

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การจำแนกและการตรวจสอบยีสต์ปนเปื้อน ในโรงงานผลิตเบียร์ลาเกอร์

โดยเทคนิคพีซีอาร์

IDENTIFICATION AND DETECTION OF WILD YEASTS IN

LAGER BREWERY BY PCR TECHNIQUES



T110530



ทพ.
๘ ๘๒๓๗
๒๕๕๓

ตงหปุ.....
เลขทะเบียน 110530
วัน,เดือน,ปี...-4 1111 2553

b.....12258830
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสุขภาพอาหาร
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2553

KMITL-2010-AI-M-054-074

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**IDENTIFICATION AND DETECTION OF WILD YEASTS IN
LAGER BREWERY BY PCR TECHNIQUES**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN FOOD SANITATION
FACULTY OF AGRO INDUSTRY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้เฉพาะที่ออกสอบเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KMITL-2010-AI-M-054-074



COPYRIGHT 2010

FACULTY OF AGRO INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การจำแนกและการตรวจสอบยีสต์ปนเปื้อนในโรงงานผลิตเบียร์ลาเกอร์ โดยเทคนิคพีซีอาร์
นักศึกษา	นายสุปรีชา อินทรีย์
รหัสนักศึกษา	49068761
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สุขาภิบาลอาหาร
พ.ศ.	2552
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์

บทคัดย่อ

การศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อยีสต์ในกระบวนการผลิตเบียร์ลาเกอร์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่เติม CuSO_4 จำนวน 600 ppm ซึ่งเก็บตัวอย่างจากกระบวนการผลิตเบียร์ 3 แหล่ง คือของเหลวก่อนการหมักเบียร์หรือเวิร์ด จำนวน 300 ตัวอย่าง หัวเชื้อยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเบียร์ จำนวน 100 ตัวอย่าง และน้ำทิ้งที่เหลือจากกระบวนการล้างทำความสะอาดถังหมัก จำนวน 300 ตัวอย่าง จากการทดลองพบว่าน้ำทิ้งที่เหลือจากกระบวนการล้างทำความสะอาดถังหมักมีการปนเปื้อนของเชื้อยีสต์ป่า 2 เพอร์เซ็นต์ หัวเชื้อยีสต์มีการปนเปื้อน 1 เพอร์เซ็นต์และไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อยีสต์ป่าในของเหลวก่อนการหมักเบียร์ การศึกษาเพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อยีสต์ป่าที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตเบียร์ โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งศึกษาลำดับเบสในบริเวณ D1/D2 ของ 26s rRNA gene โดยใช้ไพรเมอร์ NL1 และ NL4 พบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อยีสต์ป่าสายพันธุ์ *Clavispora lusitaniae* สูงที่สุด คิดเป็น 33 เพอร์เซ็นต์ ตามด้วยสายพันธุ์ *Candida pararugosa* และ *Pichia spartinae* 19 เพอร์เซ็นต์, *Saccharomyces cerevisiae* 10 เพอร์เซ็นต์, *Candida intermedia*, *Candida orthopsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa* และ *Trichosporon ovoides* สายพันธุ์ละ 5 เพอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นยีสต์สายพันธุ์ *Cl. lusitaniae* มีการปนเปื้อนสูงสุดในกระบวนการหมักเบียร์มาทำการศึกษาผลของคุณภาพเบียร์ที่เดิมเชื้อผสมระหว่าง Brewer yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) และ *Cl. lusitaniae* โดยประยุกต์ใช้เทคนิค PCR-DGGE ในการเฝ้าระวังและตรวจติดตามการปนเปื้อน *Cl. lusitaniae* ระหว่างกระบวนการผลิตเบียร์ลาเกอร์ โดยเก็บตัวอย่างจากกระบวนการหมักวันที่ 0,2,5,7,9,12,14 และ 21 ทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีนในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ NL1+ GC และ LS2 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการประยุกต์ใช้วิธี PCR-DGGE สามารถเฝ้าระวังและตรวจติดตามการปนเปื้อนเชื้อ *Cl. lusitaniae* ในกระบวนการผลิตเบียร์ลาเกอร์ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และจากการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสแบบ Triangle test โดยผู้เชี่ยวชาญ พบว่าเบียร์ลาเกอร์ที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *Cl. lusitaniae* มีคุณภาพทางประสาทสัมผัสไม่แตกต่างจากชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ขอสงวนสิทธิ์ในการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Identification and Detection of Wild Yeasts in Lager Brewery by PCR Techniques
Student	Mr. Supreecha Intree
Student ID.	49068761
Degree	Master of Science
Programme	Food Sanitation
Year	2009
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Adisorn Swetwiwathana

ABSTRACT

Contamination of wild yeasts in lager brewing process was studied by using yeast and mold agar (YM) supplemented with 600 ppm of CuSO_4 . Samples were collected from 3 sources of beer process; cooled wort (300 samples), pitching yeast (100 samples) and rinse water (300 samples). The data showed that rinse water contaminated with 2% wild yeasts, pitching yeast contaminated with 1% wild yeasts, while cooled wort revealed no contamination of wild yeast. Identification of contaminated wild yeasts in beer process was later studied by PCR technique. Base-sequencing in D1/D2 of 26S rRNA gene were analyzed with using primer NL1 and primer NL4. The results showed that *Clavispora lusitaniae* was the major contamination of wild yeasts (33%) followed by *Candida pararugosa* (19%), *Pichia spartinae* (19%), *Saccharomyces cerevisiae* (10%), *Candida intermedia* (5%), *Candida orthopsilosis* (5%), *Rhodotorula mucilaginosa* (5%) and *Trichosporon ovoides* (5%). Thus, *Clavispora lusitaniae* which was the highest contamination in process, was selected for lager brewing production and mixed with Brewer yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Then, PCR-DGGE technique was applied for monitoring the contamination of this wild yeast and brewer yeast. Samples of fermenting lager with mixed cultures were sampling from 0,2,4,7,9,11,14 and 25 days in fermentation system and amplified D1/D2 of 26S rRNA gene using primer NL1+ GC and LS2. The results suggested that PCR-DGGE technique was effectively used for monitoring the contamination of wild yeasts in lager brewing process. Besides, sensory test (Triangle test) found that the fermented beer with contained *Clavispora lusitaniae* had not significantly different in sensory score from control ($p \leq 0.05$).

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ อาจารย์ผู้ควบคุมการวิจัย ผู้ให้ความรู้ แนวคิด คำปรึกษา รศ.ดร.สุเมย์ นิธิสินประเสริฐ ให้ความอนุเคราะห์ ความรู้ คำปรึกษา และอนุเคราะห์ใช้ห้องปฏิบัติการเครื่องมือในการทำวิจัย ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ ที่กรุณาให้คำปรึกษา และข้อเสนอแนะในการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนการแก้ไขปัญหาต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้ ดร.กิตติชัย บรรจง คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ผู้วิจัยขอขอบคุณ บริษัทเบียร์ทิพย์ บริวเวอรี่ 1991 จำกัด ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้การสนับสนุนการวิเคราะห์ ตลอดจนนักศึกษาภาควิชาสุขาภิบาลอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่านที่อำนวยความสะดวก ให้ข้อมูลคำแนะนำและช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคุณแม่คุณพ่อ สำหรับความรัก ความเอาใจใส่ ขอขอบคุณคุณบุญพริภา และ ลูก ๆ ซึ่ง สนับสนุนและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา ประโยชน์อันใดที่ได้จากงานวิจัยนี้ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของท่านดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงใคร่ขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

สุปริษา อินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป.....	VII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 เบียร์.....	3
2.2 วัตถุประสงค์และขั้นตอนในกระบวนการผลิตเบียร์	4
2.3 การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตเบียร์.....	14
2.4 การปนเปื้อนยีสต์ ในกระบวนการผลิตเบียร์.....	17
2.5 การป้องกันการปนเปื้อนของยีสต์.....	17
2.6 การตรวจสอบการปนเปื้อนยีสต์.....	18
2.7 การตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction ...	18
2.8 เทคนิค PCR-DGGE	19
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย.....	23
3.1 วัตถุประสงค์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	23
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3 อุปกรณ์ที่ใช้การทดลอง.....	24
3.3 วิธีการทดลอง.....	24
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	33
4.1 การเก็บรวบรวมสายพันธุ์ยีสต์ที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตเบียร์ลาเกอร์.....	33
4.2 การจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตเบียร์.....	34
4.3 คุณลักษณะของเบียร์ที่ได้ระหว่างกระบวนการหมัก.....	37
4.4 การประยุกต์ใช้เทคนิค PCR-DGGE ในกระบวนการผลิตเบียร์.....	54
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะการทดลอง.....	59
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	59
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	59
เอกสารอ้างอิง.....	60
ภาคผนวก.....	64
ภาคผนวก ก. วิธีวิเคราะห์และการใช้เครื่องมือ.....	64
ภาคผนวก ข. ข้อมูลการทดลอง.....	79
ประวัติผู้วิจัย.....	91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ชนิดของเบียร์.....	5
2.2 แร่ธาตุและความสำคัญต่อกระบวนการผลิตเบียร์.....	7
2.3 แหล่งการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด.....	16
2.4 อาหารเลี้ยงที่ใช้สำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อยีสต์.....	18
3.1 ตารางสำเร็จรูปสำหรับการชิมแบบ triangle test	32
4.1 การปนเปื้อนของเชื้อยีสต์ในกระบวนการผลิตเบียร์ลาเกอร์.....	34
4.2 การจำแนกเชื้อยีสต์ซึ่งมีการปนเปื้อนกระบวนการผลิตเบียร์.....	36
4.3 ปริมาณความเข้มข้นของกลีโคลีนในกลุ่ม Ester ในผลิตภัณฑ์เบียร์.....	51



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	ขั้นตอนการผลิตเบียร์.....3
2.2	ลักษณะการรอกของข้าวบาเลย์ (มอลท์).....8
2.3	การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเมล็ดข้าวบาเลย์ระหว่างการรอก.....9
2.4	การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการ Mashing เพื่อให้ ให้เหมาะสมกับ เอนไซม์แต่ละชนิด.....10
2.5	กระบวนการ mashing เพื่อเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล.....11
2.6	Mash Kettle สำหรับใช้ในกระบวนการผลิตเบียร์.....12
2.7	Lauter-tun สำหรับใช้ในกระบวนการผลิตเบียร์.....12
2.8	wort kettle สำหรับใช้ในกระบวนการผลิตเบียร์.....12
2.9	การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลกลูโคส เป็นเอทิลแอลกอฮอล์ภายใต้ สภาวะการหมักแบบไร้อากาศ17
2.10	การเคลื่อนที่บนโพลีครีลาไมด์เจลของแถบดีเอ็นเอ จากตัวอย่างเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอ จากเชื้อมาตรฐานในการทำดีจีจีอี.....20
2.11	วิธีการวิเคราะห์จุลินทรีย์ในอาหารด้วยวิธี พีซีอาร์ ดีจีจีอี.....21
3.1	ผังกระบวนการผลิตเบียร์และจุดที่ทำการเก็บตัวอย่าง.....25
3.2	บริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA gene โดยใช้ primer NL1 และ NL4.....28
3.3	แบบจำลองกระบวนการหมักเบียร์ในห้องปฏิบัติการ.....28
3.4	ขั้นตอนในการประยุกต์ใช้เทคนิค DGGE ในการตรวจสอบการปนเปื้อนยีสต์.....30
3.7	วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบขิม แบบ triangle test.....31
4.1	ผลผลิต PCR หมายเลข 1-21 ที่ได้จาก primer NL1 และ NL4.....35
4.2	การเปลี่ยนแปลงจำนวนของกล้าเชื้อยีสต์และยีสต์ปนเปื้อน (<i>Clavispora lusitaniae</i>) ในระหว่างกระบวนการหมัก (หมักแยก).....38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.3 การเปลี่ยนแปลงจำนวนของกล้าเชื้อยีสต์และเชื้อ wild yeast (<i>Clavispora lusitaniae</i>) ในระหว่างกระบวนการหมัก (หมักร่วมกัน).....	39
4.4 การเปลี่ยนแปลงแอลกอฮอล์ ห่วงกระบวนการหมักเบียร์ในห้องปฏิบัติการ.....	40
4.5 การเปลี่ยนแปลงค่า Real Degree of Fermentation ระหว่างกระบวนการหมัก เบียร์ในห้องปฏิบัติการ.....	40
4.6 การเปลี่ยนแปลงค่า Apparent Extract ระหว่างกระบวนการหมัก ในห้องปฏิบัติการ	41
4.7 การเปลี่ยนแปลงพีเอช ระหว่างกระบวนการหมักเบียร์ในห้องปฏิบัติการ.....	41
4.8 การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลกลูโคส ระหว่างกระบวนการหมักเบียร์ในห้องปฏิบัติการ....	42
4.9 การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลมอลโตสระหว่างกระบวนการหมักเบียร์ในห้องปฏิบัติการ...43	
4.10 การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลมอลโตโตไอส ระหว่างกระบวนการหมักเบียร์ ในห้องปฏิบัติการ	44
4.11 รูปแบบการชิมแบบ triangle	45
4.12 การเปลี่ยนแปลงกลิ่น DMS ระหว่างกระบวนการหมักเบียร์ในห้องปฏิบัติการ	47
4.13 กระบวนการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นในกลุ่ม Carbonyl compounds ระหว่างกระบวนการหมักเบียร์	48
4.14 การเปลี่ยนแปลงกลิ่น Acetaldehyde ระหว่างกระบวนการหมักเบียร์ ในห้องปฏิบัติการ	48
4.15 กระบวนการเกิดกลิ่นผ่านกระบวนการ metabolism ของยีสต์.....	50
4.16 การเปลี่ยนแปลงกลิ่น VDK ระหว่างกระบวนการหมักเบียร์ในห้องปฏิบัติการ	50
4.17 การเปลี่ยนแปลงกลิ่น Ethyl acetate ระหว่างกระบวนการหมักเบียร์ ในห้องปฏิบัติการ	52
4.18 การเปลี่ยนแปลงกลิ่น Isoamylacetate ระหว่างกระบวนการหมักเบียร์ ในห้องปฏิบัติการ.....	53
4.19 การเปลี่ยนแปลงกลิ่น Ethyl Hexanoate ระหว่างกระบวนการหมักเบียร์ ในห้องปฏิบัติการ.....	54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.20 ผลผลิต PCR บริเวณ D1/D2 โดยใช้ primer NL1+ GC และ LS2	55
4.21 ผลผลิต PCR ในส่วน D1/D2 แยก โดยวิธี PCR-DGGE บน Acrylamide gel.....	56
4.22 ผลผลิต PCR ในส่วน D1/D2 ของเชื้อผสม <i>Sac. cerevisiae</i> และ <i>Cla. lusitaniae</i> โดยใช้ primer NL1+ GC และ LS2	57
4.23 ผลผลิต PCR ในส่วน D1/D2 ของเชื้อผสมระหว่าง Brewer yeast และ <i>Cla. lusitaniae</i> ซึ่งแยก โดยวิธี PCR-DGGE บน Acrylamide gel	58



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

การเสื่อมเสียของเบียร์ในขั้นตอนการหมักมักมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นในระหว่างกระบวนการผลิต เช่น *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Zymomonas*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Pectinatus* และ *Megasphaera* (EBC Analytica Microbiologica II, 2001) รวมถึงยีสต์ที่ไม่ใช่สายพันธุ์ที่เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมัก ซึ่งยีสต์บางสายพันธุ์ที่ปนเปื้อนนี้ก่อให้เกิดการเสื่อมเสียและไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคได้ เรียกยีสต์ในกลุ่มนี้ว่า ยีสต์ปนเปื้อน (wild yeasts) การปนเปื้อนมักเกิดในช่วงต้นของกระบวนการผลิต แหล่งของการปนเปื้อนอาจมาจากหลายแหล่ง เช่น วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเบียร์ กล้าเชื้อยีสต์ที่มีการหมวนเวียนใช้งานในระบบ (pitching yeast) หรือจากกระบวนการล้างทำความสะอาดถัง (Cleaning In Place, CIP) ที่ไม่มีประสิทธิภาพ (Storgårds, 2000) การปนเปื้อนมักก่อให้เกิดปัญหา เช่น เกิดกลิ่นรสไม่พึงประสงค์ในกระบวนการผลิต และผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด ก่อให้เกิดการสูญเสียทางธุรกิจ

ปัจจุบันการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ยังคงนิยมใช้การเลี้ยงเชื้อบนอาหารคัดเลือกเฉพาะ (selective media) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่าย ต้นทุนต่ำ และไม่ซับซ้อน แต่วิธีการดังกล่าวมีข้อจำกัดเรื่องระยะเวลาในการรายงานผล เนื่องจากวิธีการวิเคราะห์จำเป็นต้องอาศัยการเจริญเติบโตของยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ระยะเวลานานประมาณ 4 วัน (EBC Analytica Microbiologica II, 2001) ประกอบกับโดยทั่วไปแล้ว กระบวนการผลิตไม่สามารถรอผลการวิเคราะห์ได้ เนื่องจากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมเบียร์มักเป็นแบบต่อเนื่องและผลิตในปริมาณมาก ดังนั้นในกรณีที่มีการปนเปื้อนจากยีสต์ จะไม่สามารถแก้ปัญหาได้ทันที ก่อให้เกิดการสูญเสียทางธุรกิจในแง่การปรับแต่งและการผลิตซ้ำ (reprocess) เป็นต้น

จากปัญหาด้านความล่าช้าในการวิเคราะห์ผล งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการประยุกต์ใช้เทคนิค polymerase chain reaction-Denaturing gradient gel electrophoresis (PCR – DGGE) ในการตรวจสอบและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของยีสต์ในอุตสาหกรรมเบียร์ เพื่อให้ทราบผลการวิเคราะห์ในเวลาอันรวดเร็ว และการจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีการปนเปื้อนเข้าสู่กระบวนการ เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลและทราบสายพันธุ์ที่เป็นปัญหาสำคัญ รวมถึงประเมินคุณภาพเบียร์ที่ได้จากการผลิตจากกระบวนการที่มีการปนเปื้อนจากเชื้อยีสต์ชนิดอื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการใช้เทคนิค PCR-DGGE ในการตรวจสอบยีสต์ในผลิตภัณฑ์เบียร์ โดยจะทำการเก็บรวบรวมเชื้อยีสต์จากแหล่งต่างๆที่มีโอกาสปนเปื้อนสู่กระบวนการผลิต เช่น น้ำสุดท้ายของกระบวนการล้างถัง (rinse water) กล้าเชื้อยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการ (pitching yeasts) และน้ำเวิร์ท (cooled wort) ในกระบวนการผลิตเบียร์ลาเกอร์ การจัดจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของยีสต์ ด้วยเทคนิค PCR และประเมินคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการผลิตที่มีการปนเปื้อนจากยีสต์ ซึ่งจะใช้เป็นข้อมูลในการตัดสินใจกรณีมีการปนเปื้อนจริงในกระบวนการ

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.3.1 จัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีการปนเปื้อนในกระบวนการผลิตเบียร์
- 1.3.2 ศึกษาคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกล้าเชื้อยีสต์ที่มีการปนเปื้อน
- 1.3.3 การใช้เทคนิค PCR-DGGE ในการตรวจสอบและเฝ้าระวังการปนเปื้อนยีสต์ในกระบวนการหมัก (fermenting Beer)

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

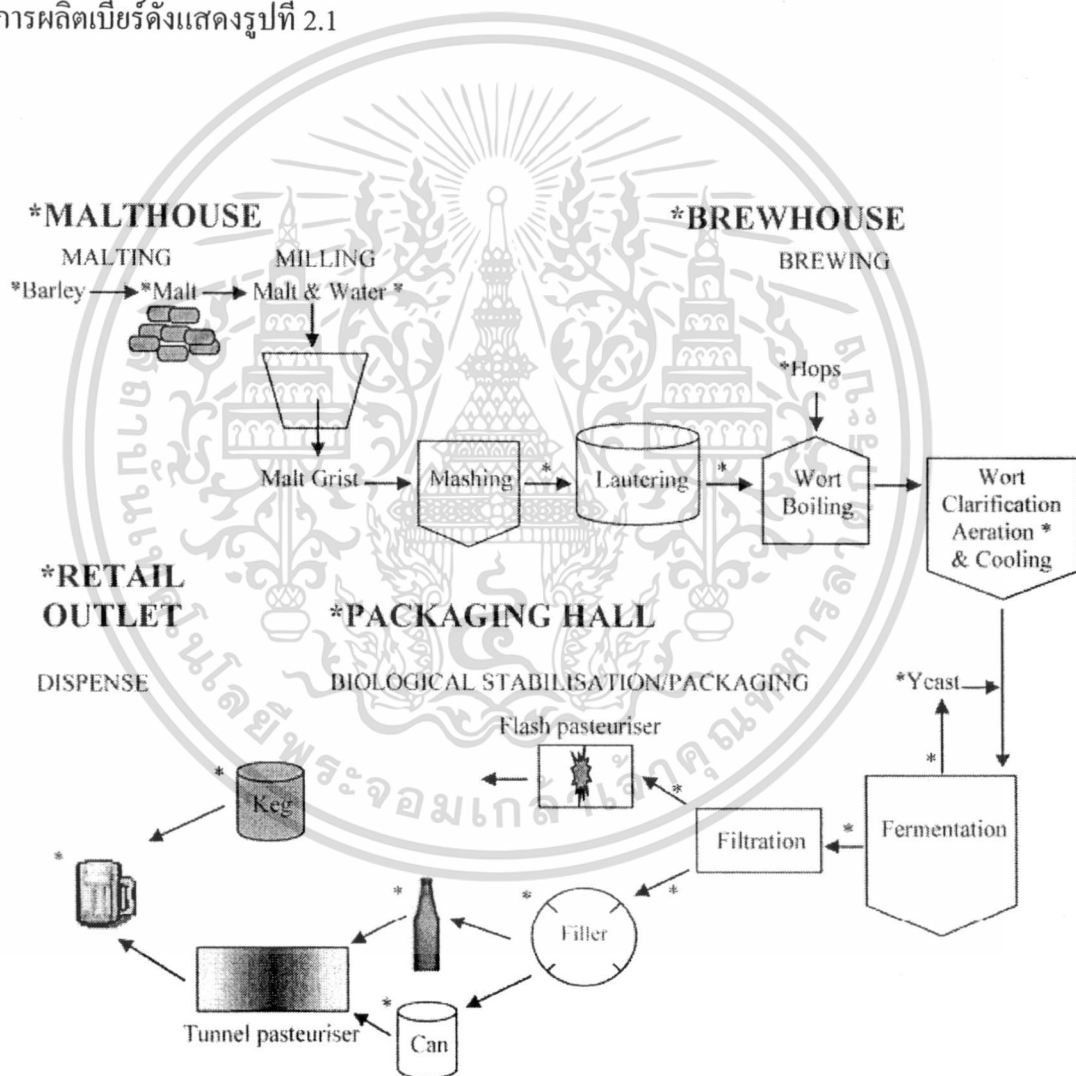
- 1.4.1 สามารถรวบรวมและทราบสายพันธุ์ ยีสต์ที่ปนเปื้อนในกระบวนการและทราบถึงสายพันธุ์ยีสต์ที่มีการปนเปื้อนมากที่สุด
- 1.4.2 ทราบคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการที่มีการปนเปื้อนยีสต์เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการตัดสินใจกรณีมีการปนเปื้อนจริงในกระบวนการ
- 1.4.3 สามารถประยุกต์ใช้วิธีทางชีวโมเลกุลในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อยีสต์เพื่อให้สามารถทราบผลและตัดสินใจได้ทันทีกรณีมีการปนเปื้อนในกระบวนการ

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เบียร์

เบียร์ เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่มีแรงแอลกอฮอล์ตั้งแต่ 0.5 ดีกรีขึ้นไปได้จากกระบวนการหมักเวิร์ท (wort) ด้วยยีสต์ (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2544) โดยมีขั้นตอนการผลิตเบียร์ดังแสดงรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการผลิตเบียร์

ที่มา : Vaughan และคณะ (2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดของเบียร์ อาศัยลักษณะการหมัก ยีสต์ที่ใช้ปริมาณฮอป (hops) ปริมาณแอลกอฮอล์ การบ่ม และรสชาติ สามารถจำแนกเบียร์ได้เป็น 2 กลุ่มหลักคือ

1. ลาเกอร์ (Lager) มาจากภาษาเยอรมัน lagern หมายถึงเก็บรักษาเบียร์ลาเกอร์ จะต้องมีการบ่มหลังจากหมักระยะหนึ่งก่อนจึงจะบริโภค การผลิตเบียร์ลาเกอร์ใช้ยีสต์จม (bottom yeasts) ซึ่งจะตกตะกอนที่ก้นถังหมัก และทำการหมักที่อุณหภูมิค่อนข้างต่ำ ใช้เวลาในการหมักค่อนข้างนาน ปริมาณแอลกอฮอล์ค่อนข้างสูง (Boultonm and Quain, 2006) จำแนกเป็นกลุ่มย่อยๆ ดังตารางที่ 2.1 และ 2.2

2. เอลิ (Ale) เป็นเบียร์ที่ใช้ยีสต์ลอย (top yeast) ซึ่งจะลอยอยู่บนผิวน้ำของเวิร์ตในขณะที่ทำการหมัก อุณหภูมิที่ใช้หมักค่อนข้างสูงกว่าการผลิตลาเกอร์และใช้เวลาหมักสั้นกว่า นอกจากนี้ใช้ฮอปในปริมาณที่มากกว่าลาเกอร์ จึงมีรสขมกว่า และปริมาณแอลกอฮอล์อาจจะสูงถึง 8 เปอร์เซ็นต์ (Boultonm and Quain, 2006) จำแนกเป็นกลุ่มย่อยๆ ได้ดังตารางที่ 2.1 และ 2.2

2.2 วัตถุดิบและขั้นตอนในกระบวนการผลิตเบียร์

2.2.1 น้ำ (Brewing water)

น้ำที่จะใช้สำหรับการผลิตเบียร์ต้องมีปริมาณเกลือแร่ที่เหมาะสม ซึ่งปริมาณเกลือแร่จะส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ และรสชาติของเบียร์ โดยปกติ กระบวนการผลิตเบียร์ในปัจจุบันนิยมการดึงแร่ธาตุทั้งหมดออก และทำการเติมแร่ธาตุลงไปอีกครั้งเพื่อให้ได้ปริมาณแร่ธาตุที่เหมาะสมต่อผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด ความสำคัญของแร่ธาตุแต่ละชนิด ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.1 ชนิดของเบียร์

Beer	Origin	Fermentation system	Characteristics
Pilsener (archetype – Pilsener Urquell)	Bohemia, Czech Republic	Bottom fermented	Pale highly hopped lager brewed with very soft water (5% abv)
Dortmunder (Dort) (archetype – Dortmunder Aktien-Brauerei)	Westphalia, Germany	Bottom fermented	Golden coloured lager, less hop than Pilsener (5.2% abv)
Münchener dunkel	Münich, Bavaria, Germany	Bottom fermented	Dark, malty, lightly hopped lager (4.4–5.0 abv)
Münchener helles (archetype – Paulaner)	Münich, Bavaria, Germany	Bottom fermented	Paler version of dunkel
Altbier (Düsseldorfer)	Mainly Düsseldorf, some other towns in Westphalia, Germany	Top fermented	Dark colour, well hopped, fruity flavoured beer (4.4–5.0% abv)
Bockbier	Originally from Einbeck, Saxony, Germany	Originally top fermented	Strong dark brown
Doppelbock	Bavaria, Germany	Bottom fermented	Full, estery strong lager (7.5–13.0% abv)
Eisbock (ice beer)	Bavaria, Germany	Bottom fermented, very low-temperature lagering to increase alcohol content by removal of ice	Very strong full bodied lager (13.2% abv)
Bock beer (USA)	USA and Canada	Bottom fermented	Dark colour, lightly hopped and estery
Vienna (Märzen) beer	Originally Austrian beer but now Bavaria, Germany	Bottom fermented	Pale, well-hopped lager, stronger than Helles (5–6% abv)
Bitter ale	UK	Originally top fermented	Well bittered, pale to copper ale. Sold for draught dispense, originally cask-conditioned (3.5–5.5% abv)
Brown ale	UK	Top fermented	Sweetish, full-bodied, lightly hopped bottled ale, 3.5–4.5% abv
Burton ale	Burton-upon-Trent, UK	Top fermented	Pale, well-bittered top-fermented ale brewed using gypsum-rich well waters of Burton-upon-Trent
India pale ale (IPA)	UK	Top fermented	Highly bittered strong bottled pale ale originally brewed for export to British troops in India
Kölschbier	Köln (Cologne) Germany	Top fermented	Pale golden highly hopped ale with acidic, lactic taste (4.6% abv)
Mild ale	North and Midlands, England	Top fermented	Lightly-hopped, sweet, dark brown ale (3.5–4.0% abv)

ที่มา : Boulton และ Quain (2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

Beer	Origin	Fermentation system	Characteristics
Weizenbier	Bavaria, Germany	Top fermented	Lightly hopped, highly carbonated wheat beer with estery, phenolic taste. Usually bottle conditioned (5-5.5% abv)
Blanche de Hoegaarden	Flanders, Belgium	Top fermentation	Wheat beer from 50% wheat and 50% malt
Lambic	Brussels area, Belgium	Spontaneous top fermentation	Wheat/barley beer with sour or estery flavour depending on age
Gueze	Brussels area, Belgium	Bottle-fermented	Blend of young and old lambic, bottle fermented and aged for at least a year. Dry, fruity and highly carbonated (5-5.5% abv)
Porter	London, UK	Top fermented	Deep ruby colour from brown malts and made with London water, high in bicarbonate (6-7% abv)
Provisie	Oudenaarde, Belgium	Top fermented	Sweet dark ale aged for a minimum of 2 years, and up to 25 years (5.5-6.5% abv)
Rauchbier (smoked beer)	Bamberg, Bavaria, Germany	Bottom fermented	Dark beer with smoked taste due to practice of drying malts over open beech wood fires
Saison	Walloon region of Belgium	Top fermented	Estery amber-coloured bottle conditioned ale (5.5-6.0% abv)
Scotch ale	Scotland, UK	Bottom fermented, low fermentation temperature	Dark copper brown, strong sweet ale with creamy taste (7-10% abv)
Steam beer	California, USA	Top fermentation using bottom yeast at relatively high temperature	Well-hopped amber coloured highly carbonated beer (sound of gas escaping from broached casks gives name). (4.5-5.0% abv)
Stout	Sweet stout (UK) Dry stout (Eire)	Top fermentation	Very dark, highly hopped made with up to 10% roasted unmalted barley and possibly caramel malt. Dry version (Guinness) more alcoholic (4.0-5.0% abv)
Trappist beers	Five brewing abbeys of Belgium (Chimay, Orval, Rochefort, St Sixtus, Westmalle) and one remaining in Holland (Schaapskooi)	Mainly top fermentation; the Dutch brewery produces a bottom fermented Pilsener-type lager as well	Brown or amber colour, bottle conditioned. Usually several beers of different strengths produced (5-12% abv)

ที่มา : Boulton และ Quain (2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แร่ธาตุและความสำคัญต่อกระบวนการผลิตเบียร์

Ion	Effect
Ammonium	Indicative of contamination with decomposed organic material.
Calcium	One of the most significant ions with multiple effects. Interacts with phosphate and proteins to reduce pH of mash and promote formation of a bright wort with good run-off. Precipitates oxalate from wort, which can cause hazes and gushing and hazes in beer. Activates α -amylase and proteases in mash. Promotes flocculation of yeast at the end of fermentation. Inhibits extraction of hop resins at high concentrations. Has a bitter astringent taste.
Copper	Toxic to brewing yeast at high concentrations. Eliminates H_2S from beer as insoluble sulphide.
Iron	Toxic to yeast. Can produce hazes and adverse colour changes in beer.
Magnesium	Reduces wort pH by interaction with phosphates but less important than calcium. Important co-factor for many enzymes especially those catalysing dissimilation of pyruvate during fermentation. Essential component of many enzymes involving ATP.
Manganese	Co-factor of many yeast and malt enzymes.
Potassium	Imparts saline taste to beer.
Sodium	In combination with chloride contributes to beer sweetness.
Zinc	Inhibitory to yeast growth at high concentration (> 1 ppm) but stimulates fermentation at lower concentrations (0.1–0.3 ppm).
Bicarbonate	At high concentrations (> 100 ppm) causes increase of mash pH and concomitant reduction in extract formation.
Chloride	Inhibits fermentation at high concentrations (> 600 ppm). Contributes to fullness at low concentration but imparts saline taste at concentrations above 400 ppm.
Nitrate	Precursor to nitrosamine formation by <i>Obesumbacterium proteus</i>
Phosphates	Interacts with calcium and magnesium to reduce wort pH during mashing. Essential nutrient for yeast growth.
Sulphate	Precursor for sulphur-containing amino acid synthesis by yeast in worts with low amino acid content. Precursor for sulphite formation by yeast which improves beer flavour stability. Precursor for sulphide formation by yeast.

ที่มา : Boultonm และ Quain (2006)

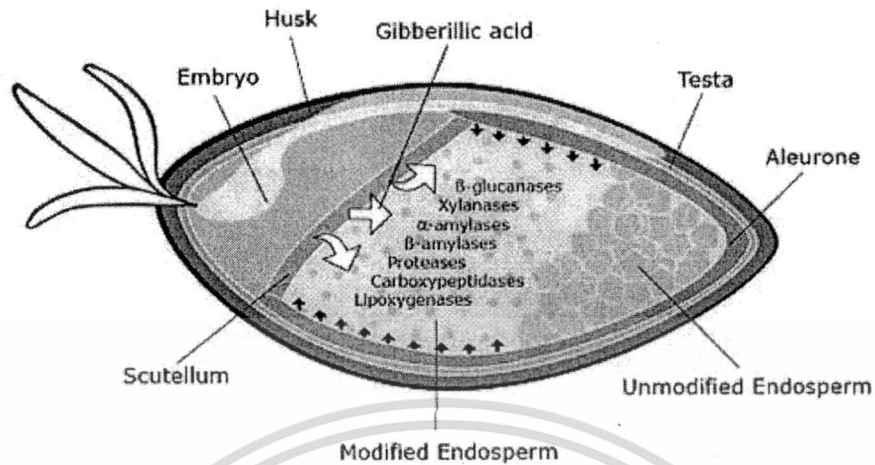
2.2.2 มอลท์ (Malt)

มอลท์ที่ใช้ทำเบียร์มักมาจากข้าวบาเลย์ ซึ่งข้าวบาเลย์ที่ใช้มีอยู่ 2 ชนิด คือ แบบ 2 แถว และ 6 แถว การทำมอลท์ได้จากการเพาะข้าวบาเลย์ที่อุณหภูมิค่อนข้างต่ำซึ่งลักษณะข้าวบาเลย์ที่ออกตามรูปที่ 2.2 ข้าวบาเลย์ที่สะอาดปราศจากเศษผงและเมล็ดลีบจะถูกล้างทำความสะอาด และแช่น้ำเย็นที่อุณหภูมิ 10-15.6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน ในระหว่างนี้ต้องเปลี่ยนน้ำและให้อากาศเพื่อป้องกันการเน่าเสียของเมล็ดข้าวบาเลย์ ความชื้นของเมล็ดข้าวบาเลย์ประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์ นำข้าวบาเลย์มาเพาะในห้องเพาะกล้าซึ่งปรับอุณหภูมิเป็น 15.6 - 21.1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ ตลอดจนมีการถ่ายเทอากาศตลอดเวลา เพื่อเป็นการระบายก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และเป็นการให้ออกซิเจนแก่ต้นกล้า ใช้ระยะเวลาประมาณ 3-5 วัน โดยสังเกตจากรากของมอลท์ซึ่งจะงอกยาวออกมาประมาณ 1 เซนติเมตร ในขณะที่กำลังงอกจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ต่างๆ ภายในเมล็ด ดังรูปที่ 2.3 โดยเฉพาะอย่างยิ่งอัลฟา-และเบต้า-อะมัยเลส ซึ่งจะย่อยแป้งเป็นน้ำตาล โปรตีนซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยโปรตีน เป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กและเป็นสารที่ละลายน้ำได้ ซัยเตส (cytases) ย่อยเพนโตแซนกัน (pentosangums) และไฟเตส (phytases) ย่อยสารประกอบแล้วให้อนุมูลฟอสเฟตกับอินอสิตอล (inositol) ซึ่งจะไปกระตุ้นการเจริญของยีสต์ เมื่อการเพาะต้นกล้าของข้าวบาเลย์สิ้นสุด ลำเลียงเมล็ดเข้าห้องอบ การอบมอลท์ขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น อุณหภูมิของการอบ อัตราการไหลของอากาศ อัตราเร็วในการระบายความชื้นออกจากห้องอบ เป็นต้น (Kunze, 2004)



รูปที่ 2.2 ลักษณะการงอกของข้าวบาเลย์ (มอลท์)

ที่มา : Biokemi (2010)



รูปที่ 2.3 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเมล็ดข้าวบาเลย์ระหว่างการงอก

ที่มา : Biokemi (2010)

2.2.3 มอลต์แอดจังก์ท (Malt adjuncts)

มอลต์แอดจังก์ทเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ เช่น ซีลิวพีซ แป้ง น้ำตาล เดิมลงในขั้นตอนการทำเม็ชซิง (mashing) เพื่อลดต้นทุนการผลิต และเป็นการเพิ่มปริมาณน้ำตาล ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์โดยยีสต์ในขั้นตอนของการหมัก (Kunze, 2004)

2.2.4 ฮีบ (Hop)

ฮีบ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Humulus lupulus* เฉพาะดอกตัวเมียที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการทำเบียร์ เริ่มมีการใช้ฮีบเป็นส่วนผสมในการทำเบียร์ครั้งแรกในประเทศเยอรมันเมื่อ ค.ศ. 1079 ดอกฮีบมียาง (resins) สีเหลืองที่โคนกลีบดอก ทำให้เกิดรสขมในเบียร์ ยางของฮีบจำแนกได้เป็น alpha และ beta resins (soft) กับ gamma resin (hard) ดอกฮีบยังให้น้ำมันหอมระเหย (essential oils) เช่น myrcene, linalool geraniol, humulone, lupulone และ cohumulone เป็นต้น ส่วนโคนกลีบดอกของฮีบจะเป็นแหล่งของแทนนิน(tannins) ที่สำคัญได้แก่ pyrogallol กับ catechol ซึ่งแทนนินเหล่านี้จะช่วยตกตะกอนโปรตีนที่ไม่คงตัวในระหว่างการต้มเวิร์ท ปัจจุบันดอกฮีบอาจอยู่ในรูปเป็นผงอัดเป็นเม็ด หรือสารสกัด (hop extract) เพื่อสะดวกต่อการขนส่งและใช้งาน (Boultonm and Quain, 2006)

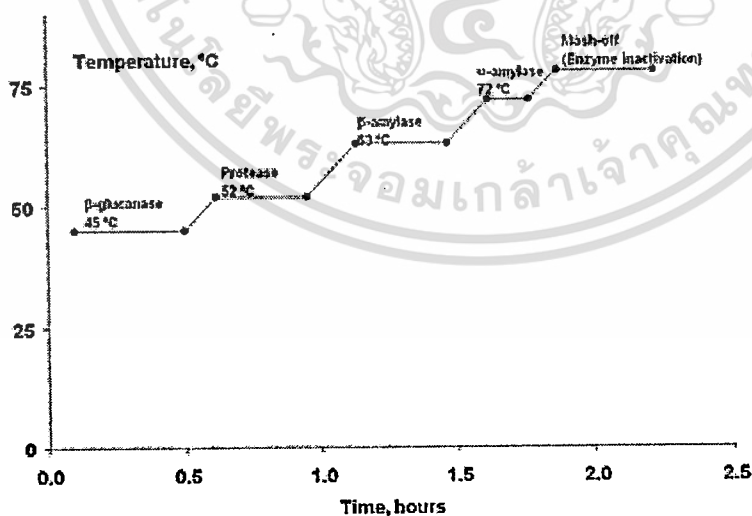
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5 ยีสต์ (Yeast)

จุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลในเวิร์ทเป็นแอลกอฮอล์ ยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมเบียร์แบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามลักษณะของการหมักคือ ยีสต์ลอย (top yeast) ซึ่งเซลล์ยีสต์จะถูกฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ดันให้ลอยขึ้นข้างบน ทั้งนี้เพราะการหมักจะเกิดอย่างรวดเร็วและรุนแรง อันเป็นผลของการหมักที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง อีกประเภทหนึ่งคือยีสต์จม (bottom yeast) พบว่าเซลล์ยีสต์จะรวมกลุ่มเป็นเม็ด (flocculation) แล้วจมอยู่ก้นถังหมัก ปกติการหมักจะเกิดที่อุณหภูมิต่ำกว่า และการหมักจะดำเนินไปอย่างช้าๆ และใช้เวลาในการหมักนานกว่า ยีสต์จมเดิมมีชื่อเรียก *Saccharomyces carlsbergensis* แล้วเปลี่ยนชื่อเป็น *Saccharomyces uvarum* ปัจจุบันนี้คือ *Saccharomyces cerevisiae* เช่นเดียวกับยีสต์ลอย ส่วนการรวมตัวกันเป็นเม็ดยังนี้อาจเกิดจากลักษณะทางพันธุกรรม สารอาหาร อนุมูลอิสระ ตลอดจนสภาพความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้น (EBC Analytica Microbiologica II, 2001)

2.2.6 แม็ชชิง (Mashing)

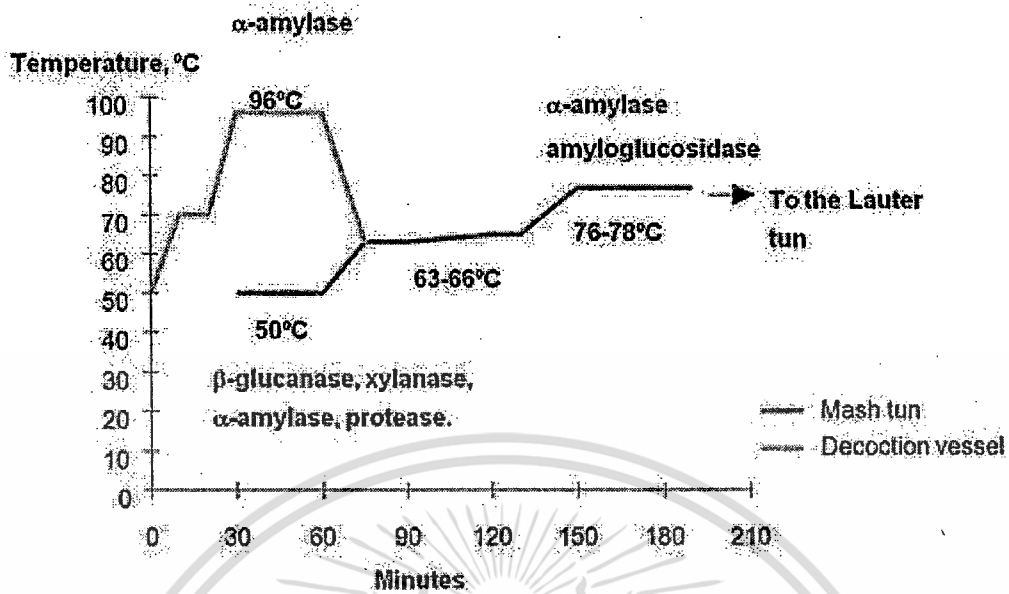
เป็นการต้มมอลท์กับมอลท์แอดจัสท์และน้ำ โดยมีการควบคุมอุณหภูมิและเวลาดังรูปที่ 2.4 และ 2.5 เพื่อให้เอนไซม์อะไมเลส (amylase) ย่อยแป้งเป็นน้ำตาลและเอนไซม์โปรติเอสย่อยโปรตีน ผลที่ได้จากการทำแม็ชชิงคือ เวิร์ท (wort) หรือเวิร์ทหวาน (sweet wort) ซึ่งประกอบด้วย น้ำตาลโมเลกุลต่างๆ สารประกอบพวกโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลต่างๆ แทนนินเกลือแร่ สารให้สี และอื่นๆ (Kunze, 2004)



รูปที่ 2.4 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการ Mashing เพื่อให้เหมาะสมกับเอนไซม์แต่ละชนิด

ที่มา : Biokemi (2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 กระบวนการ mashing เพื่อเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล

ที่มา : Biokemi (2010)

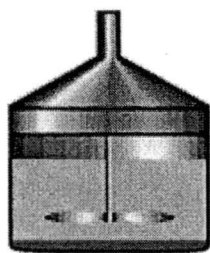
2.2.7 การต้มเวิร์ท (wort boiling)

Kunze (2004) กล่าวถึงวัตถุประสงค์ของการต้มเวิร์ทดังนี้

1. เพิ่มความเข้มข้นของเวิร์ทตามความต้องการของเบียร์แต่ละชนิด
2. เป็นการลดปริมาณจุลินทรีย์
3. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากกระบวนการ mashing ทั้งหมด เช่น อัลฟา-และเบตา-อัมัยเลส และ โปรติเอส
4. สกัดสารที่ละลายได้จากฮีบ เช่น iso-alpha-acids และ humulone
5. ทำให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีนและสารอื่นๆ เช่น polyphenol (tannin)
6. เพิ่มความเข้มข้นของสี เพื่อให้ได้ความเข้มสีตามเกณฑ์ที่กำหนดของเบียร์แต่ละชนิด

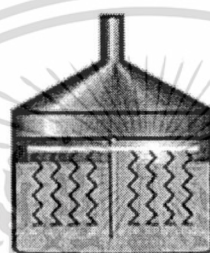
ชนิด

วิธีการเริ่มจากโดยถ่ายเวิร์ทจากหม้อต้ม (mash kettle) ดังรูปที่ 2.6 สู่ม้อกรอง (lauter-tun) ดังรูปที่ 2.7 เพื่อกรองกากและตะกอนของมอลท์ บรรจุเวิร์ทที่กรองได้ในหม้อต้ม (wort kettle) ดังรูปที่ 2.8 และเติมฮีบลงไป



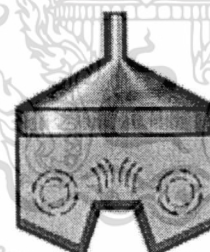
รูปที่ 2.6 Mash Kettle สำหรับใช้ในกระบวนการผลิตเบียร์

ที่มา : Hofbräuhaus (2010)



รูปที่ 2.7 Lauter-tun สำหรับใช้ในกระบวนการผลิตเบียร์

ที่มา : Hofbräuhaus (2010)



รูปที่ 2.8 wort kettle สำหรับใช้ในกระบวนการผลิตเบียร์

ที่มา : Hofbräuhaus (2010)

2.2.8 การหมัก (Fermentation)

การหมักเบียร์อาจทำในถังหมักที่ทำจากวัสดุจำพวกเหล็กปลอดสนิม ทองแดง บ่อคอนกรีต หรืออื่นๆ ถ้าทำในถังปิดจะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลพลอยได้ และการหมักในถังปิดนิยมใช้กับการผลิตเบียร์ลาเกอร์ ซึ่งใช้ยีสต์จม (bottom yeast) ถ้าทำในบ่อเปิดมักใช้ยีสต์ลอยหรือผลิตเบียร์ประเภทเบียร์เอล ยีสต์ (Kunze , 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.9 การเก็บ (Storage)

ลาเกอร์หรือเอลที่ผลิตได้จากถังหมัก ยังมีสารแขวนลอยอื่นๆ ปะปนอยู่ในปริมาณที่มาก จำเป็นต้องตกตะกอน เพื่อให้รสชาติของเบียร์กลมกล่อมขึ้น โดยทำการเก็บเบียร์ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส เพื่อให้สารแขวนลอยต่างๆ ตกจนคอลลอยด์ที่ไม่คงตัวเกิดการตกตะกอน (chill proof) แล้วจึงทำการกรองเพื่อให้เบียร์ใสยิ่งขึ้น (Kunze , 2004)

2.2.10 การอัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbonation)

การอัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงในเบียร์มักทำที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการละลายได้ของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในเบียร์ ซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์ที่ใช้ควรมีความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 99.5 เปอร์เซ็นต์ ออกซิเจนที่มีอยู่ในเบียร์จะถูกแทนที่ด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายอยู่ในเบียร์อยู่ในช่วง 0.45 - 0.52 เปอร์เซ็นต์ (Kunze , 2004)

2.2.11 การพาสเจอร์ไรเซชัน (Pasteurization)

เพื่อเป็นการเก็บรักษาเบียร์ไว้ได้นานขึ้น จำเป็นต้องผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์เบียร์ที่บรรจุในภาชนะปิด เช่นขวดหรือกระป๋องแล้ว โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการฆ่าเชื้อประมาณ 60–61 องศาเซลเซียส แต่ความร้อนอาจทำให้รสชาติของเบียร์เปลี่ยนแปลงไป (Kunze , 2004)

2.2.12 ตำหนิ (Defect)

ตำหนิของเบียร์เกือบทั้งหมดเกิดจากความขุ่น ซึ่งมีสาเหตุมาจาก โปรตีน แป้ง ยาง แแทนนิน และจุลินทรีย์

1. Gluten หรือ albumin เป็น โปรตีนที่มีในเบียร์ ทำให้ผลิตภัณฑ์ขุ่นเมื่อเก็บภายใต้ อุณหภูมิต่ำ สาเหตุเนื่องมาจากมีการใช้บารเลย์ที่มีโปรตีนในปริมาณที่สูง อย่างไรก็ตามความขุ่นที่เกิดขึ้นจะหายไปเมื่ออุณหภูมิของเบียร์สูงขึ้น

2. Oxidation turbidity หรือ Haze มีสาเหตุมาจากการรวมตัวของสารประกอบของโปรตีน-โพลีฟีนอล ที่มีอยู่ในเบียร์โดยมีปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้เป็นตัวเร่ง ได้แก่ ออกซิเจน การเขย่า แสง ตลอดจนคลื่นเสียงความถี่สูง อย่างไรก็ตาม ถ้ามีการอัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพียงพอแล้ว จะช่วยป้องกันความขุ่นนี้ได้

3. Starch turbidity เกิดจากการทำเหม็นซึ่งที่ไม่ถูกวิธี เช่น ใช้ระยะเวลาหรืออุณหภูมิ ไม่ถูกต้อง หรือการทำมอลต์ไม่ดีทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ โดยเฉพาะตอนอบมอลต์อาจทำให้ อุณหภูมิสูงจนเกินไป วิธีการป้องกันและแก้ไขทำได้โดยเติมอัมัยเลสลงไปเพื่อย่อยสลายแป้งที่มีอยู่ใน

ผลิตภัณฑ์ เอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Yeast turbidity ความขุ่นที่เกิดจากการปนเปื้อนยีสต์ชนิดอื่น หรือ ยีสต์ปนเปื้อน (wild yeasts)

5. Bacteria turbidity เกิดจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียอันมีสาเหตุมาจากความไม่สะอาด แบคทีเรียที่มักก่อปัญหาได้แก่ *Acetobacter* จะเปลี่ยนแอลกอฮอล์ของเบียร์ในที่มีอากาศเป็นกรดน้ำส้ม (acetic acid) ได้ เชื้อบางชนิดนอกจากจะทำให้เบียร์ขุ่นแล้ว ยังผลิตกรดนม ทำให้เบียร์เปรี้ยว *Pediococcus cerevisiae* ทำให้เบียร์ขุ่นเป็นสาย มีรสเปรี้ยวเนื่องจากสร้างกรดนม การเสียบแบบนี้เรียกว่า sarcina sickness ส่วน *Zymomonas mobilis* หรือ anarobia นอกจากจะทำให้เบียร์ขุ่นแล้ว ยังสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นอย่างรุนแรง (Boultonm and Quain, 2006)

2.3 การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตเบียร์

โดยทั่วไปเบียร์ (finish goods) และผลิตภัณฑ์ระหว่างการผลิต (fermenting beer) เป็นสภาวะที่ไม่เหมาะต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เนื่องจากในเบียร์ประกอบด้วยแอลกอฮอล์ตั้งแต่ 0.5-10 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ประกอบด้วยสารต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งได้จากการเติมฮ็อพ (hop) และมีความเข้มข้นของ iso- α -acids ประมาณ 17-55 ppm ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ความเป็นกรดต่างอยู่ในช่วง 3.8-4.7 และทำการดึงออกซิเจนออกให้เหลือต่ำกว่า 0.1 ppm (Suzuki *et al.*, 2006) แต่มีจุลินทรีย์บางชนิดซึ่งสามารถเจริญได้ในเบียร์และผลิตภัณฑ์ในระหว่างการผลิต ซึ่งเรียกจุลินทรีย์กลุ่มนี้ว่า beer spoilage microorganisms แหล่งการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดดังตารางที่ 2.3

ทั้งนี้ Storgårds (2000) สามารถแบ่งกลุ่มของจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอุตสาหกรรมผลิตเบียร์ ออกเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

2.3.1 Absolute beer spoilage organisms

จุลินทรีย์ซึ่งสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมในเบียร์ได้โดยที่ไม่จำเป็นต้องปรับตัว โดยเชื้อในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Lactobacillus brevis*, *L. lindneri*, *L. brevisimilis*, *L. frigidus*, *L. coryniformis*, *L. casei*, *Pediococcus damnosus*, *Pectinatus cerevisiiphilus*, *P. frisingensis*, *Megasphaera cerevisiae*, *Selenomonas lactificifex* และ *Saccharomyces cerevisiae* เมื่อมีการปนเปื้อนจากเชื้อในกลุ่มนี้ จะส่งผลให้เบียร์มีกลิ่นรสผิดปกติ ขุ่น หรือ มีการตกตะกอน

2.3.2 Potential beer spoilage organisms

โดยปกติแล้วเชื้อกลุ่มนี้ไม่สามารถเจริญได้ในเบียร์ แต่สามารถเจริญได้ในผลิตภัณฑ์เบียร์ชนิดที่มี ความเป็นต่ำ ความเข้มข้นของฮ็อพ และปริมาณแอลกอฮอล์ในระดับต่ำ และมีปริมาณออกซิเจนสูง โดยเชื้อในกลุ่มนี้ต้องใช้ระยะเวลาในการปรับตัวนาน ซึ่งได้แก่ *L. plantalum*, *Lactococcus lactis*, *L. raffinolactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Micrococcus kristinae*, *pediococcus inopinatus*, *Zymomonas mobilis*, *Z. raffinovorans* และ *Saccharomyces cerevisiae*

2.3.3 Indirect beer spoilage organisms

เชื้อในกลุ่มนี้ไม่สามารถเจริญได้ในผลิตภัณฑ์เบียร์สำเร็จรูป แต่อาจเจริญเติบโตได้ในระหว่างกระบวนการผลิต การเจริญของเชื้อในกลุ่มนี้ส่งผลให้เกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย มักพบว่าการปนเปื้อนใน pitching yeasts หรือในช่วงต้นของกระบวนการหมัก (primary fermentation) โดยเชื้อในกลุ่มนี้ได้แก่ Enterobacteria และ Saccharomyces wild yeasts

2.3.4 Indicator organisms

เชื้อในกลุ่มนี้ไม่ได้เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในกระบวนการผลิต แต่การปนเปื้อนของเชื้อในกลุ่มนี้อาจเป็นตัวชี้บ่งประสิทธิภาพของกระบวนการล้าง หรือความผิดพลาดจากกระบวนการผลิต โดยเชื้อในกลุ่มนี้มักเกิดขึ้นควบคู่กับการปนเปื้อนของเชื้อที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย ซึ่งได้แก่ *Acetobacter* spp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *Gluconobacter oxydans*, *Pediococcus agglomerans*, *Klebsiella* spp. และ wild yeast ที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต

2.3.5 Latent organisms

เชื้อในกลุ่มนี้มีความสามารถในการสร้างสปอร์ จึงสามารถมีชีวิตได้ในระหว่างกระบวนการ แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ซึ่งเชื้อในกลุ่มนี้มักปนเปื้อนมาจากดินและน้ำที่ไม่สะอาด

ตารางที่ 2.3 แหล่งการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด

Stage	Spoilage microorganism	
Barley in the field / malting	Aspergillus	<i>A. fumigatus</i>
	Fusarium	<i>F. culmorum</i>
		<i>F. graminearum</i>
Mashing & wort separation	Pediococcus	<i>Ped. pentosaceus</i>
		<i>Ped. inopinatus</i>
	Bacillus	<i>B. coagulans</i>
	Rahnella	<i>R. aquatilis</i>
	Citrobacter	<i>C. freundii</i>
	Klebsiella	<i>K. terrigena</i> <i>K. oxytoca</i>
Fermentation	Wild yeasts	<i>non-Saccharomyces</i> <i>Saccharomyces spp.</i>
	Pediococcus	<i>Ped. inopinatus</i>
	Selenomonas	<i>S. lactificex</i>
	Zymophilus	<i>Z. raffinosivorans</i>
	Rahnella	<i>R. aquatilis</i>
	Obesumbacterium	<i>O. proteus</i>
Biological stabilisation & packaging	Pectinatus	<i>P. cerevisiiphilus</i> <i>P. frisingensis</i>
	Megasphaera	<i>M. cerevisiae</i>
	Lactic acid bacteria	<i>Lactobacillus spp</i> <i>Pediococcus spp.</i>
Contaminants of finished beer	Lactic acid bacteria	<i>Lb. brevis</i>
		<i>Lb. brevisimilis</i>
		<i>Lb. casei</i>
		<i>Lb. collinoides</i>
		<i>Lb. coryneformis</i>
		<i>Lb. curvatus</i>
		<i>Lb. lindneri</i>
		<i>Lb. plantarum</i>
		<i>Ped. damnosus</i>
		<i>Ped. inopinatus</i>
	Pectinatus	<i>P. cerevisiiphilus</i>
		<i>P. frisingensis</i>
		<i>M. cerevisiae</i>
Zymomonas	<i>Z. mobilis</i>	
Micrococcus	<i>M. kristinae</i>	
Dispense	Acetic acid bacteria	<i>A. aceti</i>
		<i>A. pasteurianus</i>
		<i>G. oxydans</i>
	Lactic acid bacteria	
	Wild yeasts	

ที่มา : Vaughan และคณะ (2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิตยังคงต้องมีการตรวจสอบเฝ้าระวังการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น รวมทั้งกลุ่มยีสต์ปนเปื้อน (EBC Analytica Microbiologica II, 2001)

2.6 การตรวจสอบการปนเปื้อนยีสต์

van der Aa Kühle and Jespersen (1998) ได้ทำการจัดจำแนกกลุ่มของยีสต์ที่มีการปนเปื้อนในโรงงานผลิตเบียร์ลาเกอร์ พบว่ามีการปนเปื้อนยีสต์ในกลุ่ม *Saccharomyces cerevisiae* 57 เปอร์เซ็นต์, *Pichia* spp. 28 เปอร์เซ็นต์ และ *Candida* spp. จำนวน 15 เปอร์เซ็นต์ ทำการศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ wild yeast และพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดคือ CuSO_4 medium โดยสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อได้ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณเชื้อทั้งหมด ซึ่งชนิดและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สามารถสรุปได้ ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อนยีสต์

Growth	Selective principles					
	¹ Lysine medium	² Actidione medium (1.0 ppm)	³ Crystal violet medium (20 ppm)	⁴ CuSO_4 medium (195 ppm)	⁵ UBA 37°C	⁶ WLN 37°C
-	18	33	22	8	22	21
+	2	1	4	6	4	4
++	3	1	7	7	5	5
+++	18	6	8	20	10	11
Positive Samples (%)	56	20	46	80	46	49

¹ -, no growth; +, one-ten colony-forming units (cfu); ++, 11-100 cfu; +++, > 100 cfu.

² Incubation at 27°C.

³ UBA, universal beer agar; WLN, Wallerstein Laboratory nutrient medium.

ที่มา : van der Aä Kühle และ Jespersen (1998)

2.7 การตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

ปัจจุบันวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม CuSO_4 ปริมาณ 600 ppm ยังคงใช้ในการตรวจสอบและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของ wild yeasts ในกระบวนการ (อ้างอิงวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนตาม European Brewing Convention หรือ EBC) เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก ค่าใช้จ่ายต่ำ แต่วิธีการดังกล่าวยังคงมีข้อจำกัดคือ ใช้ระยะเวลานาน และผลที่ได้ไม่มีความแม่นยำ (inaccuracy) ไม่สามารถใช้วิธีการหรืออาหารเลี้ยงเชื้อเพียงชนิดเดียวในการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลจึงเป็นแนวทางที่นิยมนำมาใช้ เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาและแก้ไขข้อจำกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการสงวนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่แจ้งประวัติการดำเนินการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

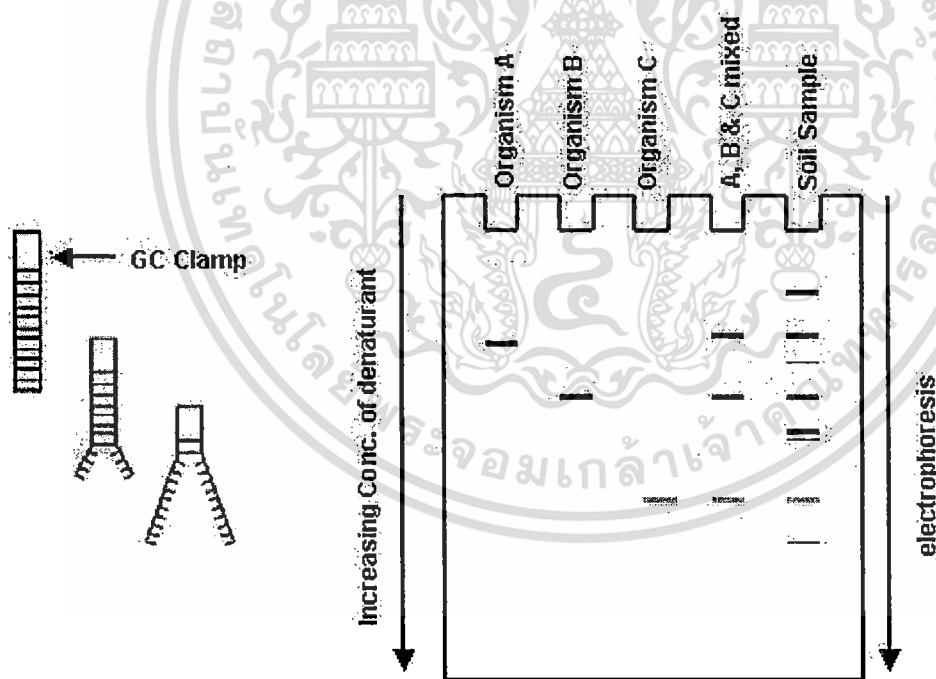
ในการวิเคราะห์ ข้อได้เปรียบของวิธีทางชีวโมเลกุลคือสามารถวิเคราะห์ผลได้โดยใช้ระยะเวลาสั้น และให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำกว่า วิธีดังกล่าวเรียกว่า เทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

สำหรับการนำเทคนิค PCR มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ในอุตสาหกรรมเบียร์ จากการศึกษาของ Satokari และคณะ (1999) ซึ่งทำการประยุกต์ใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียที่มีการปนเปื้อนในเบียร์ พบว่าสามารถลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ และสามารถรายงานผลการวิเคราะห์ได้ภายในระยะเวลาน้อยกว่า 8 ชั่วโมง ในขณะที่วิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อต้องใช้ระยะเวลาถึง 7 วัน สำหรับเชื้อกลุ่ม *Lactobacilli* และใช้เวลา 2-4 วันสำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อในกลุ่ม *Pectinatus* spp. และมีนักวิจัยได้ทำการประยุกต์ใช้เทคนิค PCR สำหรับสำหรับตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ในเบียร์อีกหลายงานวิจัยแต่พบว่างานวิจัยโดยส่วนใหญ่มุ่งเน้นการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactic acid bacteria* ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการปนเปื้อนสูงประมาณ 60-70 เปอร์เซ็นต์ ของการปนเปื้อนทั้งหมด (Suzuki *et al*, 2006) แต่การศึกษาเพื่อประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลสำหรับการตรวจสอบเชื้อยีสต์ในกระบวนการผลิตเบียร์ยังมีไม่มากนัก ดังนั้นจากปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อ wild yeasts ซึ่งเป็นปัญหาหลักขององค์กรประกอบกับฐานข้อมูลหรืองานวิจัยในแง่การประยุกต์ใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของ wild yeast ในกระบวนการยังมีไม่มากนักประกอบกับเชื้อในกลุ่ม wild yeasts มีพฤติกรรมและโครงสร้างทาง DNA ที่คล้ายคลึงกับยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก ดังนั้นการใช้เทคนิค PCR แบบปกติไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนได้จึงจำเป็นต้องใช้ เทคนิคอื่น ๆ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ ซึ่งได้แต่เทคนิค Polymerase chain reaction -denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)

2.8 เทคนิค PCR-DGGE

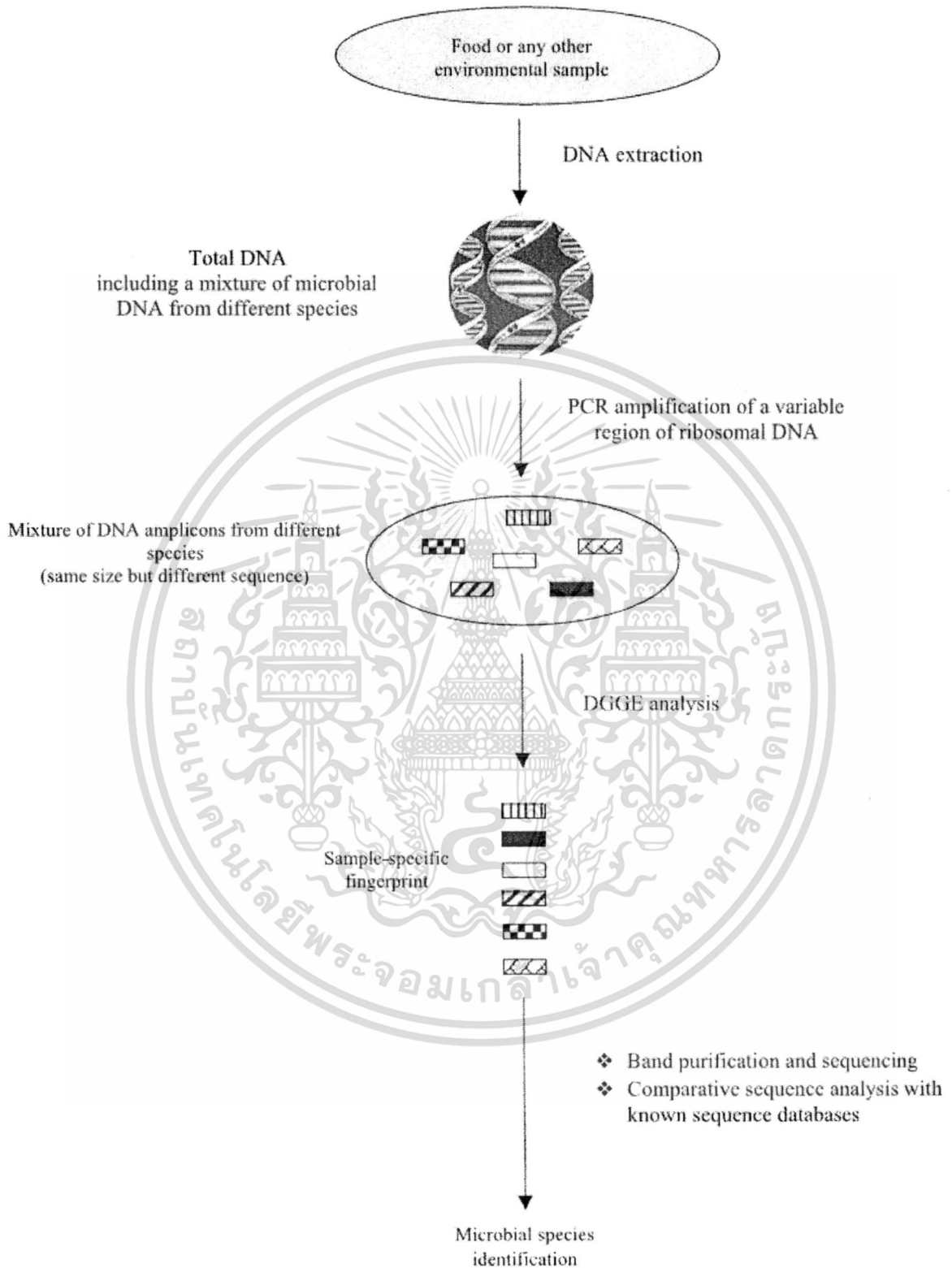
DGGE เป็นเทคนิคใช้แยกโมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสต่างกัน ได้แม้ว่าขนาดความยาวของดีเอ็นเอจะเท่ากัน ซึ่งอาศัยความแตกต่างของความเข้มข้นของสารที่มีคุณสมบัติในการแยกสายดีเอ็นเอ (denaturant) ที่มีสัดส่วนความเข้มข้นของสาร (gradient) จากส่วนบนของเจลที่มีความเข้มข้นน้อยไปสู่ส่วนล่างของเจลที่มีความเข้มข้นมาก ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิการหลอมหรือการแยก (melting temperature) จะแตกต่างกันไปตามลำดับและชนิดของเบส นั่นคือสายดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันจะเคลื่อนที่บนเจลต่างกัน และการเพิ่มเบส GC ประมาณ 30-50 nucleotide (Muyzer *et al.*, 1993) เรียกว่า GC clamp ที่ปลายสาย 5' ของไพรเมอร์ ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอเพื่อทำหน้าที่เป็น high melting domain บนสายดีเอ็นเอทำให้ไม่แยกจากกันเป็นสายเดี่ยวเมื่อเคลื่อนที่บนดีจีจีเจลดังรูปที่ 2.10 นอกจากนี้ยังสามารถตัดแถบดีเอ็นเอที่สนใจไปทำการวิเคราะห์เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สแกนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หาลำดับเบสเพื่อใช้ศึกษาในระดับที่ลึกลงไปได้ มีการประยุกต์ใช้เทคนิค DGGE ใช้ในการศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ในดิน (Muyzer *et al.*, 1993) ต่อมาจึงมีการเริ่มมีการประยุกต์ใช้ในการติดตามประชากรจุลินทรีย์ในอาหาร เช่น เนยแข็ง (Ercolini *et al.*, 2001; Ercolini, 2004) และไส้กรอก (Cocolin *et al.*, 2000; 2001a; 2001b; 2004); Rantsiou *et al.*, 2005 รวมไปถึงอาหารหมักชนิดอื่นๆ โดยเทคนิคดีจีจีอีสามารถทำได้กับยีนที่มีขนาดประมาณ 200 bp สูงสุดไม่เกิน 500 bp เท่านั้น (Muyzer and Smalla, 1998) ซึ่งสามารถศึกษาแบคทีเรียในตัวอย่างได้โดยตรง เป็นการลดปัญหาจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารในห้องปฏิบัติการได้ และสามารถประเมินความหลากหลายของจุลินทรีย์ได้อย่างสมบูรณ์มากขึ้นซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วและไม่ยุ่งยากทำให้นักวิทยาศาสตร์และวิศวกรทางชีวภาพเข้าใจโครงสร้างชนิด และปริมาณของแบคทีเรียว่าเป็นอย่างไร มากหรือน้อยต่างกันในระดับอนุวิทยา ทั้งยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ หรือตรวจสอบความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียที่มีอยู่ในธรรมชาติ น้ำเสียหรือของเสียทางอุตสาหกรรมและการเกษตรรวมถึงทางการแพทย์ โดยวิธีการดำเนินการตามรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.10 การเคลื่อนที่บนโพลีครีลาไมด์เจลของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอจากเชื้อมาตรฐานในการทำดีจีจีอี

ที่มา: Microbial Insights (2010)



รูปที่ 2.11 วิธีการวิเคราะห์จุลินทรีย์ในอาหารด้วยวิธี พีซีอาร์ ดีจีจีอี

ที่มา : Ercolini (2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของโรงงานผลิตเบียร์ลาเกอร์ ซึ่งใช้เป็นสถานที่ในการทำการวิจัย พบมีการปนเปื้อนของยีสต์ป่าในช่วงต้นของกระบวนการหมัก (primary fermentation) ประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ ประกอบกับปัญหาความล่าช้าในการตรวจวิเคราะห์ซึ่งก่อให้เกิดการสูญเสียทางธุรกิจในแง่การปรับแต่ง การผลิตซ้ำ (reprocess) เป็นต้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาปริมาณการปนเปื้อน จัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ป่าในกระบวนการผลิตเบียร์ และประยุกต์ใช้ เทคนิค PCR - DGGE ในการตรวจสอบและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของยีสต์เพื่อลดระยะเวลาในการตรวจสอบการปนเปื้อนและเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ รวมถึงประเมินคุณภาพเบียร์ที่ได้จากการผลิตที่มีการปนเปื้อนจากเชื้อยีสต์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 น้ำสุดท้ายจากกระบวนการล้างถัง (rinse water) ภายหลังจากการทำความสะอาดด้วยระบบ CIP

3.1.2 ยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการ (pitching yeast)

3.1.3 น้ำเวิร์ท (cooled wort)

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast & Mold Agar (YM Agar) (Difco, สหรัฐอเมริกา)

3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Universal Beer Agar(UBA) (Difco, สหรัฐอเมริกา)

3.2.3 SYBR Green nucleic acid stain (Eugene, สหรัฐอเมริกา)

3.2.4 ชุดสกัด DNA (high pure DNA template preparation kit) (Roche, เยอรมนี)

3.2.5 Primer (Sigma-Aldrich, สิงคโปร์)

NL1 (5'-GCATATCAATAAGCG GAGGAAAAG-3')

NL4 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')

NL1+GC (5'-CGC CCGCCGCGCGGGCGGGCGGGCGGGG
GCCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')

LS2 (5'-ATTCCCAAACAACACTCGACTC-3')

3.2.6 Taq polymerase (Roche, เยอรมนี)

3.2.7 40% Acrylamide/Bis solution (Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา)

3.2.8 ammonium-persulfate (APS) (Amresco, สหรัฐอเมริกา)

3.2.9 Formamide deionized (Bio Basic Inc, แคนาดา)

3.2.10 50X TAE buffer (Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา)

3.2.11 Tris Borate EDTA (TBE) (Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา)

3.2.12 Ethidium bromide (Bio-Rad, สหรัฐอเมริกา)

3.2.13 Urea (Amresco, สหรัฐอเมริกา)

3.2.1.4 CuSO₄ (Ajax, สหรัฐอเมริกา)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

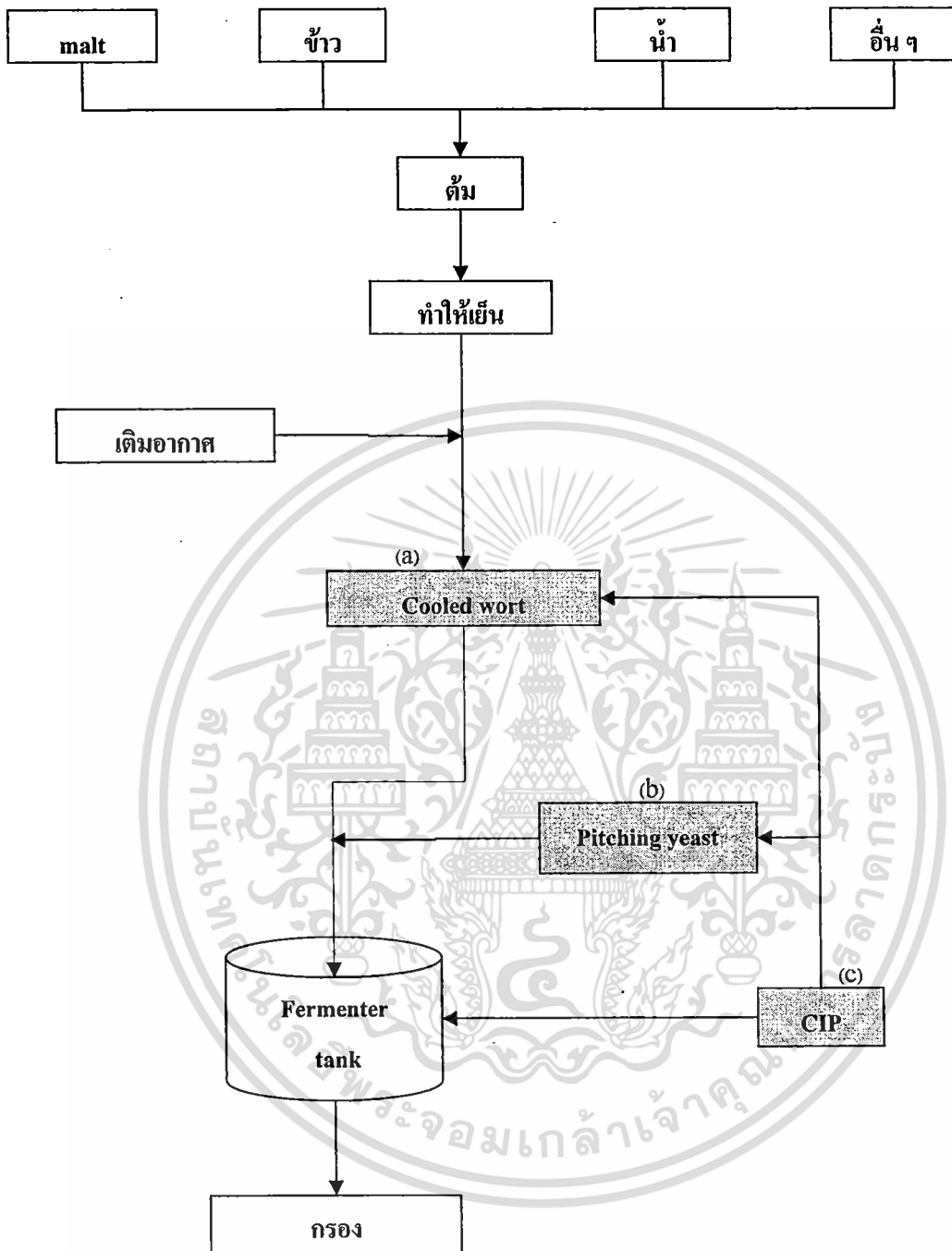
3.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- 3.3.1 กล้องจุลทรรศน์ (Zeizz, เยอรมนี)
- 3.3.2 เครื่อง PCR (Biometra, เยอรมนี)
- 3.3.3 ตู้บ่มเชื้อ (Memmert, เยอรมนี)
- 3.3.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (Denville, สหรัฐอเมริกา)
- 3.3.5 PCR-DGGE Set (มิวเตชัน ดีเทคชัน) (BioRad, สหรัฐอเมริกา)
- 3.3.6 Anton Paar (Methrom, ออสเตรีย)
- 3.3.7 Gas Chromatography (Varian, สหรัฐอเมริกา)
- 3.3.8 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Shimadzu, ญี่ปุ่น)
- 3.3.9 pH meter (Radiometer, เดนมาร์ก)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเก็บรวบรวมเชื้อยีสต์ที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิต

เก็บตัวอย่างน้ำเวิร์ท (cooled wort) จำนวน 200 ตัวอย่าง ตามผังกระบวนการผลิต รูปที่ 3.1(a) pitching yeast จำนวน 100 ตัวอย่าง ตามผังกระบวนการผลิต รูปที่ 3.1(b) น้ำที่เหลือจากกระบวนการล้างทำความสะอาดถัง (CIP) ประมาณ 300 ตัวอย่าง ตามผังกระบวนการผลิตรูปที่ 3.1(c) โดยวิธี aseptic techniques และนำตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast & Mold Agar (YM) ซึ่งเติม CuSO_4 ความเข้มข้น 600 ppm บ่มในสภาวะที่มีอากาศ (aerobic condition) ที่ 27 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของยีสต์ในกระบวนการผลิตเบียร์ตามมาตรฐาน European Brewery Convention (EBC) เนื่องจากยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเบียร์ (*Saccharomyces Brewer Yeast*) จะถูกยับยั้งด้วย CuSO_4 ในขณะที่ยีสต์ปนเปื้อน (Wild Yeasts) ยังคงสามารถเจริญได้ดีโดยอาศัยกระบวนการ Metal Detoxification Pathways และนำยีสต์ที่ได้ Streak บนอาหาร YM Agar เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว และเก็บยีสต์ที่คัดแยกได้บนอาหารเลี้ยงที่อุณหภูมิ 2-10 องศาเซลเซียส



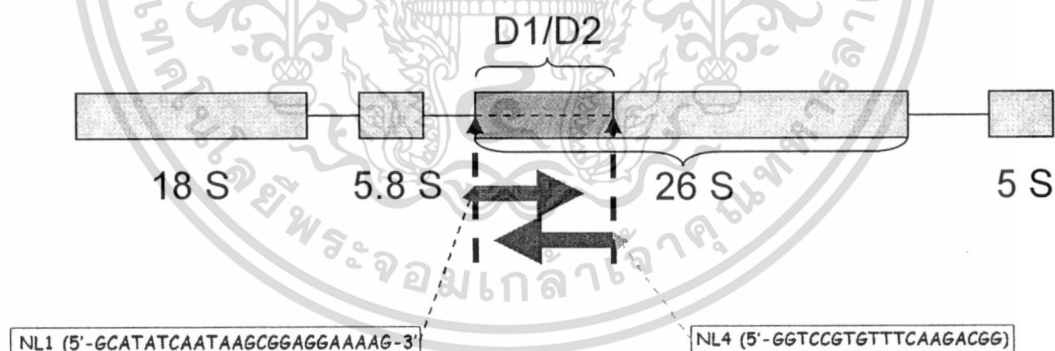
รูปที่ 3.1 ผังกระบวนการผลิตเบียร์และจุดที่ทำการเก็บตัวอย่าง

- (a) จุดเก็บตัวอย่าง Cooled wort
- (b) จุดเก็บตัวอย่าง pitching yeast
- (c) จุดเก็บตัวอย่างน้ำล้างถัง (CIP)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2 การจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์โดยการศึกษาลำดับเบสในส่วน D1/D2 region rRNA gene

เลี้ยงยีสต์ในอาหาร YPD broth (Yeast extract 10 กรัม, Peptone 20 กรัม, Glucose 20 กรัม) บ่มที่ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง บ่มเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที (Manzano *et al.*, 2005) สกัด genomic DNA โดยชุดสกัด high pure PCR template และนำ genomic DNA ที่ได้จัดเก็บภายใต้ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน ทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ D1/D2 region ของ 26S rRNA gene โดยใช้ primer NL1 และ NL4 ดังแสดงในรูปที่ 3.2 ซึ่งกำหนดสภาวะ (PCR condition) ตามวิธี Kurtzman and Robnett (1998) โดย Predenaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที, ตามด้วย 30 รอบของ Denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, Annealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที และทำให้ DNA บริสุทธิ์ ด้วยชุด kit สำเร็จรูป PCR clean-up Gel Extraction จากนั้นนำผลผลิต PCR ไปวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (1.5 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp plus) ทำการวิเคราะห์ลำดับเบส และนำลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลในเวบไซด์ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> เพื่อระบุสายพันธุ์ยีสต์ที่มีการปนเปื้อนในกระบวนการผลิตเบียร์



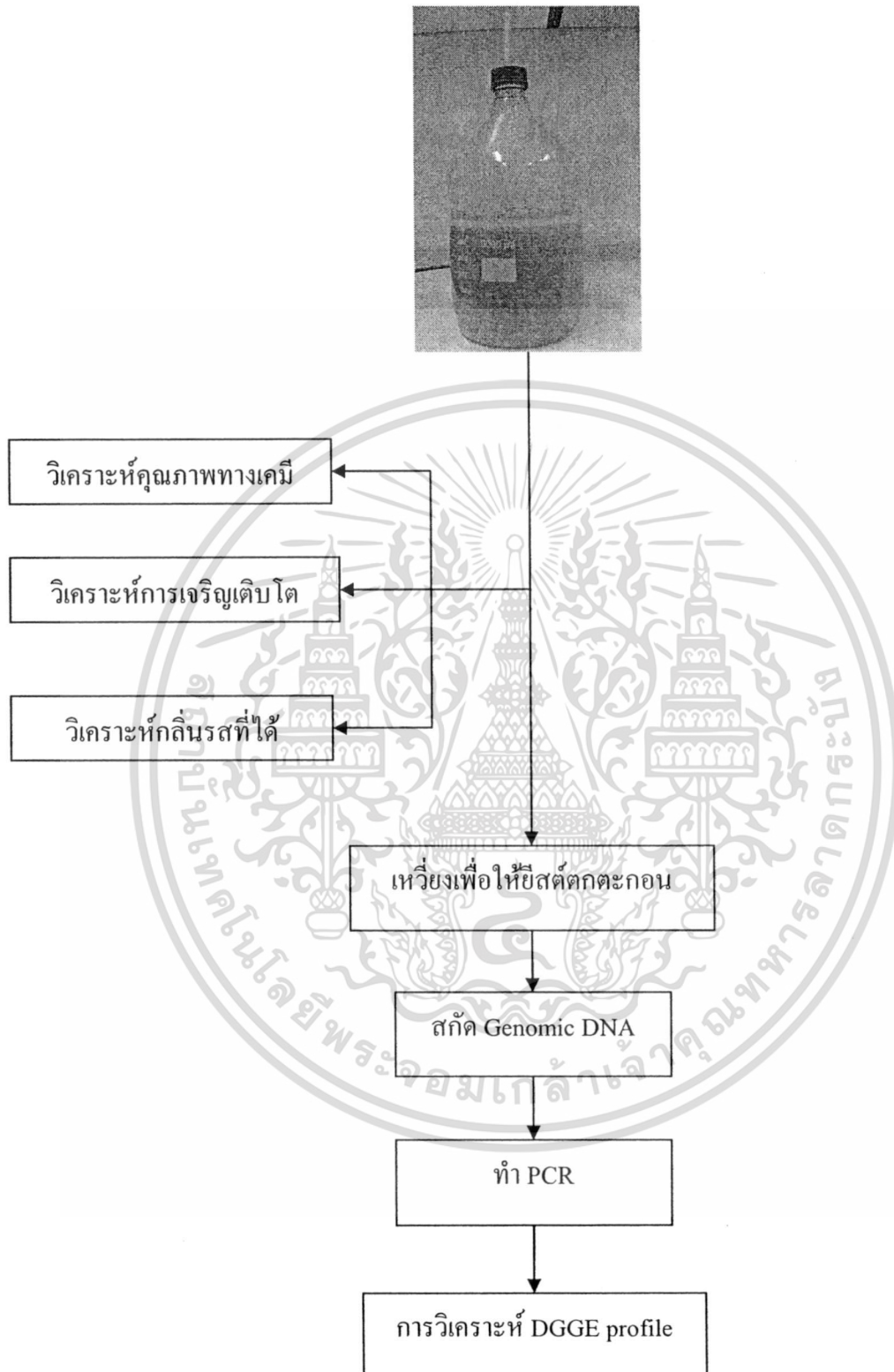
รูปที่ 3.2 บริเวณ D1/D2 region ของ 26S rRNA gene โดยใช้ primer NL1 และ NL4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 ทำการหมักเบียร์เพื่อการศึกษาคุณภาพทางเคมี, คุณภาพทางประสาทสัมผัสของเบียร์ที่ได้ระหว่างกระบวนการหมัก และการประยุกต์ใช้เทคนิค PCR-DGGE ในการตรวจสอบและฝ้าระวังการปนเปื้อนยีสต์ในกระบวนการ

จำลองกระบวนการหมักเบียร์ในห้องปฏิบัติการ โดยหมักภายในขวดขนาด 1,000 มิลลิลิตรที่เติมเวิร์ท 600 มิลลิลิตร ก้าวเชื้อยีสต์ประมาณ 12×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร และเติมเชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่มีการปนเปื้อนมากที่สุด (จากข้อ 3.4.2) 1×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร หมักที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วันหลังจากนั้นลดอุณหภูมิเหลือ 7 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน และลดอุณหภูมิเหลือ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน โดยวิธีการและขั้นตอนในการดำเนินงาน ตามรูปที่ 3.3 และ แบ่งรูปแบบในการหมักเป็นกลุ่ม คือ

1. หมักโดยใช้กัวเชื้อยีสต์ (Brewer yeast) (12×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร)
2. หมักโดยใช้เชื้อยีสต์ปนเปื้อน (*Cl. lusitaniae*) (1×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร)
3. หมักโดยใช้กัวเชื้อยีสต์ + เชื้อ *Cl. lusitaniae* (12×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร + 1×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร)

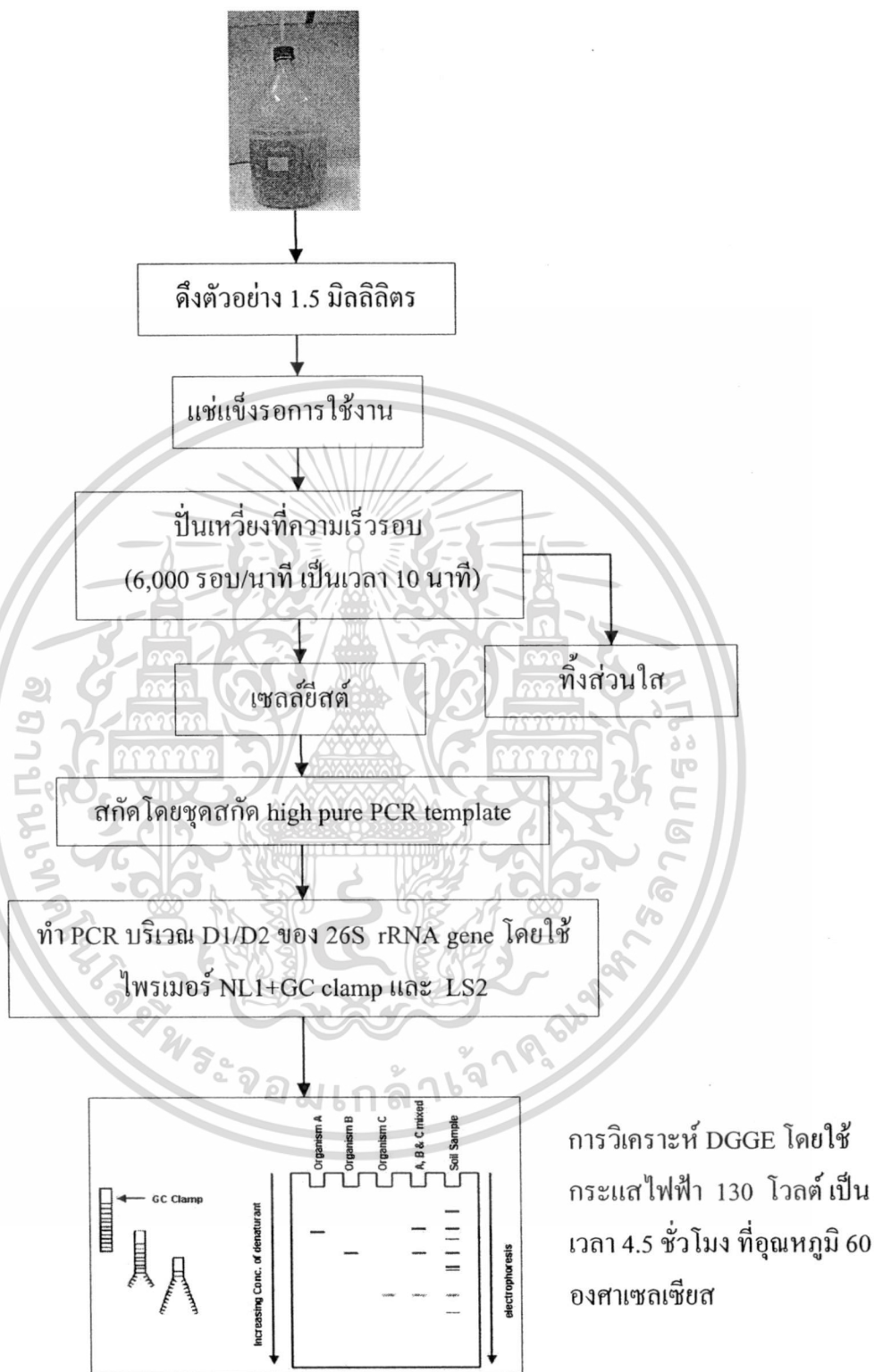


รูปที่ 3.3 แบบจำลองกระบวนการหมักเบียร์ในห้องปฏิบัติการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เก็บตัวอย่างเบียร์ประมาณ 200 มิลลิลิตรกรองยีสต์ออกด้วยกระดาษกรอง และทำการแบ่งตัวอย่างเป็น 3 ส่วนสำหรับ วิเคราะห์ความเป็นกรดต่างด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์, วิเคราะห์ค่าทางเคมี (แอลกอฮอล์, Real degree of fermentation, apparent extract) ด้วยเครื่อง Anton paar และ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) วิธีการวิเคราะห์ดังกล่าว การศึกษาการเจริญเติบโตของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ในระหว่างกระบวนการหมักโดยทำการเก็บตัวอย่างโดยวิธี aseptic techniques และเลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM Agar ป่มที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นับจำนวนยีสต์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์

การตรวจติดตามการปนเปื้อนเชื้อยีสต์ในระหว่างกระบวนการด้วยวิธี PCR-DGGE ดังรูปที่ 3.6 โดยเก็บตัวอย่างเบียร์ประมาณ 1.5 มิลลิลิตรจากกระบวนการหมัก เก็บภายใต้อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียสเพื่อรอการใช้งาน เมื่อต้องการนำมาใช้งานทำการละลายตัวอย่าง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ง่วนใส (Manzano *et al.*, 2005) นำเซลล์ยีสต์ (Pellet) สกัดโดยชุดสกัด high pure PCR template และนำ genomic DNA ที่ได้ทำการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA gene โดยใช้ primer NL1+GC clamp โดยกำหนดสภาวะ (PCR condition) ตามวิธี Cocolin และคณะ (2001c) โดย Predenaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที, ตามด้วย 30 รอบของ Denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที, Annealing อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียสนาน 45 วินาที, Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสนาน 60 วินาที และ Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสนาน 7 นาที และนำผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้ทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ซึ่งเตรียม polyacrylamide gel (Polyacrylamide เข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ : bis-acrylamide 37.5 ต่อ 1) ให้มีความเข้มข้นของ denaturant (urea และ formamide) อยู่ที่ 30-50 เปอร์เซ็นต์ (100 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย urea ความเข้มข้น 8 โมลาร์ และ acrylamide เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์) นำ DNA ซึ่งมี ส่วน GC clamp มาวิเคราะห์โดยใช้กระแสไฟฟ้า 130 โวลต์ เป็นเวลา 4.5 ชั่วโมง อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำ polyacrylamide gel มาข้อมใน 1X TAE buffer ที่มี 1X SYBR gold และนำไปส่องภายใต้ UV-transilluminator วิธีการดำเนินการตามรูปที่ 3.4

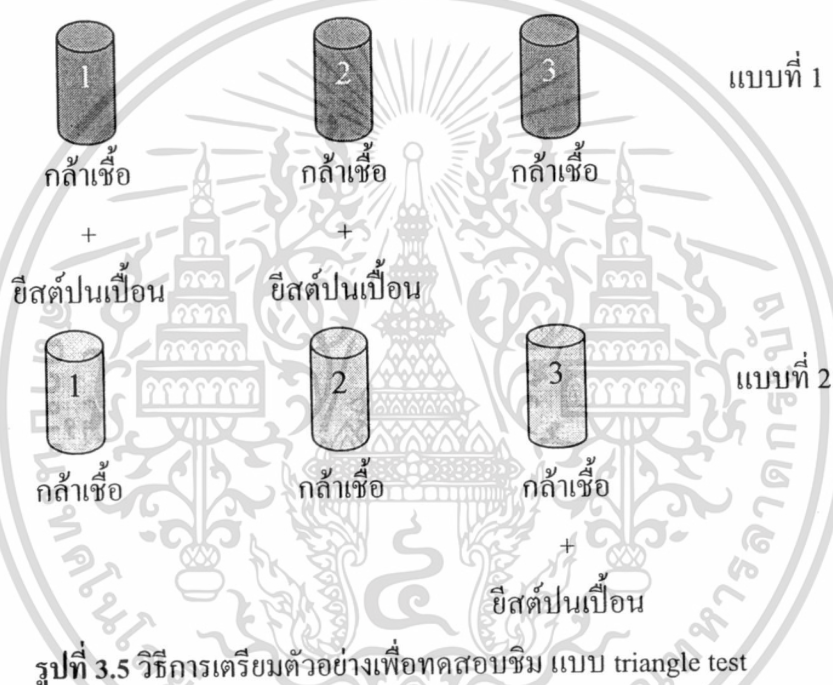


รูปที่ 3.4 ขั้นตอนในการประยุกต์ใช้เทคนิค DGGE ในการตรวจสอบการปนเปื้อนยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4 การศึกษาคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์หลังจากหมักด้วยยีสต์ปนเปื้อน เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่หมักด้วยกล้าเชื้อยีสต์

เก็บตัวอย่างเบียร์จากวันสุดท้ายของกระบวนการหมัก (fermented beer) ทดสอบชิมแบบ Triangle test โดยผู้เชี่ยวชาญ 14 คนเพื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกล้าเชื้อยีสต์ และผลิตภัณฑ์ที่หมักโดยกล้าเชื้อยีสต์ยีสต์และ กล้าเชื้อยีสต์ซึ่งปนเปื้อนเชื้อยีสต์ปนเปื้อน โดยการ จัดเตรียมตัวอย่างดังรูปที่ 3.5 และเปรียบเทียบผลที่ได้กับตารางสำเร็จรูปสำหรับการชิมแบบ triangle test (ตารางที่ 3.1) เพื่อประเมินความแตกต่างระหว่างผลิตภัณฑ์ที่ได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ตารางสำเร็จรูปสำหรับการชิมแบบ triangle test

Number of replies	Minimum number of correct replies for a significance level of $\alpha \leq$			Number of replies	Minimum number of correct replies for a significance level of $\alpha \leq$		
	0,05	0,01	0,001		0,05	0,01	0,001
5	4	5		53	24	27	30
6	5	6		54	25	27	30
7	5	6	7	55	25	28	30
8	6	7	8	56	26	28	31
9	6	7	8	57	26	28	31
10	7	8	9	58	26	29	32
11	7	8	10	59	27	29	32
12	8	9	10	60	27	30	33
13	8	9	11	61	27	30	33
14	9	10	11	62	28	30	33
15	9	10	12	63	28	31	34
16	9	11	12	64	29	31	34
17	10	11	13	65	29	32	35
18	10	12	13	66	29	32	35
19	11	12	14	67	30	33	36
20	11	13	14	68	30	33	36
21	12	13	15	69	31	33	36
22	12	14	15	70	31	34	37
23	12	14	16	71	31	34	37
24	13	15	16	72	32	34	38
25	13	15	17	73	32	35	38
26	14	15	17	74	32	35	39
27	14	16	18	75	33	36	39
28	15	16	18	76	33	36	39
29	15	17	19	77	34	36	40
30	15	17	19	78	34	37	40
31	16	18	20	79	34	37	41
32	16	18	20	80	35	38	41
33	17	18	21	81	35	38	41
34	17	19	21	82	35	38	42
35	17	19	22	83	36	39	42
36	18	20	22	84	36	39	43
37	18	20	22	85	37	40	43
38	19	21	23	86	37	40	44
39	19	21	23	87	37	40	44
40	19	21	24	88	38	41	44
41	20	22	24	89	38	41	45
42	20	22	25	90	38	42	45
43	20	23	25	91	39	42	46
44	21	23	26	92	39	42	46
45	21	24	26	93	40	43	46
46	22	24	27	94	40	43	47
47	22	24	27	95	40	44	47
48	22	25	27	96	41	44	48
49	23	25	28	97	41	44	48
50	23	26	28	98	41	45	48
51	24	26	29	99	42	45	49
52	24	27	30	100	42	46	49

The values in this Table were calculated from the exact formula: binomial law for parameter $p=1/3$ with n repetitions (replies). When the number of replies is larger than 100, numbers of required correct replies may be obtained from the following formula based on the approximation binomial law by the normal law, with a maximum error equal to one unit: $x = 0,4714 \cdot z\sqrt{n} + [(2n+3)/6]$ where $z = 1,64$ for $\alpha \leq 0,05$; $2,3$ for $\alpha \leq 0,01$, and $3,10$ for $\alpha \leq 0,001$ (9.4). The minimum number of correct replies is X if X is a whole number, or the next higher integer if X is not a whole number. Tables for significance levels other than those listed here may be found in the bibliography (9.2 and 9.5)

ที่มา : EBC (1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การเก็บรวบรวมสายพันธุ์ยีสต์ที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตเบียร์ลาเกอร์

ผลการเก็บรวบรวมเชื้อ ยีสต์ปนเปื้อนจากตัวอย่างของเหลวก่อนการหมักเบียร์ (เวียร์ท) กล้าเชื้อยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเบียร์ และน้ำทิ้งที่เหลือจากกระบวนการล้างทำความสะอาดถังหมัก ตารางที่ 4.1 พบว่าน้ำทิ้งที่เหลือจากกระบวนการล้างทำความสะอาดถังหมัก มีการปนเปื้อนเชื้อจำนวน 6 ตัวอย่างจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 300 ตัวอย่าง คิดเป็น 2 เปอร์เซ็นต์ และกล้าเชื้อยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเบียร์ มีการปนเปื้อนจำนวน 1 ตัวอย่างจากจำนวน 100 ตัวอย่าง คิดเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อยีสต์ปนเปื้อนในตัวอย่างเวียร์ท เนื่องจากกระบวนการผลิตเบียร์โดยทั่วไปมีการต้มฆ่าเชื้อเวียร์ทก่อนการเติมกล้าเชื้อยีสต์ และกระบวนการเติมอากาศลงในเวียร์ท ทำการเติมผ่าน sterile filter สามารถกรองเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ประกอบกับระบบการจัดการด้านสุขาภิบาลที่ดี ส่งผลให้ไม่พบการปนเปื้อนของยีสต์ปนเปื้อนในเวียร์ท ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Lin และคณะ (2008) ทำการศึกษาการปนเปื้อนของยีสต์จากจุดต่าง ๆ 5 จุด คือ เวียร์ท, เบียร์ระหว่างการหมัก (Fermenting beer), กล้าเชื้อยีสต์ (seed yeasts), อุปกรณ์ (equipment) และผลิตภัณฑ์สุดท้าย (finished beer) พบว่าทุกจุดในกระบวนการผลิตเป็นแหล่งการปนเปื้อนยีสต์ แต่สำหรับโรงงานที่ใช้ในการศึกษาพบว่า การปนเปื้อนมาจากกระบวนการล้างทำความสะอาดถัง และกล้าเชื้อในการหมัก

ตารางที่ 4.1 การปนเปื้อนเชื้อยีสต์ในกระบวนการผลิตเบียร์ลาเกอร์

แหล่ง	ปริมาณที่ตรวจพบ (cfu/ml)	จำนวนตัวอย่าง ที่วิเคราะห์	จำนวนตัวอย่าง ที่มีการปนเปื้อน	เปอร์เซ็นต์ การปนเปื้อน
เวิร์ท	ไม่พบการ ปนเปื้อน	300	0	0
หัวเชื้อ	2.97×10^4	100	1	1
กระบวนการล้างถัง 1	4.10×10^4			
กระบวนการล้างถัง 2	5.10×10^2			
กระบวนการล้างถัง 3	2.60×10^4	300	6	2
กระบวนการล้างถัง 4	4.40×10^4			
กระบวนการล้างถัง 5	3.20×10^4			
กระบวนการล้างถัง 6	5.50×10^2			

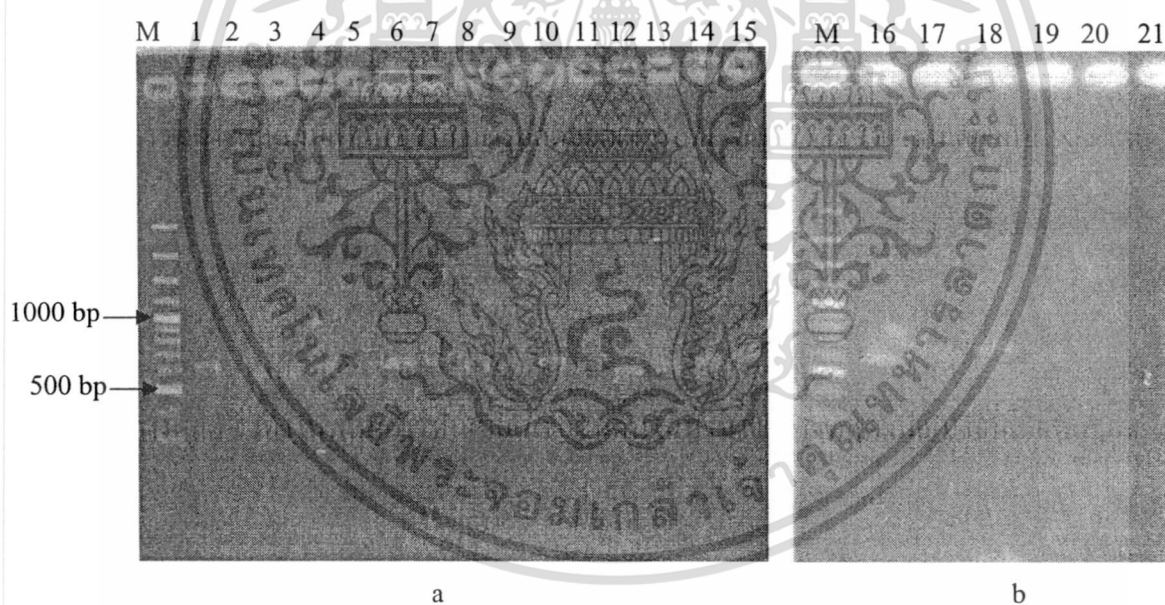
4.2 การจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตเบียร์

รวบรวมยีสต์ปนเปื้อนจำนวน 21 โคลนิจากงานเพาะเชื้อ และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เป้าหมายในส่วน D1/D2 ของ 26S rRNA gene โดยใช้ไพรเมอร์ NL1 (5'-CATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') และ NL4 (5'-GTCCGTGTTTCAAGACGG-3') จากนั้นนำผลผลิต PCR ไปวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp Ladder plus) ดังรูปที่ 4.1a และ b ทำการจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์โดยวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอในส่วน D1/D2 ของ 26S rRNA gene (ตารางที่ 4.2) พบว่าน้ำทิ้งที่เหลือจากกระบวนการล้างทำความสะอาดถังหมัก (จุด c รูปที่ 3.1) พบการปนเปื้อนของยีสต์สูงสุด คิดเป็น 2 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ที่มีการปนเปื้อนในตัวอย่าง คือ *Clavispora lusitaniae*, *Candida pararugosa*, *Candida intermedia*, *Candida orthopsilosi*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pichia spartinae* และ *Trichosporon ovoides* โดยที่ไม่มีการปนเปื้อนยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ในขณะที่การปนเปื้อนของยีสต์ในตัวอย่างกล้าเชื้อยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเบียร์ (จุด b รูปที่ 3.1) พบการปนเปื้อน 1 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด พบว่าสายพันธุ์ยีสต์ที่ปนเปื้อน คือ *Sac. cerevisiae* และจากข้อมูลที่ได้พบว่าสายพันธุ์ที่มีการปนเปื้อนสูงสุดคือ *Clavispora lusitaniae* คิดเป็น 33 เปอร์เซ็นต์พบการปนเปื้อนสายพันธุ์ *Candida pararugosa* และ *Pichia spartinae* 19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์, *Saccharomyces cerevisiae* 10 เปอร์เซ็นต์, *Candida intermedia*, *Candida orthopsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa* และ *Trichosporon ovoides* คิดเป็นสายพันธุ์ละ 5 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาีสต์ปนเปื้อนทุกสายพันธุ์ไม่พบรายการเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร

รายงานของ Laitila และคณะ (2006) ทำการศึกษานิคของยีสต์ที่สามารถเจริญได้ในอุตสาหกรรมการผลิตมอลต์ พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อ *Cla. lusitaniae* ได้ เช่นเดียวกับ Xie และคณะ (2007) ทำการศึกษการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ใน shaoxing rice wine wheat *Qu* ซึ่งมีข้าวเป็นองค์ประกอบ พบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อ *Cla. lusitaniae* เช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นได้ว่า *Cla. lusitaniae* สามารถใช้มอลต์และข้าวเป็นสับเสรดในการเจริญเติบโตได้ และเนื่องจากในอุตสาหกรรมเบียร์โดยเฉพาะสูตรของโรงงานที่ทำการศึกษา มีการใช้มอลต์และข้าวเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิต จึงทำให้พบมีการปนเปื้อนเชื้อชนิดนี้ในปริมาณที่สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์อื่น ๆ



รูปที่ 4.1 แถบดีเอ็นเอผลผลิต a และ b ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณของส่วน 26S rRNA gene แล้ว นำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโพรซิสบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน TBE buffer เป็นเวลา 45 นาที ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ โดย Lane M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder และ Lane 1- Lane 15 คือดีเอ็นเอผลผลิตจากยีสต์หมายเลข 1-15 และ Lane 16- Lane 21 คือดีเอ็นเอผลผลิตจากยีสต์หมายเลข 16-21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 การจำแนกเชื้อยีสต์ที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตเบียร์ลาเกอร์

หมายเลข	จำนวนคู่เบสในส่วน D1/D2 ที่ได้ (bp)	สายพันธุ์ที่เหมือนที่สุดเมื่อเทียบกับ ฐานข้อมูล GenBank	เปอร์เซ็นต์ของ ความเหมือน
1	549	<i>Pichia spatinae</i>	100
2	483	<i>Clavispora lusitaniae</i>	100
3	496	<i>Candida intermedia</i>	100
4	530	<i>Pichia spatinae</i>	100
5	530	<i>Pichia spatinae</i>	100
6	549	<i>Pichia spatinae</i>	100
7	445	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100
8	500	<i>Candida pararugosa</i>	100
9	514	<i>Candida pararugosa</i>	100
10	569	<i>Trichosporon ovoides</i>	100
11	552	<i>Candida orthopsilosis</i>	100
12	495	<i>Clavispora lusitaniae</i>	100
13	483	<i>Clavispora lusitaniae</i>	100
14	462	<i>Candida pararugosa</i>	100
15	558	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
16	502	<i>Clavispora lusitaniae</i>	100
17	484	<i>Clavispora lusitaniae</i>	100
18	456	<i>Candida pararugosa</i>	100
19	554	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
20	486	<i>Clavispora lusitaniae</i>	100
21	482	<i>Clavispora lusitaniae</i>	100

* ผลจากการ Blast วันที่ 08/05/2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 คุณลักษณะของเบียร์ที่ได้ระหว่างกระบวนการหมัก

จำลองกระบวนการหมักเบียร์ในห้องปฏิบัติการโดยใช้ ยีสต์สายพันธุ์ที่มีการปนเปื้อนสูงสุด (*Clavispora lusitaniae*) เป็นตัวแทนในการศึกษาผลกระทบของการปนเปื้อนต่อผลิตภัณฑ์ที่ได้ระหว่างกระบวนการหมักดังนี้

1. หมักโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*)
2. หมักโดยใช้เชื้อยีสต์ปนเปื้อน (*Cla. lusitaniae*)
3. หมักโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ + เชื้อ *Cla. lusitaniae* (ประมาณ 10^6 cell/ml)

(*Saccharomyces cerevisiae* + *Cla. lusitaniae*)

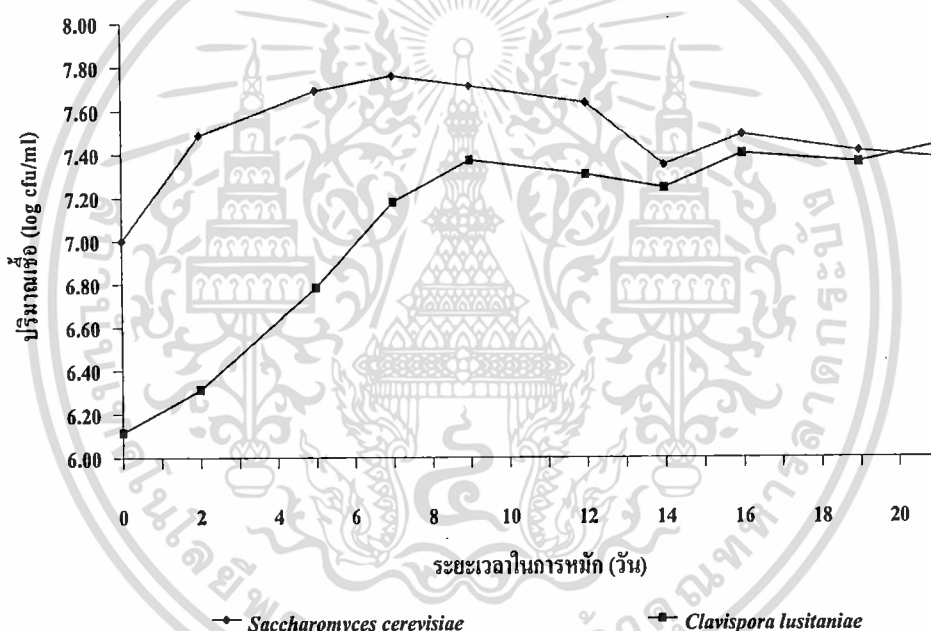
ควบคุมกระบวนการหมักโดยหมักภายในขวดขนาด 1,000 มิลลิลิตรที่เติมเวิร์ท 600 มิลลิลิตร หมักที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

4.3.1 การเจริญเติบโตของกล้าเชื้อและเชื้อ *Clavispora lusitaniae* ระหว่างกระบวนการหมัก

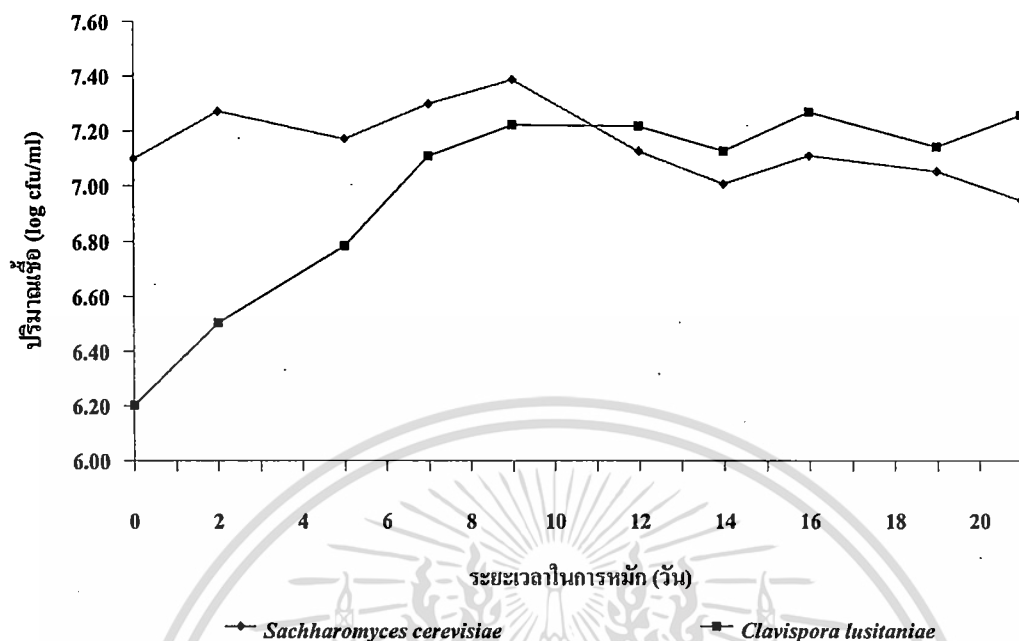
จากการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์การเจริญของเชื้อยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ระหว่างกระบวนการหมักดังรูปที่ 4.3 ตัวอย่างที่ได้มาจากกระบวนการหมักแบบเดียวกันพบว่าปริมาณกล้าเชื้อยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) มีการเพิ่มปริมาณในช่วงแรกของการหมักและจะลดปริมาณลงอย่างต่อเนื่อง เป็นผลมาจาก การเจริญเติบโตของยีสต์ภายใต้สภาวะไร้อากาศของกล้าเชื้อยีสต์ จะมีการเปลี่ยนน้ำตาล (fermentable sugars) ในเวิร์ทเป็นแอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และ pH ที่ลดลง การปลดปล่อยสารเหล่านี้ออกมามากขึ้น ส่งผลให้กล้าเชื้อเจริญเติบโตภายใต้สภาวะเครียด (stress) ทำให้ยีสต์อ่อนแอและมีอัตราการตายที่สูงขึ้นสอดคล้องกับการทดลองของ Lentini และคณะ (1998) ทำการศึกษาผลกระทบของแอลกอฮอล์ต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ พบว่าแอลกอฮอล์มีผลกระทบทำให้ยีสต์มีอัตราการตายมากขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก และสอดคล้องกับกระบวนการผลิตจริงในอุตสาหกรรมเบียร์ ในทางกลับกันสำหรับเชื้อ *Cla. lusitaniae* เป็นเชื้อยีสต์ที่มีการปนเปื้อนสูงสุดในโรงงานซึ่งใช้เป็นต้นแบบในการศึกษา ทำการหมักเบียร์โดยใช้เชื้อ *Cla. lusitaniae* ภายใต้สภาวะเดียวกับการหมักโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ พบว่ายีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวมีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาในการหมักดังรูปที่ 4.2 การเจริญอย่างต่อเนื่องเป็นผลมาจากเชื้อสายพันธุ์ *Cla. lusitaniae* มีความสามารถในการใช้น้ำตาลในเวิร์ทได้ทุกชนิดและจากรูปที่ 4.8 จะเห็นได้ว่าการใช้น้ำตาลมอลโตสอย่างช้า ๆ โดยปกติแล้วในเวิร์ทจะมีปริมาณมอลโตสสูงที่สุดประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Stewart และ Russell, 1998) จากการศึกษาวิเคราะห์ทางเคมีที่ได้จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นว่ากระบวนการเจริญเติบโตของ เชื้อ *Cla. lusitaniae* ไม่มีการสร้างแอลกอฮอล์ และ pH ลดลงอย่างเอกซารีนเป็นเอกซารีนที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซ้ำ ๆ ดังนั้นจึงมีสภาพเครียดน้อยกว่าการใช้กล้าเชื้อผสมประกอบกับมีปริมาณสารอาหารอย่างเพียงพอ (มอลโตส) ทำให้เชื้อ *Cla. lusitaniae* มีการเติบโตอย่างต่อเนื่องในระหว่างกระบวนการหมัก

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อทั้ง 2 ในการหมักร่วมกัน ดังรูปที่ 4.3 พบว่ากล้าเชื้อยีสต์และ *Cla. lusitaniae* มีรูปแบบในการเจริญเติบโตเป็นไปในทิศทางเดียวกับการเจริญโดยการเลี้ยงแบบเดี่ยว คือมีการเพิ่มจำนวนในช่วงแรกของกระบวนการหมัก มีการลดลงอย่างต่อเนื่อง และเชื้อ *Cla. lusitaniae* มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาในการหมัก จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสภาวะเครียดอันเกิดจาก แอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้น และ pH ที่ลดลง หรือแม้แต่ภาวะขาดแคลนสารอาหารไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Cla. lusitaniae*



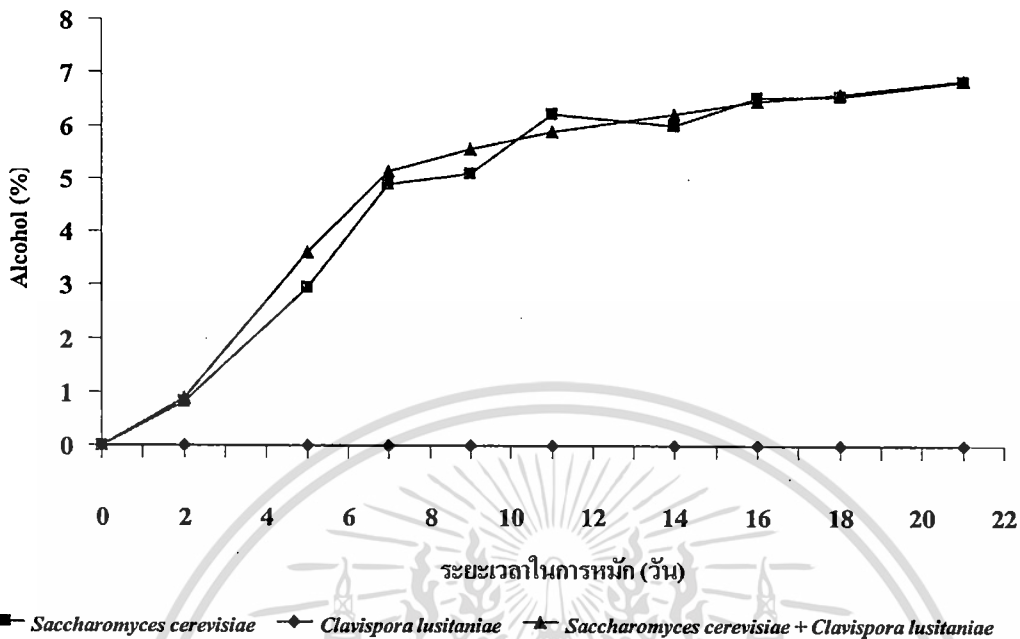
รูปที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงจำนวนของกล้าเชื้อยีสต์และเชื้อยีสต์ปนเปื้อน (*Cla. lusitaniae*) ในระหว่างกระบวนการหมักโดยแยกกระบวนการหมักออกเป็น 2 ช่วง



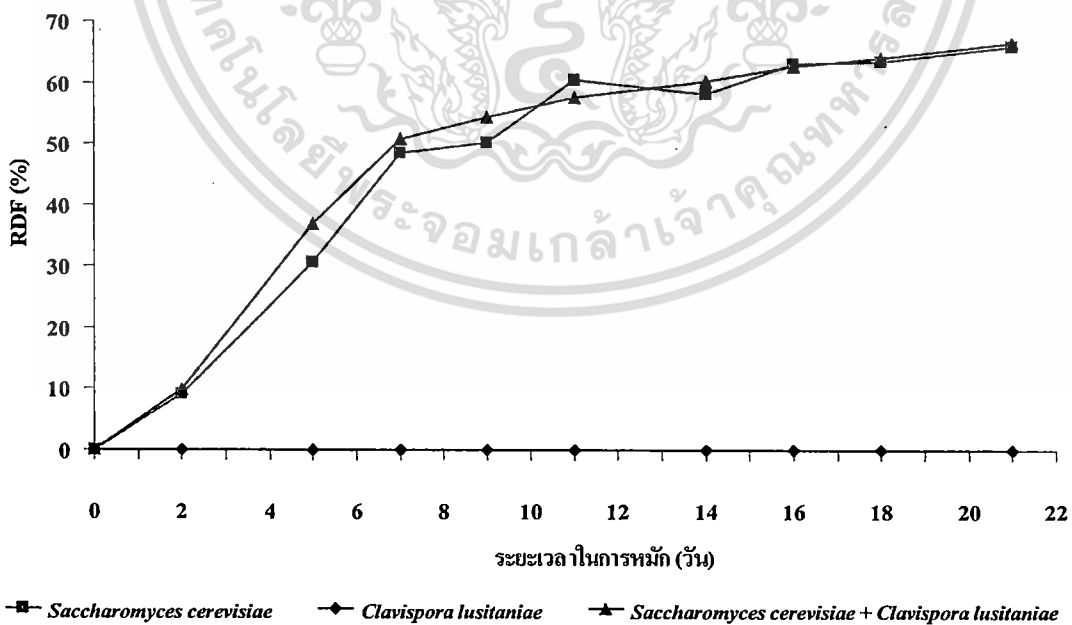
รูปที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงจำนวนของกล้าเชื้อยีสต์และเชื้อยีสต์ปนเปื้อน (*Cl. lusitanae*) ในระหว่างกระบวนการหมักโดยทำการหมักร่วมกันภายใต้ขบวนการเดียวกัน

4.3.2 คุณภาพทางเคมีของเบียร์ที่ได้ระหว่างกระบวนการผลิต

ผลวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์, ปริมาณของแข็งที่ละลาย (Apparent extract), ค่า Real Degree of Fermentation (RDF) และค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่ได้จากกระบวนการหมักเบียร์ จากรูปที่ 4.4 พบว่าเชื้อ *Cl. lusitanae* ไม่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่ใช้กล้าเชื้อยีสต์และผลิตภัณฑ์ที่ใช้กล้าเชื้อยีสต์ที่ปนเปื้อนเชื้อ *Cl. lusitanae* มีปริมาณแอลกอฮอล์ที่ใกล้เคียงกันและเมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิต (fermented beer) เป็นเวลา 21 วันนำผลปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ทดสอบความแตกต่างทางสถิติ (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์โดยกล้าเชื้อยีสต์และกล้าเชื้อยีสต์ที่ปนเปื้อนเชื้อ *Cl. lusitanae* และพบว่าการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในด้านอื่น ๆ ได้แก่ Apparent extract, Real Degree of Fermentation และ pH ดังรูปที่ 4.5-4.7 มีค่าที่ใกล้เคียงกันและมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันตลอดช่วงการหมัก แสดงให้เห็นว่าการปนเปื้อนของยีสต์สายพันธุ์ *Cl. lusitanae* ไม่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการผลิตในแง่คุณภาพทางเคมีของผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักของอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์

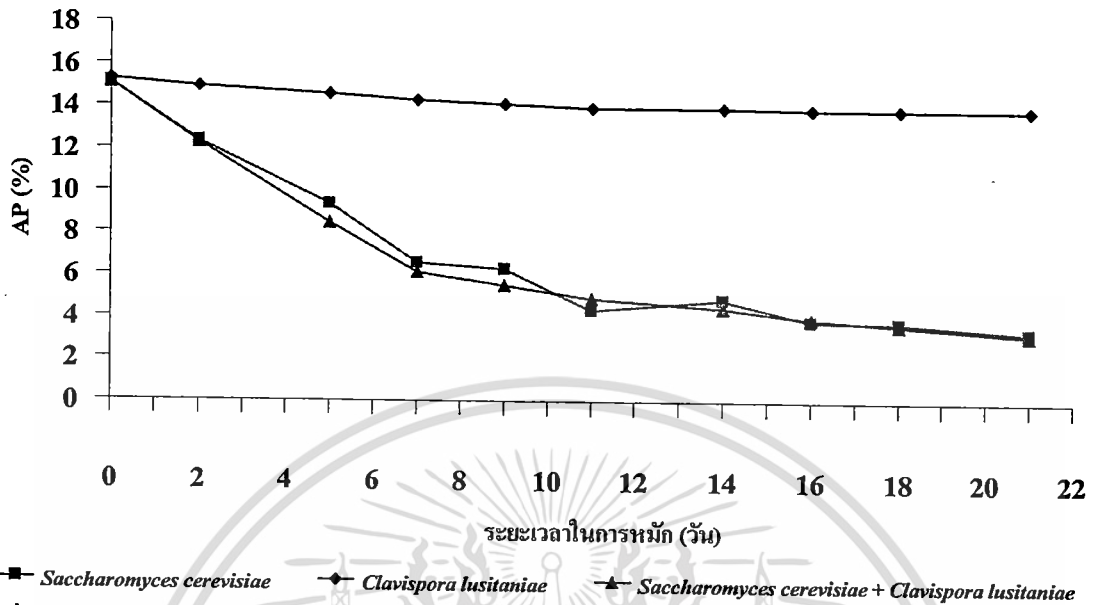


รูปที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงแอลกอฮอล์ ระหว่างกระบวนการหมักเบียร์ในห้องปฏิบัติการ

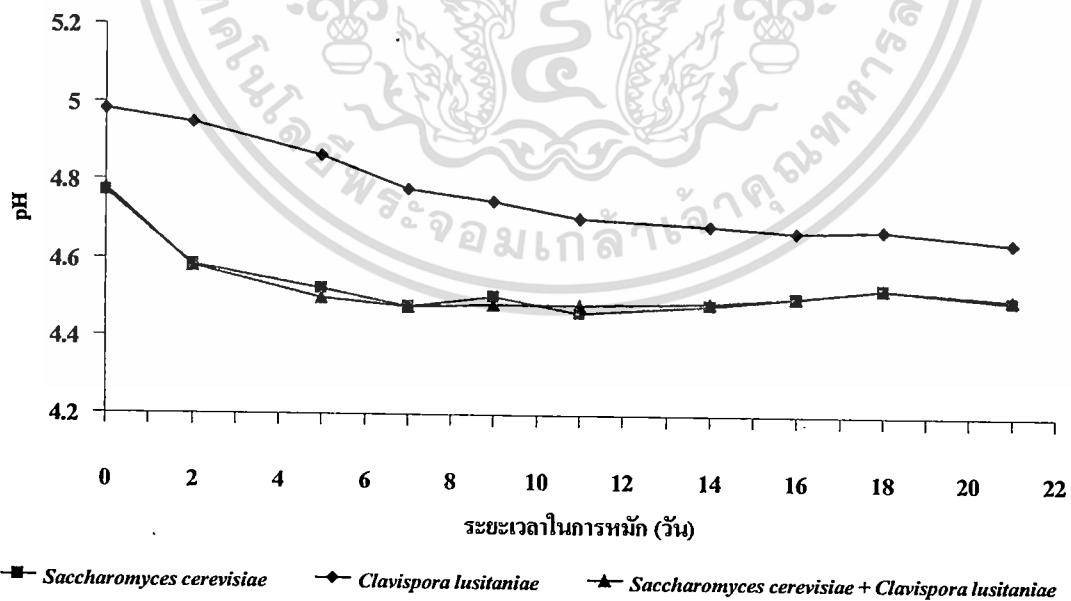


รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงค่า Real Degree of Fermentation ระหว่างกระบวนการหมักเบียร์ในห้องปฏิบัติการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงค่าปริมาณของแข็งที่ละลาย (apparent extract) ระหว่างกระบวนการหมักในห้องปฏิบัติการ

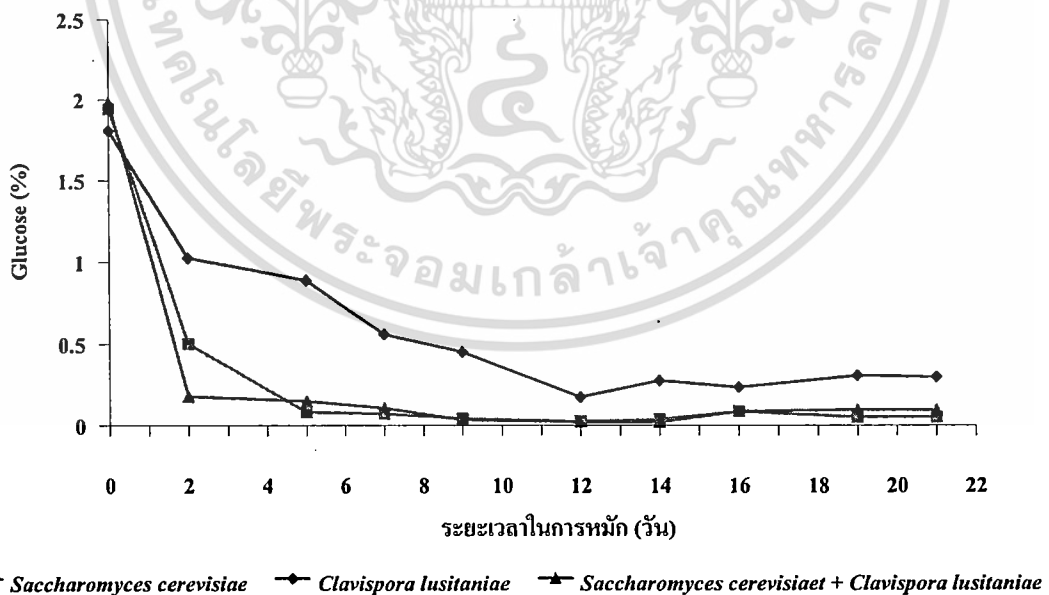


รูปที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงพีเอชระหว่างกระบวนการหมักเบียร์ในห้องปฏิบัติการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

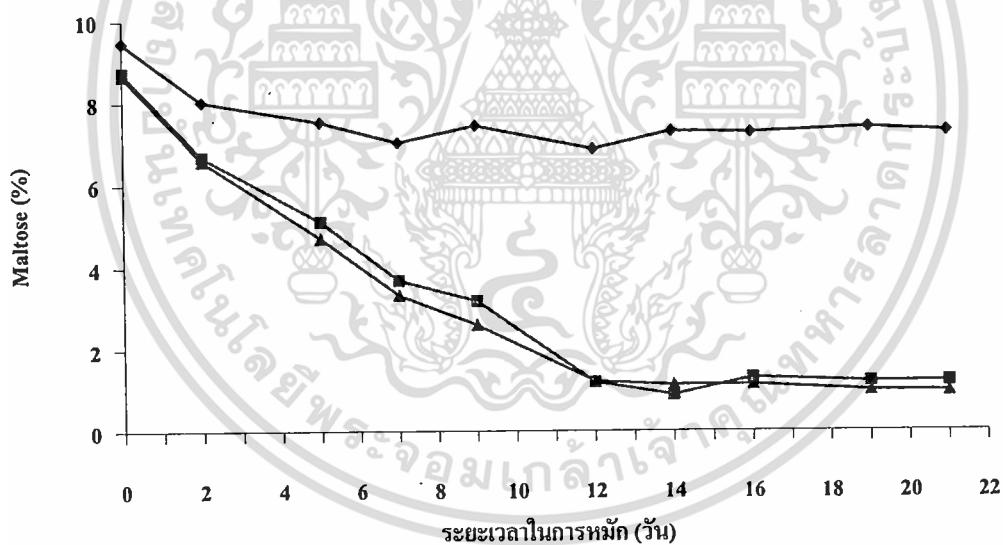
4.3.3 พฤติกรรมการใช้น้ำตาลในเวิร์ทระหว่างกระบวนการหมัก

ทำการศึกษาพฤติกรรมการใช้น้ำตาลกลูโคสระหว่างกระบวนการหมัก โดยเก็บตัวอย่างจากกระบวนการหมักในห้องปฏิบัติการ (fermenting beer) วิเคราะห์ปริมาณกลูโคสที่เหลือในผลิตภัณฑ์โดยใช้เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) พบว่าเชื้อ *Cl. lusitaniae* มีความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคสในเวิร์ทได้ดีเช่นเดียวกับกล้ำเชื้อยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเบียร์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ดังแสดงในรูปที่ 4.8 และเมื่อเปรียบเทียบพฤติกรรมการหมักของกล้ำเชื้อยีสต์และกล้ำเชื้อยีสต์ที่ปนเปื้อนเชื้อ *Cl. lusitaniae* พบว่าพฤติกรรมการหมักมีรูปแบบการหมักที่เหมือนกัน และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิตนำปริมาณกลูโคสที่เหลือในผลิตภัณฑ์ทดสอบความแตกต่างทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์แสดงให้เห็นว่าการปนเปื้อนเชื้อ *Cl. lusitaniae* ไม่ส่งผลให้พฤติกรรมการใช้น้ำตาลกลูโคสเปลี่ยนแปลงไปจากการใช้กล้ำเชื้อยีสต์ที่ไม่ปนเปื้อนเชื้อ *Cl. lusitaniae*



รูปที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลกลูโคสระหว่างกระบวนการหมักเบียร์ในห้องปฏิบัติการ

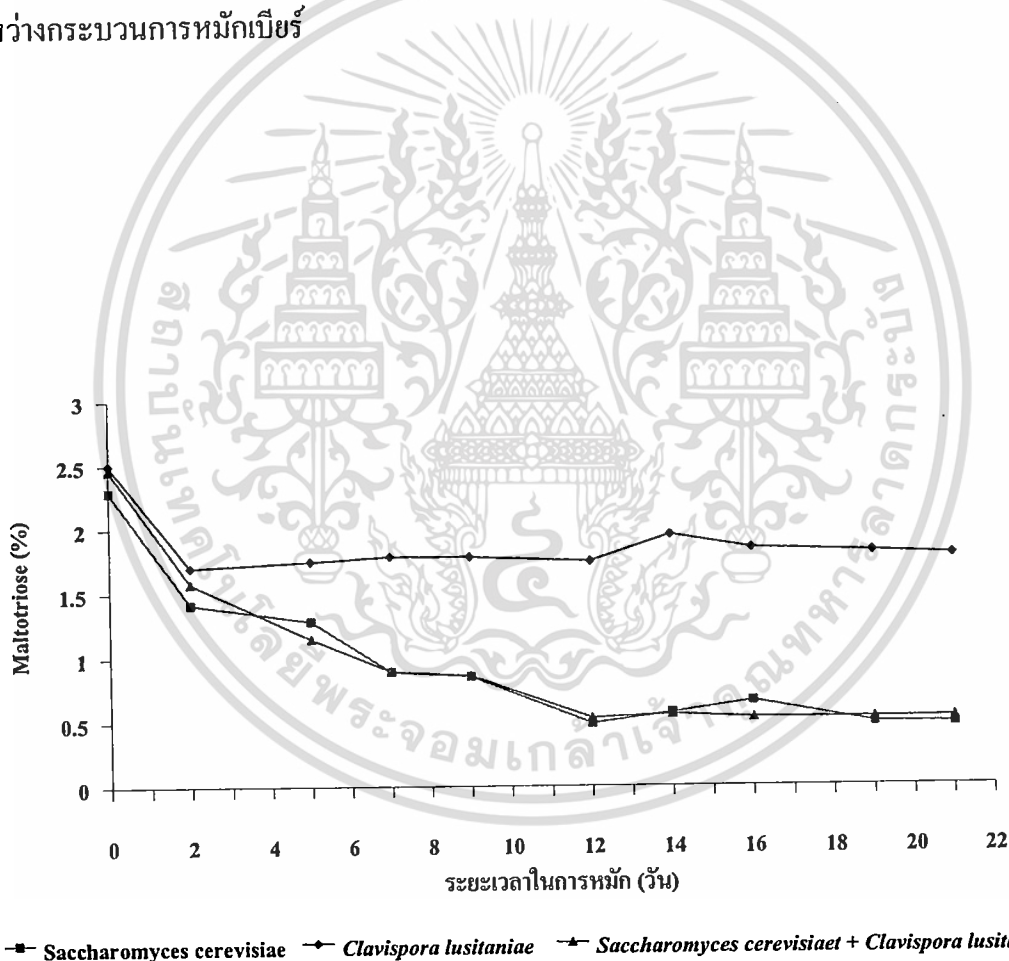
สำหรับการศึกษาการใช้น้ำตาลมอลโตส (maltose) ดังรูปที่ 4.9 พบว่าในระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อ *Cla. lusitaniae* มีการใช้น้ำตาลมอลโตสต่ำกว่าลักษณะกราฟที่ได้มีความชันของกราฟค่อนข้างต่ำ แสดงให้เห็นว่ามีการลดลงของปริมาณมอลโตสอย่างช้า ๆ สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ (Apparent extract) ดังรูปที่ 4.6 มีการลดลงอย่างช้า ๆ เช่นเดียวกัน เนื่องจากในเวิร์ทมีน้ำตาลมอลโตสเป็นองค์ประกอบหลักประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ (Stewart และ Russell, 1998) ดังนั้นการลดลงอย่างช้า ๆ ของน้ำตาลมอลโตสจึงส่งผลต่อการลดลงของปริมาณของแข็งที่ละลายในเวิร์ทเช่นกัน และพบว่าเมื่อเปรียบเทียบปริมาณมอลโตสที่เหลือภายหลังจากกระบวนการหมักระหว่างผลิตภัณฑ์ที่หมักโดยกล้าเชื้อยีสต์ที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *Cla. lusitaniae* และกล้าเชื้อยีสต์ที่ไม่มีการปนเปื้อน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการปนเปื้อนของยีสต์สายพันธุ์ *Cla. lusitaniae* ไม่ส่งผลกระทบต่อพฤติกรรมการใช้น้ำตาลมอลโตส



■ *Saccharomyces cerevisiae* ◆ *Clavispora lusitaniae* ▲ *Saccharomyces cerevisiae* + *Clavispora lusitaniae*

รูปที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลมอลโตสระหว่างกระบวนการหมักเบียร์ในห้องปฏิบัติการ

สำหรับการศึกษาการใช้น้ำตาลมอลโตไตรโอส (maltotriose) ดังรูปที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลมอลโตไตรโอสระหว่างกระบวนการหมักพบว่าเชื้อ *Cl. lusitaniae* มีคุณสมบัติในการใช้น้ำตาลมอลโตไตรโอสในช่วง 2 วันแรกของกระบวนการหมัก สังเกตได้จากกราฟภายหลังจากวันที่ 2 ไม่มีการใช้น้ำตาลมอลโตไตรโอสตลอดระยะเวลาในการหมัก และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณมอลโตไตรโอสที่เหลือภายหลังกระบวนการหมัก ระหว่างใช้กล้าเชื้อยีสต์ที่ปนเปื้อน *Cl. lusitaniae* และกล้าเชื้อยีสต์ที่ไม่มีการปนเปื้อน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการปนเปื้อนของยีสต์สายพันธุ์ *Cl. Lusitaniae* ไม่ส่งผลกระทบต่อพฤติกรรมการณ์การใช้น้ำตาลมอลโตไตรโอสในระหว่างกระบวนการหมักเบียร์



รูปที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงของน้ำน้ำตาลมอลโตไตรโอสระหว่างกระบวนการหมักเบียร์ในห้องปฏิบัติการ

4.3.4 คุณภาพทางประสาทสัมผัส และการกลิ่นรสของเบียร์ที่ได้ระหว่างกระบวนการหมัก

การทดสอบชิมแบบ Triangle test เพื่อเปรียบเทียบกลิ่นรสระหว่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักเบียร์โดยกล้าเชื้อยีสต์และกล้าเชื้อที่ปนเปื้อนเชื้อยีสต์ (*Cla. lusitaniae*) โดยผู้เชี่ยวชาญทั้งหมด 14 คน จัดตัวอย่างสำหรับการทดสอบ 2 แบบดังรูปที่ 4.11

แบบที่ 1 ตัวอย่างแก้วที่ 1 และ 2 เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก กล้าเชื้อ + ยีสต์ปนเปื้อน และแก้วที่ 3 เป็นผลิตภัณฑ์ที่หมักโดยกล้าเชื้อยีสต์

แบบที่ 2 ตัวอย่างแก้วที่ 1 และ 2 เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกล้าเชื้อยีสต์ และแก้วที่ 3 เป็นผลิตภัณฑ์ที่หมักโดย กล้าเชื้อ + ยีสต์ปนเปื้อน



รูปที่ 4.11 รูปแบบการชิมแบบ triangle

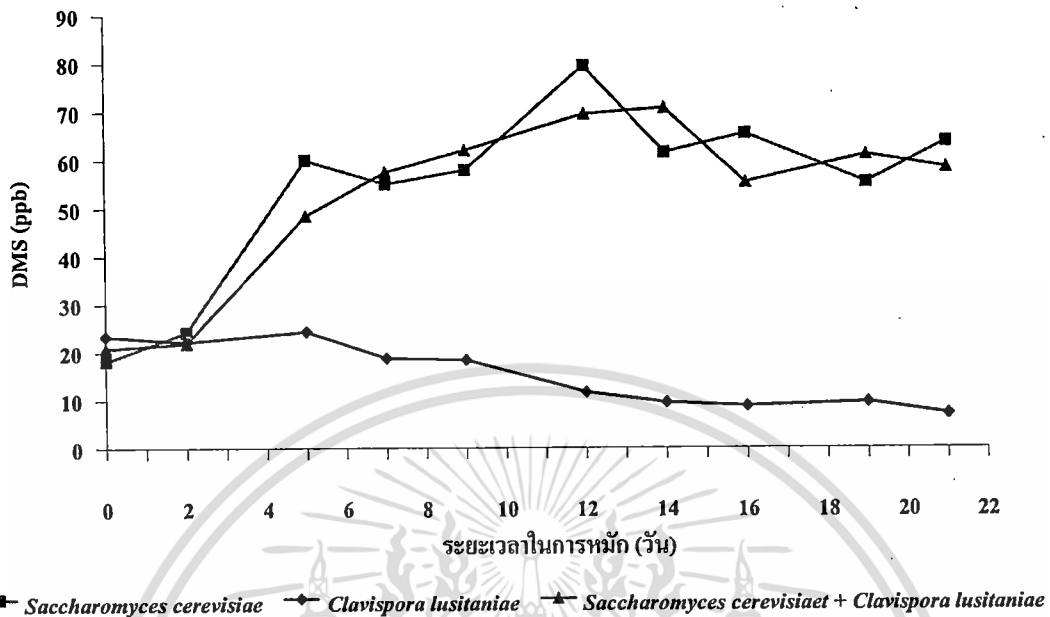
โดยให้ผู้ชิม 7 คนได้รับตัวอย่างแบบที่ 1 และผู้ชิมอีก 7 คนได้รับตัวอย่างแบบที่ 2 (ไม่แจ้งให้ทราบถึงลักษณะการเตรียมตัวอย่างทั้ง 2 แบบ) รวมจำนวนผู้ทดสอบชิมทั้งหมด 14 คน พบว่ามีผู้ทดสอบชิมสามารถแยกความแตกต่างได้ทั้งหมด 5 คน เมื่อนำค่าที่ได้จากผู้ทดสอบทั้งหมด ที่สามารถแยกความแตกต่างได้ (5 คน) ไปเปิดตารางที่ 3.1 พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์กลิ่นที่ได้ระหว่างกระบวนการหมัก โดยเครื่อง GC พบว่ามีค่าที่ใกล้เคียงกันส่งผลให้ผู้ชิมไม่สามารถแยกความแตกต่างได้

4.3.5 การเกิดกลิ่นของเบียร์ระหว่างกระบวนการหมัก

1. กลุ่ม Sulphur compounds

Dimethyl sulfide (DMS) จัดอยู่ในกลุ่ม sulphur compounds เป็นกลิ่นที่มักพบในเบียร์ลาเกอร์มีค่าอยู่ในช่วง 30- 100 ppb (Boulton and Quain, 2006) ในระหว่างกระบวนการหมักการมี Dimethyl sulfide ในปริมาณที่มากเกินไป 100 ppb จะทำให้เกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ในเบียร์ ทำให้เบียร์มีกลิ่นคล้ายผักต้ม หรือกลิ่นข้าวโพดต้มและจากการศึกษาการเกิด DMS ในระหว่างกระบวนการหมักที่เกิดจากการหมักตัวอย่างเบียร์ลาเกอร์ที่มียีสต์ *Cl. lusitaniae* ตัวอย่างเบียร์ลาเกอร์ที่มียีสต์สายพันธุ์ที่เป็นกล้าเชื้อในการหมักเบียร์ และตัวอย่างเบียร์ลาเกอร์ที่มียีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ร่วมอยู่ในการหมักดังรูป 4.12 พบว่ากลิ่น DMS ระหว่างกระบวนการผลิตโดยใช้เชื้อ *Cl. lusitaniae* มีค่าอยู่ในช่วง 0-40 ppb มีค่าที่ค่อนข้างต่ำ และเมื่อพิจารณากลิ่นที่ได้จากการหมักโดยกล้าเชื้อยีสต์และกล้าเชื้อยีสต์ที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *Cl. lusitaniae* พบว่าค่า DMS อยู่ในช่วง 10-90 ppb เมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิตนำผลวิเคราะห์ที่ได้วิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์แสดงให้เห็นว่าการปนเปื้อนเชื้อ *Cl. lusitaniae* ไม่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการผลิตในแง่การเพิ่มขึ้นของกลิ่น DMS ซึ่งเป็นกลิ่นไม่พึงประสงค์ในเบียร์

โดยปกติการเกิดกลิ่น DMS เกิดได้จาก 2 กระบวนการคือ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ S-methyl-methionine ไปสู่ DMS โดยความร้อน และกระบวนการเปลี่ยนสาร dimethylsulfoxide (DMSO) ไปเป็น DMS ผ่านกระบวนการ catalysed โดยยีสต์ จากรายงานของ Amnes และ Bamforth (1982) ทำการศึกษาโดยการเปรียบเทียบความสามารถในการเปลี่ยนสาร dimethylsulfoxide (DMSO) ไปสู่ DMS โดยยีสต์ 2 สายพันธุ์ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Sac. uvarum* พบว่า สายพันธุ์ *Sac. cerevisiae* สามารถเปลี่ยน dimethylsulfoxide (DMSO) ไปสู่ DMS ได้ดีกว่า ทั้งนี้ยีสต์สายพันธุ์ *Sac. cerevisiae* คือสายพันธุ์ที่ใช้ผลิตเบียร์ลาเกอร์ในปัจจุบัน จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ให้กลิ่น DMS ที่มีปริมาณสูง

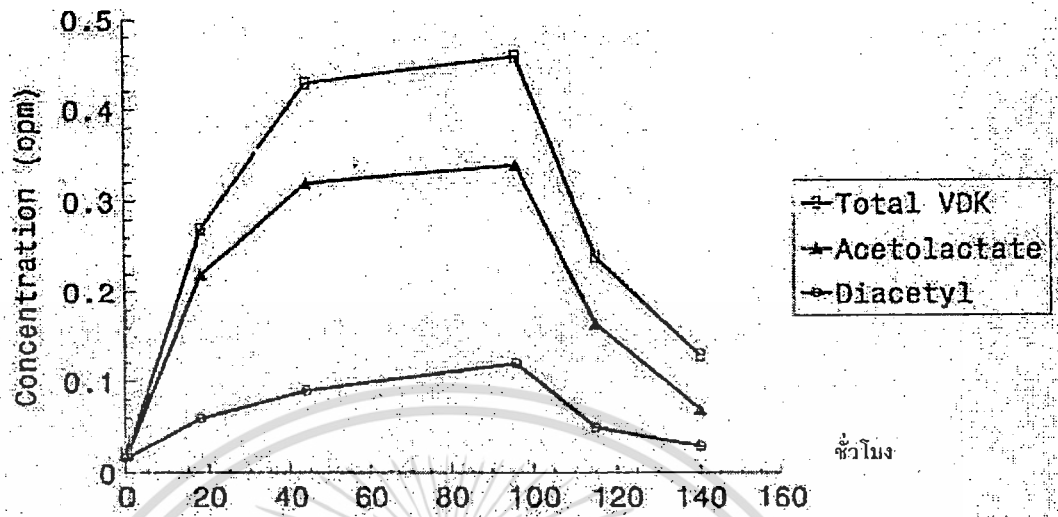


รูปที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงกลิ่น DMS ระหว่างกระบวนการหมักเบียร์ในห้องปฏิบัติการ

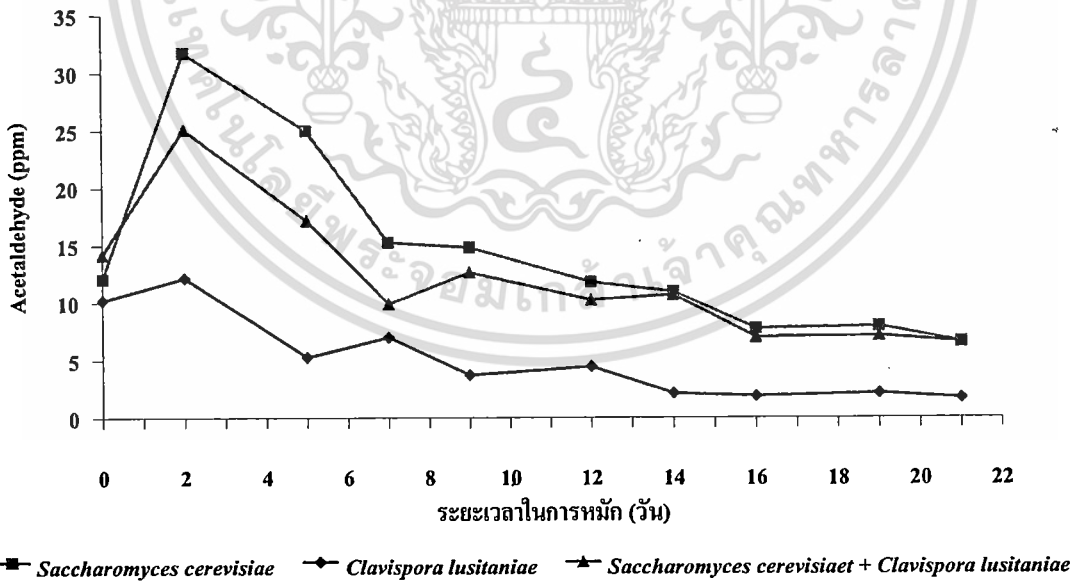
2. กลุ่ม Carbonyl compounds

กลุ่ม Carbonyl compounds ประกอบด้วยกลิ่นที่สำคัญได้แก่ Acetaldehyde และ vicinal diketone (VDK)

สำหรับกลิ่น Acetaldehyde เป็นกลิ่นที่มีค่า threshold ต่ำกว่ากลิ่นแอลกอฮอล์ที่ได้ระหว่างกระบวนการผลิต เป็นกลิ่นที่ไม่ต้องการในผลิตภัณฑ์เบียร์ให้กลิ่นที่หลากหลายเช่น กลิ่นแอปเปิ้ลเขียว กลิ่นหญ้า (Grassy) กลิ่นผลไม้ (fruity) และกลิ่นกระดาษ (cardboard) โดยปกติมีค่า threshold ประมาณ 10-20 ppm (Boulton and Quain, 2006) กลิ่น Acetaldehyde จะเกิดในช่วงเริ่มต้นของกระบวนการหมักดังรูปที่ 4.13 เป็นช่วงการเจริญเติบโตของยีสต์และจะเริ่มลดลงภายหลังช่วง stationary phase สอดคล้องกับผลการทดลองดังรูปที่ 4.14 ซึ่งจะเห็นว่าในช่วงต้นของกระบวนการหมักจะมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ Acetaldehyde และให้ค่าสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง และจะค่อย ๆ ลดลงในผลิตภัณฑ์ที่หมักด้วยกล้ายีสต์ปกติและผลิตภัณฑ์ที่หมักด้วยกล้ายีสต์ปนเปื้อนเชื้อ *Clavispora lusitaniae* และในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อ *Cl. lusitaniae* เพียงอย่างเดียวมีปริมาณ Acetaldehyde ในระดับที่ต่ำกว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0-15 ppm จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการปนเปื้อนเชื้อ *Cl. lusitaniae* ไม่ส่งผลกระทบต่อ การเพิ่มขึ้นของกลิ่น Acetaldehyde ในระหว่างกระบวนการหมักเบียร์



รูปที่ 4.13 กระบวนการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นในกลุ่ม Carbonyl compounds ระหว่างกระบวนการหมักเบียร์
 ที่มา : Boultonm and Quain (2006)

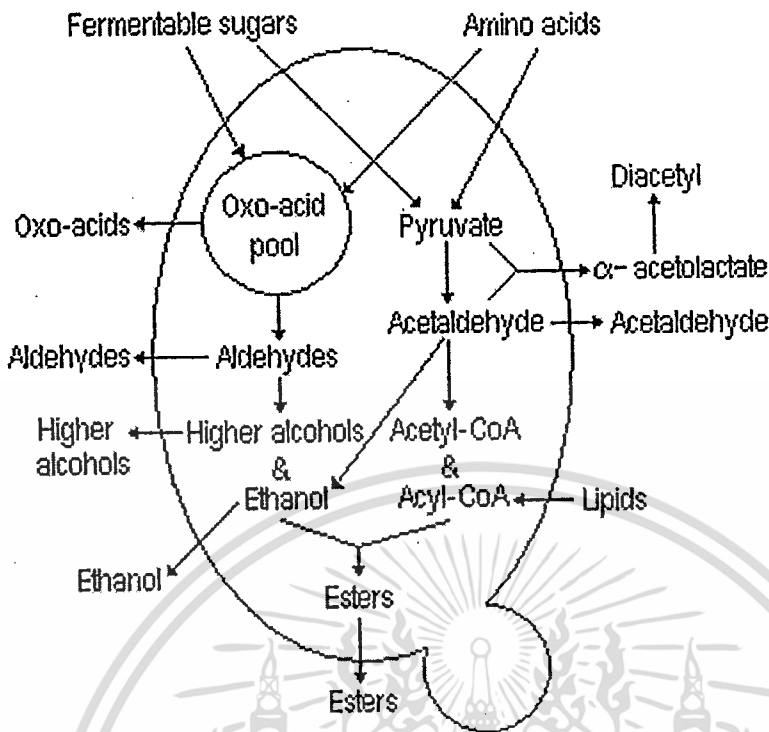


รูปที่ 4.14 การเปลี่ยนแปลงกลิ่น Acetaldehyde ระหว่างกระบวนการหมักเบียร์ในห้องปฏิบัติการ

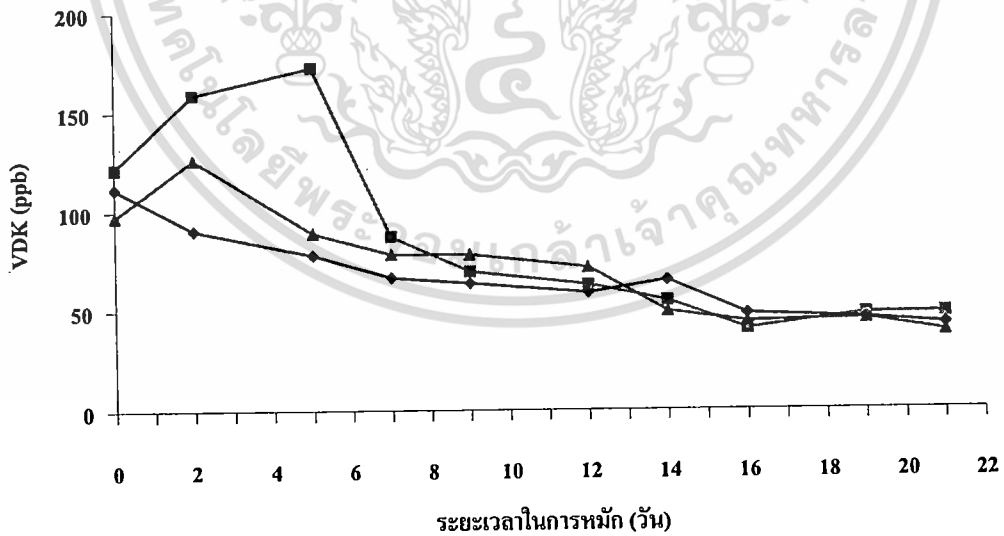
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับกลิ่น Vicinal diketone (VDK) ประกอบด้วย 2 กลิ่น คือ diacetyl และ 2,3-pentanedione ให้กลิ่นเนย เป็นกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ในเบียร์ VDK และยังเป็นกลิ่นที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการผลิตเนื่องจากกลิ่นดังกล่าวจะมี threshold ค่อนข้างต่ำ ประมาณ 0.9-0.15 ppm (Boulton and Quai, 2006) ดังนั้นกระบวนการผลิตจำเป็นต้องควบคุมเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ VDK ที่ค่อนข้างต่ำเพื่อให้มั่นใจได้ว่าผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะมีปริมาณ VDK ต่ำกว่า threshold ที่มนุษย์สามารถได้รับกลิ่น

ควบคุมผ่านกิจกรรมทางชีวเคมีของยีสต์โดยปกติแล้วในช่วงเริ่มต้นของกระบวนการผลิต ยีสต์จะปลดปล่อย VDK ออกมาภายนอกเซลล์ ดังรูปที่ 4.15 ทำให้ค่า VDK สูงในช่วงต้นของกระบวนการผลิต ดังรูปที่ 4.13 และเมื่อระยะเวลาผ่านไปยีสต์เริ่มขาดสารอาหารและมีการนำสารในกลุ่ม VDK กลับไปใช้เพื่อดำรงชีวิตอีกครั้งทำให้ค่า VDK ลดลง จากกิจกรรมดังกล่าวจึงมีการนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการโดยร่อนกระทั่งได้ค่า VDK ต่ำกว่าค่า threshold เพื่อยุติกระบวนการผลิตในแต่ละ batch จากผลการทดลอง รูปที่ 4.16 พบว่าค่า VDK ที่วัดได้จากเบียร์ที่ใช้กล้าเชื้อยีสต์ และเบียร์ที่ใช้กล้าเชื้อยีสต์ที่ปนเปื้อนเชื้อ *Cl. lusitaniae* พบว่า มีค่าที่สูงในช่วงแรกของการหมัก (วันที่ 0 และวันที่ 2) สอดคล้องตามทฤษฎีที่กล่าวมาแล้วข้างต้นและลดลงอย่างต่อเนื่องภายหลังวันที่ 2 และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง ค่า VDK ที่ได้จากยีสต์ทั้ง 2 โดยเปรียบเทียบค่าสำหรับวันสุดท้ายของกระบวนการผลิต พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการเนื่องจากค่า VDK ที่ได้จากกระบวนการหมัก มีค่า Threshold ต่ำกว่า threshold ที่สามารถรู้สึกได้



รูปที่ 4.15 กระบวนการเกิดกลิ่นผ่านกระบวนการ metabolism ของยีสต์
ที่มา : Brányik และคณะ (2008)



■ *Saccharomyces cerevisiae* ◆ *Clavispora lusitanae* ▲ *Saccharomyces cerevisiae* + *Clavispora lusitanae*

รูปที่ 4.16 การเปลี่ยนแปลงกลิ่น VDK ระหว่างกระบวนการหมักเบียร์ในห้องปฏิบัติการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. กลุ่ม ester

Ester เป็นกลิ่นที่มีบทบาทสำคัญในเบียร์ กลิ่นที่ได้เกิดจากกระบวนการ metabolism ของยีสต์ให้กลิ่นรสผลไม้ (fruity) และกลิ่นดอกไม้ (floral) กลิ่นในกลุ่ม ester ประกอบด้วยกลิ่นที่สำคัญได้แก่ Ethyl acetate, isoamylacetate และ ethyl hexanoate ปริมาณความเข้มข้นของสารที่มักพบในปริมาณที่แตกต่างกันในผลิตภัณฑ์เบียร์ ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ปริมาณความเข้มข้นของกลิ่นกลุ่ม Ester ในผลิตภัณฑ์เบียร์

Ester	Concentration (ppm)
Ethyl acetate	8-12
Isoamylacetate	1-1.5
Ethyl hexanoate	0.12-0.18

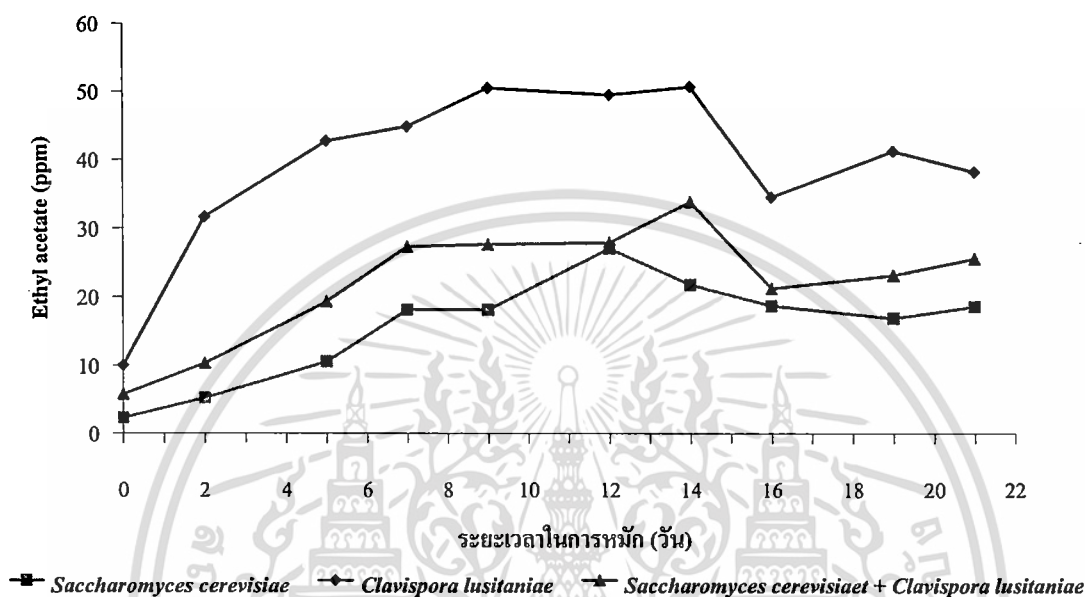
ที่มา : ดัดแปลงจาก Boultonm and Quain (2006)

Ethyl acetate ให้กลิ่นผลไม้ (Fruity) และกลิ่นสารทำละลาย (Solvent) จากผลการทดลองรูปที่ 4.17 จะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ซึ่งหมักโดยใช้เชื้อ *Clavispora lusitaniae* มีความเข้มข้นของกลิ่น Ethyl acetate ในปริมาณที่สูงสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Mingorange-Cazorla และคณะ (2003) ทำการศึกษาผลของการใช้ยีสต์ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติต่อการผลิตกลิ่น ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ พบว่ายีสต์สายพันธุ์ *Cla. lusitaniae* สามารถให้กลิ่น Ethyl acetate ในปริมาณที่สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์อื่น ๆ และส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่หมักโดยกล้าเชื้อยีสต์ปนเปื้อนเชื้อ *Cla. lusitaniae* มีปริมาณของ Ethyl acetate สูงด้วยเช่นกัน แต่ความเข้มข้นของ Ethyl acetate ต่ำกว่าการหมักโดยใช้เชื้อ *Cla. lusitaniae* เพียงสายพันธุ์เดียวตลอดช่วงเวลาในการหมัก เป็นผลมาจากระหว่างกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อ *Cla. lusitaniae* มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นในปริมาณที่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักโดยกล้าเชื้อยีสต์ที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *Cla. lusitaniae* สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Ranger และคณะ (1992) ทำการศึกษาผลของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเกิดกลิ่นในระหว่างกระบวนการหมักเบียร์พบว่าความเข้มข้นของ Ethyl acetate ลดลงเมื่อมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูง แสดงให้เห็นว่าการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากยีสต์ซึ่งใช้เป็นกล้าเชื้อมีผลทำให้การผลิตกลิ่น Ethyl acetate ได้น้อยกว่า

จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการปนเปื้อนเชื้อ *Cla. lusitaniae* ในกระบวนการผลิตจะส่งผลในแง่บวกต่อการเพิ่มกลิ่นของ Ethyl acetate เป็นกลิ่นที่เพิ่มคุณลักษณะเด่นในเบียร์

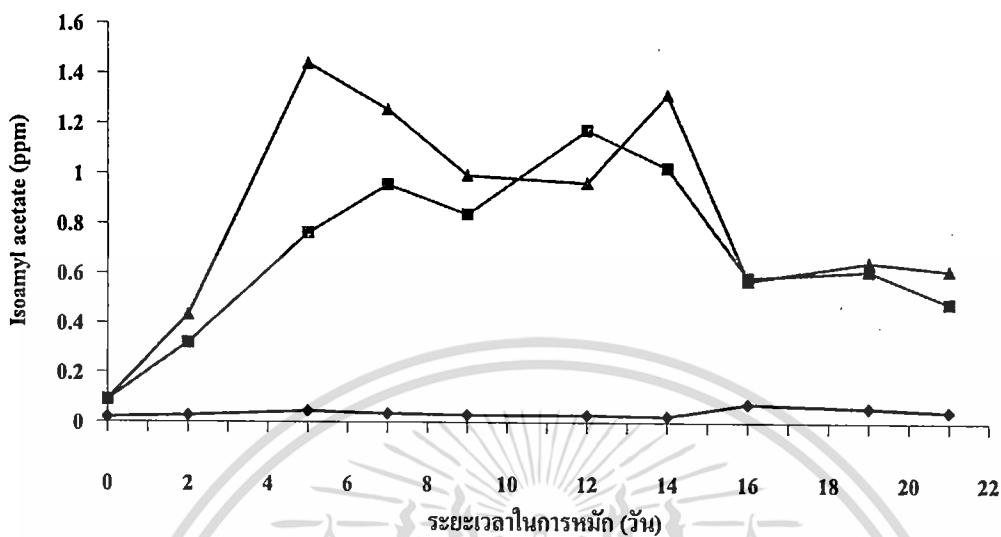
แต่อย่างไรก็ตามคุณสมบัติที่ดีดังกล่าวจะต้องนำไปพิจารณาร่วมกับผลในเชิงคุณภาพด้านอื่น ๆ โดยไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวมว่าถ้ามีการปนเปื้อนของเชื้อสายพันธุ์ที่ว่านี้ในขณะหมักเบียร์ลาเกอร์ จะส่งผลทางด้านบวกหรือลบต่อผลิตภัณฑ์อีกครั้งหนึ่ง



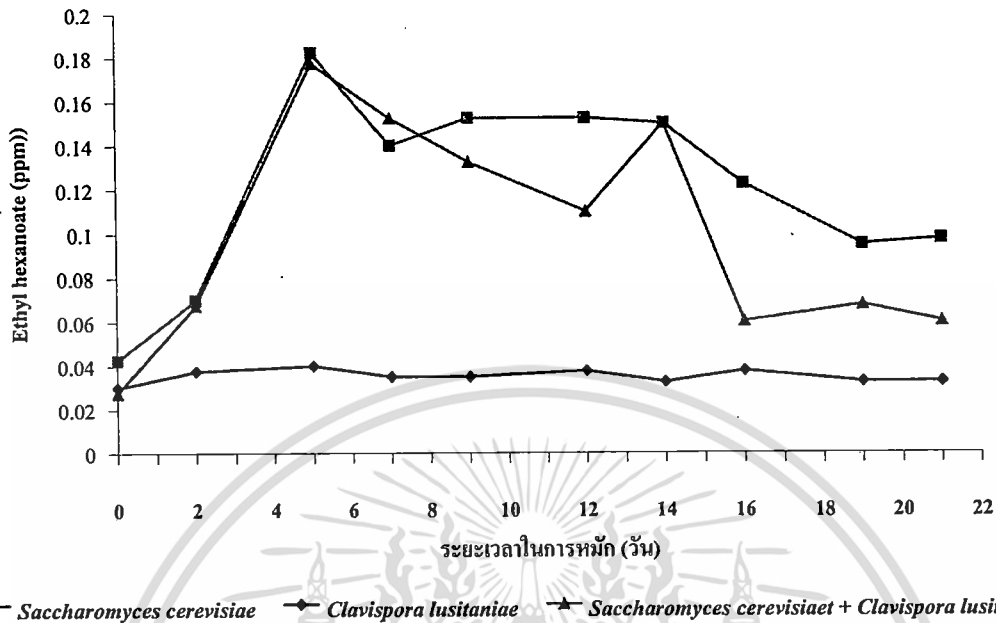
รูปที่ 4.17 การเปลี่ยนแปลงกลิ่น Ethyl acetate ระหว่างกระบวนการหมักเบียร์ในห้องปฏิบัติการ

Isoamylacetate ให้กลิ่น กล้วย (Banana) กลิ่นผลไม้ (Fruity) เป็นกลิ่นที่มีปรากฏในเบียร์ทุกชนิดมีความสำคัญต่อคุณลักษณะของเบียร์ โดยปกติแล้วจะมีความเข้มข้นประมาณ 1.0 – 1.5 ppm (Boultonm and Quain, 2006) จากผลการทดลองรูปที่ 4.18 พบว่ายีสต์สายพันธุ์ *Clavispora lusitaniae* ให้กลิ่น Isoamylacetate ในระดับที่ต่ำอยู่ในช่วง 0-0.2 ppm และเมื่อนำยีสต์มาหมักร่วมกับกล้าเชื้อยีสต์และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่า Isoamylacetate ที่ได้กับผลิตภัณฑ์ที่หมักโดยกล้าเชื้อพบว่าผลิตภัณฑ์เบียร์ที่ได้จากกระบวนการหมัก (Fermented beer) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์แสดงให้เห็นว่าการปนเปื้อนเชื้อ *Clavispora lusitaniae* ไม่ส่งผลกระทบต่อพฤติกรรมการสร้างกลิ่น Isoamylacetate และยังคงให้ผลิตภัณฑ์ซึ่งมีเอกลักษณ์เหมือนเดิม



รูปที่ 4.18 การเปลี่ยนแปลงกลิ่น Isoamylacetate ระหว่างกระบวนการหมักเบียร์ในห้องปฏิบัติการ

Ethyl hexanoate ให้กลิ่นแอปเปิลแดง (apple) เป็นกลิ่นที่มีปรากฏในเบียร์ทุกชนิด มีความสำคัญต่อคุณลักษณะของเบียร์แต่ละชนิด โดยปกติแล้วจะมีความเข้มข้นประมาณ 0.12-0.18 ppm (Boulton and Quain, 2006) กลิ่น Ethyl hexanoate ให้กลิ่นที่ไม่ต้องการถ้ามีปริมาณที่สูงจนเกินไป จากผลการทดลองรูปที่ 4.19 พบว่ายีสต์สายพันธุ์ *Clavispora lusitanae* ให้กลิ่น Ethyl hexanoate ในระดับที่ต่ำอยู่ในช่วง 0-0.06 ppm และจากผลการหมักโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ที่ปนเปื้อนเชื้อ *Cla. lusitanae* พบว่าให้ค่ากลิ่น Ethyl hexanoate ใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ที่ใช้กล้าเชื้อยีสต์ที่ไม่มี การปนเปื้อนในการหมัก แสดงให้เห็นว่าการปนเปื้อนจากเชื้อดังกล่าวไม่ส่งผลกระทบต่อค่าให้กลิ่น Ethyl hexanoate



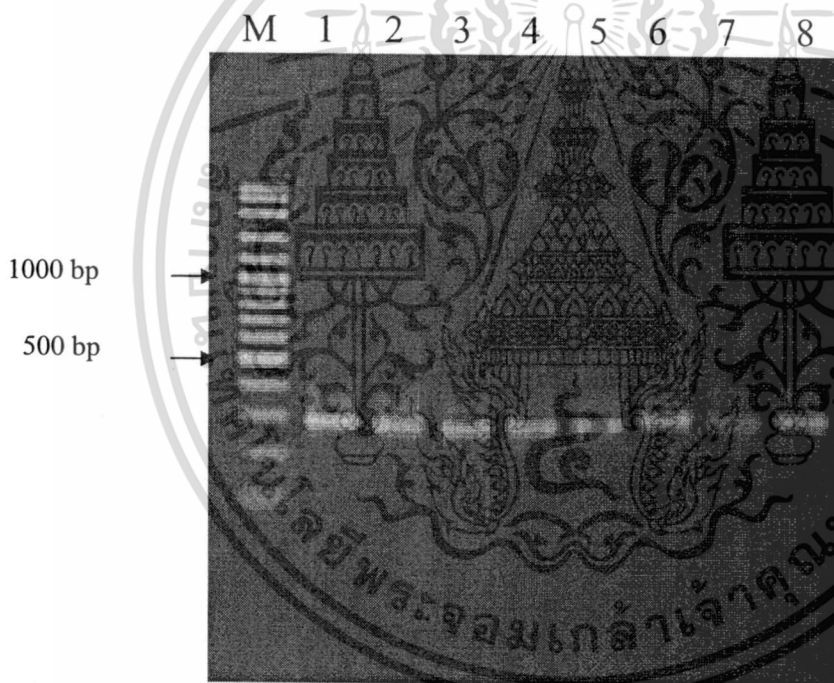
รูปที่ 4.19 การเปลี่ยนแปลงกลิ่น Ethyl hexanoate ระหว่างกระบวนการหมักเบียร์ในห้องปฏิบัติการ

4.4 การประยุกต์ใช้เทคนิค PCR-DGGE ในกระบวนการผลิตเบียร์

4.4.1 เปรียบเทียบความแตกต่างของยีสต์ที่คัดแยกได้กับกล้าเชื้อยีสต์โดยวิธี PCR-DGGE

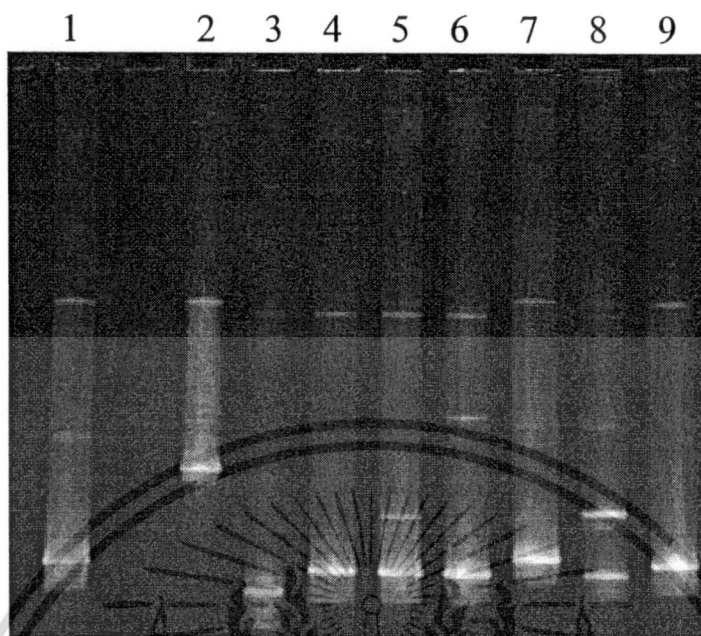
จากการจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตเบียร์ สามารถคัดแยกได้จำนวน 21 สายพันธุ์ โดยมีสายพันธุ์ต่าง ๆ ดังนี้ *Clavispora lusitanae* คิดเป็น 33 เปอร์เซ็นต์ พบการปนเปื้อนสายพันธุ์ *Candida pararugosa* และ *Pichia spartinae* 19 เปอร์เซ็นต์, *Saccharomyces cerevisiae* 10 เปอร์เซ็นต์, *Candida intermedia*, *Candida orthopsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa* และ *Trichosporon ovoides* คิดเป็นสายพันธุ์ละ 5 เปอร์เซ็นต์ และทำการศึกษาค้นคว้าโดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อยีสต์ปนเปื้อนบริสุทธิ์จำนวน 8 สายพันธุ์และกล้าเชื้อยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA gene โดยใช้ไพรเมอร์ NL1 + GC (5'-CGCCCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') และ LS2 (5'-ATTCCCAAACAACACTCGACTC-3') จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ไปวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ดังรูปที่ 4.20 ทำการแยกผลผลิต PCR ที่ได้โดย PCR-DGGE บนอะคลิลาไมด์เจลดังรูปที่ 4.21 พบว่า PCR-DGGE สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อยีสต์ปนเปื้อนสายพันธุ์ *Pichia spartina*, *Cla. lusitani*, *Trichosporon ovoides*, *C. orthopsilosis* ออกจากกล้าเชื้อยีสต์ *Sac. cerevisiae* ในขณะที่ยีสต์ปนเปื้อนสายพันธุ์ *C. intermedia*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *C. pararugosa* ถึงแม้จะมีความ

แตกต่างกันกับกล้าเชื้อยีสต์ในระดับจีโนม พบว่ายังไม่สามารถแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน ที่ความเข้มข้นของ denaturant 30-50 เปอร์เซ็นต์ จำเป็นต้องลดปรับเปอร์เซ็นต์ของ denaturant ลง เพื่อให้สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนมากขึ้น นอกจากนี้พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ *Sac. cerevisiae* (lane10) ออกจากกล้าเชื้อยีสต์ *Sac. cerevisiae* (lane 1) เนื่องจากยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์มีความเหมือนกันในระดับสปีชีส์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Cocolin และคณะ (2002) ไม่สามารถนำลำดับเบสบริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA gene เพื่อใช้ในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ *Sac. cerevisiae* ได้เนื่องจากยีสต์ที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันมีการจัดเรียงตัวของลำดับเบสในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA เหมือนกันทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอบนอะคริลลาไมด์เจล เคลื่อนที่ไปอยู่ในตำแหน่งเดียวกัน จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างได้



รูปที่ 4.20 เป็นแถบดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ บริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA gene แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรส เจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 45 นาที ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ โดย lane M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder และ lane1 คือดีเอ็นเอผลผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ *Pichia spartinae*; lane 2, *Clavispora lusitaniae*; lane 3, *C. intermedia*; lane 4, *Rhodotorula mucilaginosa*; lane 5, *C. pararugosa*; lane 6, *Trichosporon ovoides*; lane 7, *C. orthopsilosis*; lane 8, *Sac. cerevisiae* (wild yeast)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.21 เป็นแถบดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ บริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA gene แล้ว นำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสบนโพลีอะครีลาไมด์เจล ความเข้มข้น denaturant 30-50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4.5 ชั่วโมงที่ความต่างศักย์ 150 โวลต์ และ lane 1, *Sac. cerevisiae* (Brewer yeast); Lane 2, *Pichia spartinae*; lane3, *Cla. lusitaniae*; lane 4, *C. intermedia*; lane 5, *Rhodotorula mucilaginosa*; lane 6, *C. pararugosa*; lane 7, *Trichosporon ovoides*; lane 8, *C. orthopsilosis*; lane 9, *Sac. cerevisiae* (wild yeast)

4.4.2 การตรวจติดตามการปนเปื้อนเชื้อ *Cla. lusitaniae* ในระหว่างกระบวนการหมัก

ทดสอบความสามารถในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนเชื้อ *Cla. lusitaniae* กรณีที่มีการปนเปื้อนในกระบวนการผลิตโดยการเติมเชื้อ *Cla. lusitaniae* ในกระบวนการหมักประมาณ 1.0×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร (มีการปนเปื้อนในกระบวนการประมาณ 50,000 เซลล์/มิลลิลิตร) และใช้กลีเซอรีนประมาณ 1.2×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร และทำการเก็บตัวอย่างในระหว่างกระบวนการหมักวันที่ 0, 2, 5, 7, 9, 12, 14 และ 21 วัน จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอของเชื้อผสมในแต่ละวัน และทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA gene โดยใช้ไพรเมอร์ NL1+ GC (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') และ LS2 (5'-ATTCCCAAACAACACTCGACTC-3') จากนั้นนำผลผลิต PCR วิเคราะห์บนวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ดังรูปที่ 4.22 ทำการแยกดีเอ็นเอที่โดย PCR-DGGE ดังแสดงผลในรูปที่ 4.23 พบว่า PCR-DGGE สามารถแยกความแตกต่างของกลีเซอรีน (*Saccharomyces cerevisiae*) และ เชื้อ *Cla. lusitaniae* ได้บนอะครีลาไมด์เจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

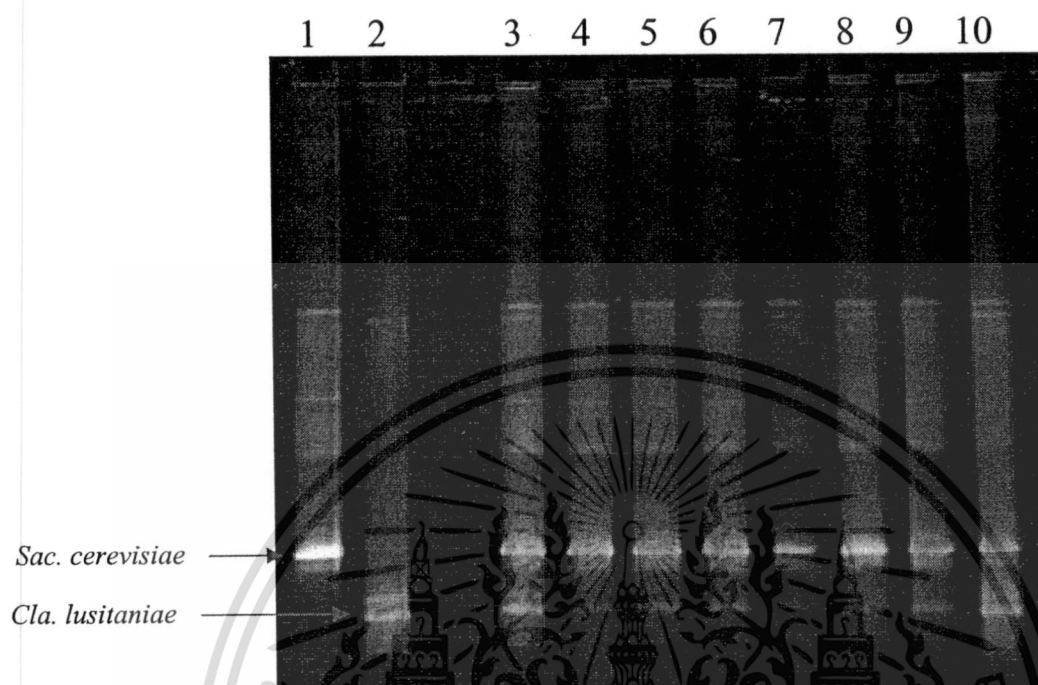
สอดคล้องกับ Cocolin และคณะ (2000) ทำการทดสอบการติดตามกระบวนการหมักไวน์โดยการเติมเชื้อ 4 ชนิด พบว่าสามารถแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจนโดยเทคนิค PCR-DGGE เช่นกัน

จากข้อมูลที่ได้จะเห็นได้ว่าการประยุกต์ใช้เทคนิค PCR-DGGE สามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจติดตามและเฝ้าระวังการปนเปื้อนเชื้อ *Cl. lusitaniae* ได้เป็นอย่างดี โดยสามารถตรวจพบการปนเปื้อนได้ทันทีภายหลังจากการเติมกล้าเชื้อยีสต์ (วันที่ 0) แตกต่างจากวิธีการในปัจจุบัน ซึ่งทำการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อยีสต์โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารคัดเลือกเฉพาะ (selective media) มีข้อจำกัดเรื่องระยะเวลาในการรายงานผลต้องใช้เวลานานประมาณ 4 วัน ดังนั้นการประยุกต์ใช้เทคนิค PCR-DGGE สามารถลดระยะเวลาในการตรวจสอบการปนเปื้อนได้เป็นเวลา 3 วัน ซึ่งทำให้สามารถแก้ไขปัญหาได้ทันที สามารถลดการสูญเสียทางธุรกิจในแง่การปรับแต่งและการผลิตซ้ำ (reprocess) เป็นต้น



รูปที่ 4.22 เป็นแถบดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA gene ในส่วน D1/D2 ของเชื้อผสมระหว่าง *Sac. cerevisiae* และ *Cl. lusitaniae* แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 45 นาที ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ โดย lane M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder และ lane1 คือดีเอ็นเอผลผลิตจากยีสต์ผสม 0 วัน ; lane 2, 2 วัน; lane 3, 5 วัน; lane 4, 7 วัน; lane 5, 9 วัน; lane 6, 12 วัน; lane7, 14 วัน; lane 8, 21 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.23 เป็นแถบดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA gene ในส่วน D1/D2 ของเชื้อผสมระหว่าง *Sac. cerevisiae* และ *Cla. lusitaniae* นำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสบนโพลีอะครีลาไมด์เจล ความเข้มข้น denaturant 30-50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4.5 ชั่วโมงที่ความต่างศักย์ 150 โวลต์ lane1 คือดีเอ็นเอผลผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ *Sac. cerevisiae*; lane 2, *Cla. lusitaniae*; lane 3, 0 วัน; lane 4, 2 วัน; lane 5, 5 วัน; lane 6, 7 วัน; lane 7, 9 วัน; lane 8, 12 วัน; lane 9, 14 วัน; lane 10, 21 วัน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อยีสต์ในกระบวนการผลิตเบียร์ลาเกอร์ พบว่าแหล่งของการปนเปื้อนมาจากหัวเชื้อยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเบียร์ และน้ำทิ้งที่เหลือจากกระบวนการล้างทำความสะอาดถังหมัก โดยพบการปนเปื้อน คิดเป็น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ป่า พบว่าสายพันธุ์ยีสต์ที่มีการปนเปื้อนสูงสุด คือ *Clavispora lusitaniae* คิดเป็น 33 เปอร์เซ็นต์ จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการปนเปื้อนยีสต์ซึ่งเป็นปัญหาหลักในกระบวนการผลิตเบียร์ เป็นผลมาจากกระบวนการล้างทำความสะอาดยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ และการจัดการด้านสุขลักษณะยังคงต้องได้รับการปรับปรุงและพัฒนา เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากยีสต์ป่าเข้าสู่กระบวนการผลิต

การประยุกต์เทคนิค PCR-DGGE สำหรับกระบวนการผลิตเบียร์พบว่าสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับเชื้อสายพันธุ์ *Cla. lusitaniae* ซึ่งใช้เป็นต้นแบบสำหรับการศึกษา และจากการประเมินกลิ่นรส และค่าทางเคมีซึ่งได้จากการจำลองหมักยีสต์ซึ่งมีการปนเปื้อนเชื้อ *Cla. lusitaniae* พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้ให้กลิ่นรส และการวิเคราะห์ทางเคมีไม่แตกต่างกับเบียร์ซึ่งหมักโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ซึ่งไม่มีการปนเปื้อน

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลที่ได้พบว่าเชื้อที่นำมาเป็นต้นแบบ (*Clavispora lusitaniae*) ถึงแม้จะมีการปนเปื้อนมากที่สุดในการหมัก แต่จากการประเมินผลิตภัณฑ์ที่ได้พบว่าไม่มีความแตกต่างจากผลิตภัณฑ์ซึ่งหมักโดยเชื้อยีสต์ซึ่งไม่มีการปนเปื้อน ดังนั้นแนวทางในการศึกษาต่อไปทำการศึกษาเพื่อทดสอบหาสายพันธุ์ ซึ่งมีผลกระทบต่อกระบวนการ เช่น ให้กลิ่นผิดปกติไม่เป็นที่ยอมรับ หรือการวิเคราะห์ทางเคมีที่ไม่เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด มาทำการศึกษาเพื่อหาแนวทางในการตรวจสอบและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของเชื้อเหล่านั้นเพื่อเป็นการลดผลกระทบที่เกิดขึ้นจากการปนเปื้อนแล้วก่อให้เกิดปัญหาต่อกระบวนการผลิต

เอกสารอ้างอิง

- สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2544. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเบียร์ มอก. 2090-2544.กระทรวงอุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ
- Allen, F. 1994. The Microbrewery Laboratory Manual - Part II: Bacteria Detection, Enumeration, and Identification." *Brewing Techniques* 2.
- Annes , B.J. and Bamforth, C.W. 1982. Dimethyl sulphide-a review. *J. Inst. Brew.* 88 : 244-52
- Biokemi. **Enzyme production during malting.** [Online].
Available : <http://www.biokemi.org/biozoom/issues/522/articles/2368>. 2553
- Biokemi . **Germinating barley kernel.** [Online].
Available : <http://www.biokemi.org/biozoom/issues/522/articles/2368>. 2553
- Boultonm and Quain .2006. *Brewing yeast and fermentation.* Blackwell Science:England 644p
- Brányik, T., Vicente, A., Dostálek, P. and Teixeira, J.A. 2008. A Review of Flavour Formation in Continuous Beer Fermentations *J. Inst. Brew.* 114(1) : 3–13.
- Charles, T., and Mark , D . 1998. Mechanisms for protection against copper toxicity *Am. J. Clin. Nutr.* 67 :1091S–7S.
- Cheresources . **Ethanol fermentation .** [Online].
Available : http://www.cheresources.com/wild_yeast_contamination.shtml. 2553
- Cocolin, L., Bisson, L.F. and Mills, D.A., 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol. Lett.*189 : 81– 87.
- Cocolin, L., Heisey, A. and Mills, D.A., 2001a. Direct identification of the indigenous yeasts in commercial wine fermentations. *Am. J.Enol. Vitic.* 52 : 49–53.
- Cocolin, L., Manzano, M., Aggio, D., Cantoni, C. and Comi, G., 2001b. A novel polymerase chain reaction (PCR)-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for the identification of Micrococcaceae strains involved in meat fermentations. Its application to naturally fermented Italian sausages. *Meat Sci.* 57 : 59– 64.

- Cocolin, L., Daniele, A., Manzano, M., Cantoni, C., and Comi, G. 2001c. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast population in raw milk. *Int. Dairy J.* 12 : 407-411.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Urso, R., Cantoni, C. and Comi, G. 2004. Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology.* 70 : 1883–1894.
- Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G. and Coppola, S., 2001. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of Natural Whey Cultures for water-buffalo Mozzarella cheese production: bias of “culture dependent” and “culture independent” approaches. *Syst. Appl. Microbiol.* 24 : 610– 617.
- Ercolini, D., 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food *J. of Microbiological Methods.* 56 : 297– 314
- European Brewing Convention, EBC Analytica chemical. 1997. Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag, Nürnberg, Germany.
- European Brewing Convention, EBC Analytica Microbiologica II. 2001. Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag, Nürnberg, Germany.
- European Brewing Convention, EBC Analytica Microbiologica II. 2008. Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag, Nürnberg, Germany.
- Hofbrauhausnewport. **Lauter Tun.** [Online]. Available : <http://www.hofbrauhausnewport.com/beer.2553>
- Hofbrauhausnewport. **Mash Kettle.** [Online]. Available : <http://www.hofbrauhausnewport.com/beer.2553>
- Hofbrauhausnewport. **Wort Kettle.** [Online]. Available : <http://www.hofbrauhausnewport.com/beer.2553>
- Kunze W. 2004. Technology Brewing and Malting, 3rd Edition, VBL, Berlin, 950p

- Kurtzman, C. P. and Robnett, C.J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequence. **Antonie van Leeuwenhoek**. 73: 331–371.
- Laitila, A., Wilhelmson, A., Kotaviita, E., Olkku, J., Home, S. and Juvonen, R. 2006. Yeasts in an industrial malting ecosystem. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 33: 953–966.
- Lawrence, D.R. 1988. Spoilage organisms in beer. In: Robinson, R.K. (Ed.), *Developments in Food Microbiology*. Elsevier, London, pp. 1–48.
- Manzano, M., Cocolin, L., Longo, B. and Comi, G. 2004. PCR-DGGE differentiation of *Saccharomyces sensu stricto* strains. **Antonie van Leeuwenhoek**, 85 : 23–27.
- Manzano, M., Giusto, C., Bartolomeoli, I., Buiatti, S. and Comi, G. 2005. Microbiological analyses of dry and slurry yeasts for brewing. **J. Inst. Brew.** 111: 203–208.
- Microbial Insights. **How does DGGE work**. [Online]. Available :http://www.environmentalexpert.com/stse_resulteach_product.aspx?cid=24977&idproduct=18770. 2553
- Mingorance-Cazorla, L., Clemente-Jiménez, J.M., Martínez-Rodríguez, S. and Las Heras-Vásquez, F.J. 2003. Contribution of different natural yeast to the aroma of two alcoholic beverages. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 19: 297-304
- Muyzer, G., De Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 59 : 695–700.
- Muyzer, G. and Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis(TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**. 73 :127–141.
- NCBI blast. [Online] available URL : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. 2553

- Rantsiou, K., Urso R., Iacumin L., Cantoni C., Cattaneo P., Comi G. and Cocolin, L. 2005. Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. **Appl. Environ. Microbiol.** 71:1977–1986.
- Renger, R. S., S. H. Van Hateren. and K. C. A. M. Luyben. 1992. The formation of esters and higher alcohols during brewery fermentation—the effect of carbon dioxide pressure. **J. Inst. Brew.** 98:509-513.
- Satokari, R., Juvonen, R., von Wright, A. and Haikara, A., 1999. Detection of Pectinatus beer spoilage bacteria by using the polymerase chain reaction. **J. Food Protect.** 60 : 1571–1573.
- Storgårds, E. 2000. Process Hygiene Control in Beer Production and Dispensing. VTT Biotechnology, Finland.
- Suzuki, K., Iijima, K., Sakamoto, K., Sami, M. and Yamashita, H. 2006. A Review of Hop Resistance in Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria. **J. Inst. Brew.** 112(2) : 173–191
- Van der Aa Jespersen and Jakobsen, M. 1996. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. **Int. J. Food Microbiol.** 33 :139–155.
- van der Aa Kühle, A. and Jespersen, L. 1998. Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. **Int. J. Food Microbiol.** 43: 205–213.
- Vaughan, A., O’Sullivan, T. and Van Sinderen, D. 2005. Enhancing the microbiological stability of malt and beer - A review. **J. Inst. Brew.** 111: 355-371.
- Xie, G. F., Li, W. J., Lu, J., Cao, Y., Fang, H., Zou, H.J and Zhi-ming Hu, Z.M. 2007. Isolation and Identification of representative fungi from shaoxing rice wine wheat *Qu* using a polyphasic approach of culture-based and molecular-based methods. **J. Inst. Brew.** 113: 272–279.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ Dimethyl sulphide (DMS) ใน Wort และ Beer ด้วยวิธี GC
อ้างอิงวิธีการ EBC (2008)

1. ขอบข่าย

ใช้สำหรับการวิเคราะห์ DMS ใน Wort และ Beer ด้วยเครื่อง GC-FID (Headspace)

2. หลักการ

- 2.1 ทำให้ตัวอย่างเวิร์ตและ เบียร์เกิดสมดุลระหว่างของเหลวและแก๊ส
- 2.2 นำส่วน gas phase ไปวิเคราะห์ด้วย GC-FID

3. สารเคมี

- 3.1 Dimethyl sulphide (> 99 เปอร์เซ็นต์)
- 3.2 Ethyl alcohol
- 3.3 Ammonium sulphate

4. เครื่องมือ

- 4.1 Gas chromatograph พร้อม detector ชนิด FID
- 4.2 Crimp-top vials ขนาด 20 ml พร้อม aluminum cap
- 4.3 Crimper
- 4.4 Graduated pipette ขนาด 10 ml
- 4.5 Volumetric flask ขนาด 100 ml
- 4.6 Micro pipette
- 4.7 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

5. การเตรียม Calibration Standard

5.1 Stock solution

ดูดตัวอย่าง DMS มาตรฐาน 0.1 ml ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

5.2 Working solution

ดูด stock solution 0.4 ml ใส่ใน vol. flask ขนาด 100 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรด้วย น้ำกลั่น

5.3 Standard solution

ปิเปต working solution และ ethanol ตามปริมาตรดังตาราง ใส่ใน vol. flask ขนาด 100 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

Calibration level	Working solution (ml)	Ethanol (ml)	Calibration Concentration (ppb)
1	2	3.52	68
2	4	3.04	136
3	6	2.56	204

6. การเตรียมตัวอย่าง

- 6.1 แช่ตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ในตู้เย็น 0 - 5 องศาเซลเซียส ก่อนทำการวิเคราะห์
- 6.2 ชั่ง ammonium sulphate 4.75 ± 0.25 g ใส่ vial ขนาด 20 ml
- 6.3 ปิด vial ด้วย parafilm นำไปแช่เย็นก่อนทำการวิเคราะห์

7. การสร้าง calibration และวิเคราะห์ตัวอย่าง

- 7.1 ปิเปตตัวอย่างที่แช่เย็นไว้ 5 ml ใส่ใน vial ซึ่งมี ammonium sulphate อยู่ (ที่เตรียมไว้ในข้อ 6.3)
- 7.2 นำไปวางในถาด auto sampler ซึ่งเครื่องจะนำตัวอย่างไป incubate อัดโนมัติ เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC โดยอัดโนมัติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. การควบคุมคุณภาพ

ทุกตัวอย่างทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ โดยผลต่างของความเข้มข้นของการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (d)

ต้องไม่เกิน spec. d ดังสมการ

$$\text{Spec. d} \leq 6 + (0.14 \times \text{Avg.})$$

9. GC condition

Syringe temperature	70 °C
Sample incubation time	10 min
Agitator speed	500 rpm
Agitation cycle	2 sec On, 4 sec Off
Plunger fill speed	100 ul/sec
Fill stokes	1
Viscosity delay	1 sec
Injector	Front
Pre-injection delay	0.5 sec
Plunger inject speed	100 ul/sec
Post injection delay	0.5 sec
Syringe flush time	30 sec
GC cycle time	32 min
Injector temperature	200 °C
Detector temperature	300 °C
Column temperature program	: - 1 st temp 30 °C hold 5 min - 2 nd temp 100 °C hold 15 min, rate 10 °C/min
Make up flow	29 ml/min
H ₂ flow	30 ml/min
Air flow	300 ml/min

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล อ้างอิงวิธีการ EBC (2008)

1. ขอบเขต

ปริมาณน้ำตาล glucose, maltose, maltotriose และ oligosaccharide โดยเครื่อง HPLC

2. หลักการ

2.1 เตรียมตัวอย่างตามหลักการวิเคราะห์ด้วย HPLC Chromatography โดยกรองผ่านกระดาษ

กรองขนาด 0.45 um และ Guard column และ Refractive Index Detector

2.2 ความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลสามารถคำนวณจาก Standard Calibration Curve

3. สารเคมี

3.1 น้ำกลั่น

3.2 Glucose 99.9%, purity

3.3 Maltose 99.9%, purity

3.4 Maltotriose, DP3 99.9%, purity

3.5 Oligosaccharide 99.9%, purity

3.6 ตัวทำละลาย Acetonitrile : water (70:30) 'mobile phase'

4. เครื่องมือ

4.1 เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง

4.2 กระดาษกรองขนาด 0.45 um

4.3 ซ้อนดักสาร

4.4 Beaker ขนาด 50 ml

4.5 Volumetric flask ขนาด 25 ml

4.6 Volumetric Pipette ขนาด 20 ml, 5 ml, 2 ml และ Measuring pipette ขนาด 1 ml

4.7 เครื่อง HPLC , Refractive Index Detector (RID)

4.8 Column NH₂ , 250 x 4 mm, 5 um

4.9 Pre-column (guard column), NH₂ , 4.0 x 10 mm, 5 um

5. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

5.1 Mixed standard (glucose+maltose+maltotriose+oligosaccharide) solution 0.2, 0.4 และ 0.6 %

5.1.1 Mixed standard (glucose+maltose+maltotriose+oligosaccharide) solution 0.2 %

5.1.1.1 ชั่ง Glucose 99.9%, purity 2 g ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 ml

5.1.1.2 บีบต่อน้ำกลั่น 20 ml ใส่ลงในบีกเกอร์ เขย่าให้เข้ากัน (glucose 10%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1.1.3 เตรียม maltose, maltotriose, oligosaccharide เช่นเดียวกับข้อ 5.1.1.1-

5.1.1.2 (maltose 10%, maltotriose 10%, oligosaccharide 10%)

5.1.1.4 ปิเปตสารละลาย glucose 10%, maltose 10%, maltotriose 10% และ oligosaccharide 10% อย่างละ 0.5 ml ลงใน Volumetric flask ขนาด 25 ml

5.1.1.5 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 25 ml

5.1.1.6 นำสารละลาย Mixed standard

(glucose+maltose+maltotriose+oligosaccharide) 0.2% มากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 μ m

5.1.1.7 นำไป Set standard calibration curve ด้วยเครื่อง HPLC

5.1.2 Mixed standard (glucose+maltose+maltotriose+oligosaccharide) solution 0.4 %

5.1.2.1 ปิเปตสารละลาย glucose 10%, maltose 10%, maltotriose 10% และ oligosaccharide 10% อย่างละ 1.0 ml ลงใน Volumetric flask ขนาด 25 ml

5.1.2.2 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 25 ml

5.1.2.3 นำสารละลาย Mixed standard

(glucose+maltose+maltotriose+oligosaccharide) 0.4% มากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 μ m

5.1.2.4 นำไป Set standard calibration curve ด้วยเครื่อง HPLC

5.1.3 Mixed standard (glucose+maltose+maltotriose+oligosaccharide) solution 0.6 %

5.1.3.1 ปิเปตสารละลาย glucose 10% ,maltose 10%, maltotriose 10% และ oligosaccharide 10% อย่างละ 1.5 ml ลงใน Volumetric flask ขนาด 25 ml

5.1.3.2 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 25 ml

5.1.3.3 นำสารละลาย Mixed standard

(glucose+maltose+maltotriose+oligosaccharide) 0.6 % มากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 μ m

5.1.3.4 นำไป Set standard calibration curve ด้วยเครื่อง HPLC

5.2 ตัวอย่าง

5.2.1 ทำการเจือจางตัวอย่าง 5 เท่า ด้วยน้ำกลั่น

5.2.2 กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 μm

5.2.3 นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

6. การเตรียมเครื่อง HPLC

6.1 เปิดเครื่อง HPLC set flow rate 1.0 ml/min , RID detector , sample 10 μl , 40°C

6.2 ล้าง column ด้วย mobile phase อย่างน้อย 30 นาที

6.3 และกดเปิด R flow ล้าง mobile phase อย่างน้อย 30 นาที

6.4 ก่อนวิเคราะห์ตัวอย่าง ปิด R flow กด Balance RID

6.5 Check Base line โดยกด Preview Run , Set Zero RID ด้วย

6.6 ควรวินิจฉัยตัวอย่างละ 2 ชั่วโมง

7. การรายงานผล

7.1 การคำนวณปริมาณน้ำตาล glucose, maltose, maltotriose และ oligosaccharide จะคำนวณอัตโนมัติจาก Standard calibration curve

7.2 รายงานผลปริมาณน้ำตาล glucose, maltose, maltotriose และ oligosaccharide เป็น %W / V และจำนวนเต็มทศนิยม 2 ตำแหน่ง

8. Precision

ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล glucose, maltose, maltotriose และ oligosaccharide ควรทำ System Suitability โดยใช้สารละลาย Mixed standard (glucose+maltose) ณ ความเข้มข้นหนึ่ง และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล glucose, maltose, maltotriose และ oligosaccharide ที่ทราบความเข้มข้น ทุกครั้งก่อนการวิเคราะห์ตัวอย่าง

การวิเคราะห์ Estery compounds ด้วยวิธี GC-FIDอ้างอิงวิธีการ EBC (2008)

1. ขอบข่าย

ใช้สำหรับการวิเคราะห์ Estery compounds ใน Wort, 3-Days และ Beer ด้วยเครื่อง GC-FID (Headspace)

2. หลักการ

- 2.1 ทำให้ตัวอย่างเกิดสมดุลระหว่างของเหลวและแก๊ส
- 2.2 นำส่วน gas phase ไปวิเคราะห์ด้วย GC-FID

3. สารเคมี

- 3.1 Acetaldehyde
- 3.2 Ethyl acetate
- 3.3 Ethyl hexanoate
- 3.4 iso-Butanol
- 3.5 iso-Amyl alcohol
- 3.6 iso-Butyl acetate
- 3.7 iso-Amyl acetate
- 3.8 n-Propanol
- 3.9 Ethyl alcohol
- 3.10 Ammonium sulphate

4. เครื่องมือ

- 4.1 Gas chromatograph พร้อม detector ชนิด FID
- 4.2 Crimp-top vials ขนาด 20 ml พร้อม aluminum cap
- 4.3 Crimper
- 4.4 Graduated pipette ขนาด 10 ml
- 4.5 Micro pipette ขนาด 100-1000 ul
- 4.6 Volumetric flask ขนาด 100 ml
- 4.7 Micro pipette
- 4.8 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การเตรียม Calibration Standard

5.1 Stock solution (A, B, C)

5.1.1 Stock solution A

- n-Propanol	0.4	ml
- iso-Amyl alcohol	1.2	ml
- iso-Butanol	0.5	ml

ใส่ใน vol. flask ขนาด 100 ml และปรับปริมาตรด้วย Ethanol

5.1.2 Stock solution B

- Ethyl acetate	2.5	ml
- Acetaldehyde	5	ml
- iso-Butyl acetate	0.1	ml
- iso-Amyl acetate	0.4	ml

ใส่ใน vol. flask ขนาด 100 ml และปรับปริมาตรด้วย Ethanol

5.1.3 Stock solution C

- Ethyl hexanoate	0.1	ml
-------------------	-----	----

ใส่ใน vol. flask ขนาด 100 ml และปรับปริมาตรด้วย Ethanol

5.2 Working solution (D)

- A	20	ml
- B	2	ml
- C	0.4	ml

ใส่ vol. flask ขนาด 100 ml และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

5.3 Standard solution

เปิด working solution (D) และ ethanol ตามปริมาตร ดังตาราง ใส่ใน vol. flask ขนาด 100 ml และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

Calibration level	Working solution (D) (ml)	Ethanol (ml)
1	1	3
2	2	3
3	3	3
4	4	3
5	5	3
6	6	3

จะได้ความเข้มข้นของ Standard แต่ละชนิด ดังนี้

Standards	Calibration level (ppm)					
	1	2	3	4	5	6
Acetaldehyde	7	14	21	28	35	42
1-Propanol	10	20	30	40	50	60
Ethyl acetate	7.5	15	22.5	30	37.5	45
iso-Butanol	10	20	30	40	50	60
3-Methyl-butanol *	75	150	225	300	375	450
2-Methyl-butanol *	15	30	45	60	75	90
iso-Buthyl acetate	0.17	0.34	0.51	0.68	0.85	1.02
iso-Amyl acetate	0.9	1.8	2.7	3.6	4.5	5.4
Ethyl hexanoate	0.11	0.22	0.33	0.44	0.55	0.66

* iso-Amyl alcohol = 2+3-Methyl-butanol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. การเตรียมตัวอย่าง

- 6.1 แช่ตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ในตู้เย็น 0 - 5 °C ก่อนทำการวิเคราะห์
- 6.2 ชั่ง ammonium sulphate 4.75 ± 0.25 g ใส่ vial ขนาด 20 ml
- 6.3 ปิด vial ด้วย parafilm นำไปแช่เย็นก่อนทำการวิเคราะห์

7. การสร้าง calibration และวิเคราะห์ตัวอย่าง

- 7.1 ปิเปิดตัวอย่างที่แช่เย็นไว้ 5 ml ใส่ใน vial ซึ่งมี ammonium sulphate อยู่ (ที่เตรียมไว้ในข้อ 6.3)
- 7.2 นำไปวางในถาด auto sampler เรียงตามตำแหน่ง ซึ่งเครื่องจะนำตัวอย่างไป incubate อัตโนมัติ เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC โดยอัตโนมัติ

8. การควบคุมคุณภาพ

ทุกตัวอย่างทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ โดยผลต่างของความเข้มข้นของการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (d) ต้องไม่เกิน spec.d ดังนี้

Acetaldehyde	$\leq 0.64 + (0.061 \times \text{Avg.})$
1-Propanol	$\leq 0.49 + (0.083 \times \text{Avg.})$
Ethyl acetate	$\leq 0.38 + (0.095 \times \text{Avg.})$
iso-Butanol	$\leq 0.85 + (0.047 \times \text{Avg.})$
iso-Amyl alcohol	$\leq 2.37 + (0.091 \times \text{Avg.})$
iso-Buthyl acetate	$\leq 0.014 + (0.14 \times \text{Avg.})$
iso-Amyl acetate	$\leq 0.039 + (0.11 \times \text{Avg.})$
Ethyl hexanoate	$\leq 0.004 + (0.22 \times \text{Avg.})$

9. GC condition

Syringe temperature	70 °C
Sample incubation time	10 min
Agitator speed	500 rpm
Agitation cycle	2 sec On, 4 sec Off
Plunger fill speed	100 ul/sec
Fill strokes	1
Viscosity delay	1 sec

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Injector	Front
Pre-injection delay	0.5 sec
Plunger inject speed	100 ul/sec
Post injection delay	0.5 sec
Syringe flush time	30 sec
GC cycle time	40 min
Injector temperature	200 °C
Detector temperature	300 °C
Column temperature program	: - 1 st temp 30 °C hold 5 min
	- 2 nd temp 110 °C hold 3 min,
	rate 10 °C/min
	- 3 rd temp 250 °C hold 8 min,
	rate 20 °C/min
Make up flow	29 ml/min
H ₂ flow	30 ml/min
Air flow	300 ml/min



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ Vicinal Diketones (VDK) ใน Beer ด้วยวิธี GCอ้างอิงวิธีการ EBC (2008)

1. ขอบข่าย

ใช้สำหรับการวิเคราะห์ VDK ใน Beer ด้วยเครื่อง GC-FID (Headspace)

2. หลักการ

2.1 ทำให้ตัวอย่างเบียร์เกิดสมดุลระหว่างของเหลวและแก๊ส

2.2 นำส่วน gas phase ไปวิเคราะห์ด้วย GC-FID

3. สารเคมี

3.1 Diacetyl (> 99.5 %)

3.2 2,3-Pentanedione (>97%)

3.2 Ethyl alcohol

3.3 Ammonium sulphate

4. เครื่องมือ

4.1 Gas chromatograph พร้อม detector ชนิด FID

4.2 Crimp-top vials ขนาด 20 ml พร้อม aluminum cap

4.3 Crimper

4.4 Graduated pipette ขนาด 10 ml

4.5 Volumetric flask ขนาด 100 ml

4.6 Micro pipette

4.7 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

5. การเตรียม Calibration Standard

5.1 Stock solution : (diacetyl 10,200 ppm / 2,3-Pentanedione 8,000 ppm) : VDK-A.

ปิเปต standard Diacetyl 0.51 ml และ 2,3-Pentanedione 0.42 ml ใส่ใน vol. flask ขนาด 50 ml และปรับปริมาตรด้วย Ethanol (VDK-A)

5.2 Working solution (VDK-B)

ปิเปต VDK-A 250 ul + Ethanol 4 ml ใส่ใน vol. flask ขนาด 100 ml และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น (VDK-B)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 Standard solution

ปีเปิด working solution VDK-B และ ethanol ตามปริมาตร ดังตาราง ใส่นใน vol. flask ขนาด 500 ml และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

Calibration level	VDK-B (μ l)	Calibration Concentration (ppb)	
		Diacetyl	2,3-Pentanedione
1	100	50	40
2	200	100	80
3	300	150	120
4	400	200	160

6. การเตรียมตัวอย่าง

6.1 แช่ตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ในตู้เย็น 0 - 5 °C ก่อนทำการวิเคราะห์

6.2 ชั่ง ammonium sulphate 4.75 ± 0.25 g ใส่วial ขนาด 20 ml

6.3 ปิด vial ด้วย parafilm นำไปแช่เย็นก่อนทำการวิเคราะห์

7. การสร้าง calibration และวิเคราะห์ตัวอย่าง

7.1 ปีเปิดตัวอย่างที่แช่เย็นไว้ 5 ml ใส่วial ซึ่งมี ammonium sulphate อยู่ (ที่เตรียมไว้ในข้อ 6.3)

7.2 นำไปวางในถาด auto sampler ซึ่งเครื่องจะนำตัวอย่างไป incubate อัตโนมัติ เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC โดยอัตโนมัติ

8. การควบคุมคุณภาพ

ทุกตัวอย่างทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ โดยผลต่างของความเข้มข้นของการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (d) ต้องไม่เกิน spec. d ดังนี้

$$\text{Diacetyl} \leq 0.005 + (0.083 \times \text{Avg.})$$

$$\text{2,3-Pentanedione} \leq 0.006 + (0.065 \times \text{Avg.})$$

9. GC condition

Syringe temperature 70 °C

Sample incubation time 30 min

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Agitator speed	500 rpm
Agitation cycle	2 sec On, 4 sec Off
Plunger fill speed	100 ul/sec
Fill stokes	1
Viscosity delay	1 sec
Injector	Front
Pre-injection delay	0.5 sec
Plunger inject speed	100 ul/sec
Post injection delay	0.5 sec
Syringe flush time	30 sec
GC cycle time	35 min
Injector temperature	200 °C
Detector temperature	250 °C
Column temperature program	: - 1 st temp 50 °C hold 6 min - 2 nd temp 150 °C hold 15 min, rate 13 °C/min
Make up flow	29 ml/min
H ₂ flow	30 ml/min
Air flow	300 ml/min

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับเบสในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA gene โดยใช้ไพรเมอร์ NL4

ลำดับเบสของ Wild yeast หมายเลข 1

ATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCG
AGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCATCTTCGGTGTCCGA
GTTGTAATTTGAAGAAGGTAACCTTTGGAGTTGGCTCTTGTCTATGTTCCCT
TGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAA
TTCTATGTAAAGTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTTGGGAATGCAGCTCT
AAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATA
GCCAACAAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTG
AAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTTTAAGATCAGACTTGGT
ATTTTGTATGGCTTCCCTCTCGGGGTGGTCTCTACGTTTTACCGGGCTAG
CATCAGTTTGGATGGTAGGATAATGGCATTGGAATGTGACATTGCTTCGG
TGATGTGTTATAGCCTTTGTTGATACTGCCTATCTAGACTGAGGACTGC

ลำดับเบสของ Wild yeast หมายเลข 2

ATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCG
AGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCCTGCGGGAATTGTAATTTG
AAGGTTTCGTGGTCTGAGTCGGCCGCGCCAAGTCCATTGGAACATGGCG
CCTGGGAGGGTGAGAGCCCCGTATGGCGCACGCCGACTCTTTGTACACCG
CGGCTCCGACGAGTCGAGTTGTTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTA
AATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTAC
AGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTG
AAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACGGTTTTACCGGGCCA
GCGTCGAAAAGGGGGGAGGAACAAGAAGTCTGAGAATGTGGCGCGCACCTT
CGGGCGCGCGTGTATAGCTCGTGTGACGCCT

ลำดับเบสของ Wild yeast หมายเลข 3

TCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGA
GTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCCTTCGGGAGTTGTAATTTGT
AGGTTGGGAGACCCCGCGGCTAGTGGCACCAAGTCCCTTGGAACAGGGCG
CCTTAGAGGGTGAGAGCCCCGTAGGTACCACAACACCGTCTTGTGTCTCC
TCTCAAAGAGTCGAGTTGTTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAA
TTCCATCTAAAGCTAAATACCGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAG
TGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGTACGTGAA
ATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACGGCCTTCGTGCCGGGCC
AGCATCGGTTGCTAGGGGTGGATAAGGAACAAGGAATGTAGCTCCTCGGA
GTATTATAGCCTTGCGCGATACACCCACTGGCGACCGAGGCCTGCG

ลำดับเบสของ Wild yeast หมายเลข 4

TCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGA
 GTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCATCTTCGGTGTCCGAG
 TTGTAATTTGAAGAAGGTAACCTTTGGAGTTGGCTCTTGTCTATGTTCCCT
 GGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAAT
 TCTATGTAAAGTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTTGGGAATGCAGCTCTA
 AGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAG
 CGAACAAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGA
 AAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTTTAAGATCAGACTTGGTA
 TTTTGTATGGCTTCCTCTCGGGGTGGTCCTCTACGTTTTACCGGGCTAGC
 ATCAGTTTTGGATGGTAGGATAATGGCATTGGAATGTGACATTGCTTCGGT
 GATGTGTTATAGCCTTTGTTGATACTGCCT

ลำดับเบสของ Wild yeast หมายเลข 5

TCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGA
 GTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCATCTTCGGTGTCCGAG
 TTGTAATTTGAAGAAGGTAACCTTTGGAGTTGGCTCTTGTCTATGTTCCCT
 GGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAAT
 TCTATGTAAAGTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTTGGGAATGCAGCTCTA
 AGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAG
 CGAACAAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGA
 AAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTTTAAGATCAGACTTGGTA
 TTTTGTATGGCTTCCTCTCGGGGTGGTCCTCTACGTTTTACCGGGCTAGC
 ATCAGTTTTGGATGGTAGGATAATGGCATTGGAATGTGACATTGCTTCGGT
 GATGTGTTATAGCCTTTGTTGATACTGCCT

ลำดับเบสของ Wild yeast หมายเลข 6

ATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCG
 AGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCATCTTCGGTGTCCGA
 GTTGTAAATTTGAAGAAGGTAACCTTTGGAGTTGGCTCTTGTCTATGTTCCCT
 TGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAA
 TTCTATGTAAAGTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTTGGGAATGCAGCTCT
 AAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATA
 GCGAACAAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTG
 AAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTTTAAGATCAGACTTGGT
 ATTTTGTATGGCTTCCTCTCGGGGTGGTCCTCTACGTTTTACCGGGCTAG
 CATCAGTTTTGGATGGTAGGATAATGGCATTGGAATGTGACATTGCTTCGG
 TGATGTGTTATAGCCTTTGTTGATACTGCCTATCTAGACTGAGGACTGC

ลำดับเบสของ Wild yeast หมายเลข 7

TCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATCCCCTAGTAGCGGCGA
 GCGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTATAATCTGGCACCTTCGGTGTCCGAG
 TTGTAATCTCTAGAAATGTTTTCCGCGTTGGACCGCACACAAGTCTGTTG
 GAATACAGCGGCATAGTGGTGAGACCCCCGTATATGGTGCGGACGCCAG
 CGCTTTGTGATACATTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCA
 AATGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATATGGCGAGAGACCGATA
 GCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTT
 AACAGTACGTGAAATTGTTGGAAGGGAAACGCTTGAAGTCAGACTTGCTT
 GCTGAGCAATCGGTTTTGCAGGCCAGCATCAGTTTTCCGGGATGGA

ลำดับเบสของ Wild yeast หมายเลข 8

GGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTCCCTTAGTAACGGCGAGTGAACCGG
 GAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGCCAACAGGCCGAGTTGTAATTTGTAGA
 TGGCTACACTGCATAATAGTAGATGCTCAAGTTCTTTGGAAAAGACATC
 ATGGAGGGTGACAATCCCGTGAGGCATGTTACTAGGAGCATATAGTGGGC
 TTTCTAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGCGTGGTGAAT
 ACCATGTAAAGCTAAATATGGACGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGT
 GAAGGAAAGATGAAAAGCACTCCGAAAGGAGAGTAAAATAGTACGTGAAA
 TTGTTAAAGTGGAAGGGCTTGAGATCAGAATTGGTAGTTTGGGTCCACG
 TCCTCTTGGGGCGTGTACTCCCTTTCCACCGGGCCAGCGGGAGTTTCGT
 CTCTTGGGTAAGCAGTGGAATGTAGCAGCTTGTCTGTATTATAGCCTC

ลำดับเบสของ Wild yeast หมายเลข 9

TCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTCCCTTAGTAACGGCGA
 GTGAACCGGAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGCCAACAGGCCGAGTTGTA
 ATTTGTAGATGGCTACACTGCATAATAGTAGATGCTCAAGTTCTTTGGAA
 AAAGACATCATGGAGGGTGACAATCCCGTGAGGCATGTTACTAGGAGCAT
 ATAGTGGGCTTTCTAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGC
 GTGGTGAATACCATGTAAAGCTAAATATGGACGAGAGACCGATAGCGAAC
 AAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTCCGAAAGGAGAGTAAAATAG
 TACGTGAAATTGTTAAAGTGGAAGGGCTTGAGATCAGAATTGGTAGTTTG
 GGTTCACGTCCTCTTGGGGCGTGTACTCCCTTTCCACCGGGCCAGCGG
 GAGTTTCGTCTCTTGGGTAAGCAGTGGAATGTAGCAGCTTGTCTGTAT
 TATAGCCTCTGTTC

ลำดับเบสของ Wild yeast หมายเลข 10

ATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACGGCG
 AGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGCAGTCTTCGATTGTCC
 GAGTTGTAATCTATAGAGGCGTTTTCCGTGCCGACCGTGTCCAAGTCTC
 CTGGAAAGGAGTATCAAAGAGGGTGATAATCCCGTACTTAACACGACCAC
 CGGTGCTCTGTGATACGTCTTCTACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGC
 TCAAAATGGGTGGTGAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCG
 ATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGA
 GTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGATTGAAGTCAGTCGT
 GTTCTTTGGATTACGCCAGTTCTGCTGGTCTACTTCCTTTGAACGGGTCA
 ACATCAGTTTTGTCCGGTGGATAAAGGCAGCAGGAAAGTGACTTCTCCGG
 AAGTGTTATAGCCTGTTGTCACATACTGGGTGAGACTGAGGACTGCAG
 CTCGCCTTTATGGCCGGGG

ลำดับเบสของ Wild yeast หมายเลข 11

ATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCG
 AGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTTTCAGTGTCCGA
 GTTGAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCT
 TGGAACAGAACGTACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGTCCCA
 GACCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTC
 TAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGAT
 AGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGT
 GAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGG
 TATTTTGTATGTTACTCTCTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCA
 GCATCAGTTTGGGCGGTAGGACAATTGCAAAGAAATGTGGCACTGCCTCG
 GTAGTGTGTTATAGTCTTTGTCGATACTGCCAGCCTAGACTGAGGACTGC
 GG

ลำดับเบสของ Wild yeast หมายเลข 12

TATCTCTATGAGGGGGGAAAAAAACCCACGGATTTTCCC
 CCNGTAGGGGAGAGAAAAGGCACAAAATCTAATTTTAAATCTCGTGGGAA
 AAGTAATTTTAAGGGTTTTTGTGAGTGTGGGGCGCCACATGCACAT
 GGACACAGGGCGCGGGAGGGGAGAGACCCCTATGGGGCACGCGCACTCT
 TTTTGCACCGCGGCTCCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAA
 GTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGC
 GAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAA
 ACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACGGTTT
 TACCGGGCCAGCGTCGAAAAGGGGGGAGGAACAAGAACTCGAGAATGTGG
 CGCGCACCTTCGGGCGCGCTGTTATAGCTCGTGTGACGCCTCC

ลำดับเบสของ Wild yeast หมายเลข 13

ATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCG
 AGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCCTGCGGAATTGTAATTTG
 AAGGTTTCGTGGTCTGAGTCGGCCGCGCCCAAGTCCATTGGAACATGGCG
 CCTGGGAGGGTGAGAGCCCCGTATGGCGCACGCCGACTCTTTGTACACCG
 CGGCTCCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTA
 AATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTAC
 AGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTG
 AAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACGGTTTTTACCGGGCCA
 GCGTCGAAAAGGGGGGAGGAACAAGAACTCGAGAATGTGGCGCGCACCTT
 CGGGCGCGCGTGTATAGCTCGTGTGACGCCT

ลำดับเบสของ Wild yeast หมายเลข 14

ATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTCCCTTAGTAACGGCG
 AGTGAACCGGAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGCCAACAGGCCGAGTTGT
 AATTTGTAGATGGCTACACTGCATAATAGTAGATGCTCAAGTTCTTTGGA
 AAAAGACATCATGGAGGGTGACAATCCCGTGAGGCATGTTACTAGGAGCA
 TATAGTGGGCTTTCTAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTG
 CGTGGTGAATACCATGTAAAGCTAAATATTGGACGAGAGACCGATAGCGAA
 CAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTCCGAAAGGAGAGTGAAATA
 GTACGTGAAATTGTTAAAGTGGAAGGGCTTGAGATCAGAATTGGTAGTTT
 GGGTTCCACGTCCTCTGGGGGCGTGTACTCCCTTTCCACCGGGCCAGCG
 GGAGTTTCGTCT

ลำดับเบสของ Wild yeast หมายเลข 15

TCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACCGGGATTGCCTTAGTAACGGCGA
 GTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAG
 TTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCCTTGCTATGTTCCCTT
 GGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGT
 TCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTA
 AGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAG
 CGAACAAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGA
 AAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTG
 TTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGG
 CCAGCATCAGTTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCCCT
 CGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTG
 CGACGTAA

ลำดับเบสของ Wild yeast หมายเลข 16

TCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGA
 GTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCCTGCGGGAATTGTAATTTGA
 AGGTTTCGTGGTCTGAGTCGGCCGCGCCCAAGTCCATTGGAACATGGCGC
 CTGGGAGGGTGAGAGCCCCGTATGGCGCACGCCGACTCTTTGTACACCGC
 GGCTCCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAA
 ATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACA
 GTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGA
 AATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACGGTTTTTACCGGGCCAG
 CGTCGAAAAGGGGGGAGGAACAAGAACTCGAGAATGTGGCGCGCACCTTC
 GGGCGCGCGTGTATAGCTCGTGTGACGCCTCCATCCCTTTTCGAGGCC
 TG

ลำดับเบสของ Wild yeast หมายเลข 17

TATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGC
 GAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCCTGCGGGAATTGTAATTT
 GAAGGTTTTGTGGTCTGAGTCGGCCGCGCCCAAGTCCATTGGAACATGGC
 GCCTGGGAGGGTGAGAGCCCCGTATGGCGCACGCCGACTCTTTGTACACC
 GCGGCTCCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGT
 AAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTA
 CAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGT
 GAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACGGTTTTTACCGGGCC
 AGCGTCGAAAAGGGGGGAGGAACAAGAACTCGAGAATGTGGCGCGCACCT
 TCGGGCGCGCGTGTATAGCTCGTGTGACGCCT

ลำดับเบสของ Wild yeast หมายเลข 18

TCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTCCCTTAGTAACGGCGA
 GTGAACCGGAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGCCAACAGGCCGAGTTGTA
 ATTTGTAGATGGCTACACTGCATAATAGTAGATGCTCAAGTTCTTTGGAA
 AAAGACATCATGGAGGGTGACAATCCCGTGAGGCATGTTACTAGGAGCAT
 ATAGTGGGCTTTCTAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGC
 GTGGTGAATACCATGTAAGCTAAATATGGACGAGAGACCGATAGCGAAC
 AAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTCCGAAAGGAGAGTGAAATAG
 TACGTGAAATTGTTAAAGTGAAGGGCTTGAGATCAGAATTGGTAGTTTG
 GGTTCCACGTCTCTTGGGGCGTGTACTCCCTTTCCACCGGGCCAGCGG
 GAGTTT

ลำดับเบสของ Wild yeast หมายเลข 19

TAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACCGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGA
 AGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGT
 AATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCCTTGTCTATGTTCCCTTGGAA
 CAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCGGTTCTT
 TGTAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTG
 GGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAA
 CAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAA
 GTACGTGAAATTGTTGAAAGGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTTTT
 GTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAG
 CATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCCTCGGT
 AAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGAC
 GTAA

ลำดับเบสของ Wild yeast หมายเลข 20

ATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCG
 AGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCCTGCGGGAATTGTAATTTG
 AAGTTTTCGTGGTCTGAGTCGCCCCGCCCCAAGTCCATTGGAACATGGCG
 CCTGGGAGGGTGAGAGCCCCGTATGGCGCACGCCGACTCTTTGTACACCG
 CGGCTCCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTA
 AATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTAC
 AGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTG
 AAATTGTTGAAAGGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACGGTTTTACCGGGCCA
 GCGTCGAAAAGGGGGGAGGAACAAGAACTCGAGAATGTGGCGCGCACCTT
 CGGGCGCGCGTGTATAGCTCGTGTGACGCCTCCA

ลำดับเบสของ Wild yeast หมายเลข 21

TCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGA
 GTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCCTGCGGGAATTGTAATTTGA
 AGTTTTCGTGGTCTGAGTCGCCCCGCCCCAAGTCCATTGGAACATGGCGC
 CTGGGAGGGTGAGAGCCCCGTATGGCGCACGCCGACTCTTTGTACACCGC
 GGCTCCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAA
 ATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACA
 GTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGA
 AATTGTTGAAAGGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACGGTTTTACCGGGCCAG
 CGTCGAAAAGGGGGGAGGAACAAGAACTCGAGAATGTGGCGCGCACCTTC
 GGGCGCGCGTGTATAGCTCGTGTGACGCCT

ตารางที่ ข.5 ผลวิเคราะห์ปริมาณ DMS ในผลิตภัณฑ์เบียร์ที่หมักโดยยีสต์ทั้ง 3 แบบ (ppb)

สายพันธุ์	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		เฉลี่ย (mean)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)
	1	2	3	4		
Brewer yeast	83.63	85.60	39.81	46.05	63.77 a	24.21
<i>Cla. lusitaniae</i>	9.26	9.11	5.85	3.97	7.05 b	2.59
Brewer yeast+ <i>Cla. lusitaniae</i>	73.37	73.19	51.28	35.80	58.41 a	18.30

ตารางที่ ข.6 ผลวิเคราะห์ปริมาณ Acetaldehyde ในผลิตภัณฑ์เบียร์ที่หมักโดยยีสต์ทั้ง 3 แบบ (ppm)

สายพันธุ์	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		เฉลี่ย (mean)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)
	1	2	3	4		
Brewer yeast	8.17	8.95	4.03	5.17	6.58 a	2.35
<i>Cla. lusitaniae</i>	1.74	1.92	1.40	1.73	1.70 b	0.22
Brewer yeast+ <i>Cla. lusitaniae</i>	8.14	8.05	3.85	6.20	6.56 a	2.02

ตารางที่ ข.7 ผลวิเคราะห์ปริมาณ Ethyl acetate ในผลิตภัณฑ์เบียร์ที่หมักโดยยีสต์ทั้ง 3 แบบ (ppm)

สายพันธุ์	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		เฉลี่ย (mean)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)
	1	2	3	4		
Brewer yeast	27.86	29.13	8.90	8.62	18.63 c	11.41
<i>Cla. lusitaniae</i>	51.02	49.39	24.55	27.68	38.16 a	13.98
Brewer yeast+ <i>Cla. lusitaniae</i>	37.26	35.52	14.41	14.98	25.54 b	12.55

ตารางที่ ข.8 ผลวิเคราะห์ปริมาณ Isoamyl acetate ในผลิตภัณฑ์เบียร์ที่หมักโดยยีสต์ทั้ง 3 แบบ(ppm)

สายพันธุ์	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		เฉลี่ย (mean)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)
	1	2	3	4		
Brewer yeast	0.64	0.67	0.28	0.34	0.48 a	0.20
<i>Clavispora lusitaniae</i>	0.03	0.02	0.05	0.08	0.05 b	0.03
Brewer yeast+ <i>Cla. lusitaniae</i>	0.89	0.81	0.35	0.41	0.62 a	0.27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้