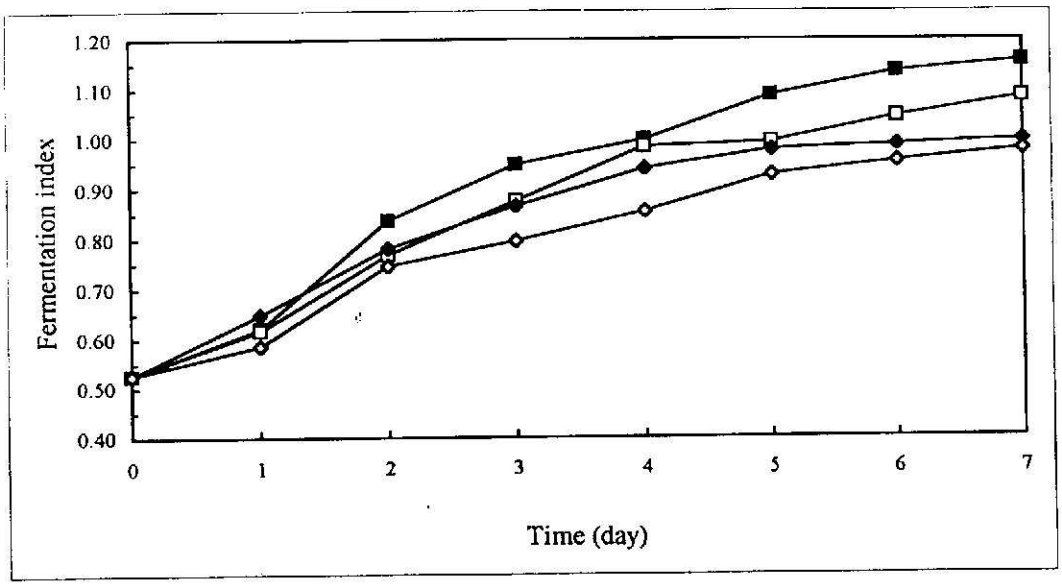
ชุดการทดลองควบคุม

สำหรับเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองควบคุมซึ่งไม่เติมยีสต์ลงไป มีกรดทั้งหมดเพิ่มสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ตั้งแต่วันที่ 1-3 ของการหมัก ในวันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองควบคุมมีปริมาณกรดทั้งหมดร้อยละ 0.73 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก

การเปลี่ยนแปลงกรดแลคติกในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยยีสต์ทั้ง 3 ชนิด แสดงดังรูป 18 เมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีกรดแลคติกประมาณร้อยละ 0.02 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก กรดแลคติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นตลอดการหมัก ในระยะแรกของการหมักกรดแลคติกมีค่าต่ำและมีค่าใกล้เคียงกันในทุกชุดการทดลอง แต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 4 ของการหมักกรดแลคติกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากสารไพรูเวตอันเป็นตัวกลางที่เกิดจากขบวนการหมัก สามารถเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติกได้ในสภาวะไร้อากาศ (Stanier, *et al.*, 1986) รวมทั้งกรดซิตริกในเมล็ดโกโก้สามารถเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติกได้อีกด้วย (Passos, *et al.*, 1984) และจากการที่กรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ที่ไม่ระเหยจึงสะสมในเมล็ดโกโก้ตลอดระยะเวลาการหมัก ในตอนสุดท้ายของการหมักปริมาณกรดเพิ่มขึ้นไม่มาก เพราะกรดแลคติกสามารถถูกออกซิไดซ์ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ด้วย (Krieg and Hott, 1986) ในวันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae*, *C. sorbosa*, หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุม มีกรดแลคติกเป็นร้อยละ 0.07, 0.09, 0.10 และ 0.07 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ

กรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยยีสต์ทั้ง 3 ชนิด มีการเปลี่ยนแปลงแสดงดังรูป 18 เมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีกรดแอซีติกร้อยละ 0.12 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก กรดแอซีติกมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นในระยะ 3 วันแรกของการหมัก หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงจนสิ้นสุดการหมัก ในวันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae*, *C. sorbosa* หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุมมี กรดแอซีติกเป็นร้อยละ 0.12, 0.11, 0.23 และ 0.20 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ กรด แอซีติกที่เพิ่มขึ้นในช่วงแรกของการหมัก เกิดจากยีสต์สร้างเอทานอลโดยการหมักน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มาก เมื่อมีการให้อากาศโดยการคนเมล็ดโกโก้ทำให้เกิดการออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดแอซีติก หลังจากนั้นเมื่อยีสต์มีปริมาณลดลง รวมทั้งน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ถูกใช้หมดไป ทำให้มีการสร้างเอทานอลลดลงด้วย เป็นผลให้การออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดแอซีติกเกิดขึ้นน้อยอีกทั้งกรดแอซีติกยังถูกออกซิไดซ์ไปเป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์อีกด้วย (Carr, *et al.*, 1979) ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีของเหลวเกิดขึ้นในขวดหมักเร็วกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ เนื่องจาก *S. cerevisiae* สามารถย่อยสลายสารเพกตินในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ (Roelofsen, 1958) อันเป็นคุณลักษณะของจุลินทรีย์ที่ต้องการในการหมักเมล็ดโกโก้ (Sanchez, *et al.*, 1988)

ค่าดัชนีการหมักเมล็ดโกโก้ในระหว่างการหมักด้วยยีสต์ และชุดการทดลองควบคุม แสดงดังรูป 19 ตลอดเวลาการหมักค่าดัชนีการหมักมีค่าเพิ่มขึ้นทุกชุดการทดลอง เมล็ดโกโก้ตอนเริ่มต้นมี



รูปที่ 19 การเปลี่ยนแปลงดัชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *S. cerevisiae* *C. sorbosa* หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

S. cerevisiae

C. sorba

C. sake

ชุดการทดลองควบคุม

ค่าดัชนีการหมักเป็น 0.53 แสดงว่าเมล็ดโกโก้ที่บ่มไว้ 3 วัน ก่อนแกะเอาเมล็ดมาหมักเกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบภายในเมล็ดแล้วเช่นกัน หลังจากการหมัก 1 วัน ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีค่าดัชนีการหมักสูงกว่าชุดการทดลองอื่นจนสิ้นสุดการหมัก วันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae, C. sorbosa,* หรือ *C. sake* และชุดการทดลองควบคุม มีค่าดัชนีการหมักเป็น 1.16, 1.08, 0.99 และ 0.98 ตามลำดับ จากรูป 19 พบว่าในวันที่ 4 ของการหมักนั้นชุดการทดลองที่เติมยีสต์ทั้ง 3 ชนิด มีค่าดัชนีการหมักที่ใกล้เคียงกับค่า 1.0 ซึ่งเป็นค่าดัชนีการหมักที่บอกถึงการหมักที่ดี (Wood and Lass, 1985) แสดงว่าการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยยีสต์นั้น เมล็ดโกโก้มีการเปลี่ยนแปลงในการหมักที่ดีตั้งแต่ประมาณวันที่ 4 ของการหมัก

หลังจากหมักเมล็ดโกโก้ครบ 7 วัน นำเมล็ดโกโก้ที่ได้ทั้ง 4 ชุดการทดลอง ไปทำแห้งแล้วนำเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้มาผ่าเมล็ดเพื่อหาค่า Cut Test ของเมล็ดโกโก้สีต่าง ๆ ผลที่ได้แสดงดังตาราง 9 ซึ่งชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาล (10PR3/1,2) สูงสุด และมีความแตกต่างจากชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ส่วนชุดการทดลองควบคุมนั้นมีค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้ที่มีสีดังกล่าวน้อยที่สุด และมีค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้สีม่วงแกมน้ำตาลสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ซึ่งเป็นลักษณะของเมล็ดโกโก้ที่เกิดการหมักไม่สมบูรณ์ แสดงว่าเมล็ดโกโก้หากปล่อยให้เกิดการหมักขึ้นตามปกติต้องใช้ระยะเวลาในการหมักนานขึ้น

องค์ประกอบต่าง ๆ ของเมล็ดโกโก้ที่ได้ในวันสุดท้ายของการหมักด้วยยีสต์ทั้ง 3 ชนิด แสดงดังตาราง 10 ดังนั้นผลการศึกษาเพื่อคัดเลือกยีสต์ที่เหมาะในการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ พบว่าการหมักเมล็ดโกโก้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วย *S. cerevisiae* มีความเหมาะสมมากกว่าชุดการทดลองอื่น เนื่องจากชุดการทดลองดังกล่าวมีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นสูงสุด เกิดการย่อยสลายเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ได้เร็ว ทั้งมีค่าดัชนีการหมักสูง และมีอุณหภูมิของกองหมักเพิ่มขึ้นสูงเพียงพอที่ทำให้เอนไซม์ต่าง ๆ ในเมล็ดโกโก้เกิดกิจกรรม นอกจากนั้นเมล็ดโกโก้ที่ได้จากชุดการทดลองดังกล่าวยังมีปริมาณกรดทั้งหมด กรดแลคติก และกรดที่ระเหยได้ต่ำ มีค่าพีเอชสูงกว่าชุดการทดลองอื่น และยังให้ค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลช็อกโกแลตสูงกว่าชุดการทดลองอื่น

2. บทบาทของแบคทีเรียแลคติกในการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ

แบคทีเรียแลคติกที่ใช้ศึกษาในตอนนี้มี 3 ชนิด คือ *Lactobacillus casei, Leuconostoc mesenteroides* และ *Streptococcus thermophilus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลคติกที่พบมากในการหมักเมล็ดโกโก้ตามธรรมชาติ *L. casei* และ *S. thermophilus* เป็นแบคทีเรียแลคติกกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ ส่วน *Leu. mesenteroides* อยู่ในกลุ่มเฮทโทโรเฟอร์เมนเตทีฟ (Passos, *et al.*, 1984) นำแบคทีเรียแลคติกแต่ละชนิดเติมลงในขวดหมักเมล็ดโกโก้ ใช้แบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก พบว่ามีจุลินทรีย์ประมาณ $2.95\text{-}3.09\times10^{5}$ โคโลนี ต่อกรัมเมล็ดโกโก้ หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สุ่มตัวอย่างทุกวัน เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นทั้งด้านจุลินทรีย์ และด้านเคมีของเมล็ดโกโก้ทั้ง 3 ชุดการทดลอง เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้น

ตาราง 9 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 10 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 ($P<0.05$)

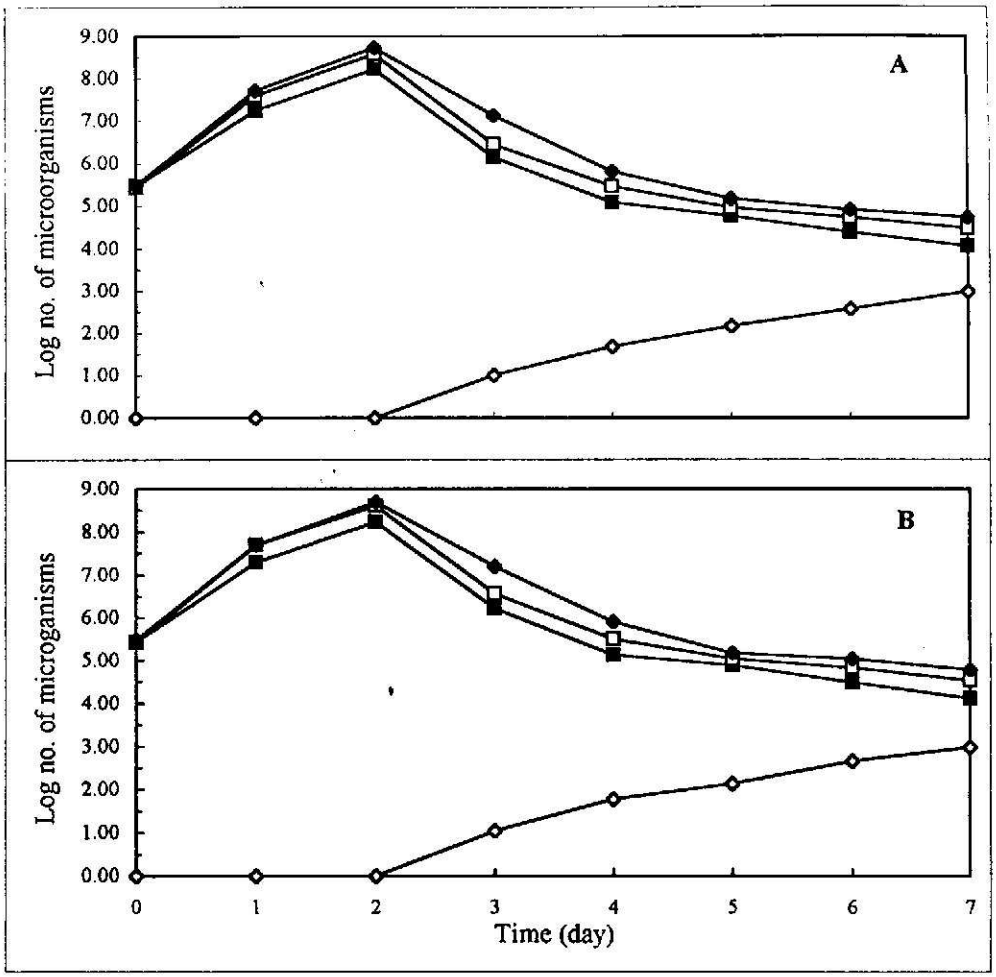
3 ปริมาณน้ำตาลที่วัดได้ในวันที่ 4 ของการหมัก

การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร MRS ซึ่งเป็นอาหารจำเพาะต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติก และอาหาร TYGKCP ซึ่งเป็นอาหารที่จุลินทรีย์ทั่วไปสามารถเจริญได้ ผลการทดลองแสดงดังรูป 20 พบว่าทุกชุดการทดลองมีปริมาณจุลินทรีย์บนอาหาร MRS เพิ่มขึ้นในมีค่าสูงสุดในวันที่ 2 ของการหมักเป็น $1.62x10^8$, $3.72x10^8$, $5.37x10^7$ โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Passos และคณะ (1984) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลคติกระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก ในประเทศบราซิล ในระยะ 48 ชั่วโมงแรกของการหมักนั้น แบคทีเรียแลคติกมีปริมาณสูงเนื่องจากในระยะดังกล่าวปริมาณอากาศในกองหมักเป็นปัจจัยจำกัดการเจริญของยีสต์ และส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแลคติก เพราะแบคทีเรียแลคติกนั้นไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญหลังจากนั้นทุกชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกมีจุลินทรีย์ลดลงวันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติม *L. casei, Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม มีจุลินทรีย์บนอาหาร MRS เป็น $1.12x10^4$, $3.02x10^4$, $5.37x10^4$ และ $9.44x10^2$ โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ตามลำดับ

เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างกรดแลคติกขึ้นในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้แล้วไม่สามารถระเหยได้ในขั้นตอนต่อ ๆ ไป จากผลการทดลองที่ได้ชุดการทดลองที่เติม *Leu. mesenteroides* และ *S. thermophilus* มีจุลินทรีย์สูงกว่าชุดการทดลองที่เติม *L. casei* ดังนั้นการที่มีแบคทีเรียแลคติกอยู่ในกองหมักมาก อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มีการเพิ่มของกรดแลคติกในกองหมักเมล็ดโกโก้ (Rohan and Stewart, 1966b; Weissberger, *et al.*, 1971)

การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP พบว่าทุกชุดการทดลองมีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นใน 2 วันแรกของการหมัก เช่นเดียวกับบนอาหาร MRS หลังจากนั้นจุลินทรีย์มีปริมาณลดลงจนสิ้นสุดการหมัก และทุกชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกที่เวลาเดียวกันปริมาณจุลินทรีย์บนอาหารทั้ง 2 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในการหมักเมล็ดโกโก้นั้นเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เติมลงไปเป็นสำคัญ ส่วนชุดการทดลองควบคุมในระยะ 2 วันแรกของการหมัก ไม่พบจุลินทรีย์บนอาหารทั้ง 2 ชนิด แต่หลังจากนั้นมีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น และมี จุลินทรีย์สูงสุดในวันสุดท้ายของการหมัก วันสุดท้ายของการหมักมีปริมาณจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP ของชุดการทดลองที่เติม *L. casei, Leu. mesneteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม เป็น $1.32x10^4$, $3.39x10^4$, $6.17x10^4$ และ $9.55x10^2$ โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขวดหมักเมล็ดโกโก้ที่หมักด้วยแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 ชนิด และชุดการทดลองควบคุม แสดงดังรูป 21 อุณหภูมิเริ่มต้นของทุกชุดการทดลองเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ในชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 ชุด มีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นในระยะ 2 วันแรกของการหมัก แล้วมีค่าลดลงจนสิ้นสุดการหมัก โดยชุดการทดลองที่เติม *L. casei, Leu. mesenteroides*



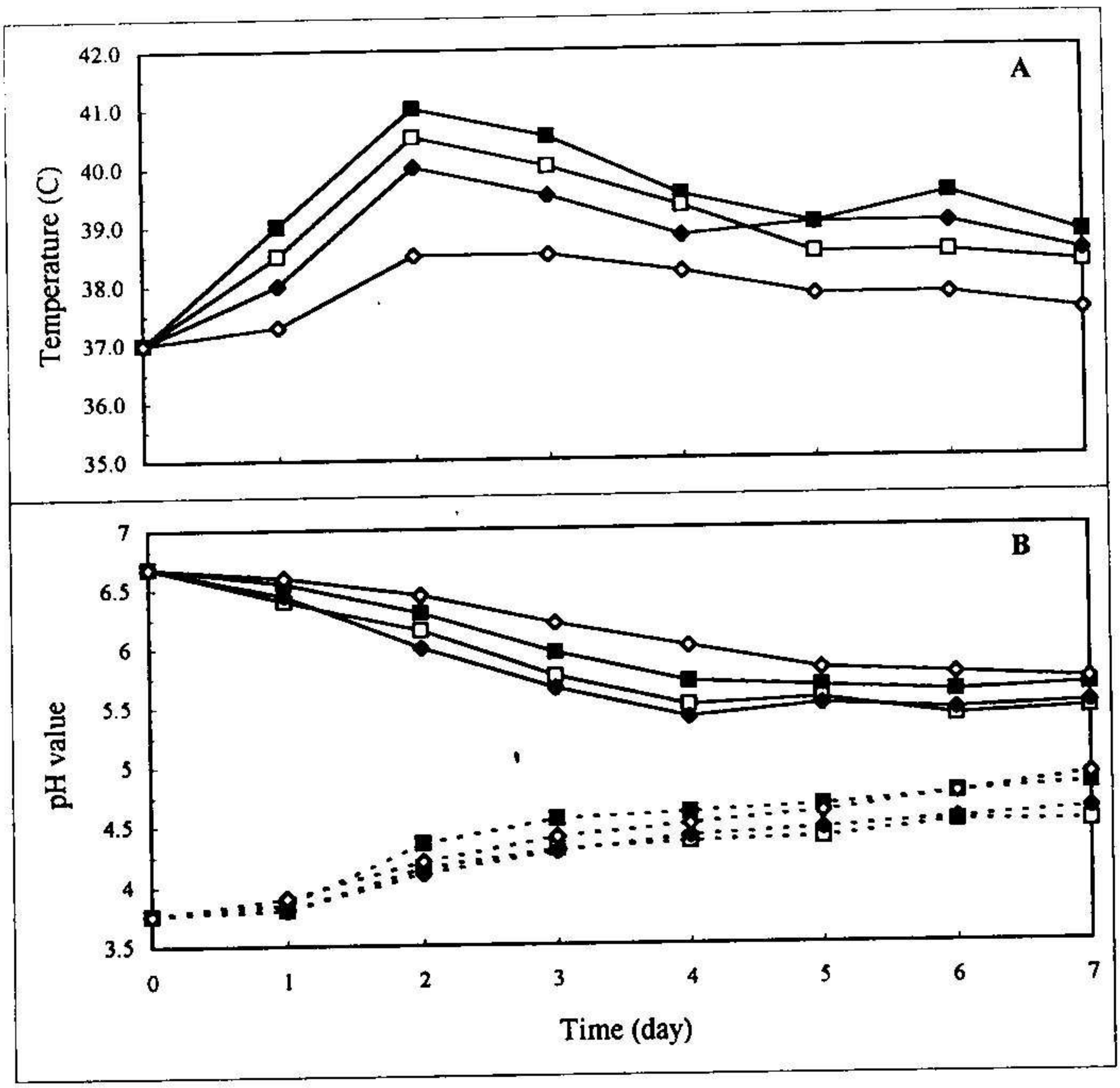
รูปที่ 20 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร MRS และ TYGKCP ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *L. casei, Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

L. casei

Leu. mesenteroides

S. thermophilus

ชุดการทดลองควบคุม



รูปที่ 21 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดและเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *L. casei, Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

L. casei

Leu. mesenteroides

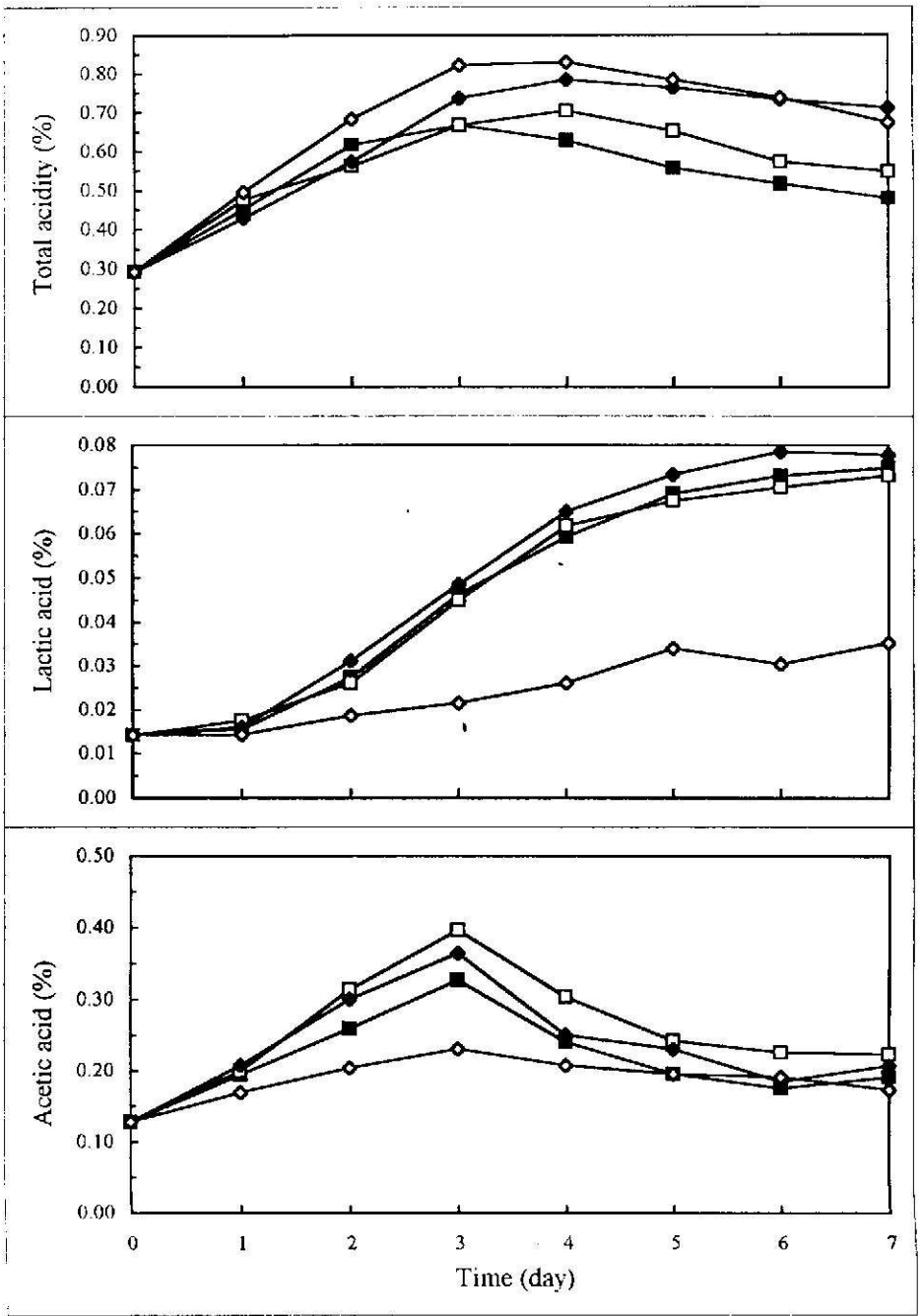
S. thermophilus

ชุดการทดลองควบคุม

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) ไปเป็นกรดแลคติก กรดแอซีติก และคาร์บอนไดออกไซด์ สำหรับชุดการทดลองควบคุมมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในระยะแรกของการหมักเท่านั้น เพราะชุดควบคุมมีจุลินทรีย์เจริญอยู่น้อย โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมักเป็น 38.5 องศาเซลเซียส การที่อุณหภูมิของกองหมักลดลงในระยะสุดท้ายของการหมักเป็นผลจากมวลของเมล็ดโกโก้ที่ใช้หมักมีน้อย ดังนั้นความร้อนจากขบวนการหมัก ขบวนการเมตาบอลิซึมของน้ำตาล และขบวนการออกซิเดชันของเอทานอล และกรดอินทรีย์มีปริมาณต่ำ คงอยู่ในภาชนะหมักได้ไม่นานเพียงพอ รวมถึงการหมักเมล็ดโกโก้ปริมาณน้อย ๆ จะสูญเสียความร้อนได้เร็วกว่าปกติ (Glossop. 1983)

การเปลี่ยนแปลงพีเอชในเมล็ดโกโก้และเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในระหว่างการหมักด้วยแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 ชนิด แสดงดังรูป 21 เมล็ดโกโก้และเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.68 และ 3.76 ตามลำดับ เมื่อเวลาของการหมักเพิ่มขึ้นเมล็ดโกโก้มีค่าพีเอชลดลง ขณะที่เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีค่าพีเอชเพิ่มสูงขึ้น ในชุดการทดลองที่เติม *L. casei* มีพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักเป็น 5.65 ซึ่งสูงกว่าพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกชนิดอื่นๆ ส่วนพีเอช ในเมล็ดโกโก้นั้นชุดการทดลองที่เติม *Leu. mesenteroides* มีค่าต่ำที่สุด และชุดการทดลองควบคุมมีพีเอช ในเมล็ดสูงสุด ซึ่งสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ การเพิ่มขึ้นของพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในระยะแรกของการหมักนั้นมีผลส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแลคติก เพราะที่พีเอชต่ำ ๆ (3.6-4.0) จะเป็นอันตรายต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติก (Forsyth and Quesnel, 1963) ในวันสุดท้ายของการหมักพีเอชของเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติม *L. casei, Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุมมีค่าเป็น 5.65, 5.50 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* และชุดการทดลอง



รูปที่ 22 การเปลี่ยนแปลงกรดทั้งหมด กรดแลคติก และกรดที่ระเหยได้ ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *L. casei, Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

L. casei

Leu. mesenteroides

S. thermophilus

ชุดการทดลองควบคุม

ควบคุม มีกรดทั้งหมดสูงกว่าอีก 2 ชุดการทดลองที่เหลือ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ปริมาณกรดทั้งหมดในวันสุดท้ายของการหมักมีค่าต่ำลง เนื่องจากกรดซิตริกสามารถเปลี่ยนไปเป็น กรดแลคติก กรดแอซีติก และคาร์บอนไดออกไซด์ได้ โดยกิจกรรมของแบคทีเรียแลคติก (Passos, *et al.*, 1984) และเป็นผลจากเมื่อมีการให้อากาศแก่กองหมักเมล็ดโกโก้ ทำให้กรดซิตริกถูกออกซิไดซ์เป็นกรดแลคติกได้ (Weissberger, *et al.*, 1971)

กรดแลคติกในเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่หมักด้วยแบคทีเรียแลคติกแต่ละชนิดเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม แสดงดังรูป 22 ตลอดการหมักกรดแลคติกมีปริมาณเพิ่มขึ้น เนื่องจากกรด แลคติกในเมล็ดโกโก้เป็นกรดอินทรีย์ที่ไม่ระเหยมีการสะสมอยู่ในเมล็ดโกโก้ตลอดการหมักกรดแลคติก ในเมล็ดโมโก้เริ่มต้นมีค่าร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 2-5 ของการหมัก เป็นผลมาจากมีจุลินทรีย์เพิ่มปริมาณขึ้นมากในระยะดังกล่าว กรดแลคติกในชุดการทดลองที่เติม *Leu. mesneteroides* หรือ *S. thermophilus* มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่เติม *Leu. mesneteroides* เพราะว่าแบคทีเรียแลคติก 2 ชนิดแรกอยู่ในกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสด้วยวิถี Embden-Meyerhof ได้ผลผลิตเป็นกรดแลคติกสูงกว่าร้อยละ 85 ส่วน *Leu. mesneteroides* นั้นเป็นแบคทีเรียในกลุ่มเฮทโทโรเฟอร์เมนเตทีฟ ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านวิถี Hexose monophosphste ได้ผลผลิตกรดแลคติกประมาณร้อยละ 50 นอกจากนี้ยังได้เป็นเอทานอล กรดแอซีติก กลีเซอรอล แมนนีทอล และคาร์บอนไดออกไซด์อีกด้วย (Passos, *et al.*, 1984) กรดแลคติกในเมล็ดโกโก้จากวันสุดท้ายของการหมักของชุดการทดลองที่เติม *L. casei, Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทด ลองควบคุมมีค่าเป็นร้อยละ 0.08, 0.07, 0.08 และ 0.04 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ กรดแลคติก ในชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่เติมด้วยยีสต์เพราะแบคทีเรียแลคติก สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดแลคติกได้โดยตรงดังที่กล่าวข้างต้น ส่วนชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรียแลคติก มีกรดแลคติกต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น เพราะว่าชุดการทดลองควบคุมมีจุลินทรีย์อยู่น้อย เป็นผลให้การย่อยสลายสารอาหารโดยเฉพาะน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในเยื่อหุ้มเมล็ดเกิดขึ้นได้น้อย

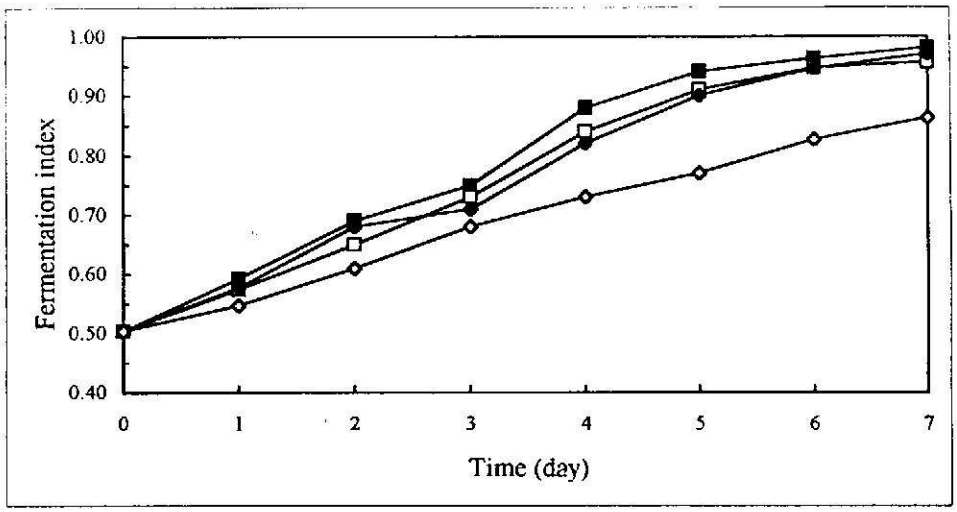
การเปลี่ยนแปลงกรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 ชนิด แสดงดังรูป 22 เมล็ดโกโก้เริ่มต้นก่อนการหมักมีกรดที่ระเหยได้ร้อยละ 0.13 โดยน้ำหนัก ใน 3 วันแรกของการหมัก ทุกชุดการทดลองมีกรดที่ระเหยได้เพิ่มขึ้น เนื่องจากในระยะดังกล่าวเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ยังย่อยสลายไม่หมด ทำให้จุลินทรีย์ต่างๆ ที่เจริญในการหมักสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ได้ และมีการสร้างเอทานอลขึ้นในกองหมัก ในระยะต่อมาเมื่อให้อากาศแก่กองหมักจะเกิดการออกซิเดชันของเอทานอลเป็นกรดแอซีติก แล้วกรดแอซีติกจะซึมผ่านผนังหุ้มเมล็ดโกโก้เข้าสู่ภายในเมล็ดโกโก้ในเวลาต่อมา (Roelofsen, 1958) เมล็ดโกโก้ของชุดการทดลองที่เติม *Leu. mesenteroides* มีกรดแอซีติกสูงกว่าชุดการทดลองอื่น และมีค่าสูงสุดในวันที่ 3 ของการหมัก เป็นร้อยละ 0.40 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก เพราะ *Leu. mesenteroides* เป็นแบคทีเรียกลุ่มเฮทโทโรเฟอร์เมนเทตีฟ ที่สร้างกรดแอซีติกในขณะสร้างกรดแลคติก และกรดแอซีติกดังกล่าว

สามารถแพร่เข้าสู่ภายในเมล็ดโกโก้ได้ (Passos, *et al.*, 1984) ชุดการทดลองควบคุมมีกรดแอซีติกในเมล็ดโกโก้ต่ำที่สุด หลังจากนั้นกรดแอซีติกมีค่าลดลงจนสิ้นสุดการหมัก กรดที่ระเหยได้มีค่าลดลงเนื่องจากในระยะดังกล่าวกรดแอซีติกถูกออกซิไดซ์ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ในวันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติม *L. casei*, *Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม ให้เมล็ดโกโก้ที่มีกรดระเหยได้เป็นร้อยละ 0.19, 0.22, 0.21 และ 0.17 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักในชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม แสดงดังรูป 23 เมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีค่าดัชนีการหมักเป็น 0.50 เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นทุกชุดการทดลองมีค่าดัชนีการหมักเพิ่มสูงขึ้น โดยใน 2 วันแรกของการหมัก ค่าดัชนีการหมักมีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย เพราะในระยะดังกล่าวเมล็ดโกโก้มีการเปลี่ยนแปลงภายในเมล็ดน้อย ซึ่งเป็นผลจากปัจจัยแวดล้อม เช่น กองหมักมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นน้อย และค่าพีเอชของเมล็ดโกโก้ลดลงไม่มาก เมื่อกองหมักมีอุณหภูมิและพีเอชเหมาะสม ทำให้เอนไซม์เกิดกิจกรรมเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบภายในเมล็ดโกโก้ โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของเม็ดสีจากสารสีม่วงเป็นสารสีน้ำตาลช็อกโกแลตเกิดได้ดี (Forsyth and Quesnel, 1963) ทำให้ค่าดัชนีการหมักซึ่งเป็นการวัดสัดส่วนของสารสีน้ำตาลต่อสารสีม่วงมีค่าสูงขึ้นในวันต่อ ๆ มา วันสุดท้ายของการหมักเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองต่าง ๆ มีค่าดัชนีการหมักเป็น 0.98, 0.96, 0.97 และ 0.86 ตามลำดับ ซึ่งค่าดัชนีการหมักที่ได้มีค่าต่ำ เมื่อเทียบกับการทดลองที่เติมด้วยยีสต์ ถึงแม้ทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน แสดงว่าแบคทีเรียแลคติกนั้นมีบทบาทในด้านการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเมล็ดโกโก้น้อยกว่ายีสต์

หลังจากสิ้นสุดการหมักนำเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองต่างๆ ที่เติมแบคทีเรียแลคติก และชุดการทดลองควบคุมไปทำแห้ง แล้วนำเมล็ดโกโก้ที่ได้มาผ่าเมล็ดเพื่อหาค่า Cut Test ของเมล็ดโกโก้สีต่าง ๆ ผลที่ได้แสดงได้ดังตาราง 11 ชุดการทดลองที่เติม *L. casei* นั้น ให้ค่าร้อยละเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลช็อกโกแลต (10PR3/1,2) สูงสุดและมีค่าแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนชุดการทดลองที่เติม *Leu. mesenteroides* ให้ค่าเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลสูงกว่าชุดการทดลองที่เติม *S. thermophilus* ซึ่งให้ค่าไม่แตกต่างกับชุดการทดลองควบคุม และจากผลการทดลองพบว่าค่า Cut Test ของเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียแลคติกมีค่าต่ำกว่าการหมักด้วยยีสต์

องค์ประกอบต่างๆของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักด้วยแบคทีเรียแลคติก แสดงดังตารางที่ 12 เมล็ดโกโก้จากการหมักด้วย *L. casei* มีคุณภาพที่ดีกว่าเมล็ดที่ได้จากชุดการทดลองอื่น คือ มีค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาล ค่าดัชนีการหมักสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ และมีอุณหภูมิกองหมักสูงกว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกชนิดอื่น ๆ นอกจากนั้นเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองดังกล่าวยังมีปริมาณกรดทั้งหมด กรดแลคติก และกรดที่ระเหยได้ต่ำ มีน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้สูง รวมถึงพีเอชของเมล็ดโกโก้ที่ได้มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอีกด้วย



รูปที่ 23 การเปลี่ยนแปลงดัชนีการหมัก ของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *L. casei*, *Leu. mesenteroides* หรือ *S. thermophilus* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ตาราง 11 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 12 องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 7) ด้วยแบคทีเรียแลคติก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

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

1 ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ (โดยน้ำหนักสด) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2 อักษรเหมือนกันในแถวนอนเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

3 เป็นปริมาณน้ำตาลในวันที่ 4 ของการหมัก

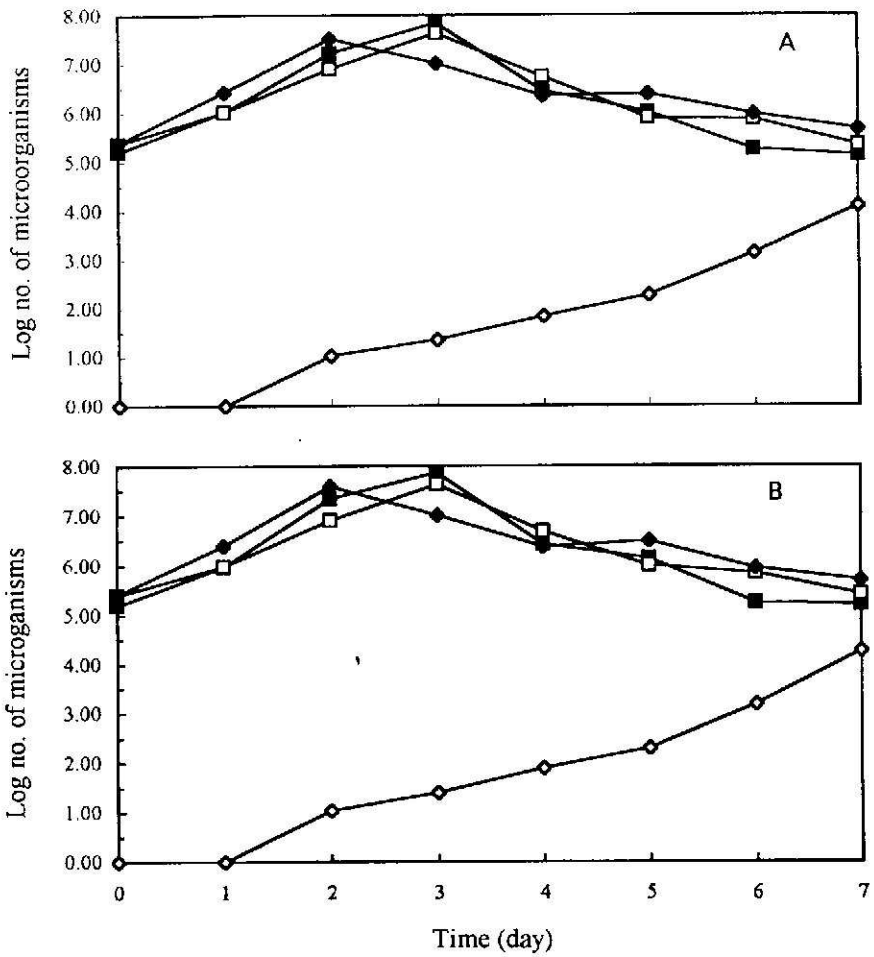
3. บทบาทของแบคทีเรียแอซีติกในการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ

แบคทีเรียแอซีติกที่ใช้ศึกษามี 3 ชนิด ได้แก่ *Acetobacter rancen, A. lovaniense* และ *Gluconobacter oxydan* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแอซีติกที่พบปริมาณมากจากการหมักเมล็ดโกโก้ตามธรรมชาติ นำแบคทีเรียแอซีติกแต่ละชนิดเติมลงในขวดหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เมล็ดโกโก้ 500 กรัม ใช้เชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร ต่อน้ำหนัก (มีเซลล์จุลินทรีย์ประมาณ $2.11x10^5$ โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้) หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร DSM และอาหาร TYGKCP แสดงดังรูป 24 ทุกชุดการทดลองมีจุลินทรีย์บนอาหาร DSM เพิ่มขึ้นในระยะแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *G. oxydan* มีจุลินทรีย์เจริญได้เร็วกว่าชุดการทดลองอื่นและมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 2 ของการหมักเป็น $3.31x10^7$ โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ สอดคล้องกับรายงานของ Carr และคณะ (1980) ที่พบ *G. oxydan* สูงสุดในระยะแรกของการหมัก หลังจากนั้นจนสิ้นสุดการหมักจุลินทรีย์ชนิดนี้มีปริมาณลดลง ปริมาณจุลินทรีย์ตลอดการหมักของชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติกทั้ง 3 ชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* หรือ *A. lovaniense* มีจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงสุดในวันที่ 3 ของการหมักเป็น $7.05x10^7$ และ $4.27x10^7$ โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ตามลำดับ ชุดทดลองควบคุมในตอนเริ่มต้นการหมักตรวจไม่พบจุลินทรีย์ แต่เมื่อการหมักผ่านไป 2 วัน มีจุลินทรีย์ $1.05x10^1$ โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ชุดควบคุมมีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นตลอดการหมัก วันสุดท้ายของการหมักมีจุลินทรีย์ $1.29x10^4$ โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ การเพิ่มขึ้นของของจุลินทรีย์ในชุดการทดลองควบคุม เกิดจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากแหล่งอื่นในภายหลัง (Ostovar and Keeney, 1973) ปริมาณจุลินทรีย์ในวันสุดท้ายของการหมักบนอาหาร DSM ของชุดการทดลองที่เติม *A. rancen, A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* มีค่าเป็น $1.35x10^5$, $2.24x10^5$ และ $4.68x10^5$ โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่าในช่วงสุดท้ายของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *G. oxydan* มีจุลินทรีย์สูงกว่าชุดการทดลองอื่น เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้สามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดแอซีติกได้ แต่ไม่สามารถออกซิไดซ์กรดแอซีติกเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำได้ (Carr, *et al.*, 1980) เมื่อกองหมักมีจุลินทรีย์ชนิดนี้อยู่สูงทำให้มีการสร้างกรดแอซีติกสูง ดังนั้นแบคทีเรียชนิดนี้ไม่เหมาะสมที่จะใช้หมักเมล็ดโกโก้ เนื่องจากปริมาณของจุลินทรีย์ที่สร้างกรดแลคติก และกรดแอซีติก จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณกรดทั้งสองชนิด (Abdul Samah, 1993)

การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP พบว่าทุกชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติกมีจุลินทรีย์เพิ่มสูงขึ้นในช่วงแรกของการหมัก แล้วค่อยๆ ลดลงจนสิ้นสุดการหมัก เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร DSM และจำนวนจุลินทรีย์บนอาหารทั้ง 2 ชนิด ของทุกชุดการทดลองที่ระยะเวลาเดียวกันนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ วันสุดท้ายของการหมัก



รูปที่ 24 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร DSM และ TYGKCP ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วย *A. rancen, A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

A. rancen

A. lovaniense

G. oxydan

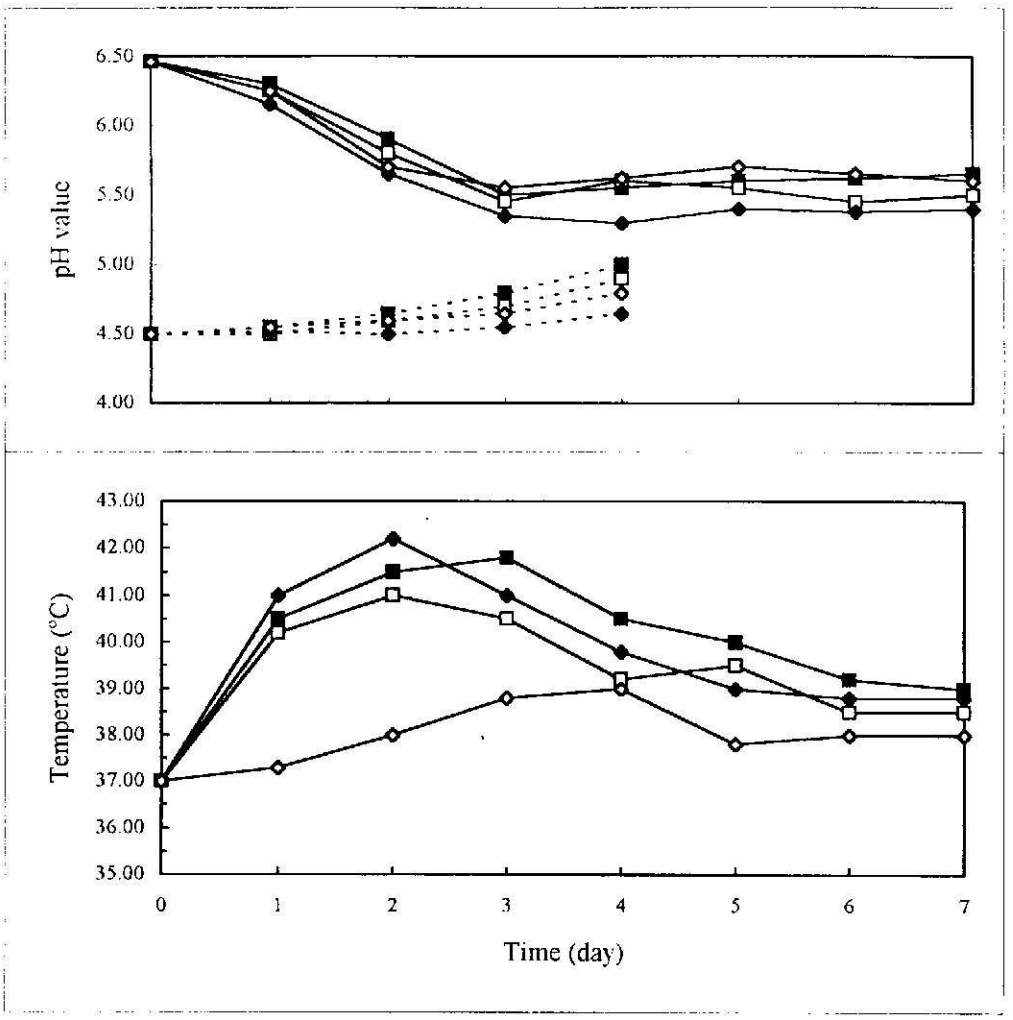
ชุดการทดลองควบคุม

ปริมาณจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP ของชุดการทดลองที่เติม *A. rancen, A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม มีค่าเป็น $1.58x10^5$, $2.57x10^5$, $4.89x10^5$ และ $1.86x10^4$ โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ตามลำดับ แบคทีเรียแอซีติกในตอนสุดท้ายของการหมักมีปริมาณลดลงไม่มาก สอดคล้องกับการรายงานของ อรพิน ภูมิภมร และคณะ (2536) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียแอซีติกสามารถเจริญได้ในสภาพของอุณหภูมิ และพีเอชช่วงกว้าง (Lehrian and Patterson, 1983)

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยแบคทีเรียแอซีติกแต่ละชนิดแสดงดังรูป 25 ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติกมีอุณหภูมิเพิ่มสูงใน 3 วันแรกของการหมักและในระยะหลังของการหมักจะมีอุณหภูมิลดลง ชุดการทดลองที่เติม *G. oxydan* มีอุณหภูมิสูงสุดในวันที่ 2 ของการหมัก เป็น 42.2 องศาเซลเซียส เพราะว่า *G. oxydan* เจริญได้เร็วในระยะแรกและเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้ายในการออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดแอซีติก ซึ่งมีการปล่อยพลังงานความร้อนออกมามาก (Carr, *et al.*, 1980) เนื่องจากแบคทีเรียแอซีติกสามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดแอซีติก และออกซิไดซ์กรดแอซีติกเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ ในสภาวะที่มีอากาศ มีการปล่อยพลังงานความร้อนออกมาสูงเป็น 118.20 และ 209.40 กิโลแคลอรีต่อโมล ตามลำดับ (Forsyth and Quesnel, 1963)

สำหรับชุดการทดลองควบคุม อุณหภูมิในระยะแรกของการหมักมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เนื่องจากในระยะดังกล่าวจุลินทรีย์ที่เจริญในชุดการทดลองควบคุมมีต่ำ หลังจากผ่านวันแรกของการหมักไป อุณหภูมิมีค่าเพิ่มขึ้นเช่นกัน และมีค่าสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมัก เป็น 38.5 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจึงมีค่าลดลงจนสิ้นสุดการหมัก สาเหตุหนึ่งที่อุณหภูมิของชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติกมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรียแอซีติกเพราะว่าปริมาณจุลินทรีย์ที่มีในขวดหมักเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติกมีปริมาณมากกว่าการทดลองควบคุม (Abdul Samah, *et al.*, 1993) อุณหภูมิในวันสุดท้ายของการหมักในชุดการทดลองที่เติม *A. rancen, A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุมมีค่าเป็น 39.0, 38.5, 38.8 และ 37.5 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อุณหภูมิของกองหมักลดลงในระยะหลังเป็นผลจากความร้อนที่เกิดขึ้นในการหมักโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์มีปริมาณน้อย (Glossop, 1983)

การหมักเมล็ดโกโก้ด้วยแบคทีเรียแอซีติกชนิดต่างๆ มีการเปลี่ยนแปลงพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดและเมล็ดโกโก้ แสดงดังรูป 25 เมล็ดโกโก้และเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีค่าพีเอชเป็น 6.46 และ 4.50 ตามลำดับ เมื่อเวลาการหมักเพิ่มขึ้นเมล็ดโกโก้มีค่าพีเอชลดลง ขณะที่เยื่อหุ้มเมล็ดมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้น ค่าพีเอชของเมล็ดโกโก้ในชุดการทดลองต่างๆ ลดลงรวดเร็วในระยะแรกของการหมัก ซึ่งชุดการทดลองที่เติม *A. rancen, A. lovaniense* และชุดการทดลองควบคุม มีค่าต่ำสุดในวันที่ 3 ของการหมัก ขณะที่ชุดการทดลองที่เติม *G. oxydan* มีค่าต่ำสุดในวันที่ 4 ซึ่งสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงกรดแอซีติกในเมล็ดโกโก้ เมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* มีค่าพีเอชลด



รูปที่ 25 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดและเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *A. rancen*, *A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

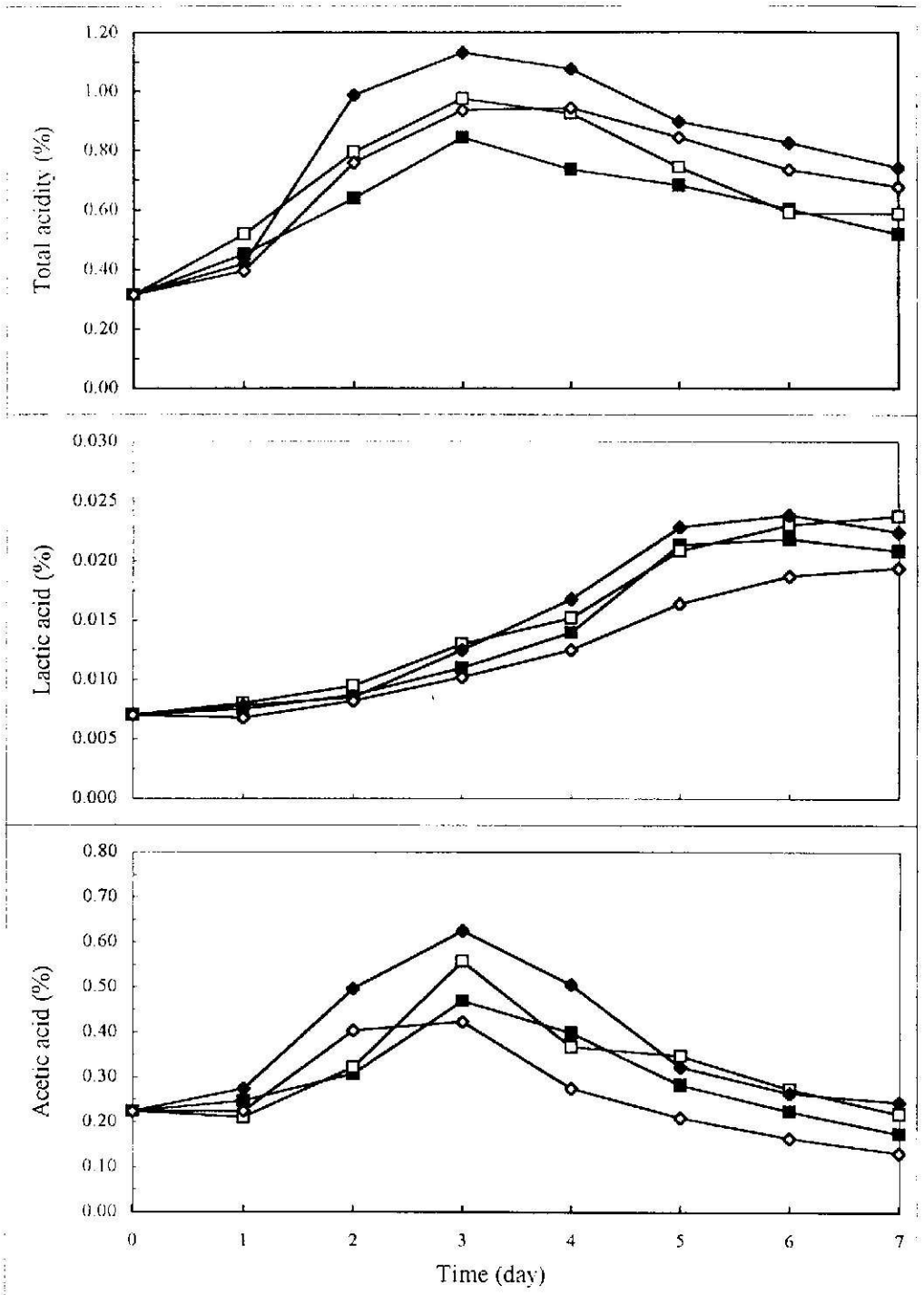
A. rancen
A. lovaniense
G. oxydan
ชุดการทดลองควบคุม

----ในเยื่อหุ้มเมล็ด
-----ในเมล็ด

ลงน้อยที่สุด และมีค่าใกล้เคียงกับชุดการทดลองควบคุม วันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองทั้งหมดมีค่าพีเอชของเมล็ดโกโก้ใกล้เคียงกัน โดยชุดการทดลองที่เติม *A. rancen*,*A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุมมีค่าพีเอชเป็น 5.65, 5.50, 5.40 และ 5.60 ตามลำดับ จากรูป 28 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เพียงวันที่ 4 ของการหมักเท่านั้น เพราะว่าหลังจากวันที่ 4 ของการหมัก เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในกองหมักเป็นของเหลวและเยื่อเมือก ทุกชุดการทดลองมีค่าพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักเพิ่มขึ้น โดยชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* มีค่าพีเอชในส่วนดังกล่าวเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมัก ค่าพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในชุดทดลองที่เติม *A. rancen, A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดทดลองควบคุมมีค่าเป็น 4.95, 4.86, 4.65 และ 4.80 ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มทำนองเดียวกับการศึกษาของ Abdul Samah, และคณะ (1993) ที่ทำการหมักเมล็ดโกโก้โดยการเติม *A. xylinum* พบว่าค่าพีเอชของเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองดังกล่าวทั้งในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้และในเมล็ดโกโก้มีค่าต่ำกว่าชุดการทดลองควบคุม ปริมาณกรดที่สูงในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีผลทำให้ความเป็นกรดของเมล็ดโกโก้เพิ่มขึ้น โดยกรดในเยื่อหุ้มเมล็ดจะซึมผ่านผนังหุ้มเมล็ดเข้าสู่ภายในเมล็ดโกโก้ ซึ่งสัมพันธ์กับการลดลงของพีเอชในเมล็ดโกโก้ (Roelofsen, 1958; Forsyth and Quesnel, 1963)

การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดของเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติก และชุดการทดลองควบคุม แสดงดังรูป 26 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 และคณะ (1993) พบว่าการเติม *A. xylinum* ในการหมักทำให้เมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักมีปริมาณกรดทั้งหมดสูงกว่าชุดการทดลองควบคุม ทั้งนี้ในเมล็ดโกโก้ตอนเริ่มต้นการหมักมีปริมาณกรดทั้งหมดสูงกว่าชุดการทดลองควบคุมถึง 2.5 เท่า (0.19 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ต่อ 0.07 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) การลดลงของกรดซิตริกในระยะสุดท้ายของการหมักเป็นผลจากเมื่อมีการให้อากาศแก่กองหมักโดยการกวนเมล็ดโกโก้ ทำให้กรดซิตริกถูกออกซิไดซ์เป็นกรดแลคติกได้ (Weissberger, *et al.*, 1971) และพบว่ากรดซิตริกและกรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีปริมาณมากที่สุดในการหมักเมล็ดโกโก้ (Abdul Samah, *et al.*, 1993)



รูปที่ 26 การเปลี่ยนแปลงกรดทั้งหมด กรดแลคติก และกรดที่ระเหยได้ ใน เมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วย *A. rancen, A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

A. rancen

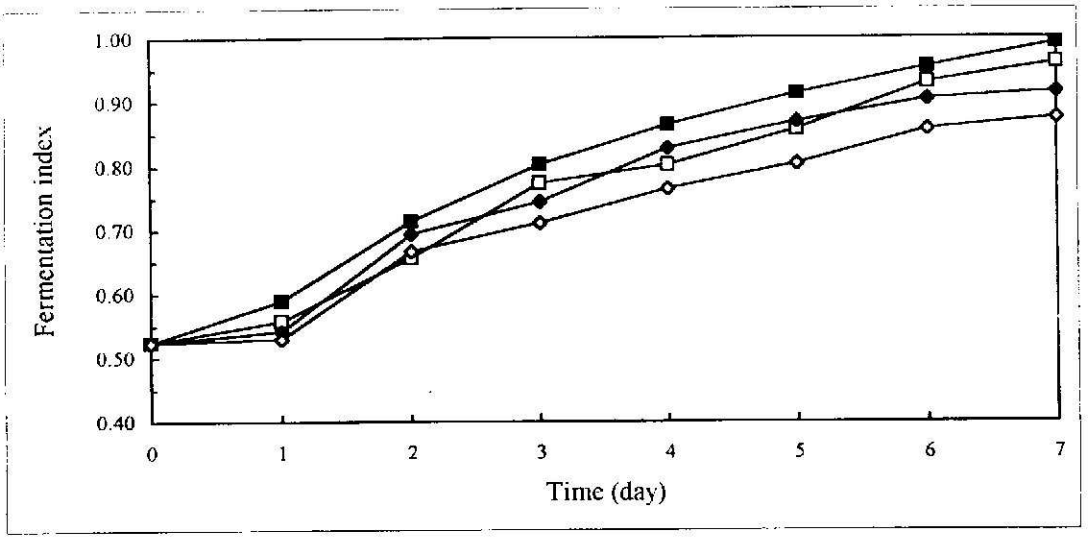
A. lovaniense

G. oxydan

ชุดการทดลองควบคุม

การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติกระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยแบคทีเรียแอซีติกชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม แสดงดังรูป 26 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) ชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมแบคทีเรียแอซีติกมีกรดแลคติกต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ เนื่องจากชุดการทดลองดังกล่าวมีจุลินทรีย์เจริญอยู่น้อย ดังนั้นการย่อยสลายสารอาหารโดยเฉพาะน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดเกิดขึ้นได้น้อย สอดคล้องกับรายงานของ Abdul Samah และคณะ (1993)

กรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยแบคทีเรียแอซีติก และชุดการทดลองควบคุม มีการเปลี่ยนแปลงแสดงดังรูป 26 เมล็ดโกโก้เริ่มต้นมีกรดที่ระเหยได้ร้อยละ 0.22 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติกทั้ง 3 ชนิด มีการเปลี่ยนแปลงคล้ายคลึงกัน โดยในวันแรกของการหมักปริมาณกรดที่ระเหยได้มีเพียงเล็กน้อย เนื่องจากแบคทีเรียแอซีติกยังมีปริมาณต่ำ ในวันที่ 1-3 ของการหมักมีกรดที่ระเหยได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีค่าสูงสุดในวันที่ 3 ของการหมัก หลังจากนั้นมีค่าลดลงเช่นเดียวกับรายงานของ Abdul Samah และคณะ (1993) 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 จึงออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดแอซีติกได้มากกว่าชุดการทดลองอื่นๆ กรดที่ระเหยได้ มีปริมาณลดลงในระยะสุดท้ายของการหมัก เนื่องจากแบคทีเรียแอซีติกมีปริมาณลดลงในระยะดังกล่าว รวมถึงน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ลดลงเป็นผลให้มี เอทานอลลดลง 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



รูปที่ 27 การเปลี่ยนแปลงดัชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักด้วย *A. rancen, A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

A. rancen

A. lovaniense

G. oxydan

ชุดการทดลองควบคุม

การเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ในชุดการทดลองต่างๆ ที่หมักด้วยแบคทีเรียแอซีติก เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม แสดงดังรูป 27 ทุกชุดการทดลองมีค่าดัชนีการหมักเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเวลาการหมักนานขึ้น ในวันแรกของการหมักค่าดัชนีการหมักเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากค่าเริ่มต้นซึ่งเป็น 0.52 เมื่อให้อากาศแก่กองหมักทำให้กองหมักมีอุณหภูมิ และพีเอชเพิ่มขึ้นสูงเพียงพอที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเมล็ดโกโก้ โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของเม็ดสีจากสารสีม่วงเป็นสารสีน้ำตาลช็อกโกแลตเกิดขึ้นได้ดี (Quesnel, 1986; Lehrian and Petterson, 1983) ทำให้ค่าดัชนีการหมักมีค่าสูงขึ้นในวันต่อ ๆ มา และในวันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติม *A. rancen, A. lovniense* หรือ *G. oxydan* และชุดการทดลองควบคุม มีค่าดัชนีการหมักเป็น 0.99, 0.96, 0.92 และ 0.88 ตามลำดับ ค่าดัชนีการหมักที่ได้นี้มีค่าต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองที่เติมยีสต์ ถึงแม้ทำการหมักเป็นเวลานาน 7 วัน ชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* ซึ่งมีค่าดัชนีการหมักสูงสุดและมีค่าใกล้เคียงกับ 1 มากที่สุด

เมื่อนำเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติกและชุดการทดลองควบคุมไปผ่าเมล็ดเพื่อหาค่า Cut Test ของเมล็ดโกโก้ และความสมบูรณ์ของเมล็ดโกโก้แห้ง ผลที่ได้แสดงดังตาราง 13 พบว่าชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* มีค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลช็อกโกแลต (10PR3/1,2) สูงสุด และแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนชุดการทดลองที่เติม *A. lovaniense* หรือ *G. oxydan* ให้ค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลช็อกโกแลตไม่แตกต่างกัน และมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองควบคุม ซึ่งมีค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้สีม่วงแกมน้ำตาลหรือเมล็ดโกโก้ที่เกิดการหมักที่ไม่สมบูรณ์สูงกว่าชุดการทดลองอื่น

องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักด้วยแบคทีเรียแอซีติกและชุดการทดลองควบคุม แสดงดังตาราง 14 ดังนั้นการศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียแอซีติกที่เหมาะสมสำหรับการหมักเมล็ดโกโก้พบว่า *A. rancen* มีความเหมาะสมมากกว่าแบคทีเรียแอซีติกชนิดอื่น ถึงแม้การเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในกองหมักมีไม่สูงมาก แต่คุณภาพของเมล็ดโกโก้จากการหมักด้วยแบคทีเรียชนิดนี้ดีกว่าเมล็ดที่ได้จากชุดการทดลองอื่น

4. บทบาทของเชื้อเริ่มต้นผสมต่อการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ

การใช้ยีสต์ แบคทีเรียแอซีติก และแบคทีเรียแลคติก ที่คัดเลือกได้จากการทดลองตอนที่ผ่านมาได้แก่ *S. cerevisiae, A. rancen* และ *L. casei* เตรียมเป็นเชื้อจุลินทรีย์ผสม โดยใช้เชื้อเริ่มต้นแต่ละชนิดปริมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก เติมลงในขวดหมักเมล็ดโกโก้ในลักษณะต่างๆ กัน โดยอาศัยลักษณะการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ตามการหมักเมล็ดโกโก้ในธรรมชาติเป็นเกณฑ์ในการจัดชุดการทดลอง (รายละเอียดในวิธีการข้อ 4.2) การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP ของชุดการทดลองต่าง ๆ แสดงดังรูป 28 พบว่าทุกชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ผสมมีจุลินทรีย์เพิ่ม

ตาราง 13 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 14 องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมัก ด้วยแบคทีเรียแอซีติก ที่คัดเลือก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

องค์ประกอบ[1]	ชนิดของแบคทีเรียแอซีติกที่เติม			
	A. rancen	*A. lovaniense*	*G. oxydan*	Control
น้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ด (%)[3]	0.84 + 0.02[d2]	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]
ความสีการหมัก (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

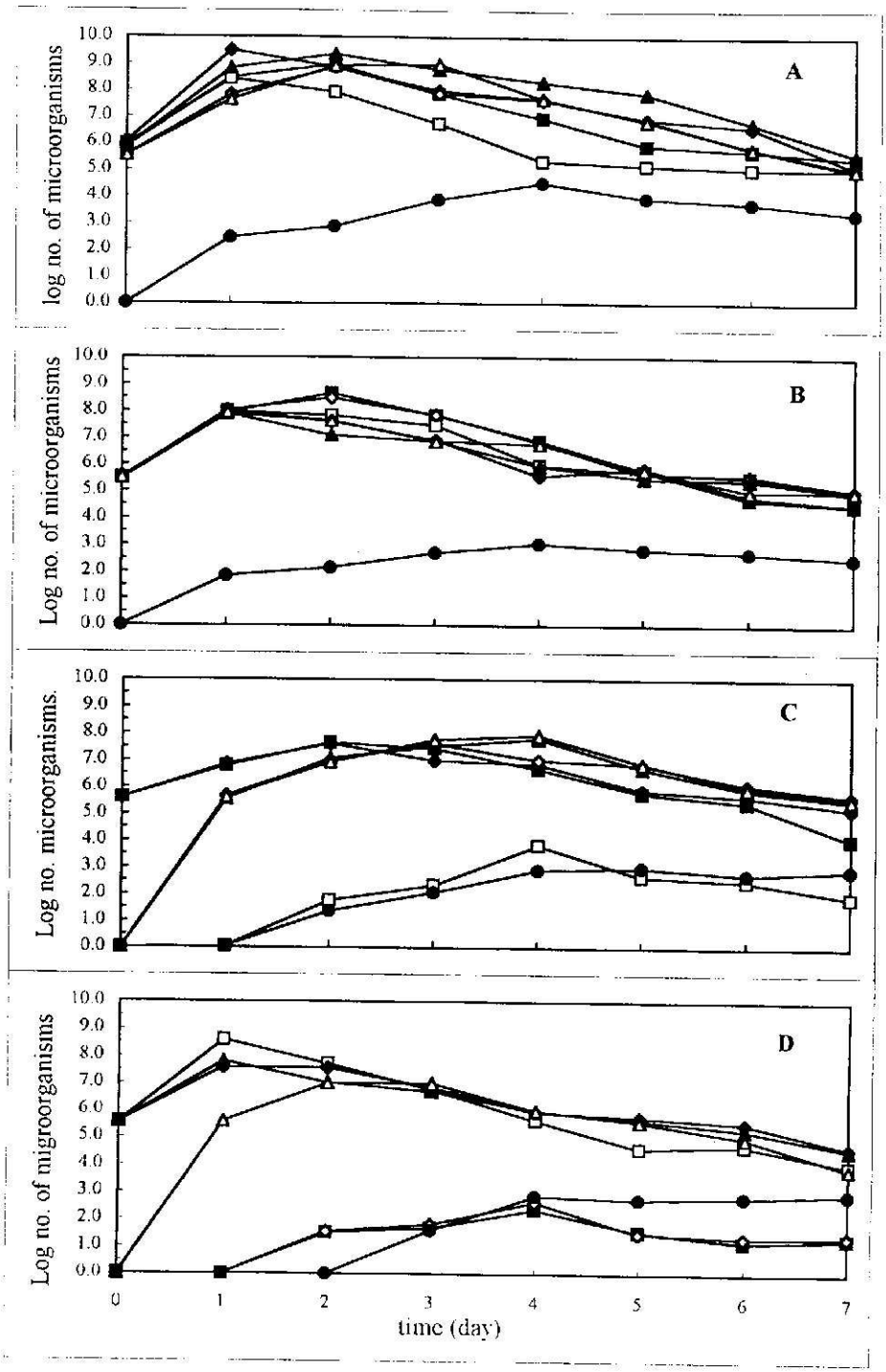
2 อักษรเหมือนกันในแถวเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

3 เป็นปริมาณน้ำตาลที่วัดได้ในวันที่ 4 ของการหมัก

ขึ้นรวดเร็วในระยะแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติมเชื้อผสมของ *S. cerevisiae* , *A. rancen* และ *L. casei* ลงไปพร้อมกันในตอนแรกของการหมัก มีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันแรกของการหมักเป็น $3.16x10^9$ โคโลนี ต่อกรัมเมล็ดโกโก้ หลังจากนั้นจุลินทรีย์มีปริมาณลดลง โดยชุดการทดลองที่เติมเชื้อผสมของ *S. cerevisiae* และ *L casei* ในตอนเริ่มต้นการหมักมีปริมาณจุลินทรีย์ต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ตลอดการหมัก ขณะที่ชุดการทดลองที่เติมเชื้อผสม *S. cerevisiae* และ *L. casei* ในตอนเริ่มต้นการหมัก แล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีจุลินทรีย์สูงกว่าชุดการทดลองอื่นตลอดการหมัก ส่วนชุดควบคุมซึ่งไม่เติมจุลินทรีย์ลงไปตอนแรกตรวจไม่พบจุลินทรีย์ในกองหมักแต่หลังจากนั้นจะมีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น และมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมักเป็น $3.10x10^4$ โคโลนี ต่อกรัมเมล็ดโกโก้แล้วมีปริมาณลดลงจนสิ้นสุดการหมัก

การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร PDA แสดงดังรูป 28 ชุดการทดลองที่เติมยีสต์มีจุลินทรีย์ใกล้เคียงกันในตอนเริ่มต้นการหมัก ซึ่งมีค่าประมาณ $3.10\text{-}3.30x10^5$ โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ และมีปริมาณจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นในวันแรกของการหมัก ทั้งนี้เพราะในระยะแรกของการหมักนั้นกองหมักมีสภาพไร้อากาศ และมีน้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เพียงพอ รวมทั้งเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในขณะนั้นมีพีเอชเหมาะแก่การเจริญของยีสต์ (Wood and Lass, 1985) ส่วนชุดการทดลองควบคุมมีการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ใกล้เคียงกับบนอาหาร TYGKCP คือในวันแรกของการหมักตรวจไม่พบจุลินทรีย์หลังจากนั้นมีจุลินทรีย์เพิ่มสูงขึ้นจนถึงวันที่ 4 ของการหมัก แล้วในตอนสุดท้ายของการหมักมีจุลินทรีย์บนอาหาร PDA ลดลงเร็วกว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียดังกล่าวในระยะหลัง (หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง) แต่ในระยะสุดท้ายของการหมักทุกชุดการทดลองมีจุลินทรีย์บนอาหาร PDA ลดลง และชุดการทดลองต่างๆ มีปริมาณจุลินทรีย์ในวันสุดท้ายของการหมักบนอาหาร PDA ประมาณ $3.10x10^4$ ถึง $1.03x10^5$ โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้

การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร DSM แสดงดังรูป 28 ในชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* พร้อมกับยีสต์ *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นการหมัก มีจุลินทรีย์บนอาหาร DSM ประมาณ $4.05 - 4.20x10^5$ โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ และมีปริมาณจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นในระยะ 2 วันแรกของการหมัก หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการหมัก ส่วนชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นวันที่ 4 ของการหมัก และมีปริมาณสูงสุดเป็น $6.65\text{-}8.50x10^7$ โคโลนี ต่อกรัมเมล็ดโกโก้ หลังจากนั้นมีปริมาณลดลง ในวันสุดท้ายของการหมักมีจุลินทรีย์ใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมัก สอดคล้องกับรายงานของ Roelofsen (1958) ซึ่งพบแบคทีเรียแอซีติกได้ในปริมาณสูงตลอดการหมัก ส่วนชุดการทดลองที่ไม่เติม *A. rancen* และชุดการทดลองควบคุมในระยะแรกของการหมักไม่พบจุลินทรีย์บนอาหาร DSM แต่หลังจากนั้นสามารถพบจุลินทรีย์บนอาหาร DSM ได้เช่นกัน และมีจุลินทรีย์ในวันสุดท้ายประมาณ $8.50x10^1$ และ $8.05x10^2$ โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ตามลำดับ



รูปที่ 28 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP PDA DSM และ MRS ในการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

A - TYGKCP, B - PDA, C - DSM, D - MRS

(■) 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% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

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

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

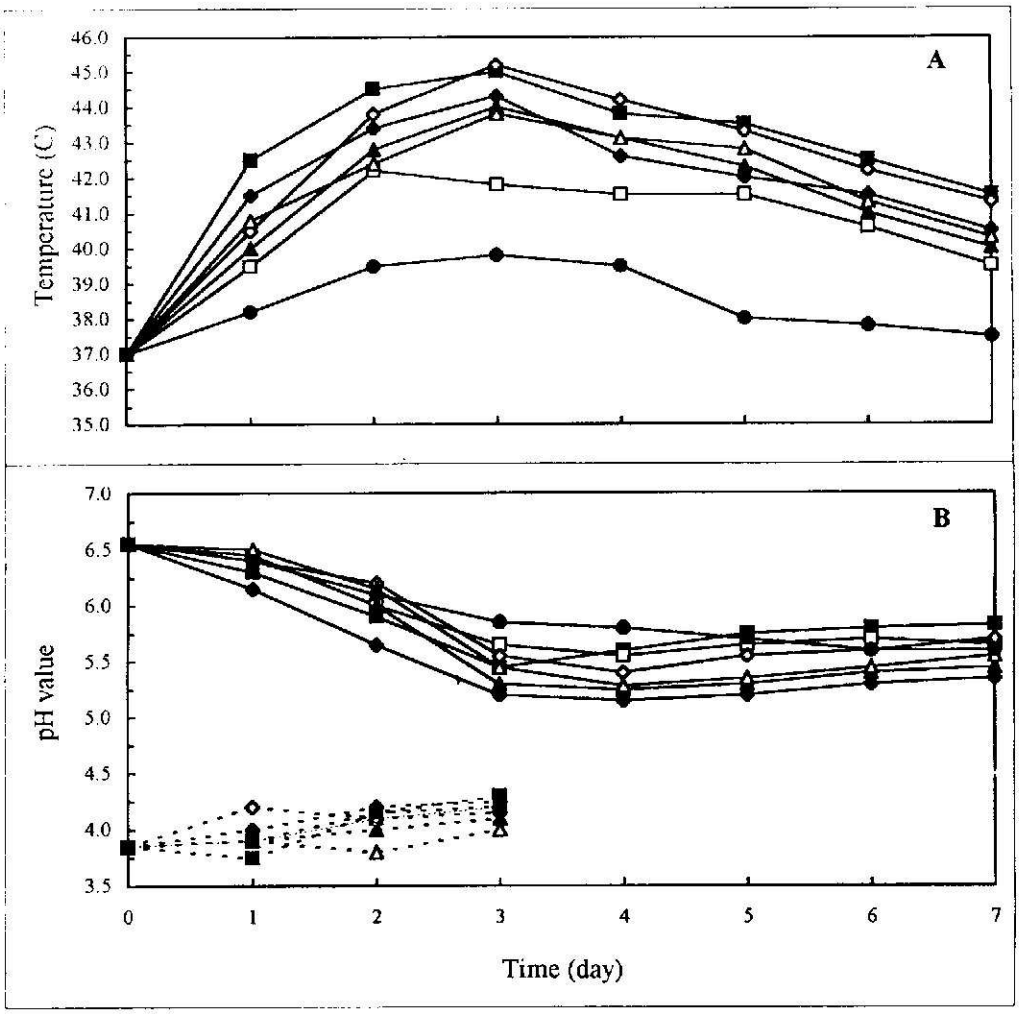
(•) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใดๆในการหมัก

การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร MRS แสดงดังรูป 28 ในชุดการทดลองที่เติม *L. casei* ตอนเริ่มต้นการหมัก มีจุลินทรีย์บนอาหาร MRS ประมาณ 3.70-3.80x10^5 โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ และมีจุลินทรีย์สูงสุดในวันแรกของการหมัก หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงจนสิ้นสุดการหมัก ส่วนชุดการทดลองที่เติม *L. casei* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีจุลินทรีย์บนอาหาร MRS สูงในวันที่ 2-3 ของการหมัก แต่ปริมาณจุลินทรีย์ในระยะดังกล่าวมีค่าต่ำกว่าชุดการทดลองที่เติม *L. casei* ในตอนเริ่มต้นการหมัก ส่วนชุดการทดลองควบคุมและชุดการทดลองที่ไม่เติม *L. casei* ในการหมัก พบว่าในระยะแรกของการหมักตรวจไม่พบจุลินทรีย์บนอาหาร MRS แต่หลังจากนั้นพบจุลินทรีย์บนอาหารดังกล่าวเช่นกัน และมีปริมาณใกล้เคียงกับชุดการทดลองควบคุม โดยมีจุลินทรีย์สูงสุดในวันที่ 4 ของการหมักเป็น 2.50x10^2 และ 6.90x10^2 โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิขณะหมักเมล็ดโกโก้ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ แสดงดังรูป 29 ทุกชุดการทดลองมีอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นในระยะแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมักมีอุณหภูมิสูงกว่าชุดการทดลองอื่นและมีค่าใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่เติม *S. cereviseiae* ในตอนเริ่มต้นแล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* มีอุณหภูมิสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติม *A. rancen* เพราะชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* นั้นเมื่อมีการให้อากาศแก่กองหมักทำให้เกิดการออกซิไดซ์ของเอทานอลเป็นกรดแลคติกมีการปล่อยพลังงานความร้อนออกมามาก ส่วนชุดควบคุมที่ไม่เติมจุลินทรีย์ลงไปมีอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นน้อยกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ และระยะสุดท้ายของการหมักมีอุณหภูมิลดลงเช่นเดียวกับชุดการทดลองอื่น

การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดและในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ แสดงดังรูป 29 ในเมล็ดโกโก้และเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เริ่มต้นมีพีเอชเป็น 6.55 และ 3.85 ตามลำดับ ในชุดการทดลองต่าง ๆ ที่เติม *A. rancen* มีพีเอชในเมล็ดลดต่ำลง เนื่องจากกรด แอซีติกซึ่งแบคทีเรียแอซีติกสร้างขึ้นมานั้นมีความแรงของกรดมากกว่ากรดแลคติกและกรดอินทรีย์อื่น ๆ (Biehl, *et al*., 1982) เมื่อแพร่เข้าสู่ภายในเมล็ดโกโก้ทำให้เมล็ดโกโก้มีค่าพีเอชลดต่ำลงกว่า ชุดการทดลองที่ไม่เติมแบคทีเรียดังกล่าว ส่วนชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *L. casei* ทำให้พีเอชในเมล็ดลดลงน้อย ในวันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมักมีพีเอชสูงสุดเป็น 5.83 ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae, L. casei* และ *A. rancen* พร้อมกันในตอนเริ่มต้นการหมักเมล็ดโกโก้มีพีเอชต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ และมีค่าเป็น 5.35 เนื่องจากผลของกรดแอซีติกและกรดแลคติกที่เกิดขึ้นในการหมัก

การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ ด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แสดงดังรูป 30 ในเมล็ดโกโก้เริ่มต้นมีกรดทั้งหมดเป็นร้อยละ 0.08 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก กรดทั้งหมดมีค่าเพิ่มขึ้นในระยะ 5 วันแรกของการหมัก หลังจากนั้นมีค่าลด



รูปที่ 29 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดและเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

(■) 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% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

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

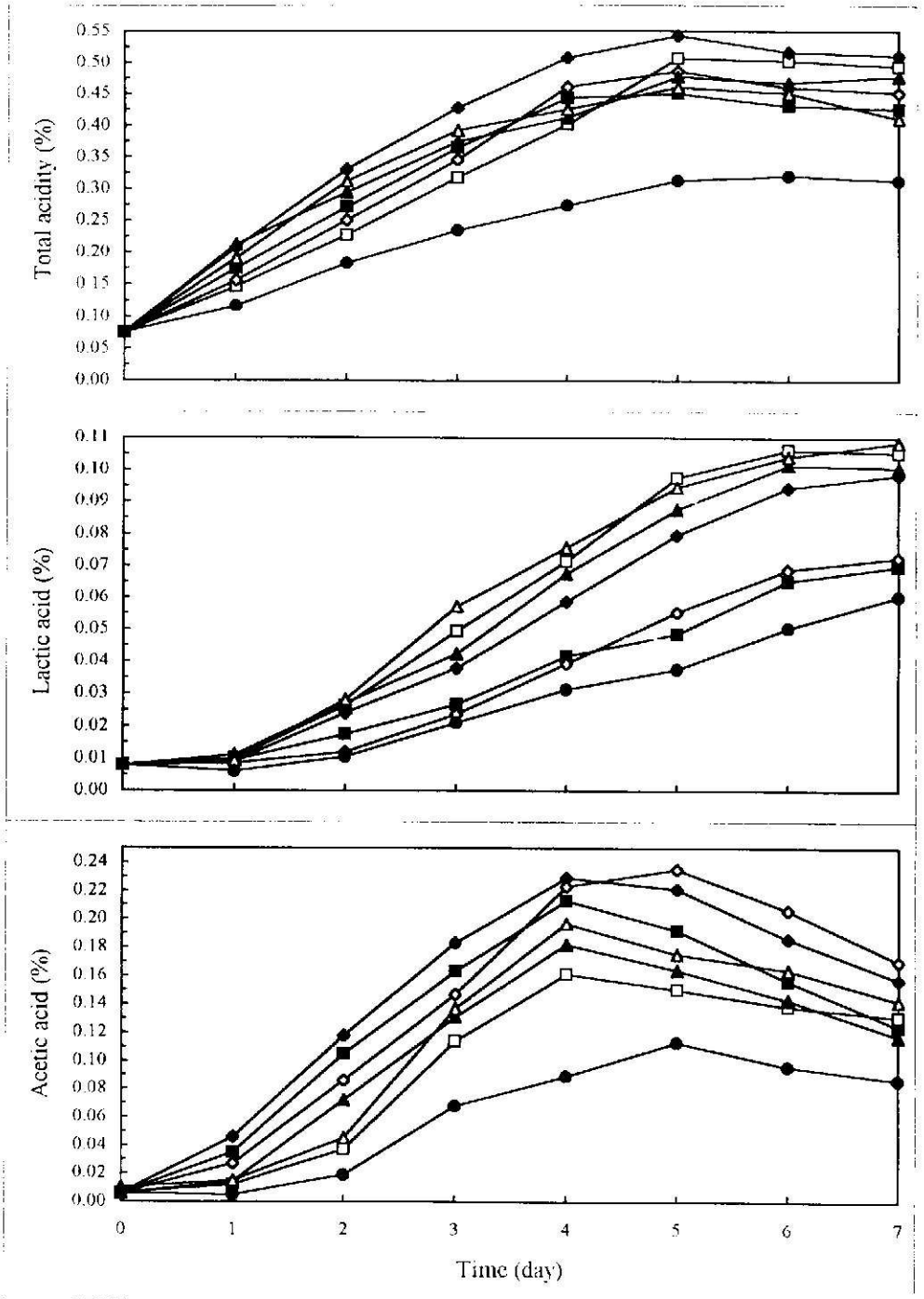
(Δ) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(•) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใดๆในการหมัก

ลงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการหมัก ส่วนชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมจุลินทรีย์ลงไปมีกรดทั้งหมดต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae*, *L. casei* และ *A. rancen* ในตอนเริ่มต้นของการหมักมีกรดทั้งหมดสูงกว่าชุดการทดลองอื่นตลอดการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* ลงไปหลังจากการหมักได้ 24 ชั่วโมง มีกรดทั้งหมดต่ำกว่าในระยะแรกของการหมัก แต่เมื่อเติม *A. rancen* แล้วจะมีกรดสูงขึ้น วันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมจุลินทรีย์ลงไปมีกรดทั้งหมดต่ำสุดเป็นร้อยละ 0.31 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ขณะที่ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae*, *L. casei* และ *A. rancen* ในตอนเริ่มต้นการหมัก มีกรดทั้งหมดสูงสุดเป็นร้อยละ 0.51 โดยน้ำหนัก และมีค่าใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *L. casei* ในตอนเริ่มต้นการหมักมีค่าเป็นร้อยละ 0.50 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก

กรดแลคติกที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีการเปลี่ยนแปลงแสดงดังรูป 30 เมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตลอดการหมัก 7 วันกรดแลคติกมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากกรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ที่ไม่ระเหยเมื่อแพร่เข้าสู่ภายในเมล็ดโกโก้แล้วจึงสะสมอยู่ในเมล็ดโกโก้ (Weissberger, *et al.*, 1971) ในระหว่างการหมักพบว่าปริมาณกรดแลคติกในชุดการทดลองต่างๆ มีค่าเพิ่มสูงขึ้นและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เติม *L. casei* ในการหมักนั้นพบกรดดังกล่าวในปริมาณสูง และกลุ่มที่ไม่เติม *L. casei* มีกรดแลคติกต่ำ สำหรับชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* และ *L. casei* มีกรดแลคติกต่ำกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติม *A. rancen* เพราะการเติม *A. rancen* ทำให้อัตราการเจริญของแบคทีเรียแลคติกน้อยลง มีการสร้างกรดแลคติกลดลง และเมื่อมีการให้อากาศในระยะต่อมาของการหมัก แบคทีเรียแอซีติกสามารถออกซิไดซ์กรดแลคติกได้ด้วย (Carr, *et al.*, 1979) ในวันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นการหมัก แล้วเติม *L. casei* และ *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีกรดแลคติกสูงสุดเป็นร้อยละ 0.11 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก และมีค่าใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *L. casei* ในตอนเริ่มต้นการหมัก ซึ่งมีค่าเป็นร้อยละ 0.10 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ส่วนชุดการทดลองควบคุมมีกรดแลคติกต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นๆ และในวันสุดท้ายของการหมักมีค่าเป็น 0.06 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก

การเปลี่ยนแปลงกรดที่ระเหยได้ในเมล็ดโกโก้ที่หมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ แสดงดังรูป 30 ทุกชุดการทดลองมีกรดแอซีติกเพิ่มขึ้นในระยะ 4-5 วันแรกของการหมัก หลังจากนั้นจึงลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก ในวันแรกของการหมักกรดแอซีติกในชุดการทดลองต่าง ๆ มีค่าใกล้เคียงกัน จากนั้นมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* และพบว่าการเติม *A. rancen* ในตอนเริ่มต้นการหมักนั้น เมล็ดโกโก้มีกรดแอซีติกต่ำกว่าการเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง เนื่องจากการเติมแบคทีเรียแอซีติกในตอนแรกของการหมักนั้นแบคทีเรียแอซีติกเจริญ



รูปที่ 30 การเปลี่ยนแปลงกรดทั้งหมด กรดแลคติกและกรดที่ระเหยได้ ในเมล็ดโกโก ระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

(■) 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% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

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

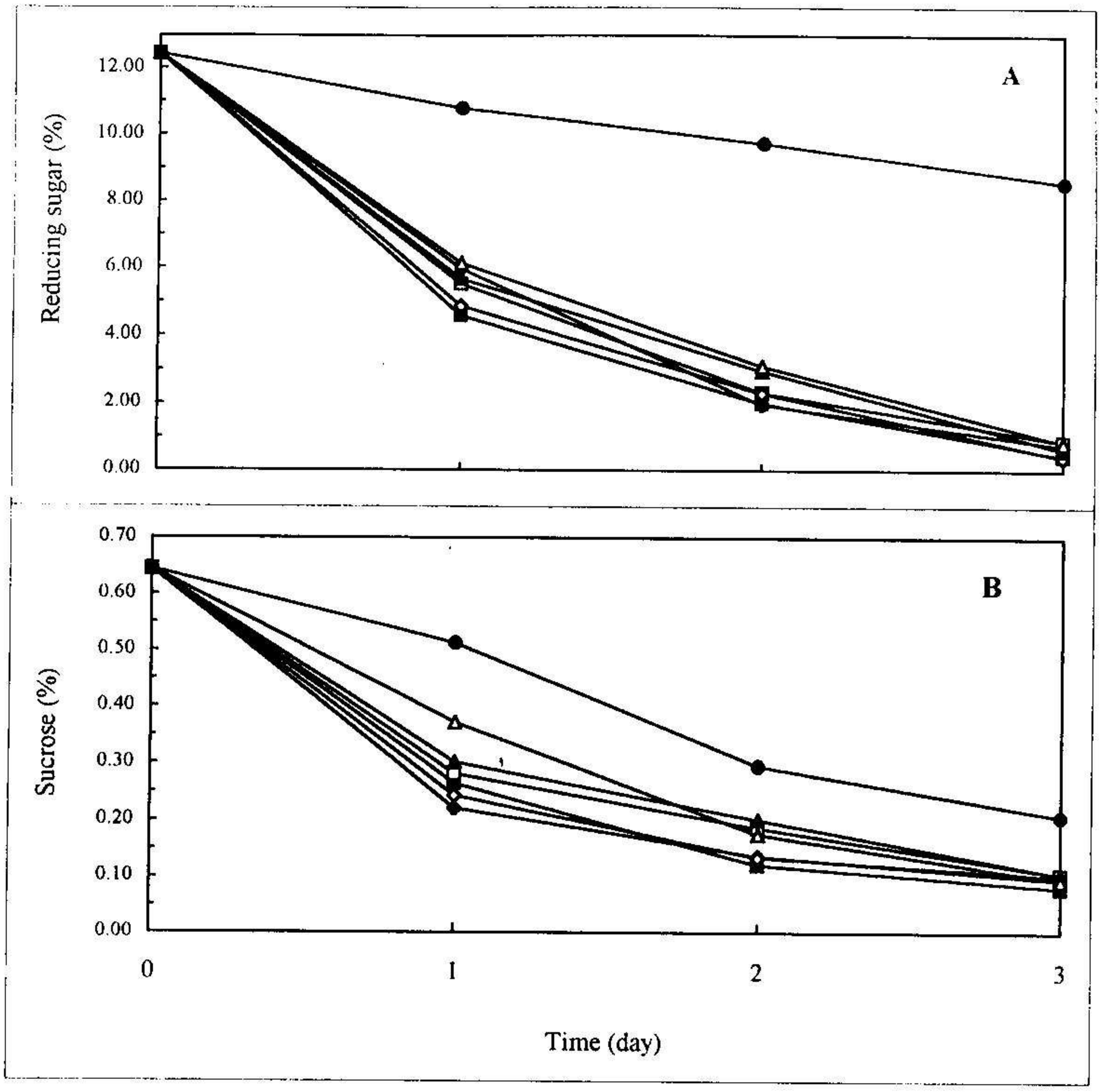
(Δ) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(•) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใดๆในการหมัก

แข่งขันกับยีสต์ 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

การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่างๆ แสดงดังรูป 31 น้ำตาลทั้ง 2 ชนิด ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีค่าเป็นร้อยละ 12.44 และ 0.64 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ทุกชุดการทดลองมีน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดลดลงตลอดการหมักและมีค่าใกล้เคียงกัน ยกเว้นชุดการทดลองควบคุมซึ่งไม่เติมจุลินทรีย์ใดๆ มีน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดลดลงน้อยที่สุด และชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ในตอนเริ่มต้นการหมักมีน้ำตาลซูโครสลดลงมากที่สุด ขณะที่ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisisae* ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *A. rancen* ตามลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีน้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ลดลงน้อยที่สุด น้ำตาลทั้ง 2 ชนิด ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้วิเคราะห์ได้เพียงวันที่ 3 ของการหมักเท่านั้น หลังจากนั้นเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ถูกย่อยสลายโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์เกิดเป็นของเหลวขึ้นในกองหมักจนไม่สามารถวิเคราะห์ได้ ในวันที่ 3 ของการหมักชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ผสมต่างๆ มีน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ประมาณร้อยละ 0.42-0.88 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักและมีน้ำตาลซูโครสประมาณร้อยละ 0.09-0.11 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ส่วนชุดการทดลองควบคุมในวันที่ 3 ของการหมักมีน้ำตาลทั้ง 2 ชนิด ในเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นร้อยละ 0.87 และ 0.21 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ

น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ที่หมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่างๆ มีการเปลี่ยนแปลง แสดงดังรูป 32 เมื่อเริ่มต้นการหมักเมล็ดโกโก้มีน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดเป็นร้อยละ 0.54 และ 2.61 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ในวันแรกของการหมักน้ำตาลทั้ง 2 ชนิด ในชุดการทดลองต่างๆ มีค่าลดลงเล็กน้อย หลังจากนั้นน้ำตาลกลูโคสมีค่าสูงขึ้นในทุกชุดการทดลอง โดยชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ในตอนเริ่มต้น มีน้ำตาลกลูโคสสูงกว่าชุดการทดลองอื่นตลอดการหมัก ส่วนน้ำตาลรีดิวซ์ในชุดการทดลองควบคุมมีค่าเพิ่มขึ้นน้อยกว่าชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นในชุดการทดลองต่างๆ เป็นผลจากในระยะดังกล่าว เมล็ดโกโก้มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลซูโคสในเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองต่างๆ แสดงดังตาราง 25 โดยน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองต่างๆ มีค่าลด



รูปที่ 31 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

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

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

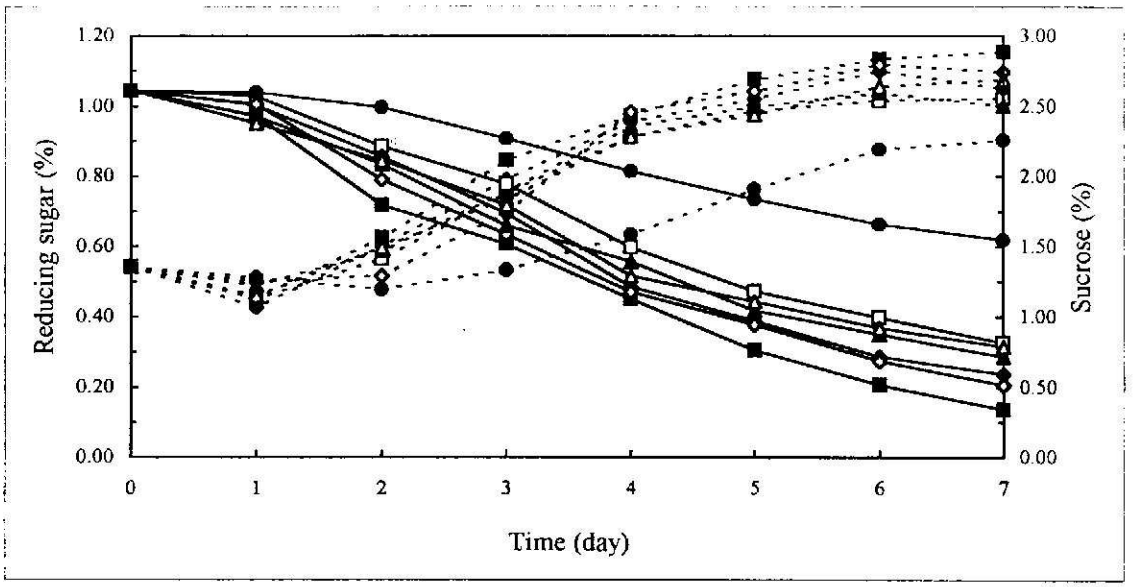
(◆) เติม *S. cerevisiae* 5% , *L. casei* 5% และ *A. rancen* 5% ตอนเริ่มต้นหมัก

(✧) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

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

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

(•) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใดๆในการหมัก



รูปที่ 32 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

(■) 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% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

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

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

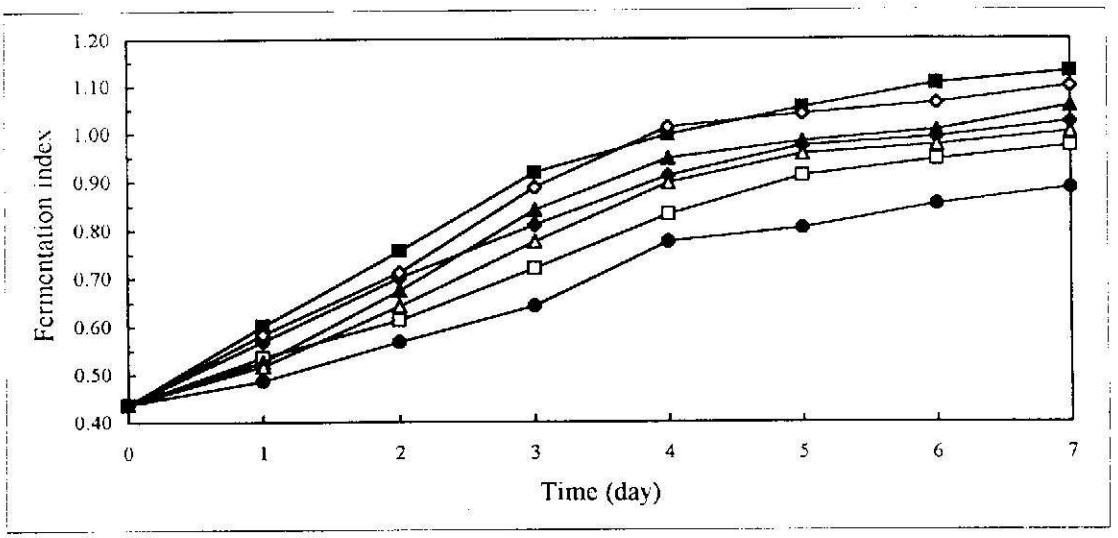
(•) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใดๆในการหมัก

ลงหลังจากหมักเมล็ดโกโก้ได้ 1 วัน ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *L. casei* ตอนเริ่มต้นการหมักมีน้ำตาลซูโครสลดลงน้อยที่สุดเนื่องจากชุดการทดลองควบคุมนั้นไม่มีการเติมจุลินทรีย์ลงไป ทำให้กองหมักเกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เช่น การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ และการลดลงของพีเอช จากกิจกรรมของจุลินทรีย์น้อยกว่าชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ ปริมาณน้ำตาลซูโครสในชุดการทดลองต่างๆ ในวันสุดท้ายของการหมักแสดงดังตาราง 15

การเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ในระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมแสดงดังรูป 33 ก่อนการหมักเมล็ดโกโก้มีค่าดัชนีการหมักเป็น 0.44 ระหว่างการหมักมีค่าดัชนีการหมักเพิ่มขึ้นตลอดการหมัก โดยชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมัก และชุดการทดลองที่เติม *S.cerevisiae* ตอนเริ่มต้นการหมักแล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีค่าดัชนีหมักใกล้เคียงกันและมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นตลอดการหมัก ส่วนชุดการทดลองควบคุมมีค่าดัชนีการหมักเพิ่มขึ้นน้อยกว่าชุดการทดลองอื่น เนื่องจากชุดการทดลองควบคุมนั้นไม่เติมจุลินทรีย์ลงไป ทำให้การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในขวดหมักไม่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ ในเมล็ดโกโก้ ในระหว่างการหมัก ชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซิติกมีค่าดัชนีการหมักสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมแบคทีเรียแอซิติก และชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติกเมล็ดโกโก้มีค่าดัชนีการหมักใกล้เคียงกับ 1.00 ตั้งแต่วันที่ 4-5 ของการหมัก เพราะการเติมแบคทีเรียแอซีติกนั้นทำให้กองหมักมีอุณหภูมิเพิ่มสูง และมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะกว่ากรณีที่ไม่เติมแบคทีเรียแอซีติก ส่วนชุดการทดลองควบคุมที่เติมเฉพาะ *S. cerevisiae* และ *L.casei* ตอนเริ่มต้น มีค่าดัชนีการหมักที่ใกล้เคียงกับชุดการทดลองควบคุม

เมื่อนำเมล็ดโกโก้ไปทำแห้งแล้วนำเมล็ดโกโก้ที่ได้มาผ่าดูสีของเมล็ดโกโก้ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตาราง 15 จากค่าร้อยละเฉลี่ยของเมล็ดโกโก้แห้งจากชุดการทดลองต่างๆ แสดงให้เห็นว่าชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นการหมักแล้วเติม *A.rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลซึกอโกแลต เป็นร้อยละ 83.13 และมีค่าใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่เติม *S.cerevisiae* และ *A.rancen* ในตอนเริ่มต้นการหมัก ซึ่งมีค่าเป็นร้อยละ 82.65 ส่วนชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์อื่นๆ มีค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลต่ำกว่าชุดการทดลองทั้งสองนี้ ชุดการทดลองควบคุมให้ค่าร้อยละของเมล็ดแห้งสีน้ำตาลต่ำสุดเป็นร้อยละ 49.38 แต่ให้ค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้แห่งสีม่วงแกมน้ำตาลสูงกว่าชุดการทดลองอื่น

องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมแสดงดังตาราง 16 เมื่อนำเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักไปทำแห้งแล้วมีคุณภาพแสดงดังตาราง 17 ซึ่งเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้มีคุณภาพดี ยกเว้นเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองควบคุมซึ่งมีคุณภาพต่ำ เมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติม *S.cerevisiae* ในตอนเริ่มต้นการหมักแล้วเติม *A.rancen* ลงไปหลังจากการหมักได้ 24 ชั่วโมง และชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมักให้เมล็ดโกโก้แห้งที่ดีกว่าชุดการทดลองอื่นๆ เมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองทั้งสองชุดมีพีเอชเพิ่มขึ้นมีกรดแอซีติกลดต่ำลง และให้ค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้สีน้ำตาลสูง มีปริมาณไขมัน และปริมาณความชื้นใกล้เคียงกับมาตรฐาน



รูปที่ 33 การเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีการหมักในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมชุดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

(■) 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% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

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

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

(•) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใดๆในการหมัก

ตาราง 15 การเปลี่ยนแปลง ค่า Cut Test ของเมล็ดโกโก้ จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสม เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ชุดการทดลอง	สีเมล็ดโกโก้แห้ง (ร้อยละ)[1]			
	สีน้ำตาล	สีม่วงแกมน้ำตาล	สีหินชนวน	สีอื่น ๆ
Treatment A	82.65[a] [2]	16.18[bc]	1.17[bc]	0.00[c]
Treatment B	75.43[c]	20.48[b]	2.73[b]	1.36[a]
Treatment C	80.13[b]	18.87b	1.00[d]	0.00[b]
Treatment D	83.13[a]	14.97c	1.90[c]	0.00[c]
Treatment E	80.63[b]	17.98b	1.38[c]	0.00[c]
Treatment F	78.57[c]	18.67b	1.76[c]	1.00[b]
Control Treatment	48.38[d]	45.73[a]	4.61[a]	1.28[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% 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 16 องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

องค์ประกอบ[1]	ชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ผสม[3]						
	Treatment A	Treatment B	Treatment C	Treatment D	Treatment E	Treatment F	Control
น้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อหุ้มเมล็ด (%)[4]	0.45 + 0.02^{e}[2]	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 ตัวอักษรเหมือนกันในแถวนอนเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

3 ชุดการทดลองต่าง ๆ มีรายละเอียดดังตาราง 24

4 ปริมาณน้ำตาลที่วัดได้ในวันที่ 3 ของการหมัก

ตาราง 17 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

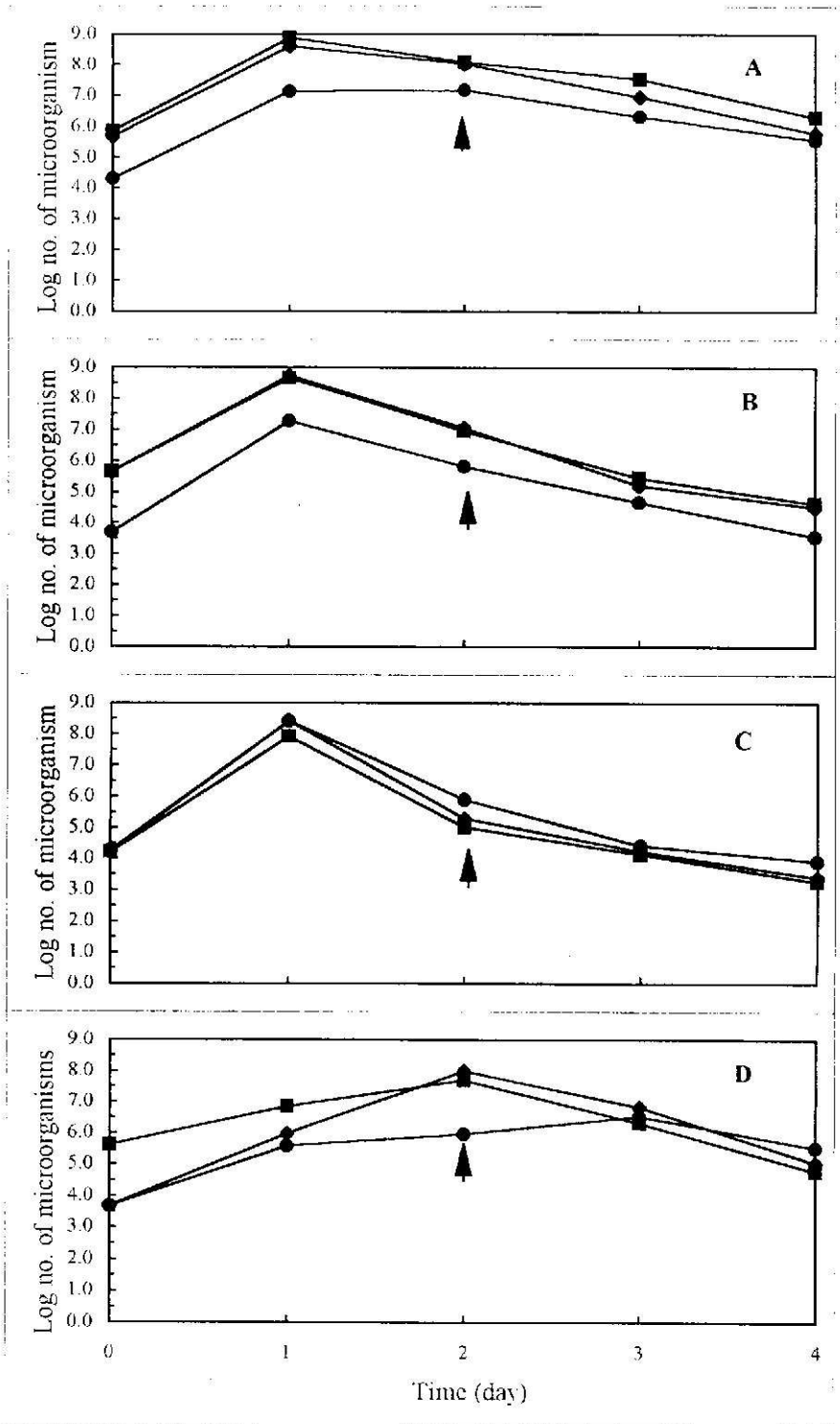
ดังนั้น การศึกษาการใช้เชื้อผสมของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่คัดเลือกในการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการในขวดหมัก สามารถสรุปได้ว่าการใช้ *S. cerevisiae* ปริมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก และ *A.rancen* ปริมาณร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เติมลงไปพร้อมกันในตอนเริ่มต้นการหมักหรือการเติม *A.rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง ให้เมล็ดโกโก้ที่มีคุณภาพดีกว่าชุดการทดลองที่เติมเชื้อผสมของ *S.cerevisiae, A. rancen* และ *L. casei* ในลักษณะอื่นๆ และชุดการทดลองควบคุม

5. บทบาทของเชื้อเริ่มต้นผสมต่อการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก

ใช้จุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ผ่านมาได้แก่การใช้เชื้อผสมของ *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ปริมาณร้อยละ 5 เติมลงในกองหมักพร้อมกันตอนเริ่มต้นการหมักและการเติม *A. rancen* ลงในกองหมักหลังจาก *S. cerevisiae* แล้ว 24 ชั่วโมง โดยเลี้ยงในอาหารเหลวที่เหมาะสม 24 ชั่วโมง แล้วเตรียมสารแขวนลอยจุลินทรีย์แต่ละชนิดให้มีจุลินทีย์ประมาณ 10^5 โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นเติมในกองเมล็ดโกโก้ในกล่องไม้ขนาด 34x76x32 เซนติเมตร หมักเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิห้อง และกลับเมล็ดในวันที่ 2 ของการหมัก

การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP แสดงดังรูป 34 พบว่าทุกชุดการทดลองมีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นในระยะแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* พร้อมกันในตอนแรกของการหมักมีจุลินทรีย์ในวันแรกของการหมักเฉลี่ย $7.3x10^5$ โคโลนี ต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกของการหมัก แล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีจุลินทรีย์เฉลี่ย $4.64x10^5$ โคโลนี ต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ชุดการทดลองควบคุมซึ่งไม่เติมจุลินทรีย์ลงไปแต่เกิดการหมักด้วยจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนจากธรรมชาติ มีจุลินทรีย์เริ่มต้นเป็น $2.43x10^4$ โคโลนี ต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ในระหว่างการหมักหนึ่งวันชุดการทดลองที่เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมมีจุลินทรีย์ในกองหมักสูงสุดเป็น $4.00\text{-}7.62x10^8$ โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ หลังจากผ่านระยะแรกของการหมักชุดการทดลองต่างๆ มีจุลินทรีย์ลดลง ขณะที่ชุดการทดลองควบคุมีปริมาณจุลินทรีย์สูงสุดในวันที่ 3 ของการหมักเป็น $3.23x10^7$ โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้

การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร PDA แสดงดังรูป 34 ตอนเริ่มต้นการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ลงไป มีจุลินทรีย์ประมาณ $4.43\text{-}4.53x10^5$ โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ทุกชุดการทดลองมีจุลินทรีย์สูงสุดเมื่อหมักได้หนึ่งวัน โดยชุดการทดลองที่เติม *S.cerevisae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมักและชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกของการหมัก แล้วเติม *A. rancen* มีจุลินทรีย์สูงสุดเป็น $5.29\text{-}5.62x10^8$ โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองควบคุมมีจุลินทรีย์บนอาหาร PDA สูงสุดเป็น $5.99x10^7$ โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ซึ่งต่ำกว่าชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ผสม



รูปที่ 34 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP PDA MRS และ DSM ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมในกล่องหมัก

A - TYGKCP, B - PDA, C - MRS, D - DSM

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

(◆) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

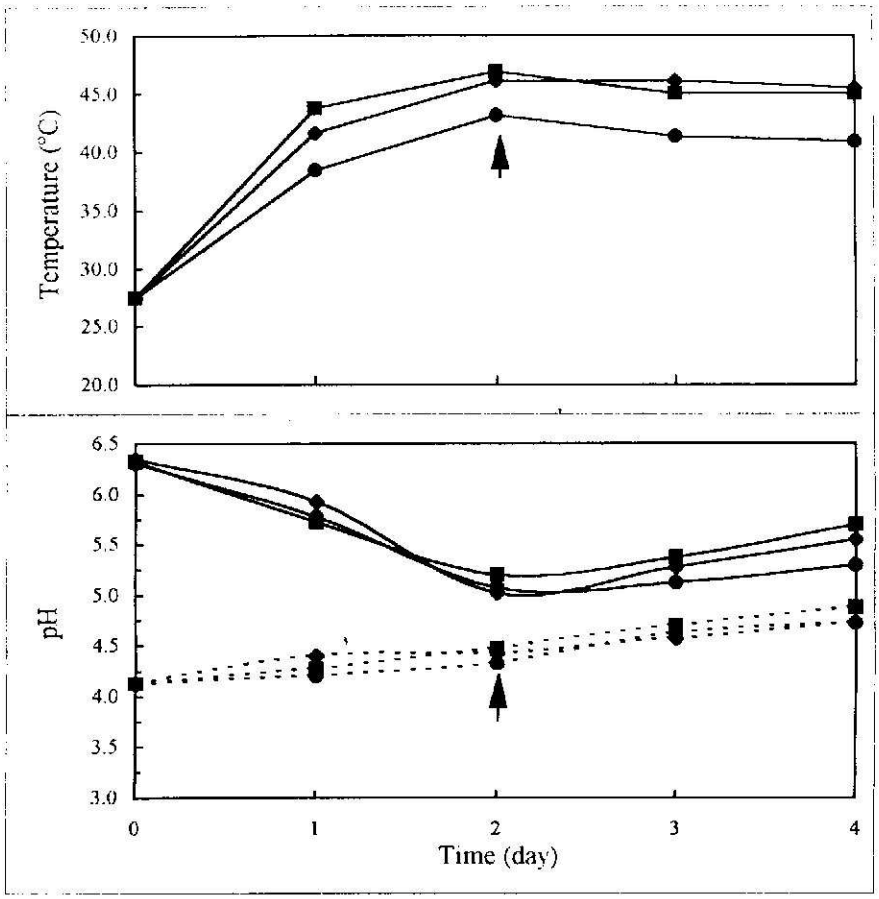
(●) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใดๆในการหมัก

จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าชุดการทดลองควบคุมมีจุลินทรีย์เริ่มต้นบนอาหาร PDA ต่ำกว่ารายงานของ อรพิน ภูมิภมร และคณะ (2536) แต่มีการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักที่สอดคล้องกัน คือ กองหมักมีจุลินทรีย์บนอาหาร PDA สูงสุดในวันแรกของการหมัก หลังจากนั้นมีปริมาณลดลงเนื่องจากในวันแรกนั้นกองหมักมีสภาพไร้อากาศ และน้ำตาลในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของยีสต์มีปริมาณสูงรวมทั้งพีเอชในเมล็ดโกโก้ยังมีค่าต่ำเหมาะแก่การเจริญของยีสต์ (Wood and Lass, 1985)

การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์บนอาหาร MRS ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักแสดงดังรูป 34 ตอนเริ่มต้นการหมักมีจุลินทีย์บนอาหาร MRS เท่ากับ 2.38-2.49x10^4 โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ หลังจากหมักได้หนึ่งวันปริมาณจุลินทีย์มีค่าสูงสุด และชุดการทดลองควบคุมซึ่งเกิดการหมักตามธรรมชาติมีจุลินทีรย์บนอาหาร MRS สูงกว่าชุดการทดลองที่เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสม โดยชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* พร้อมกันในตอนแรกของการหมัก ชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง และชุดการทดลองควบคุม มีปริมาณจุลินทรีย์สูงสุดเป็น 8.22x10^7, 2.46x10^6 และ 3.55x10^8 โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ตามลำดับ หลังจากนั้นปริมาณจุลินทรีย์ลดลงจนสิ้นสุดการหมัก สอดคล้องกับการทดลองของ Wood (1975)

ปริมาณจุลินทรีย์บนอาหาร DSM ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักมีการเปลี่ยนแปลงดังรูป 34 ในชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมัก มีจุลินทรีย์บนอาหาร DSM เฉลี่ยนเท่ากับ 4.5x10^5 โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ส่วนชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *A. rancen* ตามลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีจุลินทรีย์ในตอนเริ่มต้นการหมักใกล้เคียงกับชุดการทดลองควบคุมเป็น 5.08-5.09x10^3 โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ อรพิน ภูมิภมร และคณะ (2536) พบแบคทีเรียแอซีติกในตอนเริ่มต้นการหมักได้สูงสุดเป็น 1.55x10^6 ถึง 1.54x10^7 โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ชุดการทดลองที่เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมลงไปมีจุลินทรีย์สูงสุดในวันที่ 3 ของการหมักเป็น 5.08x10^7 ถึง 3.50x10^8 โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ หลังจากนั้นมีจุลินทรีย์ลดลงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการหมัก ปริมาณจุลินทรีย์ในชุดการทดลงที่เติม *A. rancen* ลงไปหลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีค่าสูงกว่าการเติม *A. rancen* และ *S.cerevisiae* พร้อมกันในตอนแรกของการหมักเพราะการเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง นั้นทำให้มีการเพิ่มออกซิเจนลงในกองหมักอันเป็นผลจากการที่ยีสต์ย่อยสลายเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ทำให้อากาศสามารถแพร่เข้าสู่กองหมักได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งมีผลส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแอซีติก

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของกองหมัก ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก เป็นเวลา 4 วัน ด้วยจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือก แสดงดังรูป 35 ชุดการทดลองที่เติม *S. cereiveisae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้น มีอุณหภูมิสูงกว่าชุดการทดลองอื่นตลอดการหมัก และมีค่าสูงสุดในวันที่ 2 ของการหมักเป็น 46.5 องศาเซลเซียส ส่วนชุดการทดลองที่เติม *S.cerevisiae* ตอนเริ่มต้นแล้วเติม



รูปที่ 35 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและพีเอชของเยื่อหุ้มเมล็ดและเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมในกล่องหมัก

---- ในเยื่อหุ้มเมล็ด —— ในเมล็ด

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

(◆) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

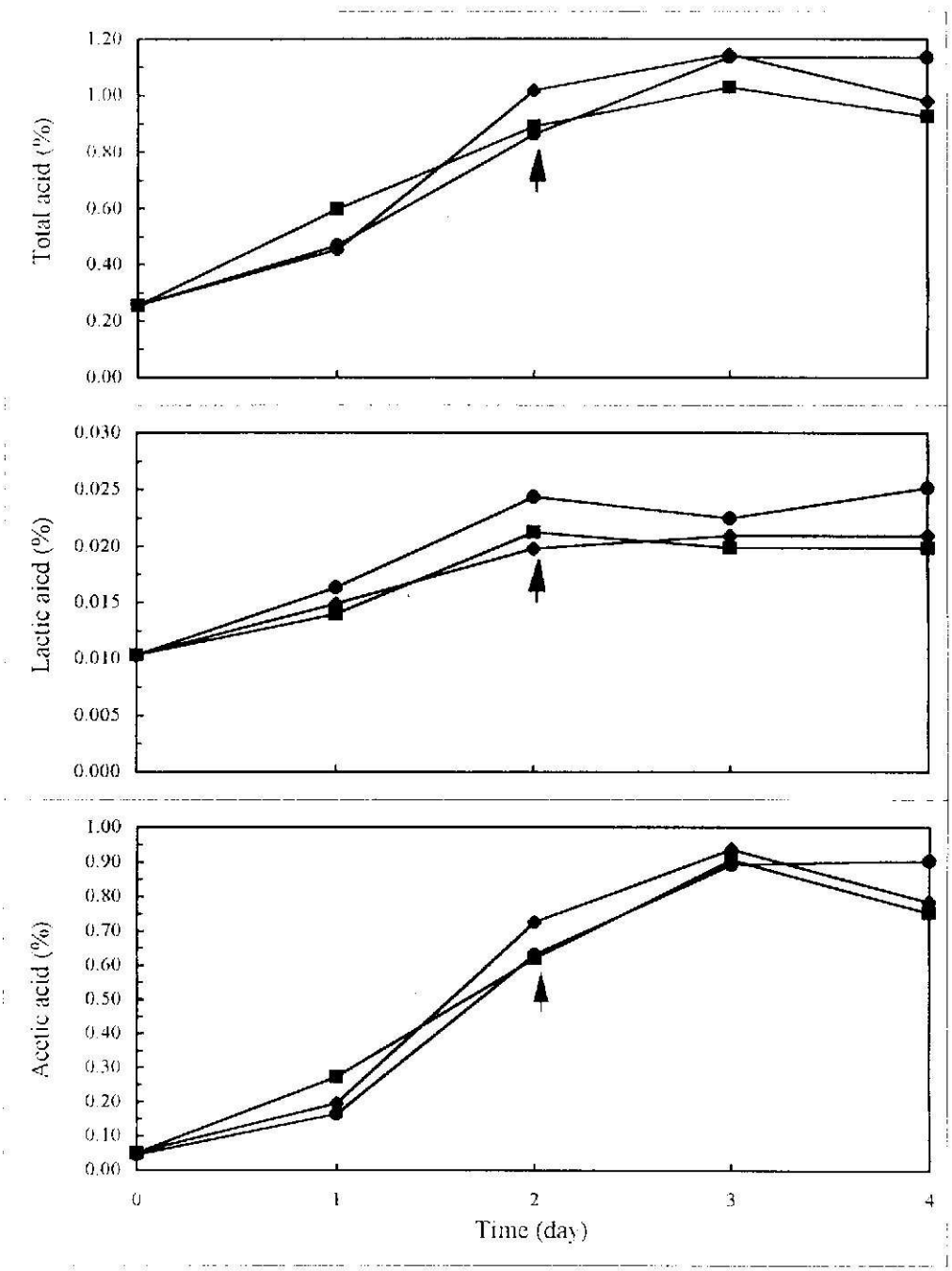
(●) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใดๆในการหมัก

A. rancen หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีอุณหภูมิสูงสุดในวันที่ 2 ของการหมัก เป็น 46.0 องศาเซลเซียส เนื่องจากชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* นั้นเกิดการออกซิไดซ์ของเอทานอลเป็นกรดแอซีติกเมื่อให้อากาศแก่กองหมัก มีการปล่อยพลังงานออกมาสูง (Forsyth and Quesnel, 1963) ชุดการทดลองควบคุมมีอุณหภูมิต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 2 ของการหมักเป็น 43.5 องศาเซลเซียส และระยะสุดท้ายของการหมักมีอุณหภูมิลดลงเช่นเดียวกับชุดการทดลองอื่น ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก และคณะ (2534) หมักเมล็ดโกโก้แบบเดียวกัน พบว่ามีอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะ 2 วันแรกของการหมัก ในวันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *A rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีอุณหภูมิสูงกว่าชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมัก

การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้และเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสมของ *S. cerevisiae* และ *A. rancen* แสดงดังรูป 35 ในระหว่างการหมักพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของเมล็ดโกโก้อยู่ระหว่าง 6.40-5.25 ชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* เมล็ดโกโก้มีค่าพีเอชลดลงต่ำกว่าชุดทดลองที่ไม่เติมจุลินทรีย์ดังกล่าว เนื่องจากกรดแอซีติกที่แบคทีเรียแอซีติกดังกล่าวสร้างขึ้นมีความแรงของกรดมากกว่ากรดแลคติกและกรดอินทรีย์อื่นๆ เมื่อกรดนี้แพร่เข้าสู่เมล็ดโกโก้ทำให้เมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติม *A. rancen* มีพีเอชลงต่ำกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมแบคทีเรียดังกล่าว หลังจากวันที่ 3 ของการหมัก พบว่าชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมักให้เมล็ดโกโก้ที่มีพีเอชสูงสุดในวันสุดท้ายของการหมักเป็น 5.70 ซึ่งใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นการหมักแล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเป็น 5.55

การเปลี่ยนแปลงพีเอชในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ในการหมักนั้น ในวันแรกของการหมักชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นการหมัก แล้วเติม *A. rancen* ลงไปหลังจากการหมักได้ 24 ชั่วโมง พีเอชที่เพิ่มขึ้นสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ แล้วหลังจากนั้นมีค่าลดลง เนื่องจากในวันแรกของการหมักนั้นมีการเติมเฉพาะยีสต์ลงไป ทำให้กองหมักมีการสร้างแอลกอฮอล์ขึ้น โดยกิจกรรมการหมักของยีสต์ หลังจากนั้นเมื่อเติม *A. rancen* ลงไป จะเกิดการออกซิไดซ์แอลกอฮอล์เป็นกรดแอซีติกขึ้น ทำให้เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว ก่อนที่เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีค่าพีเอชสูงขึ้นเพราะในระยะดังกล่าวแบคทีเรียที่เจริญในการหมักมีปริมาณลดลง รวมถึงกรดอินทรีย์ที่ถูกสร้างขึ้นมีการสูญเสียไปพร้อมกับของเหลวที่เกิดขึ้นจากการหมัก และกรดบางชนิดสามารถระเหยออกไปได้

การเปลี่ยนแปลงกรดทั้งหมดในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือก แสดงดังรูป 36 เมล็ดโกโก้ตอนเริ่มต้นการหมกมีกรดทั้งหมดร้อยละ 0.25 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ในระหว่างการหมักนั้นชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ*A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมัก มีกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นน้อยที่สุดเป็นร้อยละ 0.95 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก



รูปที่ 36 การเปลี่ยนแปลงกรดทั้งหมด กรดแลคติกและกรดที่ระเหยได้ ในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยจลินทรีย์ผสมในกล่องหมัก

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

(◆) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

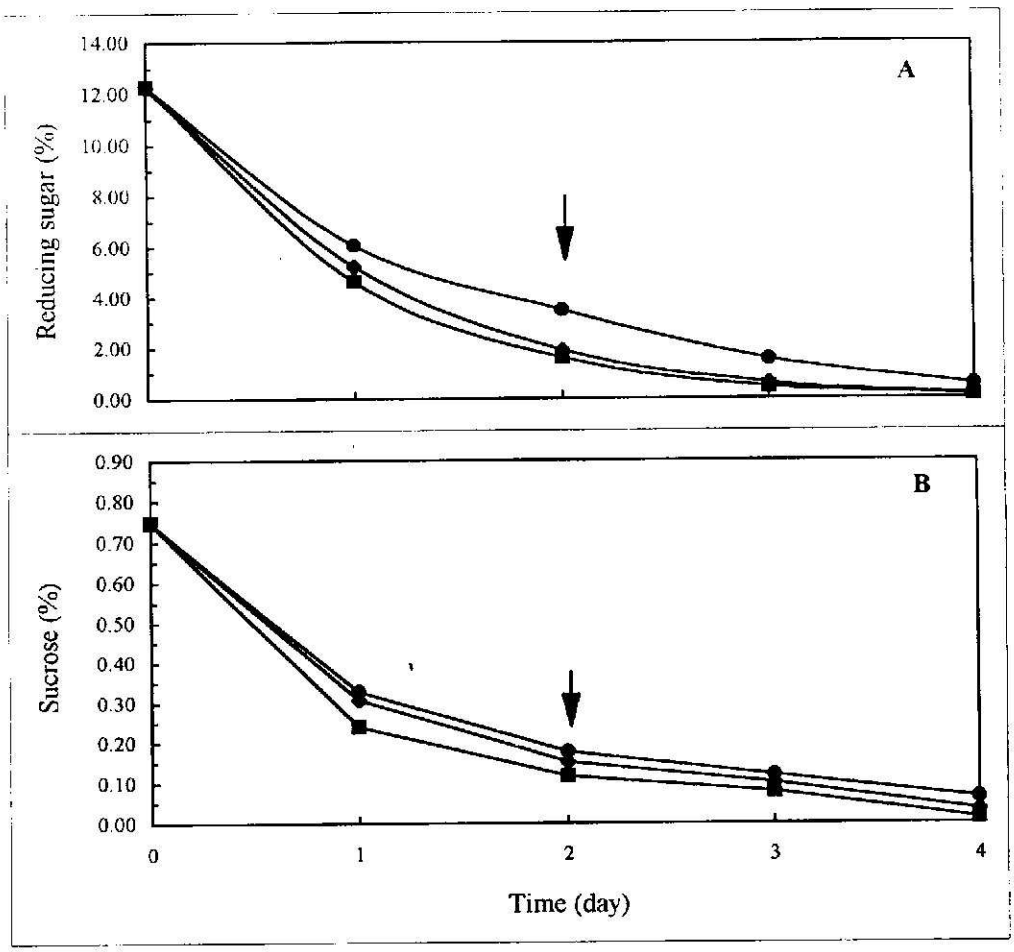
(●) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใดๆในการหมัก

ขณะที่ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* แล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 1.14 โดยน้ำหนัก และชุดการทดลองควบคุมมีกรดทั้งหมดเป็นร้อยละ 1.13 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก การที่มีปริมาณกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นในระยะแรกของการหมัก เนื่องจากในระยะแรกของการหมักนั้นจุลินทรีย์มีการเจริญและสร้างกรดอินทรีย์ต่างๆ ออกมาสู่กองหมักในปริมาณมาก แต่ในระยะสุดท้ายของการหมักปริมาณกรดในชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ทั้งสองชุดการทดลองมีค่าลดลง ขณะที่ชุดการทดลองควบคุมมีปริมาณกรดค่อนข้างคงที่ในระยะดังกล่าว ปริมาณกรดทั้งหมดในเมล็ดโกโก้จากวันสุดท้ายของการหมักแสดงดังตาราง 28

ปริมาณกรดแลคติกในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกมีการเปลี่ยนนแปลงดังรูป 36 กรดแลคติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นตลอดเวลาการหมัก เมล็ดโกโก้เริ่มต้นในการหมักมีกรดแลคติกประมาณร้อยละ 0.01-0.02 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ระหว่างการหมักชุดการทดลองต่างๆ มีกรดแลคติกเพิ่มสูงขึ้นในตอนแรกของการหมัก แต่ในระยะสุดท้ายของการหมักกรดแลคติกในชุดการทดลองต่างๆ มีค่าลดลงเล็กน้อย

การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดที่ระเหยได้ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักแสดงดังรูป36 เมล็ดโกโก้ตอนเริ่มต้นการหมักมีกรดที่ระเหยได้ประมาณร้อยละ 0.04-0.05 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ชุดการทดลองควบคุมมีกรดที่ระเหยได้เพิ่มขึ้นรวดเร็วในวันแรกของการหมัก ขณะที่ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen1* มีกรดที่ระเหยได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในวันแรกของการหมัก เมื่อมีการกลับกองหมักเมล็ดโกโก้ในวันที่ 2 ของการหมัก เมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติมเชื้อจุลินทรีย์ผสมทั้งสองชุดมีกรดที่ระเหยได้เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีค่าสูงกว่าทุกชุดการทดลองควบคุม ในวันสุดท้ายของการหมักปริมาณกรดที่ระเหยได้ในเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ผสมทั้งสองชุดการทดลองมีกรดที่ระเหยได้ลดลงอีกครั้งหนึ่ง ขณะที่ชุดการทดลองควบคุมมีกรดที่ระเหยได้เพิ่มสูงขึ้นตลอดการหมัก

การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครส ในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือก แสดงดังรูป 37 เมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้เป็นร้อยละ 12.15 และ 1.81 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ในระหว่างการหมักน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดในเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้มีการเปลี่ยนแปลงลดลงตลอดการหมัก ในวันสุดท้ายของการหมักน้ำตาลทั้ง 2 ชนิด ถูกย่อยสลายโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เหลือเพียงเล็กน้อย ชุดการทดลองควบคุมซึ่งไม่เติมจุลินทรีย์ลงไป มีน้ำตาลทั้ง 2 ชนิด ลดลงน้อยกว่าชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ ในวันสุดท้ายของการหมักชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ชุดต่างๆ และชุดการทดลองควบคุมมีน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 0.10-0.52 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก และมีน้ำตาลซูโครสร้อยละ 0.01-0.06 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก



รูปที่ 37 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสของเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมในกล่องหมัก

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

(◆) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

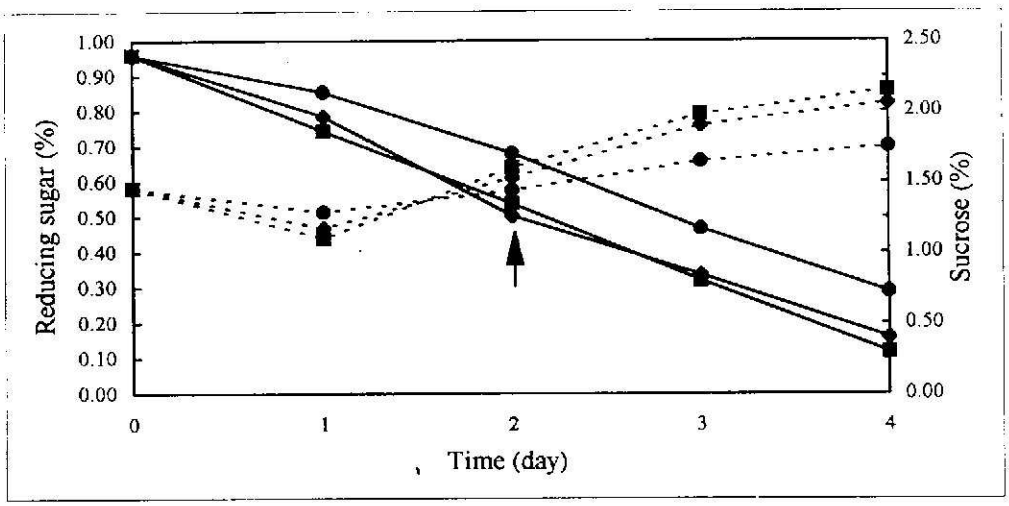
(●) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใดๆในการหมัก

การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก แสดงดังรูป 38 เมล็ดโกโก้ก่อนหมักมีน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสเป็นร้อยละ 0.54 และ 2.61 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ในระหว่างการหมักเป็นเวลา 4 วัน น้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้มีปริมาณลดลง โดยชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมักมีน้ำตาลซูโครสลดลงมากที่สุด ส่วนน้ำตาลรีดิวซ์นั้นพบว่าในระยะแรกของการหมักทุกชุดการทดลองมีค่าลดลงเล็กน้อย หลังจากนั้นมีค่าเพิ่มสูงขึ้น โดยชุดการทดลองควบคุมมีน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นน้อยที่สุด ขณะที่ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมัก มีน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นสูงสุด น้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นในชุดการทดลองต่างๆ เป็นผลจากในระยะดังกล่าวเมล็ดโกโก้มีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะแก่การเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ในเมล็ดโกโก้

การเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมักด้วยจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชุด เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม แสดงดังรูป 39 เมล็ดโกโก้ก่อนการหมักมีดัชนีการหมักเฉลี่ยนเป็น 0.51 ในช่วงแรกของการหมักชุดการทดลองที่เติม*S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนเริ่มต้นการหมักมีค่าดัชนีการหมักสูงกว่า ชุดการทดลองอื่นๆ แต่เมื่อมีการกลับกองหมักในวันที่สองของการหมัก ชุดการทดลอ่งที่เติม *S. cerevisiae* ตอนแรกของการหมักแล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีค่าดัชนีการหมักสูงกว่าชุดการทดลองอื่นตลอดการหมัก ในวันสุดท้ายของการหมักค่าดัชนีการหมักชุดการทดลองที่เติมเชื้อ จุลินทรีย์ผสมทั้ง 2 ชุด การทดลองมีค่าดัชนีการหมักที่ใกล้เคียงกัน และมีค่าเท่ากับ 1.0 ตั้งแต่วันที่ 3 ของการหมัก ขณะที่ชุดการทดลองควบคุมซึ่งเกิดการหมักตามธรรมชาติมีค่าดัชนีการหมักใกล้เคียง 1.0 ในวันที่ 4 ของการหมัก แสดงให้เห็นว่าการเติมเชื้อผสมของ *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ในการหมักเมล็ดโกโก้มีผลช่วยลดระยะเวลาในการหมักลง

เมื่อนำเมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกและจากชุดการทดลองควบคุม มาผ่าดูความสมบูรณ์ และดูสีของเมล็ดโกโก้แห้ง ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 18 ชุดการทด ลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A.rancen* ตอนเริ่มต้นการหมัก ซึ่งมีเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลช็อกโกแลตเป็นร้อยละ 90.50 และมีค่าใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่เติม *S.cerevisiae* ตอนเริ่มต้นการหมักแล้วเติม*A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง ซึ่งมีเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลช็อกโกแลตเป็นร้อยล่ะ 89.70 ส่วนชุดการทดลองควบคุมมีเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลต่ำสุดเป็นร้อยละ 64.98 แต่ให้เมล็ดโกโก้แห้งสีม่วงแกมน้ำตาลสูงกว่าชุดการทดลองอื่น

จากผลการทดลองที่ได้ชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ลงไปทั้งสองลักษณะให้เมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลสูงกว่าชุดการทดลองควบคุมที่เกิดการหมักจากจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ค่า Cut Test ของชุดการทดลองควบคุมนั้นมีค่าสูงกว่ารายงานของ ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก และคณะ (2534) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมีปริมาณจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน ซึ่งมีผลต่อการเพิ่มของ อุณหภูมิ พีเอช และกรดต่างๆ



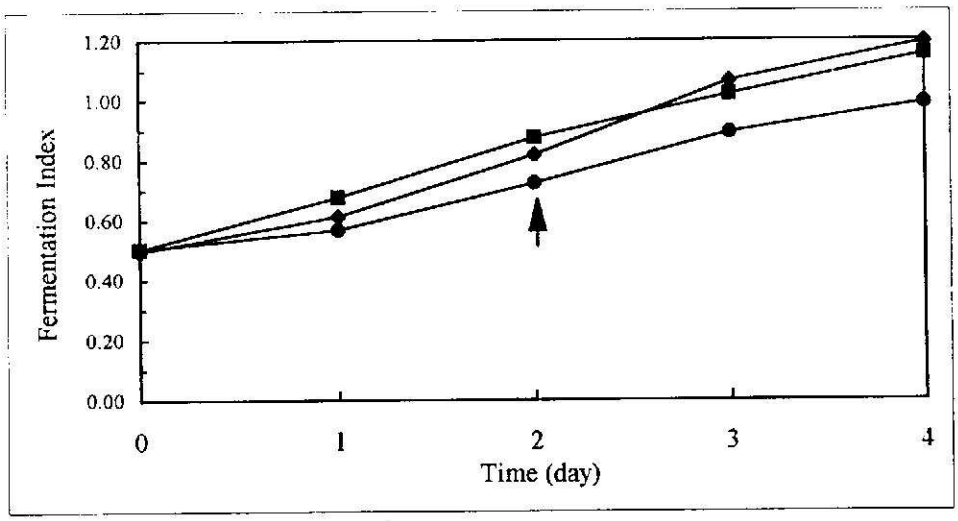
รูปที่ 38 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในเมล็ดโกโก้ระหว่างการหมักด้วยจุลินทรีย์ผสมในกล่องหมัก

(- - -) น้ำตาลรีดิวซ์ (——) น้ำตาลซูโครส

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

(◆) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(●) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใดๆในการหมัก



รูปที่ 39 การเปลี่ยนแปลงดัชนีการหมักของเมล็ดโกโก้ด้วยจุลินทรีย์ผสมในกล่องหมัก

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

(◆) เติม *S. cerevisiae* 5% ตอนเริ่มต้นแล้วเติม *A. rancen* 5% หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง

(●) ชุดการทดลองควบคุม ไม่เติมจุลินทรีย์ใดๆในการหมัก

ตาราง 18 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

อันเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการกลับกองหมักที่ไม่เหมาะสมเป็นอีกสาเหตุที่ทำให้ค่า Cut Test ของเมล็ดโกโก้ต่ำลง (Abdul Samah, *et al.*, 193b)

องค์ประกอบของเมล็ดโกโก้ในวันสุดท้ายของการหมักในกล่องหมัก ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน ด้วยจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือก แสดงดังตาราง 19 และเมล็ดโกโก้แห้งจากชุดการทดลองต่างๆ มีคุณภาพแสดงได้ดังตาราง 20 เมล็ดโกโก้แห้งที่ได้มีคุณภาพดี ซึ่งชุดการทดลองที่เติมเชื้อผสมของ *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ทั้ง 2 ชุดการทดลอง ให้เมล็ดโกโก้แห้งที่มีคุณภาพดีกว่าชุดการทดลองควบคุม เมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองทั้งสองชุดมีค่าพีเอชสูงกว่าชุดการทดลองควบคุม มีกรดแอซีติก และกรดแลคติกต่ำกว่าเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองควบคุม เมล็ดโกโก้ที่หมักมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเมล็ดเร็วกว่าชุดการทดลองควบคุม โดยมีค่าดัชนีการหมักเพิ่มขึ้นเร็วกว่าชุดการทดลองควบคุม และชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ผสมทั้ง 2 ชุดการทดลอง ให้ร้อยละของเมล็ดโกโก้สีน้ำตาลสูงขึ้น มีปริมาณไขมัน และความชื้นใกล้เคียงกับมาตรฐาน

ตาราง 19 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[b]
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 20 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

สรุป

ตอนที่ 1 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

1.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

พบว่าเมล็ดโกโก้มีจุลินทรีย์เริ่มต้น 2.21×10^{2}-1.40×10^{3} โคโลนีต่อกรัม และระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ชุดที่หนึ่งปริมาณจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้น ในวันที่ห้ามีปริมาณจุลินทรีย์สูงสุด โดยเฉพาะบริเวณด้านล่างของกองหมักมี ปริมาณจุลินทรีย์ 1.78×10^{10} โคโลนีต่อกรัม ส่วนในวันสุดท้ายของการหมักปริมาณจุลินทรีย์ลดลง ในการหมักชุดที่สองหมักได้หนึ่งวันจะมีปริมาณจุลินทรีย์สูงสุด หลังจากนั้นจะค่อยลดลงจนถึงวันที่ห้ามีปริมาณจุลินทรีย์ต่ำสุด และการศึกษาสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ทั้งหมดพบแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง แบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม และรูปแท่งตลอดระยะเวลาการหมัก

1.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณยีสต์ในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

จากการหมักเมล็ดโกโก้ชุดที่หนึ่ง พบว่ามียีสต์เริ่มต้น 2.11×10^{5} โคโลนีต่อกรัม แต่ในการหมักชุดที่สองก่อนการหมักตรวจไม่พบยีสต์อย่างไรก็ตามในการหมักทั้งสองชุดหลังจากหมักได้หนึ่งวันตัวอย่างจากทั้งสามระดับของกองหมักมีปริมาณของยีสต์สูงสุด โดยพบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก สำหรับน้ำตาลรีดิวซ์ จะเพิ่มขึ้นและมีปริมาณสูงสุดในวันที่ห้า ระยะสุดท้ายของการหมักปริมาณของยีสต์จะลดลง การจำแนกชนิดของยีสต์ในการหมักชุดที่หนึ่งส่วนใหญ่จะพบ *Candida sorbosa* ในระยะแรกของการหมัก ในระยะสุดท้ายของการส่วนใหญ่พบ *C. sorbosa* และ *C. krusei* สำหรับการหมักชุดที่สองส่วนใหญ่พบ *Saccharomyces cerevisiae*

1.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแอซีติกในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

พบว่าการหมักเมล็ดโกโก้ชุดที่หนึ่งมี ปริมาณแบคทีเรียแอซีติกขณะเริ่มต้น 2.85×10^{3} โคโลนีต่อกรัม และพบแบคทีเรียแอซีติกตลอดระยะเวลาการหมัก โดยอยู่ในช่วง 2.68×10^{7}-1.00×10^{8} โคโลนีต่อกรัม การหมักชุดที่สองก่อนการหมักไม่พบแบคทีเรียแอซีติก แต่วันที่สามพบปริมาณแบคทีเรียแอซีติกสูงสุด ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณกรดระเหยได้ในรูปกรดแอซีติก โดยที่เมล็ดโกโก้จากบริเวณบน กลาง และล่างของกองหมักมีปริมาณกรดแอซีติกร้อยละ 0.88, 0.88 และ 1.09 ตามลำดับ การจำแนกชนิดของแบคทีเรียแอซีติกของการหมักชุดที่หนึ่งพบว่า ช่วงแรกของการหมักส่วนใหญ่จะพบ *Acetobacter ascendens*, *A. rancens* และ *A. lovaniense* ระยะสุดท้ายของการหมักส่วนใหญ่พบ *A. lovaniense* และ *A. rancens* สำหรับการหมักชุดที่สอง ส่วนใหญ่พบ *A. rancens* ตลอดระยะเวลาการหมัก

1.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลคติกระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้

พบว่าการหมักเมล็ดโกโก้มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลคติกสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นของการหมักชุดที่หนึ่งมี $1.85x10^{3}$ โคโลนีต่อกรัม และในวันที่ห้ามีปริมาณแบคทีเรียแลคติกสูงสุด อยู่ในช่วง $2.68x10^{6}$-$2.38x10^{7}$ โคโลนีต่อกรัม ในการหมักชุดที่สองปริมาณแบคทีเรียแลตติกสูงสุดหลังจากหมักได้หนึ่งวัน พบอยู่ในช่วง 1.07-$3.08x10^{8}$ โคโลนีต่อกรัมหลังจากนั้นจะลดลง ในการหมักชุดที่สองพบว่าปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก ในวันสุดท้ายของการหมักบริเวณ บน กลาง และล่าง กองหมักมีปริมาณกรดแลคติก ร้อยละ 0.03, 0.09 และ 0.085 ตามลำดับ และเมื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียแลคติกในการหมักชุดที่หนึ่งพบว่าช่วงแรกของการหมักส่วนใหญ่พบ *Lactobacillus casei*, *Streptococcus lactis* และ *Leuconostoc mesenteroides* ระยะสุดท้ายของการหมักส่วนใหญ่พบ *S. thermophilus*, *S. lactlis* และ *S. milis* สำหรับการหมักชุดที่สองพบว่าช่วงแรกของการหมัก ส่วนใหญ่พบ *Leu. mesenteroides* ซึ่งพบตลอดระยะเวลาการหมัก และระยะสุดท้ายของการหมักยังพบ *S. thermophilus* และ *S.lactis* ในปริมาณสูงอีกด้วย

นอกจากนี้ในการหมักชุดทีสองยังพบว่าเมล็ดโกโก้ที่ได้หลังการหมักมีค่าดัชนีการหมักประมาณ 1 และจากการทำ Cut-Test พบว่าเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักชุดที่สองมีคุณภาพด้านสีเป็นที่ยอมรับ

สรุป

ตอนที่ 2 บทบาทของจุลินทรีย์ที่เติมต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้หมัก

2.1 บทบาทของยีสต์ในการหมักเมล็ดโกโก้

จากการใช้เชื้อยีสต์ 3 ชนิด คือ *Sccharomyces cerevisiae Candida sorbosa* หรือ *C. sake* เติมลงในการหมักเมล็ดโกโก้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมที่เกิดการหมักตามธรรมชาติ พบว่าชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ในการหมักมีจุลินทรีย์เจริญได้เร็วและมีปริมาณสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ทำให้เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้ถูกย่อยสลายไปเป็นของเหลวได้เร็วขึ้น ทั้งยังทำให้กองหมักมีอุณหภูมิสูงกว่าชุดการทดลองที่เติมยีสต์ชนิดอื่น เมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วย *S. cerevisiae* มีค่าดัชนีการหมักสูง มีปริมาณกรดทั้งหมดและกรดที่ระเหยได้ต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น โดยมีค่าเป็นร้อยละ 0.46 และ 0.12 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ส่วนปริมาณกรดแลคติกในเมล็ดโกโก้ที่หมักด้วย *S. cerevisiae* นั้นมีค่าใกล้เคียงกับชุดการทดลองควบคุม และมีค่าต่ำกว่าเมล็ดโกโก้ที่หมักด้วยยีสต์ชนิดอื่น โดยมีค่าเป็นร้อยละ 0.07 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก เมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* มีค่าพีเอชสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อีกด้วย

เมื่อนำเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักไปทำแห้ง ปรากฏว่าเมล็ดโกโก้แห้งจากชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ให้เมล็ดโกโก้สีน้ำตาลช็อกโกแลตเป็นร้อยละ 77.78 ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ และเมล็ดโกโก้แห้งจากชุดการทดลองดังกล่าว มีน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าพีเอช และค่าดัชนีการหมักสูงสุด แต่มี น้ำตาลซูโครส กรดทั้งหมด กรดแลคติก และกรดที่ระเหยได้ในเมล็ดน้อยที่สุด

2.4 บทบาทของแบคทีเรียนแลคติกในการหมักเมล็ดโกโก้

แบคทีเรียแลคติก 3 ชนิด ที่ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักเมล็ดโกโก้คือ *Lactobacillus casei Leuconostoc mesenteroides* และ *Streptococcus thermophilus* ในชุดการทดลองที่เติม *L. casei* ถึงแม้จะมีปริมาณจุลินทรีย์เจริญไม่สูงสุด แต่เมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักมีค่าดัชนีการหมักและมีพีเอชสูงกว่าชุดการทดลองอื่น เป็น 0.98 และ 5.65 ตามลำดับ ทั้งมีกรดทั้งหมดและกรดที่ระเหยได้ต่ำกว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกอื่นๆ ซึ่งมีค่าเป็นร้อยละ 0.48 และ 0.19 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ มีกรดแลคติกเป็นร้อยละ 0.08 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก เมล็ดโกโก้แห้งที่ได้จากการทดลองที่หมักด้วย *L. casei* ให้ร้อยละของเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลช็อกโกแลตสูงกว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแบคทีเรียแลคติกอื่นๆ เป็นร้อยละ 59.78 และแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมล็ดโกโก้แห้งจากชุดการทดลองที่เติม *L. casei* มีกรดทั้งหมด กรดที่ระเหยได้และกรดแลคติก ต่ำกว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกอื่น มีค่าดัชนีการหมัก และพีเอชสูงกว่าการเติมแบคทีเรียแลคติกอื่น ทั้งยังมีปริมาณไขมันในเมล็ดโกโก้แห้งใกล้เคียงกับเกณฑ์มาตรฐาน

2.3 บทบาทของแบคทีเรียแอซีติกในการหมักเมล็ดโกโก้

แบคทีเรียแอซีติกมี 3 ชนิด ที่ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการคือ *Acetobacter rancen, A. lovaniense* และ *Gluconobacter oxydan* เมื่อเติมแบคทีเรียแอซีติกแต่ละชนิดลงในการหมักเมล็ดโกโก้ พบว่าชุดการทดลองที่เติม *A.rancen* ในการหมัก มีจุลินทรีย์สูงสุดบนอาหาร DSM ในวันที่ 3 ของการหมักเป็น $7.00x10^{7}$ โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักมีค่าดัชนีการหมักเป็น 0.99 มีพีเอชเท่ากับ 5.65 มีน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้ร้อยละ 0.67 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองดังกล่าวถูกย่อยสลายได้เร็ว เมล็ดโกโก้ที่ได้จากหมักด้วย *A. rancen* มีกรดทั้งหมด และกรดที่ระเหยได้น้อยกว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแอซีติกชนิดอื่น ซึ่งมีค่าเป็นร้อยละ 0.52 และ 0.18 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักตามลำดับ และมีกรดแลคติกใกล้เคียงกับชุดการทดลองควบคุม เป็นร้อยละ 0.02 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก

เมล็ดโกโก้แห้งที่หมักด้วย *A.rancen* มีค่าร้อยละของเมล็ดโกโก้สีน้ำตาลซ็อกโกแลตสูงกว่าชุดการทดลองอื่น เป็นร้อยละ 61.11 ขณะที่ชุดการทดลองที่เติม *A.lovaniense* หรือ *G.oxydan* และชุดการทดลองควบคุม มีเมล็ดโกโก้แห้งสีน้ำตาลเป็นร้อยละ 50.00, 52.22 และ 42.22 ตามลำดับ นอกจากนี้เมล็ดโกโก้แห้งจากชุดการทดลองที่หมักด้วย *A. rancen* ยังมีค่าดัชนีการหมัก ค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดสูง แต่มีกรดทั้งหมด กรดที่ระเหยได้ และกรดแลตติกต่ำกว่าชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียแลคติกอื่นๆ ทั้งยังมีปริมาณความชื้น และปริมาณไขมันในเมล็ดโกโก้แห้งใกล้เคียงกับเกณฑ์มาตรฐาน

2.4 บทบาทของเชื้อเริ่มต้นผสมต่อการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ

การใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมของ *S. cerevisiae, A. arancen* และ *L. casei* เติมลงในการหมักเมล็ดโกโก้ในห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในลักษณะที่แตกต่างกัน 6 ลักษณะ เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมจุลินทรีย์ พบว่าชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์มีจุลินทรีย์เริ่มต้นอยู่ในช่วง $3.37\text{-}4.17x10^{5}$ โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* พร้อมกันในตอนเริ่มต้นการหมักเมล็ดโกโก้ และชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นการหมัก แล้วเติม *A. rancen* หลังจากการหมักได้ 24 ชั่วโมง ให้เมล็ดโกโก้ที่มีคุณสมบัติดีกว่าชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ในลักษณะอื่น และดีกว่าชุดการทดลองควบคุม เมล็ดโกโก้ที่ได้จากชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* และ *A. rancen* ตอนแรกของการหมัก มีค่าดัชนีการหมักเป็น 1.15 มีพีเอชเท่ากับ 5.83 และมีน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 1.15 โดยน้ำหนักเมื่อหมักได้ 4 วัน ส่วนเมล็ดโกโก้ที่ได้จากชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้น แล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีค่าดัชนีการหมักเป็น 1.10 มีพีเอชเท่ากับ 5.70 และมีน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้สูงเป็นร้อยละ 1.10โดยน้ำหนัก เยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองทั้งสองถูกย่อยสลายได้เร็วกว่าชุดการทดลองอื่นๆ มีกรดทั้งหมดน้อยกว่าชุดการทดลองอื่น แต่ชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae*

และ *A.rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง มีกรดที่ระเหยได้สูงสุดเป็นร้อยละ 0.17 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ชุดการทดลองทั้งสอบมีกรดแลคติกใกล้เคียงกับชุดการทดลองควบคุม เป็นร้อยละ 0.07 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก

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

2.5 บทบาทของเชื้อเริ่มต้นผสมต่อการหมักเมล็ดโกโก้ในกล่องหมัก

การใช้จุลินทรีย์ ผสมของ *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 4.62-7.30x10^5 โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโก้โก้ ส่วนชุดการทดลองควบคุมซึ่งมีจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนจากธรรมชาติมีจุลินทรีย์บนอาหาร TYGKCP เป็น 1.09-3.76x10^4 โคโลนีต่อกรัมเมล็ดโกโก้ เมล็ดโกโก้ที่ได้จากการชุดการทดลองทั้งสองมีค่าดัชนีการหมักสูงกว่าชุดการทดลองควบคุมโดยมีค่าเป็น 1.15-1.20 ตามลำดับ ค่าพีเอชเท่ากับ 5.70 มีน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดโกโก้สูงกว่าชุดการทดลองที่เติมควบคุมร้อยละ 0.83-0.86 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก มีกรดทั้งหมด กรดที่ระเหยได้และกรดแลคติก น้อยกว่าชุดการทดลองควบคุมเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติมจุลินทรีย์ย่อยสลายได้เร็วกว่าชุดการทดลองควบคุม

เมล็ดโกโก้แห้งจากชุดการทดลองที่หมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสมของ *S. cerevisiae* และ *A. rancen* มีเมล็ดโกโก้สีน้ำตาลเป็นร้อยละ 90.50 และเมล็ดโกโก้จากชุดการทดลองที่เติม *S. cerevisiae* ตอนเริ่มต้นการหมัก แล้วเติม *A. rancen* หลังจากหมักได้ 24 ชั่วโมง ให้เมล็ดโกโก้สีน้ำตาลเป็นร้อยละ 89.70 เมล็ดโกโก้แห้งจากชุดการทดลองทั้งสองชุดที่เติมจุลินทรีย์มี ค่าดัชนีการหมัก ค่าพีเอช และน้ำตาลรีดิวซ์ในเมล็ดสูงกว่าชุดการทดลองควบคุม แต่มีกรดทั้งหมด การดที่ระเหยได้ และกรดแลคติก ต่ำกว่าชุดการทดลองควบคุม ทั้งยังมีปริมาณความชื้น และปริมาณไขมันในเมล็ดโกโก้แห้งใกล้เคียงกับเกณฑ์มาตรฐาน

เอกสารอ้างอิง

กมลลักษณ์ โตสกุล. 2530. โกโก้ : พืชเศรษฐกิจความหวังใหม่ในแผนฯ 6. ว. เศรษฐกิจธนาคารกรุงเทพ จำกัด. 20 (1) 28-36.

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

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

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2534. ภาวะเศรษฐกิจการเกษตร. ข่าวเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 34 (376) : 15-17.

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

สมศักดิ์ วรรณศิริ. 2532. สวนโกโก้. ศูนย์ผลิตตำราเกษตรเพื่อชนบท, กรุงเทพฯ.

ประพันธ์ บุญกลิ่นขจร, ศรี ปียะพงศ์, 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.

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

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

ยอดยิ่ง คงทอง. 2529. ภาวะการค้าต่างประเทศของโกโก้. รายงานเรื่องโกโก้พืชความหวังใหม่. 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.

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 (วิทย์) 27 : 303-313.

Abd-el-Malek, Y. and Gibson, T. 1984. Studies in the bacteriology of milk I. The streptococci of milk. J. Dairy Res. 15 : 233.

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

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

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

Anon 1981. The relationship between oxygen, temperature, acetic and lactic acids during cocoa fermentation trials performed at CRIG, Tafo. Ghana. 1980. Unpublished Report Cocoa, Chocolate and Confectionery Alliance : London. cited by Wood, G.A.R. and Lass, R.A. 1985. Cocoa, 4th ed, Tropical Agriculture Series Longman, New York.

A.O.A.C. 1984. Official method of analysis of the association of analytical chemists. 14 ed. Association of Official Analytical Chemist, USA.

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

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

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

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., 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.

Bracco, U., Graihe, 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 Report, Long Ashton Research Station 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 Report, Long Ashton Research Station and Tropical Products Institute, London

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

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

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. Proceedings of International Conference on Cocoa and Coconuts, Kuala Lumper, Malaysia. pp. 22-27.

Cirigliano, M.C. 1982. A selective medium for the isolation and differentiation of *Gluconobacter* 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. Presserv. 13 : 245-256.

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

Dewitt, K. W. 1957. Nitrogen metabolism 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 vol. 5 Food and Feed Production with Microorganisms (ed. Reed, G. and Rehm, H.J.) Verlag Chemie, Wienheim pp. 531-575

Defiguireds, M.P. and Spittstoesser, D.F. 1976. Food microbiology : Public health and spoilage aspects. Westport Connecticut.

Dougan, J. 1979. A comparative study of the fermentation of Amelonado and Amazon cocoa carried out at the Cocoa Reasearch Institute, Tafo, Ghana Cocoa, Chocolate and Confectionery Alliance, 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. Churchill Living Stone, Edinbugh.

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

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

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

Frazier, W.C. and Westhoff, D.C. 1988. Food microbiology. McGraw-Hill Publishing Co., New York. p. 539.

Gibbs, B.M. and Shapton, D.A. 1968. Identification methods for microbiologist part B. Academic Press, New York p. 1-8.

Gibert, D. G. 1980. Dispersal of yeasts and bacteria by *Drosophila* in a temperate forest. Ecologia 46 : 135-137.

Gibson, T. and Abd-elMalek, Y. 1945. The formation of carbondioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process. J. Diary Res. 14:35.

Glossop, E. 1983. Cocoa Processing. Tropical Development and Research 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 Commission for Invention and Discoveries. UDC 663 : 911.13.

Hardy F. and Rodriguse, 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 Imperial College of Tropical Agriculture, St. Augustine, Trinidad. cited by Lehrian, D. W. and Patterson, G. R. 1983. Cocoa fermentation in Biotechnology.vol. 5 Food and Feed Production with Microorganisms (ed. Reed, G., and Rehm. H. J.) Verlag Chemie, Wienheim. pp. 531-575.

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

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

Jinap, S. 1989. Contribution of acids towards flavour development in cocoa beans during processing. Proceedings of the Conference of Food Processing-Prelude to the 90's ; Kuala Lumpur pp. 34-40.

Jones, K. L. and Jones, 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.) Elsevier Applied Science Publishers,London. pp. 411-456.

Kreger-van Rij, N.J.W. 1984. The Yeast-a Taxonomic Study. Elsevier Science Publishers Amsterdam.

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

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

Lopez, A. and Quesnel, V. C. 1973. Volatile fatty acid production in cocoa 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.

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

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

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

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

Ostovar, K. and Keeney, P. G. 1973. Isolation and characterization of microorganisms involved in the fermentation of Trinidad's 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., Lapez, A. Ferreira, C.L.L.F. and Guimaraes W.V. 1984. Characterization and distribution of lactic-acid bacteria from cocoa-bean fermentations in Bahia (Brazil). J. Food Sci. 49 (1) : 205-208.

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

Quesnel, V. C. 1965b. Chlorform-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 cocoa*. 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 cacoa 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. 1963. Processing of raw cocoa for the market. Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome.

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. J. Food Sci. 32 : 395-398.

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

Rangana, S. 1977. Manual of analysis of fruit and vegetable products. Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited, New Delhi p. 7-8.

Ravelomanana, R., Guiraud, J. and Galzy, P. 1986. Isolation of a pectin-utilizing yeast from cocoa beans. System. Appl. Microbiol. 8 : 230-233.

Sharpe, M.E. and Fryer, T.F. 1966. Identification of the lactic acid bacteria. In Identification methods for microbiologists part A. (ed. Gibbs, B.M., and Skinner, F.A.) Academic Press, London. pp. 65-79.

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

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

Sanchez 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 J. E.,Guiraud, J. P., and Galzy, P. 1988. Recherche de levures capables de fermenter le cacoa par voie triphasique. Cate'Cocoa 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.

Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L. and Painter, P. R. 1986. The MicrobialWorld, 5th ed. Prentice-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 of the chemical and physical profiles of Ghana cocoa. Food Chem. 46 : 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 Publishers, London.

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. Extraction and fractionation of cocoa proteins as applied to serveral varieties of cocoa beans. J. Agric. Food Chem. 24 (3) : 479- 482.

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