สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ความพยายามในการใช้ยีสต์ที่ผ่านการหมักเบียร์แล้วเพื่อผลิตเป็นสารปรุงรสและกลิ่น

นางสาวจินตนา มาตย์วิเศษ
นายพลกฤษณ์ จิตร์โต
นายยงยุทธ เหล่าโชคชัยกุล

2/๒๙.
จ 482 ค
เลขหมู่ 2537
เลขทะเบียน
วัน.เดือน.ปี

612542362

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2537

Attemp to Utillized spent brewer's yeast for Food Flavour Production

Miss Jintana Maudwisaid

Mr. Ponlakit Jitto

Mr. Youngyuth Laochookchaikul

Special Project Submitted in Partial fulfillment

of the Requirements for the Bachelor Degree of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Lardkrabang

โครงงานพิเศษ ความพยายามในการใช้ยีสต์ที่ผ่านการหมักเบียร์แล้วเพื่อผลิตเป็นสาร
ปรุงรสและกลิ่น

โดย นางสาวจินตนา มาตย์วิเศษ
นายพลกฤษณ์ จิตร์โต
นายยงยุทธ เหล่าโชคชัยกุล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. เรียม เตชะโสภณมณี

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรบัณฑิต

(อ. อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล) หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะกรรมการตรวจสอบโครงงานพิเศษ

(ผศ.ดร. มาลินี ตันติยาภรณ์) ประธานกรรมการ

(ผศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต) กรรมการ

(ผศ.ดร. เรียม เตชะโสภณมณี) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

โครงงานพิเศษ ความพยายามในการใช้ยีสต์ที่ผ่านการหมักเบียร์แล้วเพื่อผลิตเป็นสารปรุงรสและกลิ่น

โดย นางสาวจินตนา มาตย์วิเศษ

นายพลกฤษณ์ จิตร์โต

นายยงยุทธ เหล่าโชคชัยกุล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. เรียม เตชะโสภณมณี

ปีการศึกษา 2537

บทคัดย่อ

ในการผลิตสารปรุงรสและกลิ่นจากยีสต์ซึ่งเป็นยีสต์ที่ผ่านการหมักเบียร์จนหมดสภาพแล้ว หลักการสำคัญอยู่ที่การกำจัดฮอพออกจากเซลล์ซึ่งน้ำธรรมดาไม่สามารถล้างให้ฮอพออกได้จากการทดลองพบว่าการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.1 % ปริมาตรที่ใช้เป็น 2 เท่าของน้ำหนักยีสต์ ใช้เวลาในการคนเพื่อให้ยีสต์สัมผัสกับน้ำด่าง 10 นาที และถ้าการล้างยีสต์ 2 ครั้งจะให้ผลในการกำจัดฮอพออกได้ 60 % แต่ถ้าใช้ด่างล้างยีสต์เพียงครั้งเดียวแต่ใช้เวลาคน 30 นาที และตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาทีจะให้ผลในการกำจัดฮอพเพียง 44 % การนำน้ำด่างที่ผ่านการล้างยีสต์แล้ว 1 ครั้ง มาทำการล้างฮอพเพื่อลดปริมาณน้ำเสียที่จะเกิดขึ้น โดยใช้เวลาในการคน 30 นาที และตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาที พบว่ากำจัดฮอพได้ 28 %(ทั้ง 3 ตัวอย่าง หลังจากการล้างด้วยด่างจะต้องล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง) ยีสต์ที่ผ่านการล้างแล้ว จะมาทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี ออโตไลซิสที่ 45 องศาเซลเซียส เวลา 36 ชั่วโมงจะได้ยีสออโตไลเซส 34 % (ปริมาตร/ปริมาตร) นำไปแยกเศษเซลล์และเซลล์ที่มีชีวิต ด้วยเครื่องปั่นแยก ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปทำแห้งด้วยการ spray dryer ที่อุณหภูมิเข้า 197 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิออก 97 องศาเซลเซียสได้ยีสต์ผง สีขาวครีม มีกลิ่นคล้ายเนื้อ (aroma meat like flavour) มีรสคล้ายรสของกรดกลูตามิก

Special Project Title	Attemp to Utillized spent brewer's yeast for Food Flavour Production
Name	1. Miss Jintana Maudwisaid
	2. Mr. Ponlakit Jitto
	3. Mr. Youngyuth Laochookchaikul
Sopecial Project Adviser	Assist Prof.Dr.Ream Techasophonmani
Academic Year	1994

Abstract

Production of flavour from spent brew's yeast the important step is debittering. In order to do this distilled water can not be used but weakly alkaline. It was observed that using 2 fold volumn at 0.1 % NaOH per cell wet weight stirred 10 minutes 2 time and washed 3 times by distilled water . Gave the result in 60 % debittering. If was used to wash cell only 1 times stirred 30 minutes, waited for 30 minutes, the result was 44 % debittering. when reused 0.1 % NaOH from first method, doing the same as second method, the result was 28 % debittering for under not higher than 10 degree c.

Clean yeast was lysised by Autolysis at 45 degree c 36 hours. Centrifuged 10,000 rpm, supernatant is yeast autolysate. (getting dry yeast by Spray dryer Temp in 197 degree c Temp out 97 degree c)

Dry yeast autolysate is white cream, has aroma meat like flavour and taste like glutamic acid.

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิตขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. เรียม เตชะโสภณมณี ผู้ซึ่งให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้านตลอดจนให้คำแนะนำนานา ประการ และ กำลังใจซึ่งส่งผลให้โครงงานพิเศษนี้ดำเนินไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ สุธีร์ ปรางค์ทอง ที่ให้ความสะดวกในการไปเอายีสต์ที่ใช้ในการทดลอง และ คุณออมศรี ชลายน ผู้ซึ่ง ให้ความกรุณาในการวิเคราะห์หาปริมาณความขม จากบริษัทบุญรอด เบเวอร์รี จำกัด และขอกราบพระคุณ รศ. จินดา นัยเนตร ผู้ซึ่งให้ความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ เครื่องใช้ ทาง วิทยาศาสตร์ รวมทั้งห้องเย็น ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา ให้ความสะดวกในการ ใช้สถานที่ของ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย มหิดล และขอขอบคุณผู้ เกี่ยวของ เพื่อนๆ น้องๆ ที่คอยช่วยเหลือในทุกๆเรื่อง

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสารที่เกี่ยวข้อง	4
ประวัติการหมักเบียร์	4
คุณลักษณะโดยทั่วไปของยีสต์	6
ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยยีสต์	7
ออโตไลซีส	11
พลาสโมไลซีส	15
ไฮโดรไลซีส	17
โวลาไทล์ในยีสต์สกัด	18
ฮอพ	20
การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี เคลดาลฮ์	27
Flavour	29
บทที่ 3 อุปกรณ์ สารเคมี และ วิธีทดลอง	32
บทที่ 4 ผลการวิจัย และ วิจารณ์	42
บทที่ 5 สรุปการทดลอง	56
ภาคผนวก ก. กรรมวิธีการผลิตเบียร์	57
ภาคผนวก ข. การเก็บสารเคมี	60
ภาคผนวก ค. วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณและคุณภาพของโปรตีน	62
เอกสารอ้างอิง	68

สารบัญตาราง หน้า

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณและมูลค่าการนำเข้าของสารปรุงรสกลิ่นอื่นๆ 2
ตารางที่ 2 แสดงคุณสมบัติของเอ็นไซม์โปรตีเอสในยีสต์ 13
ตารางที่ 3 แสดงองค์ประกอบของฮอพ 26
ตารางที่ 4 แสดงเวลาที่คนและเวลาที่ตั้งทิ้งไว้ของแต่ละตัวอย่างจาก การทดลองย่อยที่ 1 36
ตารางที่ 5 แสดงเวลาที่คนและเวลาที่ตั้งทิ้งไว้ของแต่ละตัวอย่างจาก การทดลองย่อยที่ 2 36
ตารางที่ 6 แสดงผลการทดลองที่ 1 42
ตารางที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นในยีสต์ที่ทำการ debitterring แล้ว 42
ตารางที่ 8 แสดงค่าพีเอชของแต่ละส่วนของการล้างยีสต์ด้วยสาร ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.1 % 2 ครั้ง 43
ตารางที่ 9 แสดงค่าพีเอชในการศึกษาการล้างยีสต์ด้วยสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 ครั้ง 43
ตารางที่ 10 แสดงค่าพีเอชของแต่ละตัวอย่างทั้ง 4 ตัวอย่างเพื่อเปรียบ เทียบความสามารถในการกำจัดฮอพ 44
ตารางที่ 11 แสดงพีเอชในยีสต์ออโตไลเสท 44
ตารางที่ 12 แสดงปริมาณโปรตีน ในยีสต์ออโตไลเสทก่อนทำให้เข้มข้น 45
ตารางที่ 13 แสดงปริมาณโปรตีน ในยีสต์ออโตไลเสทหลังทำให้เข้มข้น 46
ตารางที่ 14 แสดงปริมาณความขมของทั้ง 4 ตัวอย่าง 46
ตารางที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการหาโปรตีนใน แบบต่างๆ 67

สารบัญรูป หน้า

รูปที่ 1 ไดอะแกรมแสดงการแตกของเซลล์ 14
รูปที่ 2 แสดงการเกิดพลาสโมไลซิสในเซลล์ยีสต์ 16
รูปที่ 3 แสดงสีของน้ำด่างที่ใช้ล้างสเป็นท์บลูเวอร์ยีสต์ซ้ายไปขวา 48
ขวดที่ 1 แสดงยีสต์ที่ล้างด้วยด่าง 1 ครั้ง
ขวดที่ 2 แสดงยีสต์ที่ล้างด้วยด่าง 2 ครั้ง
ขวดที่ 3 แสดงยีต์ที่ล้างด้วย NaCl 0.85 %
ขวดที่ 4 แสดงยีสต์ที่ล้างด้วยน้ำด่างที่นำกลับมาใช้ (recycle alkaline)
รูปที่ 4 แสดงสีของน้ำกลั่นที่ใช้ล้างด่างออก 48
รูปที่ 5 แสดงสีของน้ำแต่ละขั้นเริ่มจาก ขวดแรกเป็นสีของน้ำด่าง ขวดที่ 2,3,4 เป็นน้ำกลั่นที่ใช้ใน การล้างยีสต์ 1,2,3 ตามลำดับและรูปสุดท้ายเป็นการเปรียบเทียบกับน้ำกลั่นธรรมดา 49
รูปที่ 6 แสดงการวัดพีเอช 49
รูปที่ 7 การนำยีสต์ไปทำออโตไลซีสโดยใช้ incubator shaker 50
รูปที่ 8 ลักษณะยีสต์ที่ผ่านการออโตไลซีสที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง 50
รูปที่ 9 การชั่ง balane เพื่อปั่นเซลออก 51
รูปที่ 10 การนำไปปั่นแยกเศษเซลล์และเซลล์ที่ยังไม่แตกออก 51
รูปที่ 11 รูปออโตไลเซทที่แยกชั้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ 52
รูปที่ 12 ยีสต์ออโตไลเซท ที่แยกเศษเซลออกมาแล้ว 52
รูปที่ 13 เครื่อง Spray dryer 53
รูปที่ 14 แสดงยีสต์สกัดที่ผ่านการทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง spray dryer 53
รูปที่ 15 แสดงยีสต์สกัดที่ผ่านการทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง spray dryer 54
รูปที่ 16 แสดงยีสต์สกัดที่ผ่านการทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง spray dryer 54
รูปที่ 17 ฮอพที่แยกออกมาจากยีสต์ขณะทำการล้าง 55
รูปที่ 18 เครื่องวัดปริมาณของแข็ง (Solid content) 55

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันปัญหาที่ทุกคนกำลังประสบอยู่อย่างมากและทวีคูณความรุนแรงขึ้นเรื่อย ๆ ทุกขณะคือ ปัญหาสิ่งแวดล้อมเสื่อมโทรมและความเป็นพิษทางมลภาวะ ปัญหาเหล่านี้เกิดขึ้นจากการขาดความสมดุลย์ทางธรรมชาติ เพราะจำนวนสิ่งมีชีวิตที่เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะมลพิษที่เกิดจากมนุษย์เราได้สร้างขึ้นมาเอง

การผลิตทางอุตสาหกรรม เป็นการผลิตที่มีวัตถุประสงค์ทางการค้าเพื่อให้ได้อัตราการผลิตสูง เนื่องจากมีอัตราการผลิตสูงจึงเกิดของเสียปริมาณมากที่จะต้องกำจัด ในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์จะเป็นการผลิตแบบ batch จะใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นตัวเปลี่ยนวัตถุดิบให้เป็น แอลกอฮอล์ และยีสต์เหล่านี้เมื่อนำมาใช้ในการหมัก จะทำการนำยีสต์กลับไปใช้ใหม่อีก 5-7 ครั้งจน กิจกรรม ของยีสต์ลดลง ยีสต์เหล่านี้เรียกว่า spent yeast ซึ่งกำจัดยากปัญหานี้โรงงานผลิตเบียร์ต้องการกำจัด spent yeast โดยไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

spend yeast เป็น yeast ที่มี activity ไม่สูงแต่ก็ยังมีชีวิตอยู่เพราะจะมีการฟูเกิดขึ้นที่อุณหภูมิห้อง ได้มีการกำจัด spent yeast โดยการนำไปถมที่ปรากฏว่า yeast จะมีการฟูและเกิดการ lysis ส่งกลิ่นเหม็นไปทั่ว จึงเปลี่ยนวิธีการกำจัดใหม่โดยการนำไปเลี้ยงสัตว์ปรากฏว่าสัตว์ไม่ชอบที่จะกิน หลังจากนั้นจึงได้มีการศึกษาหาทางกำจัด โดยวิธีอื่น จากการศึกษาพบว่าใน เซลล์ ของ spent yeast จะมีปริมาณโปรตีนตลอดจนกรดอะมิโน และ สารระเหย volatile ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นรสในอาหารต่าง ๆ เช่น กลิ่นเนื้อย่าง กลิ่นผักผลไม้บางชนิด กลิ่นขนมปังกรอบ กลิ่นน้ำปลา และอื่นๆ ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่ามีทางเป็นไปได้ที่จะนำสารเหล่านั้นจาก spent yeast มาผลิตเป็นสารปรุงกลิ่นและรสต่างๆ (flavour)

Flavour หมายถึงสารที่ใช้ใส่ผสมลงในอาหารเพื่อเปลี่ยนแปลงลักษณะของอาหารเดิมให้มีลักษณะที่ดีขึ้นหรืออยู่ที่เราต้องการ เรียกง่ายๆ ว่าสารปรุงแต่งสีกลิ่นรส ในการผลิต flavour ประกอบด้วยเทคโนโลยีทางด้านต่างๆ หลายด้าน โดยประกอบด้วย technology of food colours, odours, tastes ตัวอย่างของ flavour เช่น spicy, กลิ่นเห็ด, กลิ่นสาหร่าย

flavour เหล่านี้จะถูกนำเข้าจากต่างประเทศในปริมาณที่สูงมากเพิ่มขึ้นทุกปี และราคาของ flavour เหล่านี้มีราคาสูงมากดังตารางที่ 1 ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้มีการสนใจนำ spent yeast มาผลิตสารปรุงกลิ่นและรส และทำการทดลองกันอย่างกว้างขวาง ปัญหาหลักของการนำ spent yeast มาใช้คือปริมาณความขมของ spent yeast เนื่องจากในการผลิตเบียร์จะมีการเติมฮอพลงไปเพื่อเพิ่มความขมของเบียร์ดังนั้น spent yeast จึงมีผลที่ไม่ดีในการผลิต flavour จึงจำเป็นที่จะต้องมีวิธีการกำจัดฮอพออกก่อน (debittering)

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณและมูลค่าการนำเข้าของปรุงรสปรุงกลิ่นอื่น ๆ ระหว่างปี พ.ศ. 2531-2535

ปี พุทธศักราช	ของปรุงรสปรุงกลิ่นอื่น ๆ	
	ปริมาณ (เมตริกตัน)	มูลค่า (1,000 บาท)
2531	5,334	517,044
2532	5,512	587,678
2533	5,830	581,159
2534	7,516	666,342
2535	24,494	793,932

ที่มา: " เอกสารสถิติการเกษตรเลขที่ 445", ศูนย์สถิติการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทำการศึกษาวิธีการกำจัด ฮอพ (debittering) ออกจาก spent yeast
2. เพื่อทำการศึกษาสภาวะในการ debittering โดยใช้ด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1%
3. เพื่อทำการศึกษาการ autolysis ของ clean yeast เพื่อให้ได้สารปรุงกลิ่นและรส
4. การนำสารปรุงกลิ่นและรสที่ได้มาเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่เก็บรักษาได้นาน

ขอบเขตการศึกษา

ในการศึกษาได้ทำการศึกษา spent yeast จากบริษัทบุญรอดบริวเวอร์รี่จำกัด โดยนำ spent yeast ทำการศึกษาสภาวะที่ดีในการกำจัดฮอพและทำการกำจัดฮอพ 1 ครั้ง และ 2 ครั้ง โดยใช้ สารละลาย NaOH 0.1 % และได้ทดลองใช้สารละลายด่าง reuse ที่ล้างด่าง 1 ครั้ง แล้วนำไปทำ autolysis จากนี้นำสารที่ได้ไปทำการวัดค่าต่างๆ เช่น โปรตีน ฮอพ และอื่นๆ หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้ง

ประโยชน์ที่คาดว่าที่จะได้รับ

1. ช่วยลดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อมเนื่องจากนำ spent yeast ไปกำจัดโดยวิธีอื่นๆ
2. เพื่อช่วยลดการนำเข้าสารปรุงกลิ่นรส จากต่างประเทศ
3. เพื่อให้ทราบแนวทางการ debitterring จะได้ไปปรับปรุงเป็นการผลิต flavour ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. การทดลองที่ 1 การทดลองหาปริมาณด่างที่เหมาะสมในการล้างยีสต์
2. การทดลองที่ 2 การกำจัดฮอพออกจากเซลล์ยีสต์ และการวัดปริมาณความชื้นใน spent yeast ที่ทำการกำจัดฮอพแล้ว
3. การทดลองที่ 3 การเปรียบเทียบความสะอาดของยีสต์ครีมระหว่างการกำจัดฮอพโดยใช้ด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1% 1 ครั้ง เปรียบเทียบกับ 2 ครั้ง
4. การทดลองเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดฮอพ
5. การทำให้เซลล์ยีสต์แตกด้วยวิธีออโตไลซีสและการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน
6. การวิเคราะห์หาปริมาณความขมในออโตไลซีสทั้ง 4 ตัวอย่าง โดยใช้การวิเคราะห์แบบ international method
7. การวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งรวมและการนำยีสต์ออโตไลเซสไปทำให้เป็นผงแห้งโดยใช้เครื่อง spray dryer

บทที่ 2
ตรวจเอกสารที่เกี่ยวข้อง
ประวัติของการหมักเบียร์

ประวัติของการหมักเบียร์ มีมานานแล้วที่บันทึกไว้โดยมนุษย์ที่เก่าแก่ที่สุด คือได้จากการสนับสนุนของเอกสารและคำจารึกที่ถูกค้นพบในหลุมฝังศพของชาวอียิปต์ ปรากฏว่าเบียร์เคยเป็นที่รู้จักครั้งหนึ่งในชื่อว่า "ไวน์บาร์เลย์" (barley wine) ซึ่งถูกผลิตด้วยวิธีที่เก่าแก่สมัย 5,000 ปีที่แล้ว ข้าวบาร์เลย์ที่ถูกทำให้เป็น มอลท์ (malted barley) มีการเก็บรักษาไว้เป็นพันปี และถูกใช้ในขบวนการหมักซึ่งมีการค้นพบได้จากหลุมฝังศพของชาวอียิปต์นั่นเอง ศิลปะการหมักนี้คล้ายๆ ว่าจะมาจากอารยธรรมเก่าแก่ของชาวเอเชียในประเทศจีนโบราณเบียร์ถูกทำจากข้าวเช่นเดียวกับอารยธรรมตอนต้นของอินเดียที่มีการหมักเครื่องดื่มที่คล้ายๆ กับเบียร์จากมอลท์ เบียร์เหล่านี้ทั้งหมดถูกผลิตขึ้นโดยที่ไม่มีการเติมฮอพ (hop) เว้นแต่บางครั้งในประเทศจีนซึ่งจะใช้ฮอพเพื่อเกิดกลิ่นรส (flavour) ของเบียร์

การหมักเบียร์เริ่มต้นจากการเป็นส่วนหนึ่งของการทำงานของครอบครัวภายในบ้านเช่น ผู้หญิงจะเป็นผู้ทำตามคำสั่งและทำเบียร์ ในศตวรรษที่ 19 วัดวาอารามเริ่มมีการทำเบียร์ เมื่อย้อนกลับไปดูการทำเบียร์ในระดับอุตสาหกรรมจะเกิดจากการย้ายจากครัวเรือนเข้ามาในเมืองและเริ่มมีการพัฒนาขั้นพื้นฐานในศตวรรษที่ 10 และ 11 หลังจากการเริ่มต้นครั้งแรกๆ การผลิตเบียร์ได้พัฒนาเหมือนศิลปะแขนงหนึ่งและเป็นอาชีพที่ต้องใช้ฝีมือ

เบียร์เป็นเครื่องดื่มที่นิยมในประเทศอังกฤษ ในศตวรรษที่ 18 และก็เป็นชนิดหนึ่งของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (ale) ในบ้าน ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีในประเทศอังกฤษในระยะเวลาหนึ่ง ผู้ทำเบียร์จะผลิตเบียร์เพื่อขายสู่สาธารณชน การเติมฮอพเพื่อให้ได้กลิ่นรสในการดื่ม เชื่อว่าเริ่มใช้ครั้งแรกในช่วงปี 1401-1410 และครั้งนั้นฮอพเข้ามาในประเทศอังกฤษ โดยผ่านมาทางประเทศฮอลแลนด์ ในศตวรรษที่ 14 เยอรมันเป็นประเทศหลักของอุตสาหกรรมการหมักเบียร์ และจนถึงศตวรรษที่ 16 อุตสาหกรรมเบียร์มีการเจริญอย่างต่อเนื่องโดยตลอดในเยอรมัน โดยศตวรรษที่ 15 การหมักเบียร์เข้ามาทั้งในยุโรปและอังกฤษ

ในปี 1620 เบียร์ถูกนำเข้าไปอเมริกาเป็นครั้งแรก เพื่อให้เกิดความกว้างขวางขึ้น การหมักแอลกอฮอล์แบบอังกฤษถูกส่งมาพร้อม ๆ กับการแลกคนที่อพยพไปอยู่ที่อเมริกา จนกระทั่งตอนกลางของศตวรรษที่ 19 เบียร์ถูกหมักในอเมริกาซึ่งก็คือเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่รู้จักจนถึงทุกวันนี้ในชื่อ larger beer ซึ่งได้มีการเพิ่มเติมในประเทศเยอรมันตั้งแต่ศตวรรษที่ 13 และถูกแนะนำให้อเมริการู้ในปี 1840 โดยชาวเยอรมันที่อพยพเข้าไปในอเมริกา คนเหล่านี้จะทำเบียร์ในบ้านของเขาเองและเป็นผู้ซึ่งเสนอว่า larger beer ว่าเป็นเบียร์ที่หมักถูกต้องตามทฤษฎีแบบอังกฤษ ทั้งนี้และใน 10 ปีแรกหลังจากการแนะนำการหมัก ลาร์จเจอร์ เบียร์ ก็มีการดำเนินการหมักอย่างต่อเนื่องช้าๆ ด้วยการพัฒนาอุตสาหกรรมในการผลิตที่สำเร็จผล

และการบริโภคของเครื่องดื่มใหม่นี้จนในที่สุด larger beer ก็เข้ามาแทนที่เครื่องดื่มแบบอื่นๆ ดังนั้นคนอเมริกันส่วนใหญ่นิยมชมชอบ larger beer จนถึงปัจจุบันนี้ด้วยการมีความสำคัญๆ เช่น lightness, sparkle และ dryness ที่เป็นการหมักเบียร์ดั้งเดิมของชาวเยอรมัน

ชื่อของเบียร์ในสมัยโบราณกับปัจจุบันมีความแตกต่างกันมาก เบียร์สมัยใหม่นี้ที่จริงแล้วก็คือผลิตภัณฑ์ที่มีการพัฒนามาอย่างยาวนาน และจนกลายเป็นเบียร์ที่เรารู้จักกันในปัจจุบัน ซึ่งก็คือเครื่องดื่มที่ทำมาจาก มอลท์ เป็นส่วนใหญ่ โดยการหมักสารสกัดจากข้าวบาร์เลย์ที่ถูกทำให้เป็น มอลท์ และ ฮอพ รวมถึงการใช้สายพันธุ์พิเศษของยีสต์ โดยไม่นานมานี้ผู้ผลิตเบียร์ก็ได้เอาสารที่ใช้แทนมอลท์ ซึ่งเรียกว่า adjuncts มาแทนที่สำหรับมอลท์ที่แพง ด้วยหลักการและเหตุผลทางเศรษฐกิจเป็นหลัก

คุณภาพสุดท้ายของเบียร์ถูกหาโดยความถูกต้องแน่นอน การควบคุมแฟคเตอร์ทั่วไปที่สนับสนุนการหาคุณภาพในขบวนการทำเบียร์ หลักเกณฑ์สำคัญอย่างแรกคือ คุณภาพของวัตถุดิบที่จะใช้หมัก เช่น มอลท์, ฮอพ, น้ำ และ adjuncts สัดส่วนของส่วนประกอบที่แตกต่างนี้จะใช้ในขบวนการหมักและมีผลกระทบโดยตรงต่อรสชาติของน้ำเบียร์สุดท้าย ลำดับที่สองประกอบด้วยขบวนการ ไฮโดรไลซีส ด้วยเอนไซม์, การทำให้ละลายน้ำ, การสกัดสาร และการเกิดไอโซเมอร์ตามลำดับ การหมักในเกเดียน (gredients) และการแยกส่วนที่สามารถละลายได้ออกจากส่วนที่เป็นอนุภาคในขบวนการหมัก วิธีทำประกอบด้วย milling, mashing, lautering, kettle boiling และน้ำสำหรับเติม แฟคเตอร์ตัวที่ 3 คือ ขบวนการหมักที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนของสับสเตรคือ
น้ำตาล โดยการย่อยจากมอลท์และ adjuncts ไปเป็นเบียร์ที่ยอมรับได้ จากการใช้สายพันธุ์พิเศษของยีสต์ แฟคเตอร์ที่ 4 เกี่ยวข้องกับขบวนการหลังการหมักที่ประกอบด้วย การบ่ม, การทำให้ใส และการบรรจุ

คุณลักษณะโดยทั่วไปของยีสต์

ยีสต์แสดงบทบาทที่สำคัญในกระบวนการทำเบียร์ไม่เฉพาะแต่การเปลี่ยนน้ำตาลในการหมักน้ำเวิร์ท (wort)ให้เป็นเอธานอลและคาร์บอนไดออกไซด์เท่านั้น แต่มันจะผลิตสารประกอบที่ไม่ให้กลิ่นรสและสารประกอบที่ให้กลิ่นรสต่างๆที่ก่อให้เกิดเป็นกลิ่นรสทั้งหมดของเบียร์ จนได้เป็นความกลมกลืนเหมาะสมก่อนที่จะเข้ากระบวนการทำให้เบียร์ใส ยีสต์ที่ใช้หมักเบียร์ คือ จีนัส Saccharomyces มี 2 สปีชีส์ที่สำคัญ ซึ่งแต่ละสปีชีส์จะขึ้นกับชนิดของกระบวนการผลิตเบียร์

เบียร์ส่วนใหญ่ถูกผลิตโดยการหมักที่ก้น (bottom fermentation process) ในการใช้ยีสต์สายพันธุ์ ***Saccharomyces uvarum*** ยีสต์สายพันธุ์นี้มักจะเหลือเป็นสารแขวนลอยเมื่อจำกัดเวลาในการหมักขณะที่การหมักกำลังดำเนินกิจกรรม หลังจากนั้นยีสต์ส่วนใหญ่จะตกตะกอนลงที่ก้นของถังหมัก สายพันธุ์นี้ส่วนใหญ่ถูกใช้ในเยอรมันและอเมริกาเหนือเพื่อผลิต larger beer และอีกชนิดหนึ่ง ***Sacchromyces cerevisiae*** ถูกใช้ในการผลิต ale คือถูกผลิตโดยยีสต์ชนิดที่ทำการหมักอยู่บริเวณด้านบนของอาหาร และส่วนใหญ่จะเกาะตัวกันที่ผิวหน้าของของเหลวที่ใช้หมักหลังจากการหมักนั้นสมบูรณ์แล้ว ale คือเบียร์ที่นิยมกันในอังกฤษและไอร์แลนด์ แม้จะมีความแตกต่างกันในพฤติกรรมการหมักของทั้ง 2 สปีชีส์ แต่จัดอยู่ในกลุ่ม ***S. cerevisiae*** เหมือนกันจนถึงทุกวันนี้อุตสาหกรรมการหมักเบียร์ยังมีความแตกต่างอย่างต่อเนื่องของทั้ง 2 สายพันธุ์นี้

สายพันธุ์ของยีสต์ในการทำเบียร์โดยทั่วไปเป็น polyploid หรือ aneuploid ที่มีจำนวนโครโมโซมที่ไม่แน่นอน คือมีหลาย ๆ ชิ้นส่วนของโครโมโซมถูกพบในสายพันธุ์แฮพพลอยด์ภายใต้สภาวะนี้ดังเช่นสายพันธุ์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมไม่มีการเกิด mating type เพราะสายพันธุ์มีการเกิดสปอร์น้อยมากๆ และสปอร์ส่วนใหญ่ก็ไม่มีชีวิตต่อไปได้ แม้ว่าจะอยู่ภายใต้สภาวะการงอกที่เหมาะสม เนื่องด้วยโพลีพลอยด์ที่สูงของพวกมันและระดับของ recombination ต่ำ สายพันธุ์ที่ใช้ในการทำเบียร์นี้มีพันธุกรรมที่มีความเสถียรมากและจุดอ่อนน้อยที่จะเกิดเป็นแรงในการกลายพันธุ์ การคัดเลือกโพลีพลอยด์ที่มีความเสถียรของยีนสูงๆ หรือ แอนยูพลอยด์ที่สำหรับการทำเบียร์ให้เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนนี้เพื่อจะสนับสนุนการผลิตที่มีคุณภาพคงที่และผลิตเบียร์ในโรงหมักเบียร์โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยยีสต์

ถึงแม้ว่ายีสต์บางครั้งถือว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์กับมนุษย์มาตั้งแต่ครั้งโบราณกาล บทบาทของมันถูกแสดงต่อเนื่องมาในวิถีชีวิตของอารยธรรมที่ผ่านมา แต่ผู้คนไม่รู้จักมัน จนกระทั่งมีการค้นพบกล้องจุลทรรศน์โดยนาย Van Leeuwenhoek หลังจากนั้น 2 ศตวรรษ หลักฐานขณะนั้นเชื่อว่าเครื่องดื่มที่ซับซ้อนคล้ายเบียร์มีต้นตำรับในอียิปต์ประมาณก่อนคริสศักราช 6,000 ปี โดยก่อนคริสศักราชราว 3,000 ปี มีการทำขนมปังและทำเบียร์ขึ้นเช่นเดียวกับการสนับสนุนด้วยเอกสารตามประวัติศาสตร์ของชาวแอซซี (Assyrian) และชาวอียิปต์ ซึ่งระบุว่าอยู่ในช่วงย้อนกลับไปราว 3,500 ปี ก่อนคริสศักราชได้มีการพูดพาดพิงถึงองุ่นและไวน์

เมื่อศตวรรษที่ 18 ผ่านไป ด้วยเหตุผลของอุตสาหกรรมการทำเบียร์ spent yeast กลายเป็นปัญหากากของเสีย หลังจากนั้นผู้ผลิตเบียร์เริ่มคิดที่จะแก้ปัญหาโดยจะนำยีสต์มาใช้ให้สำเร็จให้ได้ ซึ่งก็ทำขึ้นมาเพื่อแทนที่กากของเสียบางส่วน ดังเช่น spent yeast ใช้ฉีดลงบนพื้นที่การเกษตรเพื่อให้เป็นแหล่งปุ๋ยโดยส่วนใหญ่ จนเมื่อจบศตวรรษที่ 19 การศึกษาหลาย ๆ ครั้งที่แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของยีสต์ เช่น สารอาหารเสริมสำหรับทั้งคนและสัตว์ ขั้นต้นเลยคือมันมีระดับโปรตีนสูง ไม่นานมานี้การศึกษามีจุดบ่งบอกถึงความสำคัญของยีสต์สำหรับทำเบียร์นี้เช่น เป็นแหล่งวิตามินบีรวมที่ดีเลิศ ผู้ผลิตส่วนใหญ่เห็นถึงโอกาสของการค้นพบนี้เริ่มต้นที่จะค้นคว้าเพิ่มเติมเพื่อที่จะผลิตผลผลิตทางการค้าให้ดีกว่า ให้มีกำไรมากที่สุด

ความพยายามของผู้ริเริ่ม เริ่มทำในประเทศอังกฤษและเยอรมันนีเริ่มชักชวนให้มีการพัฒนาของความหลากหลายของสารอาหารและสารให้กลิ่นรส จากการย่อยยีสต์ที่ใช้ทำเบียร์ (brewer's yeast) จนพบอุตสาหกรรมอาหารที่เป็นที่ต้องการการวิจัยอย่างต่อเนื่องของเรื่องนี้ในระหว่าง 10 ปีเศษที่ผ่านมา ได้นำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ในหลายๆ ผลิตภัณฑ์ที่ถูกย่อยจากเบเกอร์ยีสต์และบลูเวอร์ยีสต์ ผลิตภัณฑ์ที่ย่อยจากยีสต์ส่วนใหญ่ทางการค้าที่สำคัญเช่น

1) ผลิตภัณฑ์สารให้กลิ่นรสและสารเพิ่มกลิ่นรส
2) ผลิตภัณฑ์ที่เป็นอาหารเสริม
3) สี
4) เอนไซม์
5) ผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์และเครื่องสำอางค์

ผลิตภัณฑ์ให้กลิ่นรสและสารเพิ่มกลิ่นรส

(Flavour products and flavour enhancers)

yeast extracts

ยีสต์สกัดหาได้ง่ายในตลาดเช่น รูปของผงแป้งหรือหนืดเหมือนแป้งเปียก (paste) และมีการถูกนำมาใช้เพิ่มมากขึ้นโดยเป็นตัวให้กลิ่นรสในอุตสาหกรรมอาหาร มันจะมีความเข้มข้นของส่วนที่ละลายน้ำ ยีสต์ที่เกิดออโตไลซีส หลาย ๆ ครั้ง ซึ่งขบวนการย่อยที่สำคัญจะสำเร็จได้โดยการ
กระตุ้นให้เกิดการย่อยตัวเองของยีสต์โดยเอนไซม์ที่จะละลายอยู่เป็นสารประกอบที่บรรจุในเซลล์ ยีสต์สกัดสามารถทำได้โดยการ ไฮโดรไลซีส โดยการใช้ รีเอเจนท์ ภายนอกหรือเอนไซม์ที่สามารถถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ ซึ่งจะอยู่ในรูปของการย่อยที่สูง ยีสต์สกัดถูกยอมรับอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหารระหว่าง 10 ปีเศษที่ผ่านมา เช่นเป็นตัวให้กลิ่นรสที่ทำจากธรรมชาติ สารเหล่านี้ราคาแพง ในทางเกี่ยวข้องกับสารให้กลิ่นรสอื่นๆ (ซึ่งส่วนใหญ่จะไม่ทำจากธรรมชาติ) บนพื้นฐานของกลิ่นรสที่เพิ่มขึ้นอย่างสมบูรณ์พวกสารเหล่านี้ถูกใช้กว้างขวางขึ้นเช่น เป็นแหล่งอาหารเสริมรวมในการเตรียมอาหารที่จะเลี้ยงจุลินทรีย์ในเพลต ผลิตภัณฑ์จากยีสต์สกัดจากทั่วโลก มีจำนวนประมาณ 35,000 ตันต่อปี

ในหลายๆ ครั้งเมื่อเกิดมียีสต์เหลือในอุตสาหกรรมทำเบียร์และยังมีราคาถูก จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์เพิ่มขึ้นในผลิตภัณฑ์ของสารสกัดไปเป็นอาหารที่ต้องการในอุตสาหกรรมการหมักสารสกัดถูกทำจากยีสต์ที่เจริญในช่วงปฐมภูมิเช่น ***Saccharomyces cerevisiae.*** (brewer yeast), ***C. utislis*** หรือ ***Kluyveromyces marxianus.*** มีกลิ่นรสเฉพาะบางสิ่งที่แตกต่างจาก บรูเวอร์ยีสต์ ถึงแม้กระนั้นมันก็มีกลิ่นรสที่พิเศษไม่เหมือนใคร และถูกใช้อย่างกว้างขวางเหมือนสารให้กลิ่นรสในอุตสาหกรรมอาหาร แม้ว่าบรูเวอร์ยีสต์นี้จะหาง่ายและมีในปริมาณมาก และยิ่งไปกว่านั้นราคาถูก แต่มันก็มีพฤติกรรมทางกลิ่นรสที่ไม่พึงปรารถนา เช่น ผลของการมี ฮอพเรซิน มากเกินไป และของแข็งของเบียร์จากการหมักในโรงเบียร์ ฮอพเรซินนี้ ส่วนใหญ่มีรสขม เป็นสารปฐมภูมิของ humulones และ isohumulones ที่มีอยู่ในเบียร์หรือสารประกอบที่อยู่รอบๆ เยื่อหุ้มและถูกดูดซับเข้าไปยังบริเวณผิวของเซลล์ยีสต์ ยิ่งไปกว่านั้นขบวนการของ ยีสต์ครีมนี้ ต้องมีขั้นตอนการ debittering (บางครั้งเป็นการเสียค่าใช้จ่ายสูง) และการ debittering (การนำความขมออก) บางส่วนทำให้สารสกัดในขั้นสุดท้ายมีความขมน้อยลง การให้ได้กำไรบ่อยครั้งมีผลมาจากกลิ่นรสของทั้งหมด แต่ในทางตรงกันข้ามยีสต์ที่มีการเจริญในขั้นปฐมภูมิจะมีต้นทุนมากกว่าเมื่อเทียบกับบรูเวอร์ยีสต์ จึงทำให้มีราคาสูงกว่าเมื่อพิจารณาถึงราคาวัตถุดิบที่สูงกว่า

ชนิดของยีสต์สกัดที่แตกต่างนำมาใช้ได้สำหรับอาหารแต่ละอย่าง โดยมีหลายๆ แฟคเตอร์ที่มีผลกระทบกระเทือนดังเช่น ความแตกต่างของคุณภาพและอาจเป็นผลสรุปของชนิดและสภาวะของยีสต์ในวัตถุที่ใช้ในการสกัดปัจจุบัน สภาวะที่ใช้ในการสกัดและขบวนการในการละลายยีสต์ ระดับการปนเปื้อนของ

แบคทีเรียระหว่างกระบวนการ ออโตไลซีส ซึ่งเป็นการย่อยด้วยตัวเองที่สำคัญของยีสต์ ซึ่งต้องการการขัดขวางของเอนไซม์ภายในเซลหลายตัว เอนไซม์พวกนี้ส่วนใหญ่ทำให้เกิดช่องในเซลที่กำลังมีชีวิตอยู่ ซึ่งในเซลทั่วไปเป็นที่อยู่ของ เมตริกซ์ สภาวะที่เป็นสาเหตุของการตายของเซลส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการย่อยภายใน ด้วยวิธีที่การทำให้เซลมีความรู้สึกน้อย จนทำให้เกิดกิจกรรม ออโตไลติส ความมีชีวิตในยีสต์มีความจำเป็นสูงเพื่อการย่อยตัวเองให้ได้มากที่สุดระหว่างการเกิด ออโตไลซีส

กลิ่นและรสของผลผลิตสุดท้ายมีผลกระทบด้วยโดย การนำเสนอเรื่องราวภายนอกในยีสต์ที่เป็น slurry ซึ่งเป็นกรณีเมื่อสับสเตรตถูกใช้ในกระบวนการคือ spent yeast หรือ distiller yeast โดยทั่วๆ ไป เบเกอร์ยีสต์ที่ถูกล้างแล้วผลิตเป็นสารสกัดที่นิ่มนวลกว่าสารสกัดที่ทำจากยีสต์ที่เลี้ยงด้วยโมลาส และล้างไม่เพียงพอ ปรากฏการณ์นี้เห็นได้โดยการผลิตสารสกัด ***K. maxianus*** ไปจนถึงการนำกลิ่นรสแบบเนื้อที่พึงปรารถนาออกมาเช่นเดียวกับระดับของความขมที่เป็นส่วนประกอบนำจาก สเปนท์ บรูเวอร์ ยีสต์ ไปผ่านขบวนการสามารถหาก่อนที่จะมีผลกระทบต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้าย

ผู้ผลิตอาหารบางคนไม่เห็นถึงการมีความขมบางชนิดในสารสกัด พวกเขาหวังเพียงจะใช้ในการทำเป็นสูตรอาหารเหล่านั้น สารประกอบที่ให้กลิ่นรสที่มีอยู่ สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาที่พวกเขาพึงพอใจกลิ่นรสที่สำคัญเพื่อการปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ระดับความขมของสารสกัดสุดท้ายสามารถควบคุมการเกิดโดยระดับของประสิทธิภาพการล้างเริ่มต้นของ สเปนท์ ยีสต์ การล้างด้วยอัลคาไลน์ บางครั้งเพื่อที่จะทำให้รสขมลดน้อยลง แม้กระนั้นเช่นการทำเพื่อลดผลที่ได้ของสารสกัดสุดท้าย การปนเปื้อนเกิดขึ้นในระหว่างการผลิตเป็นธรรมดา แต่มันจะถูกควบคุมที่ระดับต่ำสุดโดยการควบคุมสภาวะของขบวนการหรือการใช้ antimicrobial สารสกัดที่จะขายเป็นการค้าต้องกำจัดจุลินทรีย์ก่อน

รายละเอียดของวิธีการทำสารสกัดหลาย ๆ ชนิดไม่ได้มีเอกสารอ้างอิงเพราะมีเหตุผลที่เห็นได้ชัด ขั้นตอนการทำพื้นฐานในการใช้โดยผู้ทำสารสกัดส่วนใหญ่ทำการล้างยีสต์ ถ้ามันคือ by product ของอุตสาหกรรมอื่นๆ, การทำให้ละลาย, การแยกสารละลายจากสารที่ถูกย่อยแล้ว, การทำให้ใส, การทำให้เข้มข้น และการทำให้แห้ง

ยีสต์ที่เจริญในช่วงแรกต้องการการล้างที่เหมาะสมเพื่อเคลื่อนของเหลวหลักอีกครั้ง เฉพาะถ้าเจริญบนโมลาส บรูเวอร์ยีสต์ต้องมีชีวิตอยู่รอดให้ได้มากๆ เมื่อเวลาเข้าขบวนการและต้องมีการปนเปื้อนของเชื้อ, ฮอพเรซิน, ทรับ และสารละลายที่ไม่พึงปรารถนา หรือสสารอนุภาคในปริมาณที่ต่ำที่สุด ทรับและสารไม่ละลายถูกแยกโดยผ่านครีมร่างแหที่สั่นสะเทือน ซึ่งมีขนาด 150-200 ไมครอน สารประกอบที่ให้รสขมอื่นที่ถูกเติมไปเช่น ฮอพ ในช่วงแรกของขบวนการหมักเบียร์สามารถนำออกมาได้จาก สเปนท์ ยีสต์ครีม โดยที่ในสัดส่วนของสารละลายเป็นของแข็งของเบียร์หรือสารประกอบที่ถูกดูดซึมที่ผนังเซลล์ของยีสต์ หลังจากนั้นถ้าไม่มีการนำความขมออกในการล้างครั้งแรก ความขมอาจจะถูกปลดปล่อยในช่วงกลางระหว่าง ออโตไลซีส

ฮอพเรซินนี้อยู่ในผิวของผนังเซลล์ยีสต์ อย่างไรก็ตามสามารถทำให้ละลายได้โดยการล้างด้วยอัลคาไลน์ ข้อความหลากหลายในคุณภาพของบรูเวอร์ยีสต์ที่มาจากโรงงานคนละแห่งจะมีผลน้อยต่อความ

แตกต่างในขบวนการผลิต การผลิต yeast extract มี 3 วิธีคือ

1) ออโตไลซีส

2) พลาสโมไลซีส

3) ไฮโดรไลซีส

ออโตไลซีส

(autolysis)

สารโมเลกุลใหญ่ (macromolecule) ทั้งหมดที่มีอยู่ในเซลล์ยีสต์เป็นตัวทำให้เซลล์ยีสต์สามารถมีชีวิตอยู่ต่อไปได้ สารเหล่านี้จะลดน้อยลงจากเซลล์ โดยเยื่อหุ้มที่มีคุณสมบัติ semipermeable ของผนังเซลล์ ซึ่งมีกลไกที่สำคัญในการสนับสนุนค้ำจุนรูปร่างและขนาดของเซลล์ที่เหลืออยู่ ออโตไลซีสคือกระบวนการที่ซึ่งองค์ประกอบของเซลล์ถูกทำให้ละลายโดยการกระตุ้นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อย ซึ่งก็มีอยู่ภายในเซลล์ตามธรรมชาติ การออโตไลซีส สามารถทำได้โดยการนำมาประยุกต์ โดยการควบคุมสภาวะอย่างรอบคอบและระมัดระวังเช่น อุณหภูมิ, พีเอช, เวลา และ การเติมสารที่ช่วยเพิ่มการเกิด ออโตไลซีส การตายของยีสต์มีสาเหตุมาจากความสับสนไม่เป็นระเบียบภายในเซลล์ และการยอมรับเอนไซม์ที่ย่อยอย่างอิสระ รวมไปถึงการเข้าจับโดยขาดการพิจารณาต่อสับสเตรตที่จำเพาะเจาะจงเหล่านั้น การเข้าจับนี้มีสาเหตุมาจากโมเลกุลเหล่านั้น (macromolecule) ขาดการตอบสนองเพราะถูกทำลายไป ซึ่งเหมือนกับการที่โปรตีนและกรดนิวคลีอิก ถูกย่อยจนเป็นหน่วยพื้นฐานที่สามารถละลายน้ำได้ ในธรรมชาติความไม่เป็นระเบียบภายในเซลล์นี้มีผลต่อผนังเซลล์คือ เกิดการรั่วของผนังเซลล์และสูญเสียความสมบูรณ์ของคุณสมบัติ semipermeable ของเยื่อหุ้มเซลล์ และเปิดโอกาสให้สารประกอบที่ละลายน้ำได้รั่วไหลออกจากเซลล์ไป

กลิ่นรสสุดท้ายและผลที่ได้จากสารสกัดในกระบวนการที่ถูกควบคุมอย่างดี โดยมากขึ้นกับอุณหภูมิ, พีเอชระหว่างการมีชีวิตอยู่และความเข้มข้นของยีสต์ และชนิดของกรดที่ใช้ในขบวนการ บางสภาวะที่สารสกัดที่ได้มาให้กลิ่นรสสูง ซึ่งอาจเป็นกลิ่นรสที่ไม่สำคัญ จึงมีความพยายามผลิตสารสกัดที่ให้กลิ่นรสที่พึงพอใจ จำนวนมากแทน ความพยายามวิจัย คือ สิ่งจำเป็นเพื่อที่หาสภาวะที่เหมาะสมดังเช่น ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นรสที่น่าพึงพอใจ

ปกติกรดที่ใช้เพื่อทำการละลายระหว่างการออโตไลซีสส่วนมากเป็นเอ็นไซม์เช่นโปรติเอส, กลูโคเนส,นิวคลีเอส หรือ ฟอสโฟไดเอสเตอเรส เอธิลอะซีเตทถูกใช้บ่อยๆในการเพิ่มการออโตไลซีส และยังช่วยควบคุมการปนเปื้อนให้มีน้อยลงมาก ในกลุ่มโปรตีเอสเช่นปาเปน (papain) ซึ่งเป็นที่รู้กันว่าจะช่วยเพิ่มสารที่สกัดได้มากยิ่งขึ้นแต่เฉพาะในการทำออโตไลซีสที่ใช้เวลานานๆ เช่นที่ปฏิบัติกันในประเทศอเมริกา,อังกฤษ และออสเตรเลีย การเติมปาเปนจะมีผลน้อยมากเมื่อการออโตไลซีสอยู่ระหว่างเวลาที่สั้นกว่า 20 ชั่วโมงเช่นที่ปฏิบัติกันในประเทศญี่ปุ่นและฝรั่งเศส

วิธีการทำออโตไลซีสถูกทำให้เหมาะสมเพื่อผลิตยีสต์สกัดที่มีเกลือโซเดียมต่ำซึ่งก็จะเป็นการได้เปรียบต่อการยอมรับอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร แม้กระนั้นรสชาติอ่อนนุ่มของสารสกัดนี้ ผู้ผลิตก็มีความพยายามที่จะพัฒนากลิ่นรสโดยการรวมกับส่วนประกอบของอาหารอื่นๆ ยีสต์สกัดที่มีโซเดียมต่ำเริ่มเข้ามาเป็นส่วนประกอบที่สำคัญเพิ่มมากขึ้นในอาหารของคนไข้และสูตรอาหารของเด็กอ่อน

ออโตไลซีสหรือการย่อยด้วยตัวเองของเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตอยู่ จะยอมรับได้เมื่อ yeast slurry มีของ

แข็งเหลืออยู่ ประมาณ 15% จะถูกกระทำที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เวลา 24-36 ชั่วโมง ที่พีเอช ประมาณ 5.5 การแตกของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่นี้เริ่มต้นโดยการทำงานของเบต้า (1-3) กลูโคเนสและโปรตีเอส ที่มีอยู่ภายในเซลล์ เบต้า(1-6)กลูโคเนสและแมนแนนเอสก็มีส่วนร่วมในการละลายที่ผนังเซลล์ และมีเอ็น-ไซม์โปรติโอไลติกที่สำคัญ 4 ชนิด ที่แสดงบทบาทส่วนใหญ่ระหว่างการแตกของเซลล์ คือ

1) proteinase ysc A

2) proteinase ysc B

3) carboxypeptidase ysc Y

4) carboxypeptidase ysc S

ทั้ง 4 ชนิดนี้จะอยู่ในแวคคิวโอล (vacuole) เอ็นไซม์เหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งซึ่งจะอยู่ในส่วนนอกของไซโตพลาสซึมของแวคคิวโอล

ภายใต้สภาวะการออโตไลซีสของเซลล์ยีสต์ เริ่มจะตายหลังจากทั้งหมดของเซลล์เริ่มมีการจำกัดการใช้การ macromolecule ขึ้น สภาวะนี้สามารถทำให้เกิดความไม่เป็นระเบียบภายในเซลล์ยีสต์ ซึ่งก็เป็นเครื่องหมายบอกถึงการเริ่มต้นของการเกิดขบวนการออโตไลซีส โดยเริ่มจากการทำลายผนังกั้นของแมตริกส์ในเซลล์ ด้วยการปลดปล่อยเอ็นไซม์โปรติโอไลติกออกจากแวคคิว
โอล เพื่อป้องกันการเกิดเซลล์แมตริกส์ใหม่ขึ้น การทำงานของเอ็นไซม์นี้อย่างแรกคือ ยับยั้งการกระตุ้นระหว่างการฟอร์มตัวของสารที่ซับซ้อน (complex) โดยการทำปฏิริยาโดยตรงกับตัวยับยั้งที่มีปริมาณใกล้ๆกัน

การเติม proteinase ysc A โปรติเนสในแวคคิวโอลที่เหมือนกับ proteinase ysc A, proteinase ysc B, carboxypeptidase ysc Y, carboxypeptidase ysc S และ aminopeptidase เกี่ยวข้องกับโปรตีนที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจงอย่างสูงและการย่อยเปปไทด์ ภายใต้สภาวะธรรมชาติ เอ็นไซม์นี้ส่วนมากมีลักษณะการให้เหมือนในเซลล์ที่กำลังมีชีวิตอยู่ คือสามารถที่จะค้ำจุนแหล่งอะมิโนในแวคคิวโอลที่เป็นสิ่งที่ทำให้โปรตีนในเซลล์ที่ไม่ต้องการหมดไป เพื่อที่จะสร้างโปรตีนขึ้นใหม่ ภายใต้สภาวะออโตไลซีสเอ็นไซม์เหล่านี้จะทำให้โปรติโอไลติกเอ็นไซม์จำเป็นต้องย่อยโดยขาดการพิจารณาในการเข้าจับกับโปรตีนที่อยู่ที่แมตริกส์ ของไซโตพลาสซึม เช่นเดียวกับ เอ็นไซม์นิวคลีเอสที่มีในเซลล์ก็เริ่มทำปฏิกิริยากับอาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอ โดยลดจากโพลีนิวคลีโอไทด์ไปเป็น โมโนนิวคลีโอไทด์,นิวคลีโอไซด์ จนในที่สุดเป็นสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ที่ละลายได้ในอาหารรอบๆตัวยีสต์ได้ ที่บริสุทธิ์เพื่อเพิ่มยีสต์สกัดสดๆ ตามธรรมชาติ จะไปเพิ่มการยับยั้งของตัวยับยั้ง คือ proteinase ysc B และ carboxypeptidase ysc Y แต่จะมีผลน้อยในการดำเนินการที่ยาวนาน ในเอ็นไซม์โปรติโอไลติก ภายใต้สภาวะเหนี่ยวนำของออโตไลซีส (pH 5.5,อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส)

ตารางที่ 2 แสดงคุณสมบัติของเอ็นไซม์โปรติเอสในยีสต์

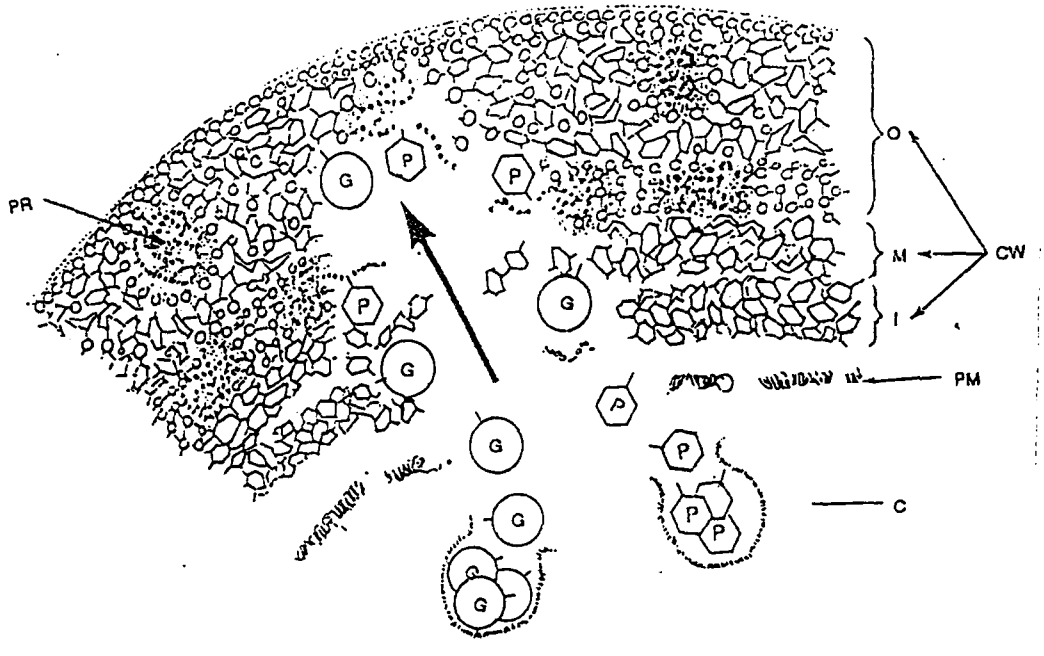
	proteinase ysc A	proteinase ysc B	proteinase ysc Y	proteinase ysc S
type	acid endopeptidase	serine endopeptidase	serine exopeptidase	metallo (Zn^{2+}) exopeptidase
optimum pH	2-6	6-7	4-7	7
optimum T ($^{\circ}C$)	35-40	45-55	45-55	60
cell location	vacuole	vacuole	vacuole	vacuole
solubility	soluble	soluble	soluble	soluble
molecular weight	60,000	32,000-44,000	61,000	not determined
isoelectric pt.	3.8	5.8	3.6	-
inhibitors	protein I^{A}_{3} pepstatin,etc.	protein I^{13}_{2} chymostatin,etc.	protein I^{o} Hg^{2+}	EDTA
cellular role	protein degradation	protein degradation	protein degradation	protein degradation

ผนังเซลล์ซึ่งโดยทั่วไปแข็งและเป็นตัวแสดงรูปร่างของเซลล์ เมื่อคิดถึงการละลายที่เกิดจากอัล-คาไลน์ ละลายเบต้า-กลูแคนภายในเนื้อเยื่อ ที่เนื้อเยื่อชั้นกลางมีการละลายเบต้า-กลูแคนของอัลคาไลน์และเนื้อเยื่อชั้นนอกของกลูโคโปรตีนในที่ซึ่งคาร์โบไฮเดรทถูก phosphorylated เป็นแมนแนน ผนังเซลล์ของยีสต์มีไคตินอยู่ประมาณ 1% โพลีเมอร์ของเอ็นอะเซทิล-กลูโคซามีนเป็นเส้นตรงซึ่งมีโอกาสในการเกิด bud scar ชั้นกลูแคนจะเป็นตัวอย่างในการผสมสารโพลีแซคคาไรด์ ชั้นกลูแคนส่วนประกอบหลักประกอบด้วย 85% เป็นเบต้า-(1-3)-linkกลูแคน และส่วนน้อยประมาณ 15% จะเกิดกิ่งเบต้า(1-6)กลูแคนระหว่างลูกโซ่ที่มีการเชื่อมกัน

เอ็นไซม์กลูโคเนสสามารถแยกได้จากยีสต์ และก็เป็นที่รู้กันว่าสามารถไฮโดรไลซ์เบต้า (1-3) และเบต้า (1-6) ของกลูแคนได้ กลูโคเนสมีส่วนในขบวนการเกิดหน่อ แต่กระนั้นภายใต้การเกิดออ-โตไลติก เบต้า (1-3) กลูโคเนสด้วยการสนับสนุนจากเอ็นไซม์โปรติเนส ก็สามารถทำลายผนังเซลล์ กระบวนการนี้สามารถเพิ่มขึ้นโดยการปล่อยให้ถูกจับโดยเอ็กเทอร์นอลโปรตีนเอส ช่วงแรกเหมือนการเกิดโอกาสหนึ่งกับปาเปนตามด้วยการเติมด้วยไลติกกลูโคเนส เอ็นไซม์ขณะนี้มีประโยชน์ในการค้าเพื่อที่จะพัฒนาปริมาณสารสกัดที่ได้

ยีสต์ที่กลายพันธุ์ด้วยทางเลือกของโครงสร้างของผนังเซลล์ ที่มีความรู้สึกได้สูงต่อเอ็นไซม์ออโตไล

ซีสสามารถเป็นตัวสำคัญเพื่อทำสารสกัด อย่างไรก็ตามตัวมิวแตนท์นี้ส่วนใหญ่จะไม่เสถียร เจริญช้าและชอบที่จะเกิดการแตกของเซลล์ระหว่างการเจริญ มิวแตนท์เหล่านั้นมีความผิดปกติทางสรีระวิทยาที่ปรากฏซึ่งจะสัมพันธ์กับ ความไม่สมบูรณ์ของการสร้างผนังเซลล์ อย่างไรก็ตามด้วยการใช้เทคนิค recomination DNA (rDNA) มันจะเป็นไปได้ที่จะสามารถทำวิศวกรรมของยีสต์เพื่อให้เกิดการออโตไลซีสเร็วขึ้น



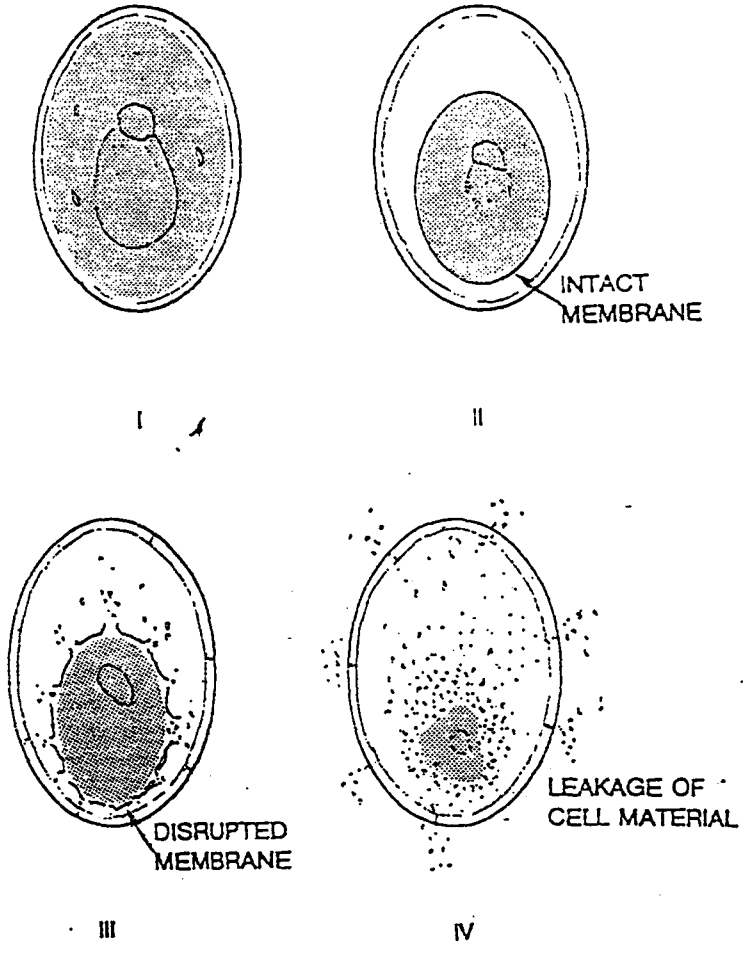
รูปที่ 1 ไดอะแกรมแสดงการแตกของเซลล์ ; C,cytoplasm;CW, cell wall;I, inner-alkali-insoluble layer; M, middle-soluble glucam layer; P,protease; G,gluconase; PM, plasma membrane;PR,protein.

พลาสโมไลซิส

(Plasmolysis)

พลาสโมไลซีส คือปรากฏการณ์ที่ถูกใช้บ่อย โดยผู้ทำการสกัดเพื่อการเริ่มต้นที่รวดเร็วของกระบวนการย่อยเซลล์ กระบวนการนี้เป็นวิธีที่มีราคาสูงและมีการใช้เกลือเป็นตัวทำให้เกิดกระบวนการ ตัวทำละลายอินทรีย์ตัวอย่างเช่น เอธิลอะซิเตท และไอโซโพรพานอล สามารถใช้ในขบวนการนี้ ยีสต์ในที่ที่มีระดับเกลือสูงในอาหาร จะเริ่มสูญเสียน้ำที่บรรจุอยู่ในตัวเซลล์ ในการพยายามที่จะรักษาสมดุลของความดันออสโมติกกับอาหารที่อยู่รอบๆนั้น ภายใต้สภาวะสุดท้าย เช่น ในกรณีของพลาสโมไลซีส สารบรรจุของเซลภายในเนื้อเยื่อพลาสมาวิ่งไปทางหนึ่งจากผนังเซลล์ และที่มักจะเข้ายึดเฉพาะส่วนของปริมาตรเซลล์ภายในผนังเซลล์ การพลาสโมไลซีสที่นานๆมีผลในการตายของเซลล์ เป็นเครื่องหมายบอกถึงการเริ่มต้นของขบวนการย่อยเซลล์ เกลือมักจะถูกเติมเพื่อเป็นตัวกดดันให้บรรลุผลที่ดีที่สุด

แม้ว่าเกลือจะถูกใช้เติมในการทำพลาสโมไลซีส ผลกระทบต่อสิ่งที่เหลือ เช่น การฆ่าแบคทีเรียหรือเหมือนเป็นสารให้กลิ่นรสที่ไม่สามารถจะประเมินค่าต่ำได้ ผลกระทบของการฆ่าแบคทีเรียของมันทำให้ขบวนการมีเกิดการปนเปื้อนน้อยลง เพราะคุณสมบัติพิเศษของเกลือ มันอาจจะเป็นไปได้ในการผลิตยีสต์สกัดโดยการพลาสโมไลซีสด้วยลักษณะที่มีจุลินทรีย์ปริมาณต่ำกว่า อย่างไรก็ตามเพราะปริมาณตัวเกลือที่สูงผลิตภัณฑ์นี้จึงถูกจำกัดในอุตสาหกรรมอาหาร สารสกัดที่มีเกลือโซเดียมต่ำมีความต้องการสูงเช่นการทำโดยการออโตไลซีสดีกว่าพลาสโมไลซิส



รูปที่ 2 การเกิดพลาสโมไลซีสในเซลล์ยีสต์

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ไฮโดรไลซีส

(Hydrolysis)

การย่อยสลายด้วยกรดเป็นการย่อยเซลล์ยีสต์ด้วยกรดแก่ เช่นกรดเกลือ (HCl) ร่วมกับความร้อนเพื่อย่อยสารโมเลกุลใหญ่ๆในเซลล์ยีสต์ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรท และกรดนิวคลีอิก ให้อยู่ในรูปของสารโมเลกุลเล็กที่ละลายได้ ซึ่งมีกระบวนการโดยสังเขปดังนี้ คือนำยีสต์ที่ผ่านการทำแห้งหรือยีสต์สดที่มีน้ำหนักแห้งประมาณ 65-85% มาเติมกรดเกลือ แล้วให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ขึ้นกับความเข้มข้นของกรดโดยปกติจะไฮโดรไลซ์จนกระทั่ง ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดถูกเปลี่ยนไปเป็นแอลฟาอะมิโนไนโตรเจนประมาณ 50-60% จากนั้นทำให้ เป็นกลางด้วยโซดาไฟ (NaOH) กรองแยกส่วนที่ไม่ละลายออกแล้ว ทำให้เข้มข้นและนำไปทำแห้งโดยใช้เครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray drier) จนมีความชื้นสุดท้าย 3-5% ผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า ยีสต์ไฮโดรไลเสท ซึ่งประกอบด้วยเกลือ 40% ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 13% และปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน 8% (โดยน้ำหนัก) แต่เนื่องจากยีสต์ไฮโดรไลเสทมีสมบัติเหมือนกับโปรตีนไฮโดรไลเสทจากพืชซึ่งมีราคาสูงกว่า ยีสต์ไฮโดรไลเสทจึงไม่ได้รับความนิยมเท่าโปรตีนไฮโดรไลเสทจากพืช นอกจากนี้แม้การย่อยสลายด้วยกรดและความร้อนจะให้ผลผลิตสูง แต่ความรุนแรงของกรดจะกัดกร่อนภาชนะที่ใช้ อีกทั้งเป็นกระบวนการที่เสี่ยงอันตราย กรดอะมิโนและวิตามินซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการถูกทำลาย และยังอาจเกิดสารพวกคลอริเนต เช่น 3-chloro-propanediol ซึ่งก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคอีกด้วย

โวลาไทด์ในยีสต์สกัด

สารต่าง ๆ ข้างในยีสต์เป็นตัวก่อให้เกิดสารประกอบ Flavour ต่าง ๆ การทราบชนิดของสารประกอบ Volatile ในยีสต์สกัดจึงมีความจำเป็นอย่างมาก เราสามารถแยกสารประกอบ Volatile ออกมาจากยีสต์และ สามารถจำแนกชนิดของสารประกอบเหล่านั้นได้ โดยวิธีต่าง ๆ ได้ทั้งหมด 3 วิธีดังนี้

1. Gas Chromatography
2. Gas Chromatography-Mass spectrometry
3. Gas Chromatography-Microwave plama detection

วิธีการทดลอง

การแยกสารประกอบ Volatile ออกมาจากยีสต์

Isolation 1. นำ Yeast Extract Compound 300 กรัม รวมกับน้ำกลั่น 300 ลิตรผสมกันใน flash 2 ลิตร ทำการสกัดด้วยวิธี Likens and Nickerson เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้ 2-methylbutane 15 มิลลิตรเป็นตัวทำละลาย หลังจากนั้นทำให้สารมีความเข้มข้นขึ้นโดยการให้ความร้อนภายใต้สูญญากาศจนระเหยเหลือปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วจึงเพิ่มความดันเป็น 0.02 มิลลิเมตรปรอท

Isolation 2. เป็นวิธีการที่เพิ่มความเข้มข้นโดยการ รวม Isolation 1. จำนวน 3 ครั้งจะได้ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วจึงให้ความร้อนภายใต้สูญญากาศจนเหลือปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วจึงเพิ่มความดันจนถึง 0.02 มิลลิตรปรอท

Isolation 3. วิธีการเหมือน Isolation 2. โดยใช้น้ำเปล่าแทน Yeast Extract Compound

การจำแนกชนิดของสารประกอบ Volatile ที่ได้จากยีสต์มีทั้งหมด 3 วิธี

Gas chromatography

วิธีการนี้ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณจำนวนชนิดของสารประกอบ Volatile ใช้เครื่องมือ Gas chromatography ชนิด Pye-Unicam Series 104 และ Perkin Elmer Sigma 2B ใช้column แบบ Packed column และ Capillary column ให้ความร้อนที่ Injector และ Detecter 200 องศาเซลเซียส ใช้ Detecter ชนิด FID. ใช้ Siliga เป็นตัว Stationary phase ใช้ ก๊าซ Helium เป็นตัว Carrier การเพิ่มอุณหภูมิทำได้โดย อุณหภูมิเริ่มต้น 60 องศาเซลเซียสแล้วเพิ่มทีละ 0.5 องศาเซลเซียสทุกนาทีจนถึงอุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส แล้วเปลี่ยนเป็น 2 องศาเซลเซียสทุกๆนาทีจนถึง 17 องศาเซลเซียส สารตัวอย่างที่นำเข้าไปต่อปริมาณของ Carrier เท่ากับ 1 ต่อ 5 ถึง 1 ต่อ 20

Gas Chromatography-Mass spectrometry

อุปกรณ์นี้ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบต่าง ๆ ใน Volatile โดย Gas Chromatography เป็นตัวแยกสารแต่ละชนิดออกมาส่วน Mass spectrometry จะทำการวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบนั้นโดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานที่ผสมลงไปใน Volatile Gas Cromatography ที่ใช้รุ่น Peking Elmer Sigma3 Mass Spectrometry ที่ใช้รุ่น Kratoc MS25 โดยเชื่อมกับ Kratos DS 50S และมีเครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อใช้ในการควบคุม พลังงาน Ionization ที่ใช้ใน Mass Spectrometry ใช้เท่ากับ 70 eletronvolt 100 ไมโครแอมแปร์ อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส ถ้าใช้ชนิด Packed column ใช้อัตราเร็วในการตรวจวัด 3 วินาที ถ้าเป็นแบบ Capilary column ใช้ความเร็วในการตรวจวัด 1 วินาที

Gas Chromatography-Microwave plasma detection

อุปกรณ์นี้ใช้ในการค้นหาจำนวนธาตุต่าง ๆ เช่น C,H,N และ S Gas Chromatography เป็นตัวแยกสารแต่ละชนิดออกมาส่วน Microwave plasma detection เป็นตัวตรวจสอบชนิดของธาตุนั้น ๆ โดยใช้รุ่น Pye-Unicam Series 104 ใช้ก๊าซ Helium บริสุทธิ์ เป็นตัว Carrier ใช้กระแสไฟฟ้า 100 มิลลิแอมแปร์กับก๊าซออกซิเจน แต่ถ้าเป็นก๊าซไนโตรเจนใช้กระแสไฟฟ้า 50 มิลลิแอมแปร์

CHEMISTRY AND ANALYSIS OF HOP AND BEER BITTER ACID

ฮอพวัตถุดิบในการผลิตเบียร์

1.1 แหล่งของฮอพ

ฮอพปลูกเพื่อวัตถุประสงค์ทางการค้าและจะเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมใน พื้นที่ที่เหมาะสมแก่การเจริญของฮอพจะมีอยู่ทั่วโลกดังนี้ ในซีกโลกเหนือบริเวณละติจูดที่ 43°- 54° (แถบยุโรป) , ละติจูดที่ 38°- 51° (แถบอเมริกาหนือ) , ละติจูดที่ 38°- 51° (แถบญี่ปุ่น) ส่วนในซีกโลกใต้คือบริเวณละติจูดที่ 37°- 43° (แถบออสเตรีย) , ละติดจูดที่ 41°- 42° (แถบนิวซีแลนด์) , ละติจูดที่ 35°- 40° (แถบอาร์เจนตินา)

แหล่งที่มีการปลูกฮอพมากคือทางตอนใต้ของตะวันออก และทางตอนกลางของตะวันตกในประเทศอังกฤษ , เขต Saaz และ Auscha ของเชคโกสโลวาเกีย , เขต Hallertau ของเยอรมันนี และในบางพื้นที่ของยูโกสลาเวีย , ในวอชิงตัน และแคลิฟอร์เนียในอเมริกา

ฮอพต้องการดินที่อุดมสมบูรณ์และสภาพอากาศที่เหมาะสม มีช่วงเวลากลางวันที่ยาวนานและอุณหภูมิที่ค่อนข้างอบอุ่น ปริมาณฝนและแหล่งน้ำใต้ดินมีส่วนช่วยให้การเพาะปลูกฮอพประสบความสำเร็จ ฮอพจัดว่าเป็นพืชชนิดหนึ่งที่ยากต่อการเพาะปลูก

1.2 ประวัติและการกำเนิดของฮอพ

ฮอพ (*Humulus lupulus*) เป็นพืชป่าในยุโรปและเอเชียตะวันตกได้มีการกล่าวถึงฮอพในหนังสือ 'Naturalis Historia' ของ Plinius ว่าเมื่อต้นศตวรรษที่ 1ได้มีการปลูกฮอพเป็นพืชสวน เพื่อเอาดอกและรากมาประกอบอาหารเหมือนกับผักชีฝรั่ง บางทีฮอพจะขึ้นระหว่างแปลงที่ปลูกต้น willow (เป็นไม้จำพวกสนุ่นหรือตะไคร้บก) ชาวโรมันเรียกฮอพว่า *Lupus salictarius* แปลว่าหมาป่าในฝูงเกาะเพราะมาขึ้นแซมต้นสนุ่น (ที่ปลูกเพราะต้องการต้นสนุ่นไม่ได้ต้องการฮอพ) และปัจจุบันฮอพมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า ***Humulus lupulus***

พวกสุเมรียนและชาวอียิปต์ได้นำฮอพมาใช้ในการหมักเบียร์เมื่อ 3,000 ปีที่แล้ว ชาวบาบิโลเนียนและพิลลิบทีนได้รู้จักวิธีการทำเบียร์แต่ว่าใช้ฮอพในสัดส่วนที่ได้แน่นอนในการหมักเบียร์

ในศตวรรษที่ 8 และ 9 ได้มีการปลูกฮอพเป็นสวนขนาดใหญ่ในบริเวณวัดซึ่งเป็นแหล่งแรกที่นำฮอพมาปลูกเพื่อเป็นพืชสมุนไพรในการปรุงยา ในปี 822 นักบวชในพีดาร์ดี้ได้นำฮอพมาใช้ในการหมักเบียร์

ในศตวรรษที่ 12-13 ฮอพถูกใช้อย่างแพร่หลายในการผลิตเบียร์ ในประเทศเยอรมันนีเรียกฮอพว่า 'Hopfo' ซึ่งจะให้กลิ่นรสที่ดีแก่เบียร์และมีกลิ่นหอมของสมุนไพรอีกด้วย

ในศตวรรษที่ 14 ได้มีการนำฮอพไปปลูกที่ Flander และมีการสั่งซื้อฮอพโดย John the Fearless ซึ่งเป็นขุนนางในเบอร์กันดีและได้มีการปลูกและนำเข้าฮอพในอังกฤษเรื่อยมา

ในศตวรรษที่ 15 อังกฤษได้ทำสัญญาการค้ากับ Flemish เป็นบริษัทที่ส่งออกฮอพ ปรากฏว่าเรือขนส่งฮอพได้จมลงในปี 949 ที่บริเวณใกล้ ๆ กับกลาเวนนี่ ซึ่งเป็นหลักฐานแสดงให้เห็นว่าที่ประเทศอังกฤษรู้จักฮอพเป็นอย่างดี และได้มีการกล่าวถึงการปลูกฮอพในหนังสืออังกฤษหลาย ๆ เล่ม ความสำคัญของฮอพค่อย ๆ ทวีความสำคัญมากขึ้นในยุโรปในภายหลัง

ในอเมริกาได้รู้จักฮอพโดยบริษัท Massachusetts แต่เริ่มมีการปลูกเป็นการค้าจริงในปี 1629

ในศตวรรษที่ 19 ได้มีการปลูกฮอพในโซเวียตและญี่ปุ่น

ฮอพเริ่มมีบทบาทในการผลิตเบียร์โดยชาวเยอรมันเป็นผู้บุกเบิกและได้มีบทบาทในประเทศอังกฤษจากนั้นจึงมาสู่ประเทศอเมริกาและแถบเอเชีย ปัจจุบันมีประเทศต่างๆ มากมายที่ทำการปลูกฮอพ และการปลูกฮอพก็ไม่ใช่เรื่องยากอีกต่อไป

1.3 ลักษณะของฮอพทางพฤกษศาสตร์

1.3.1 ลักษณะของต้นฮอพ

ฮอพเป็นพืชในแฟมิลี่ Cannabinaceae ซึ่งประกอบไปด้วย 2 จีนัส คือ Humulus และ Cannabis จีนัส Humulus มี 2 สปีชีส์ คือ *Humulus lupulus L.* และ *Humulus japomicus* สปีชีส์ *Humulus japomicus* จะไม่นำมาใช้ในการผลิตเบียร์แต่จะปลูกเพื่อเป็นไม้ประดับ

ฮอพเป็นพืชที่มีดอกเพศเดียวโดยจะขึ้นปนอยู่กับพืชอื่น ๆ ในทางการค้าจะมีความต้องการต้นฮอพตัวเมียเพราะสามารถให้ดอกได้ ต้นฮอพจะมีความทนทานต่ออุณหภูมิที่ต่ำและมีรากที่ใหญ่หยั่งลึกลงไปในดิน ระบบรากของฮอพจะกว้างและใหญ่มากทำให้เอื้ออำนวยต่อการเจริญของฮอพ รากของฮอพที่แตกออกมาใหม่สามารถนำมาประกอบอาหารได้จะให้รสชาติที่คล้ายคลึงกับผักชีฝรั่ง

ฮอพเป็นพืชเลื้อยซึ่งจะมีเถาพันกับหลักในทิศทางตามเข็มนาฬิกาในการปลูกทางการค้าจะใช้ลวดเหล็กสานเป็นตาข่ายเพื่อให้ฮอพเกาะ ในการเจริญฮอพจะให้เถาพันเป็นเกลียวและจะเจริญสูงขึ้นเรื่อย ๆ ขนาดของเถาของฮอพมีขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ที่เถาของฮอพจะมีขอที่ให้ยึดกับหลัก จะมีความแข็งแรงมากสีของลำต้นของฮอพจะขึ้นอยู่กับชนิดของฮอพ และลำต้นฮอพยาวประมาณ 6-10 เมตร

ก้านจะเกิดจากตาของใบในเถาหลัก ใบของฮอพจะแตกออกเป็นคู่ ๆ ในทิศทางตรงข้ามกับปมของเถาหลัก ใบจะมีลอน 3-5 ลอนใน 1 ใบ ซึ่งแล้วแต่พันธุ์ของฮอพ ในฮอพบางพันธุ์จะมีใบชนิด 3 ลอน และ 5 ลอน อยู่ในต้นเดียวกัน ใบจะมีขนอ่อน ๆ ปกคลุม ใบจะมีขนาดยาว 20 เซนติเมตร ใบจะมีสีเขียวถึงสีเหลืองน้ำตาล

1.3.2 การพัฒนาของโคนฮอพ

ดอกตัวเมียของฮอพมีความสำคัญทางการค้ามาก ดอกจะเริ่มบานในเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคม โดยดอกจะออกในแนวตรงและจะเกิดที่ปลายเถา หน่อของดอกที่แตกออกจากเถาที่มีขนาดสั้นเรียกว่า 'burrs

ที่แกนกลางจะมีการแตกออกเป็นคู่ ๆ ของใบที่มีขนาดเล็ก ๆ ใบเหล่านี้จะค่อย ๆ พัฒนาจนเป็นใบแท้

ในดอกฮอพจะมีต่อม lupulin อยู่ที่บริเวณกลีบดอกซึ่งติดอยู่กับแกนของดอกหรือโคนดอกในดอกจะมียางสีเหลืองหรืออาจจะมีสีขาวน้ำตาลซึ่งจะมีสีใดก็ขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของกรดที่ทำให้ขม (bitter acid) ต่อม lupulin จะติดกับดอกฮอพแบบอ่อน ๆ ดังนั้นในการขนส่งฮอพจะต้องมีความระมัดระวังในการขนส่งเพื่อป้องกันการสูญเสียต่อม lupulin

เมล็ดของฮอพที่สามารถเจริญได้จะมีน้ำหนักมากกว่าเมล็ดของฮอพที่เจริญไม่ได้และบางทีอาจจะมีน้ำหนักมากถึง 1/3 เท่าของโคนดอก เมล็ดประกอบไปด้วย ไขมันและน้ำมัน 33% ไขมันและน้ำมันเหล่านี้ถ้ามีปริมาณไม่เหมาะสมจะทำให้คุณภาพของฮอพลดลงในการงอกของเมล็ดฮอพในปัจจุบันจะมีการควบคุมไม่ให้เมล็ดฮอพตัวผู้งอกเพราะเมล็ดตัวผู้ไม่สามารถให้ดอกได้จึงไม่มีค่าทางเศรษฐกิจ

1.3.3 การปลูกและการเก็บเกี่ยวฮอพ

ในฤดูใบไม้ผลิเมื่อฮอพเจริญเต็มที่จำนวนรากจะเพิ่มขึ้นจาก 4 เป็น 12 จะมีความยาวของลำต้นเป็น 3-4 เมตร ในเดือนมิถุนายนและในเดือนกรกฎาคมจะมีความยาวของลำต้นเป็น 6-10 เมตร ฮอพจัดว่าเป็นพืชที่โตเร็วชนิดหนึ่ง ดอกจะออกเต็มที่โดยใช้เวลา 2-3 อาทิตย์ หลังจากที่ต้นเจริญเต็มที่ แต่เวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวจะต้องรอหลังจากต้นฮอพเจริญเต็มที่แล้ว 3-4 อาทิตย์ เนื่องจากเวลาในช่วงนี้ปริมาณของยาง (resin) ในดอกฮอพจะมีปริมาณสูงสุด ทำให้มีปริมาณ α-acid สูงตามด้วยคุณภาพของฮอพที่ได้จึงมีคุณภาพดีแต่ก็ต้องขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของฮอพ

ในซีกโลกเหนือจะมีการเก็บในประมาณปลายเดือนสิงหาคมถึงต้นเดือนกันยายนประมาณครึ่งหนึ่งของน้ำหนักที่เก็บเกี่ยวได้เป็นน้ำหนักของโคนในฮอพ บางชนิดจะเก็บเกี่ยวหลังจากเดือนตุลาคมไปแล้ว ในเดือนพฤศจิกายนเถาของฮอพจะเริ่มเหี่ยวแต่รากยังดูดน้ำและสารอาหารอยู่ ในเมือง Kashmir ที่ประเทศอินเดียสามารถปลูกฮอพได้ถึงปีละ 2 ครั้งแต่ผลผลิตที่ได้ไม่สูงมากนัก เนื่องจากขาดน้ำและความอุดมสมบูรณ์ของดินไม่เพียงพอ

ในช่วงที่เหมาะแก่การเก็บฮอพจะพิจารณาจากปริมาณ α-acid ในดอกฮอพ สภาพอากาศ ปัจจุบันได้มีการใช้เครื่องจักรในการแยกโคนออกจากเถา เถาจะถูกตัดโดยแรงงานคนจากนั้นจึงนำไปเข้าเครื่องแยกเอาโคนออก

ในตอนแรกของการเก็บเกี่ยวฮอพจะมีสีเขียวจะมีกลิ่นสดปริมาณ α-acid จะมีสูงเมื่อเก็บฮอพไว้อากาศที่สัมผัสกับฮอพจะทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นทำให้ปริมาร α-acid ลดลงทำให้คุณภาพของฮอพต่ำลง

1.3.4 การทำแห้งฮอพ

ฮอพยากที่จะนำมาปลูกเพราะต้องอาศัยสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ปริมาณน้ำที่มากพอและดินจะต้องอุดมสมบูรณ์ และเพื่อให้ได้ฮอพที่มีคุณภาพดีและมีปริมาณ α-acid สูง ควรจะมีแสงแดดจ้า 2-3 อาทิตย์ก่อนจะทำการเก็บเกี่ยว ฮอพที่พึ่งเก็บมาจะมีปริมาณความชื้น 80 % ยังไม่เหมาะที่จะเก็บไว้ จึงจะต้องนำมาทำแห้งและในการทำแห้งนี้จะต้องไม่ให้ต่อม lupulin หลุดออกไป

ฮอพจะถูกทำแห้งโดยเครื่องมือที่เรียกว่า kilns (เตาเผา) โดยการนำฮอพสดมาวางลงบนตะแกร

เหล็กแล้วจะมีอากาศอุ่นไหลผ่านด้านล่างขึ้นมา อุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งคือ 5 องศาเซลเซียส หรือ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ฮอพที่ผ่านการทำแห้งจะมีปริมาณความชื้น 5-6 % จากนั้นจะนำฮอพไปเก็บไว้ในที่เย็นและแห้งต่อไป

การทำแห้งมีผลต่อคุณภาพของฮอพเพราะการทำแห้งสามารถลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ α-acid ได้ ระบบการทำแห้งที่ใช้กันอยู่ทั่วไปมักเป็นระบบแบบกะจะมีปัญหาคือปริมาณความร้อนจะไปไม่ทั่วถึงทั้งเตา ถ้าทำการพลิกฮอพก็จะเกิดการสูญเสียต่อม lupulin ได้ วิธีแก้ไขคือใช้ระบบแบบต่อเนื่องแต่เนื่องจากระบบนี้มีราคาค่อนข้างจะแพงดังนั้นจึงควรพิจารณาถึงความคุ้มค่าในการลงทุนด้วย

การเก็บฮอพเพื่อการผลิตเบียร์จะเก็บในห้องเย็นเพราะจะช่วยลดปฏิกิริยาการออกซิเดชั่นและสามารถเก็บฮอพไว้ได้นานโดยที่คุณภาพไม่เสื่อมลงไปมาก

1.3.5 ชนิดของฮอพ

ปัจจุบันมีฮอพมากมายหลายสายพันธุ์และมีชนิดใหม่ ๆ ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ให้ดีขึ้น ชนิดของฮอพที่รู้จักกันดีคือ Northern Brewer, Hallertau, Saaz, Brewer Gold, Bullion an Jakima สายพันธุ์ใหม่ ๆ ได้รับการปรับปรุงมาจาก Wye college, Ashford และ Kent ในประเทศอังกฤษ

ชนิดของฮอพจะมีชื่อเรียกตามแหล่งที่พบหรือมีการปลูกเช่น Saaz Wye หรือเรียกตามผู้ที่พบครั้งแรก เช่น Fuggle, Golding จึงเกิดความสับสนของชื่อขึ้นเช่นที่ Northern Brewer ได้ใช้สายพันธุ์ที่ปลูกใน Hallertau ที่ประเทศเยอรมันนี ในประเทศเยอรมันนีเรียกสายพันธุ์นี้ว่า Hallertau hop แต่ Northern Brewer เรียกสายพันธุ์นี้ว่าพันธุ์ Northern Brewer

การพัฒนาฮอพสายพันธุ์ใหม่ทำได้โดยเปลี่ยนโครโมโซมในนิวเคลียสของเซลล์พืช จำนวนโครโมโซมในเซลพืชปรกติจะมีจำนวน 20 โครโมโซม ในเซลล์สืบพันธุ์ของต้นตัวผู้และในเซลล์สืบพันธุ์ในต้นตัวเมียจะมีจำนวนโครโมโซมอย่างละ 10 โครโมโซมเท่านั้น เมื่อเกิดการปฏิสนธิเป็นเอมบริโอจะมีจำนวนโครโมโซมเป็น 20 โครโมโซม การปรับปรุงพันธุ์จะทำในช่วงที่เป็นเอมบริโอแต่จะทำในช่วงที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น 20 แล้วไม่ได้จะต้องทำให้จำนวนโครโมโซมเป็น 10+10 แล้วค่อยปรับปรุงพันธุ์ตามความเป็นจริงแล้วเป็นไปได้ยากที่จะทำได้ ถ้าจะทำต้องใช้สารเคมีเข้าช่วย

เซลล์สืบพันธุ์ของพืชจะสามารถเพิ่มจำนวนโครโมโซมจาก 20 เป็น 40 โครโมโซมได้ (tetraploid) เมื่อเซลล์ไข่ของต้นตัวเมียแบ่งตัว ได้ 20 โครโมโซม แล้วปฏิสนธิกับเซลล์ต้นตัวผู้ 10 โครโมโซมเป็น triploid จะไม่แสดงลักษณะของต้นตัวเมียออกมา การที่จะแสดงออกของต้นตัวเมียได้ก็ต่อเมื่อมีเซลล์สืบพันธุ์เป็นของต้นตัวเมียทั้งหมด การเกิดจะต้องเกิดแบบ teraploid ซึ่งเป็นไปได้ยากมาก เพราะมีการต่อต้านของ diploid ของพืชตัวผู้ การเกิด triploid จะมีผลดีคือจะมีความต้านทานโรคสูงมากและจะมีระบบรากที่สมบูรณ์มากสามารถเกิดรากแบบ Multiflying ได้ แต่ก็มีข้อเสียคือจะไม่แสดงออกลักษณะของต้นตัวเมียจึงไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

การเลือกสายพันธุ์ของฮอพเป็นไปได้ที่จะรวมสายพันธุ์ที่มีผลผลิตของโคนสูงและมีปริมาณ α-acid สูงด้วย และปริมาณกรดที่มีค่าสูงขึ้นนี้จะต้องมีความเสถียรด้วย เมื่อปริมาณกรดสูงขึ้นปริมาณ cohumulone

จะเพิ่มจาก < 20 % เป็น > 65 %

บางทีปริมาณ cohumulone ที่สูงตัวมันเองไม่ใช่ตัวแปรที่จะทำให้คุณภาพของฮอพต่ำลงแต่จะส่งผลกับตัวแปรอื่น ๆ ที่ทำให้เกิดผลไม่ดีได้ ในการเจริญของฮอพจะมีปริมาณ α-acid สูง เมื่อเก็บฮอพไว้จะเกิดการออกซิเดชั่นทำให้ปริมาณ α-acid ต่ำ ปริมาณ cohumulone ก็จะต่ำตามไปด้วย ทำให้คุณภาพของฮอพที่ได้มีคุณภาพที่ไม่ดี การวิเคราะห์หาปริมาณ cohumulone ใช้ Liquid Chromatography (LC)

1.4 ความสำคัญของฮอพในแง่ของเศรษฐกิจ

1.4.1 ตลาดของฮอพ

ประมาณ 25 ประเทศที่มีการเพาะปลูกฮอพแหล่งของฮอพที่ทำการเพาะปลูกที่ใหญ่ที่สุดอยู่ในเยอรมันนีคิดเป็น 30 % ของผลผลิตทั้งโลก, อเมริกาคิดเป็น 20 %, โซเวียตคิดเป็น 10 %, เชคโกสโลวาเกียคิดเป็น 10 % และอังกฤษคิดเป็น 6 % แหล่งการค้าที่สำคัญเกิดขึ้นระหว่างประเทศที่มีการปลูกฮอพได้แก่ Germany, USA, Czechoslovakia, Yugoslavia, Australia และ China กับประเทศที่มีการผลิตเบียร์แต่ไม่ได้มีการปลูกฮอพได้แก่ Netherlands, Denmark, Brazil, Mexico และบางประเทศใน African ปริมาณฮอพที่มีจะเปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่างประเทศที่ปลูกฮอพเนื่องจากความแตกต่างของสายพันธุ์

ผลผลิตของฮอพทั้งโลก วัดโดยน้ำหนักของ α-acid ในปี 1973 พบว่ามากถึง 7,500 ตัน มีมากกว่าความต้องการโลก 1,000 ตัน สาเหตุที่มีมากเกินไปเพราะมีการเพิ่มพื้นที่เพาะปลูกมาก จนกระทั่งในปี 1974 ผลผลิตต่อปีของธัญญพืชต่อหนึ่งหมื่นตารางเมตรของน้ำหนัก α-acid ยังเพิ่มสูงขึ้นมากแต่ปริมาณความต้องการฮอพเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ทั้ง ๆ ที่มีการผลิตเบียร์เพิ่มขึ้น เป็นเพราะปริมาณเบียร์ที่ผลิตเพิ่มขึ้นเป็นเบียร์ชนิดที่มีปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำ (light beer) ซึ่งจะใช้ฮอพในการผลิตเบียร์ในสัดส่วนที่น้อยกว่าการผลิตเบียร์ธรรมดา

ปริมาณการปลูกฮอพลดลงในบางพื้นที่เช่นใน เบลเยี่ยม ปริมาณการปลูกฮอพน้อยกว่าเมื่อ 5 ปีที่แล้ว ส่งผลให้เกิดการชบเซาของตลาดฮอพในช่วงปี 1984-1990 ในปี 1991ปริมาณความต้องการฮอพเพิ่มขึ้นอีกครั้งหนึ่งราคาก็สูงขึ้นสาเหตุที่ตลาดฮอพกระฉับกระเฉง ขึ้นเพราะมีผู้บริโภคเบียร์เพิ่มขึ้นในประเทศที่กำลังพัฒนาโดยเฉพาะแถบประเทศในอเมริกาใต้ ฮอพมีชื่อทางด้านราคาที่ไม่แน่นอนนี่อาจจะเป็นสาเหตุสำคัญที่จะทำให้มีการลดการปลูกฮอพลงในอนาคตได้

1.4.2 การใช้ฮอพเป็นส่วนประกอบในทางการค้า

ฮอพเป็นองค์ประกอบสำคัญที่ทำให้เกิดรสขมในเบียร์ โดยเริ่มมีบทบาทเมื่อ ศตวรรษที่ 19 ในอดีตฮอพมีประโยชน์ใน 2 แง่คือ ใช้เป็นอาหารเหมือนกับผักชีฝรั่งและใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรม ในยุคที่ยังไม่มีการค้นพบการฆ่าเชื้อแบบ Pasteurization ปัจจุบันหน้าที่ของฮอพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ถูกมองข้ามไป แต่มีบทบาทในการผลิตเบียร์แทน

ประมาณ 1/5 ของน้ำหนักแห้งของฮอพประกอบไปด้วย lupulin ซึ่งมีองค์ประกอบสำคัญของฮอพคือกรดขมและไขมันจำเป็น กรดขมประกอบไปด้วย α-acid และ β-acid องค์ประกอบของสารเหล่านี้จะ

ผสมกันและจะอยู่ในรูปยาง (resin) ซึ่งมี 2 รูปคือแข็งและอ่อน ถ้าละลายในสารละลายอินทรีย์จะอยู่ในรูปอ่อน (solf resin) เมื่อผ่านอากาศเข้าไปจะเกิดการออกซิเดชั่นกรดขมจะเปลี่ยนรูปเป็น ill-dofined products ซึ่งจะไม่มีความอ่อนนุ่นและจะแข็งในสารละลายอินทรีย์ (hard resin) ฮอพประกอบไปด้วยสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ผสมกันอยู่ องค์ประกอบของฮอพแสดงในตารางที่ 3

การกำหนดค่าของฮอพสามารถดูได้จากกลิ่นของฮอพต่อปริมาณที่ใช้ และอาจจะกำหนดค่าได้จากการเกิด hard resin และ solf resin แต่วิธีที่ดีที่สุดคือวัดปริมาณ α-acid

1.4.3 การใช้ฮอพในการผลิตเบียร์

การป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นทำได้โดยเก็บฮอพไว้ในที่เย็น จากการศึกษาพบว่าปัจจัยที่ทำให้ฮอพเสื่อมคุณภาพได้แก่อุณหภูมิ และสัดส่วนของอากาศที่สัมผัสกับฮอพ เราสามารถป้องกันได้โดยเก็บฮอพไว้ในถุงที่มัดแน่นและเก็บถุงไว้ที่ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่านั้น

การใช้ฮอพในการผลิตเบียร์มีวิธีดังนี้คือ นำฮอพที่เตรียมไว้ไปต้มให้เดือดกับ wort (wort เป็นของเหลวที่มีน้ำตาล (glucose, moltose, moltotriose) ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ไฮโดรไลซิส จาก malt ไฮโดร-ไลซ์แป้งในธัญญาพืชต่าง ๆ ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเบียร์) ใช้เวลาในการต้ม 0.5-2.5 ชั่วโมง การต้ม wort มีวัตถุประสงค์เพื่อให้โปรตีนตกตะกอน, เป็นการ sterile wort, ต้องการให้สารระเหยบางอย่างใน wort ระเหยออกไป และต้องการให้ α-acid ละลายใน wort เพื่อให้เกิด iso-α-acid ซึ่งทำให้เบียร์ขม สัดส่วนการใช้ฮอพใช้ 100-800 กรัมของฮอพต่อเบียร์ 100 ลิตร ก่อน
ที่ wort จะเดือดประมาณ 15-30 นาที จะได้กลิ่นหอมของฮอพ จากนั้นปล่อยให้ wort เย็นลงแล้วทำการกรอง เมื่อกรองเสร็จแล้วจะใส่ยีสต์ลงไปเพื่อทำการหมัก
วิธีการหมักมี 2 วิธีคือ top fermentation จะใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จะเกิดการหมักที่อุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส อีกวิธีหนึ่งคือ bottom fermentation จะใช้ยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* จะเกิดการหมักที่อุณหภูมิ 5-9 องศาเซลเซียส หรือ 7-13 องศาเซลเซียส

14.4 คุณค่าทางเศรษฐกิจและการนำผลผลิตจากฮอพไปใช้

วัตถุประสงค์หลักของการใช้ฮอพในการผลิตเบียร์คือต้องการให้ α-acid ในฮอพเปลี่ยนเป็น iso-α-acid ในเบียร์ซึ่งในการผลิตเบียร์ปริมาณ α-acid จะสามารถเปลี่ยนเป็น iso-α-acid ได้เพียง 20-35% เท่านั้น α-acid อีก 65-80% จะถูกนำไปใช้ในรูปของการเกิด isomerization กับสารตัวอื่นๆ ในการหมัก ไป 40-65% ที่เหลือก็อยู่ในขั้นตอนการกรอง และอยู่ในโฟมในขั้นตอนการหมัก

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาการนำฮอพไปใช้ให้ได้ประโยชน์ที่คุ้มค่าที่สุดคือนำฮอพมาทำเป็นผงหรือเม็ดแล้วค่อยเอาไปใช้ข้อดีของการใช้ฮอพแบบผงคือ ฮอพจะละลายได้อย่างรวดเร็วทำให้ α-acid ละลายได้มากขึ้นและเปลี่ยนเป็น iso-α-acid ได้มากขึ้น แต่การใช้ฮอพผงจะมีข้อเสียตรงที่จะแยกฮอพออกจากเบียร์ได้ยาก ส่วนฮอพแบบเม็ดนั้นจะนำฮอพมาบรรจุในอลูมิเนียมฟลอยด์ หรือบรรจุในถุง polyvinylchloride (PVC) แล้วเก็บที่ 5 องศาเซลเซียส การใช้ฮอพแบบเม็ดจะง่ายกว่าแบบผงคือสามารถแยกออกจากเบียร์ได้ง่าย การใช้ฮอพแบบเม็ดได้รับความนิยมมากขึ้นเพราะสะดวกและสามารถจะคาดเดาผลของการหมักได้ ใน

ปี 1980 การใช้ฮอพแบบเม็ดเพิ่มขึ้นเป็น 1/3 ของการใช้ฮอพทั้งหมด

ตารางที่ 3 แสดงองค์ประกอบของฮอพ

nature	weight%
alpha acids	2-12
amino acids	0.1
aeta acids	1-10
cellulose	40-50
chlorophyll	-
essential oil	0.5-5
monosacchrides	2
oils and fatty acids	traces to 25 %
pectin	2
polyphenols	2-5
protein	1
water	10
waxes and steroids	8-12

α-acid สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์แต่ไม่สามารถละลายได้โดยน้ำในอาศัยคุณสมบัตินี้ในการสกัดฮอพด้วย methylene chloride และ acetone เนื่องจากสารทั้ง 2 ตัวนี้มีพิษและเป็นอันตรายต่อสภาพแวดล้อม ปัจจุบันจึงเปลี่ยนมาใช้ ethanol และ hexane แทน ข้อดีของการใช้ ethanol สกัด α-acid ในฮอพ α-acid ที่ได้จะเปลี่ยนเป็น iso-α-acid ได้ง่ายเราเรียก α-acid ที่เปลี่ยนเป็น iso-α-acid ได้ง่ายนี้ว่าสารสกัดก่อไอโซเมอร์

การเกิด isomerization ของ α-acid ได้ iso-α-acid นั้น iso-α-acid ที่ได้จะมี 2 รูปคือ cis iso-α-acid และ trans iso-α-acid รูปของ iso-α-acid ที่แตกต่างกันนี้จะให้รสขมที่แตกต่างกันออกไปสัดส่วนของ cis iso-α-acid กับ trans iso-α-acid ที่เหมาะสมจะให้รสขมที่เป็นธรรมชาติทำให้รสชาติเบียร์ที่ได้มีรสชาติดี.

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl

ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl นั้น จะทำการให้ความร้อนแก่ตัวอย่างในกรดซัลฟูริกเข้มข้น ไนโตรเจนในสารอินทรีย์ (ตัวอย่าง) จะถูกเปลี่ยนเป็น แอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นเติมด่างเข้มข้น (โซเดียมไฮดรอกไซด์) ลงไปและทำการกลั่นเก็บแอมโมเนียในกรดบอริก แอมโมเนียจะถูกหาโดยการไตเตรท

แต่เดิมนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีนี้ โดยใช้โพแทสเซียมเปอร์มังกาเนตเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น แต่ได้ผลไม่ดีนัก ต่อมา ศ.ศ.1885 Wilforth พบว่าการใช้กรดซัลฟูริกในการย่อยนั้นสามารถถูกเร่งได้โดยการเติม catalyst ซึ่งในปี 1889 Gunning แนะนำให้เติม โพแทสเซียมซัลเฟต เพื่อเพิ่มการเดือดให้กับ digestion mixture เพื่อให้ย่อยได้เร็วขึ้น

อย่างไรก็ตามมีปัจจัยหลายอย่างที่มีอิทธิพลต่อความสมบูรณ์และความเร็วของการเปลี่ยน โปรตีนไนโตรเจน ไปเป็นแอมโมเนีย โดยการย่อยด้วยกรดซัลฟูริก เช่น มีโปรตีนบางชนิดที่ออกแกนิคไนโตเจนในโปรตีนนั้นถูกเปลี่ยนเป็น แอมโมเนียได้ เช่นโปรตีนที่กรดอะมิโน ฮิสทีดีน และ ทริปโตเฟน เป็นส่วนประกอบสูงจะใช้เวลาย่อยนานต้องใช้สภาพการย่อยที่รุนแรง นอกจากนี้ถ้าเติมโพแทสเซียม หรือ โซเดียมซัลเฟต มากเกินไปในระหว่างการย่อย จะทำให้ความร้อนทำลาย ไนโตรเจนและเกิดการสูญเสียแอมโมเนียโดยทั่วไปอุณหภูมิในการย่อย จะใช้ 370-410 องศาเซลเซียส ดีที่สุด

สำหรับสารที่ใช้เป็น catalyst นั้นเกือบทุกธาตุที่มีในตารางธาตุได้ถูกนำมาทดลองเป็น catalyst สำหรับ Kjeldahl digestion ธาตุที่มีการใช้เป็น catalyst กันมากได้แก่ ปรอท , ทองแดง และซีลีเนียม ปรอทดีกว่าทองแดงถ้ามีการใช้ปรอทต้องมีการใช้โซเดียมไทโอซัลเฟต ด้วยเสมอเพื่อตกตะกอนปรอท (เป็นการ decompose สารปรอท) แต่การใช้ปรอทนั้นไม่ค่อยเป็นที่นิยมเนื่องจากปรอทเป็นสารที่ค่อนข้างเป็นพิษจึงไม่นิยม ดังนั้นจึงมีการใช้ซีลีเนียม ซึ่งเป็นสารที่ไม่เป็นพิษและมีการย่อยสลายเร็วไม่จำเป็นต้องมีการบำบัดก่อนย่อยแต่ถ้าเติมซีลีเนียมมากเกินไปหรืออุณหภูมิในการย่อยไม่ได้ถูกควบคุมอย่างระมัดระวัง จะเกิดการสูญเสียไนโตรเจนได้

หลังจากที่ย่อยเรียบร้อยแล้วมีหลายวิธีที่จะใช้หาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต สารละลายที่มีการย่อยที่สมบูรณ์แล้วจะมีลักษณะเป็นสารละลายสีเขียวใส ต้องทำสารละลายนี้ให้เป็นด่างโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 50% โซเดียมไฮดรอกไซด์จะไปปล่อย แอมโมเนียออกมาซึ่งจะถูกเก็บในสารละลายกรดและวัดได้โดยวิธีไตเตรทหรือวิธีทาง colorimetric

ปัจจุบันมีผู้ทดลองใช้ ไฮโดรเจนเปอร์อ๊อกไซด์ แทนกรดซัลฟูริกในการย่อยเพื่อวิเคราะห์หาโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl ซึ่งจำเป็นต้องใช้ highly toxic catalyst (ปรอทหรือซีลีเนียม) ซึ่งมีผู้พบว่าการใช้ไฮโดรเจนปอร์อ๊อกไซด์ สามารถวิเคราะห์โปรตีนได้ผลภายใน 10 นาที ซึ่งมีความรวดเร็ว

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl นี้ เป็นการหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของตัวอย่าง จากนั้นนำปริมาณเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนที่หาได้มาคูณกับค่าคงที่ของโปรตีน (ค่าคงที่ของโปรตีนคือ 6.25)

จึงจะได้ปริมาณโปรตีนออกมาเป็น เปอร์เซ็นต์โปรตีน

Flavour

Flavour หมายถึงสารที่ใช้ใส่ผสมลงในอาหารเพื่อเปลี่ยนแปลงลักษณะของอาหารเดิมให้มีลักษณะที่ดีขึ้นหรืออยู่ที่เราต้องการ เรียกง่ายๆ ว่าสารปรุงแต่งสีกลิ่นรส ในการผลิต flavour ประกอบด้วยเทคโนโลยีทางด้านต่างๆ หลายด้าน โดยประกอบด้วย technology of food colours, odours, tastes ตัวอย่างของ flavour เช่น spilcy, กลิ่นเห็ด, กลิ่นสาหร่าย

flavour แบ่งได้เป็น 2 ชนิด

1. Intenitional additives สารที่เติมแต่งโดยตั้งใจเช่น เกลือ,น้ำตาล
2. incidental additives สารที่เติมแต่งโดยบังเอิญเช่น สารเร่งการเจริญ, Aflatoxin

ความสำคัญของ flavour technology ทางธุรกิจมีองค์ประกอบสำคัญ 2 ส่วนคือ

1. ทุน ประกอบด้วย อุปกรณ์ วัตถุดิบ ที่ดิน ค่าประกอบการ
2. ผู้ประกอบการ

วัตถุดิบประกอบด้วย ตัวที่เป็นองค์ประกอบหลักๆ ของอาหาร เช่น ไส้กรอก ใช้ เนื้อ หมู ไก่ อื่นๆ เป็นองค์ประกอบ อีกส่วนคือ สารปรุงแต่ง คือสารที่นำเกลือ,น้ำตาล,เครื่องเทศ มารวมกันแล้วใช้ผสมในอาหารเพื่อให้เกิดกลิ่นรสต่างกันออกไป ซึ่งในการผลิตสินค้าชนิดหนึ่งวัตถุดิบหลักๆจะเหมือนๆกัน แต่ต่างกันที่สารปรุงแต่ง และกรรมวิธีการผลิตซึ่ง 2 ส่วนหลังนี้จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีความน่ารับประทานต่างกันออกไป มีผลต่อสภาพของตลาดของสินค้านั้นๆ คือถ้าผลิตภัณฑ์น่ารับประทานสินค้าตัวนั้นก็จะขายได้ดี ปัจจุบันในไทยมีการพัฒนาทางเครื่องเทศน้อยมาก ทำให้ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศปีละหลายพันล้านบาท ตัวอย่าง เช่นบะหมี่กึ่งสำเร็จรูปชนิดต่างที่วางขายในตลาด แป้งที่ใช้ทำบะหมี่จะเหมือนกันแต่ เครื่องปรุงของบะหมี่จะแตกต่างกัน ดั้งนั้นสารปรุงกลิ่นรสจะนับว่าเป็นส่วนที่สำคัญที่สุดก็ว่าได้

การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความชื้นในยีสต์

การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นเป็นการวิเคราะห์องค์ประกอบทางพื้นฐานของอาหาร (proximate analysis) ซึ่งเป็นวิธีที่คิดค้นขึ้นโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันชื่อ Henebery และ Stomann

ในการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความชื้นมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบปริมาณความชื้นในยีสต์ที่ debittering แล้ว เพื่อประโยชน์ในการเปรียบเทียบคุณภาพผลิตภัณฑ์ ในอนาคต

การวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งรวม (total solid)

เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งในยีสต์ออโตไลเซส เนื่องจากการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์จำเป็นจะต้องผลิตอยู่ในรูปของผงบ้างเพื่อความสะดวกในการใช้จึงต้องใช้เครื่อง spay-dry ในการทำให้เป็นผงแห้ง ในการทำ spay-dry ของเหลวที่จะสามารถทำได้จะต้องมีปริมาณของแข็งไม่ต่ำกว่า 20% ผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงจะมีลักษณะเป็นผงที่แห้ง ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องทำการวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งรวมในยีสต์ออโตไล-เสท

การตรวจสอบปริมาณความขมในเบียร์ (bitterness)

สารที่ให้ความขมในเบียร์ส่วนใหญ่จะเป็นพวก iso-alpha acid เช่น n-heptyl-4-hydroxyhenzoate, saccharin, salicyclic acid, sorbic acid ซึ่งสารเหล่านี้จะถูกสกัดโดย iso-octane และสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสง(absorbance)ได้ที่ 275 นาโนเมตร

บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วทั่วไปเช่น flask 500,250 มิลลิลิตร
2. เครื่องชั่งละเอียด
3. เครื่องชั่งแบบหยาบ
4. centrifuge
5. desicator
6. evapulator
7. hot air oven
8. incubator shaker
9. kjeltech
10. magnetic stirrer
11. spectrophotometer
12. spray dryer

สารเคมี

1. สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 99.99 % (conc.)
2. สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล
3. สารละลายกรดบอริกเข้มข้น 2 %
4. สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.85 %
5. สารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 25 %
6. สารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 %
7. สารละลายอินดิเคเตอร์ screened methyl red ประกอบด้วย 0.083% bromocresol green และ 0.016 % methyl red ใน alcohol
8. สารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ 95 %
9. catalyst mixture ประกอบด้วย 3.5 % $CuSO_4$, 96 % Na_2SO_4 และ 0.5% SeO_2

การวิจัยและการดำเนินงาน

การทดลองที่ 1 การทดลองหาปริมาณด่างที่เหมาะสมในการล้างยีสต์ และการวัดปริมาณความชื้นใน spent yeast (เพราะเนื่อง จากยีสต์ที่นำมาจากโรงงานเบียร์มีลักษณะที่เหนียวข้น)

1. ชั่งยีสต์ 0.5 กก. 3 ครั้ง ใส่ในบีกเกอร์หรือภาชนะที่สามารถทนกรด และด่าง ได้ 3 ภาชนะ
2. เติมน้ำด่าง(0.1% โซเดียมไฮดรอกไซด์) จำนวน 2.5 ลิตร, 1.0 ลิตร และ 0.5 ลิตรตามลำดับ ในแต่ละภาชนะ
3. คนด้วยแท่งแก้วเพื่อดูว่าสามารถคนให้ตัวยีสต์สัมผัสกับน้ำด่างได้ดีที่สุด

<u>หมายเหตุ</u> ยีสต์ที่นำมาทดลองเป็นยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ผ่าน การหมักเบียร์มาแล้ว 7-8 ครั้ง จนหมดสภาพการหมักที่ดีและถูกปั่นแยกเอาน้ำ เบียร์ออกแล้วส่วนใหญ่

การหาปริมาณความชื้น

อุปกรณ์

1. porcelain
2. hot air oven
3. desicator

วิธีการทดลอง

1. นำ porcelain ไปอบใน hot air oven ที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเข้า desicator ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมงทำการชั่งน้ำหนักแบบละเอียดถึงทศนิยม 4 ตำแหน่ง บันทึกไว้ จากนั้นนำ porcelain อันเดิมทำซ้ำตามวิธีที่กล่าวมาแล้วอีกจนชั่งได้น้ำหนักของ porcelain คงที่(ตำแหน่งทศ-นิยมจะต้องตรงกันจนถึงหลักที่ 2) ทำการบันทึกไว้เป็นน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างยีสต์ที่ต้องการวิเคราะห์หาความชื้น 10 กรัมใส่ใน porcelain ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำไปชั่งบันทึกไว้เป็นน้ำหนักก่อนอบ
3. นำ porcelain ที่มียีสต์อยู่ ไปอบใน hot air oven ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำไปเข้า desicator เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
4. นำ porcelain ที่อยู่ใน desicator มาชั่งน้ำหนัก บันทึกไว้เป็นน้ำหนักหลังการอบ

การคำนวณ

$$P = \frac{100 * (A - B)}{C}$$

เมื่อ P คือ เปอร์เซ็นต์ความชื้นในอาหาร

A คือ น้ำหนักก่อนการอบ

B คือ น้ำหนักหลังการอบ

C คือ น้ำหนักยีสต์ที่ชั่งมาก่อนการอบ

การทดลองที่ 2 การกำจัดฮอพออกจากเซลล์ยีสต์ (debittering) และการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นใน spent yeast ที่กำจัดฮอพแล้ว

1. ชั่งยีสต์ 500 กรัม เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 % (ที่เย็นโดยอุณหภูมิไม่เกิน 10 องศาเซลเซียส) 1000 มิลลิลิตร (อัตราส่วนระหว่าง ยีสต์กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ = 1:2 น้ำหนัก/ปริมาตร)

2. คนให้เข้ากันอย่าให้ยีสต์จับกันเป็นก้อน พยายามคนให้แตกออก คนด้วยมืออย่าแรง นาน 10 นาที(ควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 10 องศาเซลเซียส)

3. นำเอาสารแขวนลอยที่ได้ ไปปั่นที่ความเร็ว 1300 รอบ/นาที (ควบคุมอุณภูมิไม่ เกิน 10 องศาเซลเซียส)

4. แยกเอาส่วนที่เป็นตะกอนยีสต์เก็บไว้ ส่วนน้ำด่างที่เหลือนำไปวัดพีเอช

จากขั้นตอนที่ 1-4 เป็นวิธีการกำจัดฮอพ 1 ครั้ง

5. นำตะกอนยีสต์ที่ได้จากข้อ 4. ชั่งมา 500 กรัม เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 % แล้วทำตามวิธีการจากข้อ 1-4 อีกครั้ง (เป็นการกำจัดฮอพ ครั้งที่ 2)

6. ตะกอนยีสต์ที่ได้จะเรียกว่า ครีมยีสต์ (cream yeast) นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น โดยการเติมน้ำกลั่นที่เย็น 3 เท่า(น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 1300 รอบ/นาที

7. เก็บตะกอนยีสต์ไว้ และเทน้ำกลั่นทิ้ง ทำการล้างยีสต์อีก 2 ครั้ง

8. เก็บตะกอนยีสต์ครีมที่ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วไว้ในภาชนะที่สะอาด เก็บไว้ในห้อง เย็นอุณหภูมิไม่เกิน 10 องศาเซลเซียส (ควรปิดฝาให้มิดชิด)

<u>หมายเหตุ</u> ระหว่างการกำจัดฮอพครั้งแรก อาจเกิดการตกตะกอนของฮอพซึ่งมีสี เขียว ต้องกำจัดส่วนนี้ออกไปก่อนการกำจัดฮอพครั้งที่สอง

การทดลองที่ 3 การเปรียบเทียบความสะอาดของยีสต์ครีมระหว่างการกำจัดฮอพด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.1 % 1 ครั้ง เปรียบเทียบกับ 2 ครั้ง

โดยวิธีการกำจัดฮอพครั้งเดียวจะแบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

การทดลองย่อยที่1 โดยให้เวลาในการคนเท่ากัน แต่ใช้เวลาในการตั้งทิ้งไว้ต่างกัน

ตารางที่ 4 แสดงเวลาที่คนและเวลาที่ตั้งทิ้งไว้ของแต่ละตัวอย่าง จากการทดลองย่อยที่ 1

ตัวอย่าง	1	2	3	4	5	6
เวลาที่คน (นาที)	10 (2 ครั้ง)	10	10	10	10	10
เวลาที่ตั้งทิ้งไว้ (นาที)	0	10	30	50	70	100

การทดลองย่อยที่2 โดยกำหนดให้เวลาในการตั้งทิ้งไว้ แต่ใช้เวลาในการคนเท่ากัน

ตารางที่ 5 แสดงเวลาที่คน และเวลาที่ตั้งทิ้งไว้ของแต่ละตัวอย่าง จากการทดลองย่อยที่2

ตัวอย่าง	7	8	9	10	11
เวลาที่คน (นาที)	0	30	50	70	100
เวลาที่ตั้งทิ้งไว้ (นาที)	30	30	30	30	30

หมายเหตุ ทั้งสองการทดลองย่อย มีการใช้ยีสต์:น้ำด่าง = 1:2 (น้ำหนักต่อ ปริมาตร)และตัวที่ใช้เปรียบเทียบ(controll) คือตัวอย่างที่หนึ่ง

การทดลองที่ 4 การทดลองเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดฮอพ

จากการทดลองที่3 พบว่าตัวอย่างที่ 8 เหมาะสม จึงทำให้มีการทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดฮอพของ 4 ตัวอย่าง ดังนี้

ตัวอย่างที่1 การล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1% 1 ครั้ง (ตามตัวอย่างที่ 8 จากการทดลองที่ 3)

ตัวอย่างที่ 2 การล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1% 2 ครั้ง (วิธีทดลองเหมือนการทดลองที่ 2)

ตัวอย่างที่ 3 การล้างยีสต์ด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% 1 ครั้ง

ตัวอย่างที่ 4 การล้างยีสต์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.1 % ที่ผ่านการล้างยีสต์มาแล้ว 1 ครั้ง

วิธีทำ

การเตรียมตัวอย่างที่ 1

1. ชั่งยีสต์ 500 กรัม เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1% 1 ลิตร
2. คนด้วยแท่งแก้วเพื่อให้ยีสต์กระจายตัวไม่เกาะกันเป็นก้อน ใช้เวลาในการคน 30 นาที จะได้สารแขวนลอยสีขาว
3. ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
4. นำสารแขวนลอยสีขาวปั่นที่ความเร็วรอบ 1300 รอบ/นาที
5. เก็บตะกอนยีสต์ไว้ล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักยีสต์ ล้างทั้งหมด 3 ครั้ง และส่วนที่เป็นน้ำด่างไปวัดพีเอช
6. เก็บตะกอนยีสต์ไว้ในห้องเย็น

การเตรียมตัวอย่างที่ 2 เตรียมเหมือนการทดลองที่ 2

1. ชั่งยีสต์ 500 กรัม เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1% 1 ลิตร
2. คนด้วยแท่งแก้วเพื่อให้ยีสต์กระจายตัวไม่เกาะกันเป็นก้อน ใช้เวลาในการคน 10 นาที จะได้สารแขวนลอยสีขาวครีม
3. นำสารแขวนลอยสีขาวปั่นที่ความเร็วรอบ 1300 รอบต่อนาที
4. เก็บตะกอนยีสต์ไว้ล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักยีสต์ ล้างทั้งหมด 3 ครั้ง และเก็บส่วนที่เป็นน้ำด่างไปวัดพีเอช
5. เก็บตะกอนยีสต์ไว้ในห้องเย็น

การเตรียมตัวอย่างที่ 3 เตรียมเหมือนการเตรียมตัวอย่างที่ 1 แต่เปลี่ยนจากน้ำด่างเป็น น้ำเกลือเข้มข้น 0.85%

การเตรียมตัวอย่างที่ 4 เตรียมเหมือนการเตรียมตัวอย่างที่ 2 แต่เปลี่ยน จากน้ำด่างสด เป็นน้ำด่างที่ผ่านการล้างยีสต์มาแล้วหนึ่งครั้ง ซึ่งได้จากการเตรียม ตัวอย่างที่ 1

การทดลองที่ 5 การทำให้เซลล์ยีสต์แตกด้วยวิธีออโตไลซีส (autolysis) และการวิเคราะห์หา ปริมาณโปรตีน

1. นำตัวอย่างทั้ง 4 ตัวอย่างที่เตรียมไว้จากการทดลองที่ 4 ไปเขย่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที ใช้เวลา 36 ชั่วโมง (อาจใช้เครื่องincubator shaker, water baht หรือ hotplate ก็ได้)
2. ต้องปิดฝาภาชนะให้มิดชิด
3. เมื่อครบเวลาแล้ว ให้นำไปปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 10000 รอบ/นาที จะ สามารถแยกส่วนที่เป็นของเหลวสีน้ำตาล และเศษเซลสีขาวออกจากกัน
4. นำของเหลวสีน้ำตาลซึ่งเรียกว่า ออโตไลเซท ไปวัดปริมาตร
5. นำออโตไลเซทไปวัดพีเอช ปริมาณของแข็ง(solid content) และปริมาณ โปรตีน

หมายเหตุการเก็บตัวอย่างออโตไลเซท ควรเก็บไว้ในห้องเย็นหรือจะเก็บโดยการแช่แข็งก็ได้

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Kjeldahl flasks ขนาด 500 มิลลิลิตร
2. อุปกรณ์การย่อย (มีเครื่องดูดควัน) และอุปกรณ์การกลั่น
3. catalyst mixture (96 % โซเดียมซัลเฟต, 3.5 % คอปเปอร์ซัลเฟต และ 0.5 % ซีลีเนียม - ไดออกไซด์)
4. กรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล
5. สารละลายกรดบอริก 2 %
6. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 %
7. screen methylred indicator ประกอบด้วย 0.016 % เมธิลเรด และ 0.083 % โบโมครี-ซอลกรีนในแอลกอฮอล์
8. กรดซัลฟูริก เข้มข้น (conc.)

วิธีทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างยีสต์ ที่ต้องการวิเคราะห์ 2 กรัม ใส่ใน Kjeldahl flask ขนาด 500 มิลลิลิตร

2. เติม catalyst mixture 8 กรัม และ กรดซัลฟูริกเข้มข้น 12 มิลลิลิตร เติมสารป้องกันการเดือดรุนแรงเช่น กระเบื้อง หรือลูกแก้ว (glass bead)

3. ให้ความร้อนจนสารละลายเป็นสีเขียวใส แล้วจับเวลาให้ความร้อนต่อไปอีก 1 ชั่วโมง

4. เติมน้ำกลั่น ลงไปใน Kjeldahl flask 80 มิลลิลิตร

5. เติมด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 50% ปริมาณ 75 มิลลิลิตร ลงใน Kjeldahl flask ทำการกลั่นเก็บแอมโมเนียในกรดบอริกความเข้มข้น 2% ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ทำการเก็บอย่างน้อยมีปริมาณ 300 มิลลิลิตร (รวมปริมาณกรดบอริกด้วย)

6. ทำการไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล แล้วบันทึกปริมาณกรดไว้

7. ทำการทดลองแบบเดิมอีกครั้งโดยไม่มีตัวอย่าง (ทำ blank) เติมสารเคมีต่าง ๆ เช่นเดียวกัน แล้วนำไปทำการย่อย เก็บสารละลายแล้วทำการไตเตรทกับกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล จดปริมาณกรดที่ใช้ไว้

8. หาปริมาณกรดซัลฟูริกที่ใช้ของตัวอย่าง โดยนำมาลบปริมาณกรดที่ใช้ไตเตรทใน blank จากนั้นนำไปคำนวณหา เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนและเปอร์เซ็นต์โปรตีนต่อไป

วิธีการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์โปรตีน

เมื่อได้ค่าปริมาตรกรดที่แน่นอนในการไตเตรทโดยนำไปลบ blank ออกแล้วสามารถนำมาหาเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนได้จากสูตรการคำนวณต่อไปนี้

$$\%N = \frac{(\text{ml acid} * \text{normality acid}) * 1.4}{g}$$

g = น้ำหนักของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์หน่วยเป็นกรัม

เมื่อได้เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนแล้วจะต้องนำไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์โปรตีนอีกจากสูตร

%protein = % นอร์มอล * 6.25

6.25 เป็นค่า protein factor

การทดลองที่ 6 การวิเคราะห์หาปริมาณความขมในออโตไลเซททั้ง 4 ตัวอย่าง โดยใช้ International method

ความขมนี้จะวัดจากปริมาณ ไอโซ-อัลฟา-แอซิด(iso-α-acid) ซึ่งจะถูกสกัดด้วย ไอโซออกเทน (iso octane) และนำไปวัดปริมาณ อัลฟ่าแอซิดด้วย UV spectrophotometry

สารละลาย(reagent)

1. กรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มอล ต้องใช้ reagent grade
2. iso-octane (2,2,4-trimetyl-pentane) ต้องเป็น spectroscopic grade

อุปกรณ์

1. centrifuge tube
2. ฝาปิดหลอดเซนตริฟิวก์ ต้องใช้ที่ทำมาจาก polypropylene โดยเฉพาะ
3. ปิเปตขนาด 0.5 ,10 และ 20 มิลลิลิตร
4. เซนตริฟิวก์ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที
5. rotary shaker ที่มีแอมปลิจูด 2-3 เซนติเมตร
6. UV spectrophotometer และต้องใช้ silica cell ที่มี slit width น้อยกว่า 2 มิลลิเมตร

วิธีทำ

1. ปิเปตตัวอย่างออโตไลเซทมา 10 มิลลิลิตร
2. เติมกรดไฮโดรคลอริก 6 N จำนวน 0.5 มิลลิลิตร
3. ใส่กลาสบีด 2-3 เม็ด (ต้องใส่ให้จำนวนเท่ากันเพื่อความสมดุล)
4. เติมไอโซออกเทน 20 มิลลิลิตร แล้วปิดฝาหลอดเซนตริฟิวก์ให้แน่น เพื่อป้องกัน การระเหยหรือการซึมออกสู่ภายนอกของไอโซออกเทน
5. นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที 15 นาที
6. นำไปปั่นอีก 4 นาที ที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที
7. นำเฉพาะส่วนใสด้านบน ซึ่งเป็นส่วนของไอโซออกเทนที่สกัดเอา อัลฟาแอซิดไว้ ไปวัดค่า absorbance ที่ 275 นาโนเมตร โดยใช้ไอโซออกเทนเป็นแบล็งค์

การคำนวณหาปริมาณความขม

bitterness unit (BUs) = $50 * E_{275}$

<u>หมายเหตุ</u> หน่วยของ bittering unit จะเป็นตัวเลขจำนวนเต็ม

การทดลองที่ 7 การนำยีสต์ออโตไลเซสไปทำให้เป็นผงแห้ง โดยใช้เครื่อง spray dryer

วิธีทำ

1. เตรียมตัวอย่างโดยการนำตัวอย่างมาทำให้ละลาย (เพราะเก็บตัวอย่างแช่แข็งอยู่)
2. เทตัวอย่างที่ละลายแล้วรวมกัน (เฉพาะตัวอย่างชนิดเดียวกัน)
3. นำหัวฉีด atomizer ติดเข้ากับตัวเครื่อง

4. ติดตั้งปั๊มเข้ากับเครื่อง

5. เดินเครื่อง spray-dryer โดยการอุ่นเครื่องก่อนเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้อุณหภูมิในเครื่องสูงตามความต้องการ

6. ตั้งอุณหภูมิให้ลมร้อนเข้ามีอุณหภูมิ 197 องศาเซลเซียส และลมร้อนออกมีอุณหภูมิ 97 องศาเซลเซียส

7. นำตัวอย่างที่เทรวมกันแล้วมาต่อกับสายยางจากปั๊ม ปรับอัตราเร็วในการปั๊มให้เหมาะสมกับปริมาณของแข็งรวม

8. นำขวดเก็บตัวอย่างวางในท่อเก็บตัวอย่าง คอยเคาะเครื่องด้วยค้อนพลาสติก

9. เมื่อทำการ spray-dry เสร็จหมดแล้วทำการล้างเครื่อง

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

ผลการทดลองที่ 1 การทดลองหาปริมาณด่างที่เหมาะสมในการล้างยีสต์ และการวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นใน spent yeast ที่ทำการกำจัดฮอพแล้ว

ตารางที่ 6 แสดงผลการทดลองที่ 1

ตัวอย่างที่	1	2	3
ปริมาณด่างที่เติม (ลิตร)	2.5 (5 เท่า)	1.0 (2 เท่า)	0.5 (1 เท่า)
ผลที่ได้	สามารถกวนหรือ คนยีสต์ให้สัมผัสกับด่างได้ดี	สามารถกวนหรือ คนยีสต์ให้สัมผัสกับด่างได้ดี	การกวนหรือคน ยากกว่าตัวอย่าง ที่ 1 และ 2

เพราะฉนั้นปริมาณด่างที่เหมาะสมที่จะเป็นตัวแทน ก็คือตัวอย่างที่ 2 เพราะ ว่าสามารถคนยีสต์ได้ดีและใช้ปริมาณด่างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ 1

ผลการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความชื้น

ตารางที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นในยีสต์ที่ทำการ debitterring แล้ว

จำนวนชุดการ ทดลองที่	น้ำหนักแน่นอนของ porcelain (กรัม)	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	เปอร์เซ็นต์ความชื้น
1	29.6079	39.6003	31.3859	82.144
2	29.6075	39.6081	31.3704	82.377
3	29.3255	39.3275	31.1102	82.173
เฉลี่ย	29.514	39.512	31.289	82.231

ผลการทดลองที่ 2 การทดลองกำจัดฮอพออกจากยีสต์

ตารางที่ 8 แสดงค่าพีเอชของแต่ละส่วนของการล้างยีสต์ ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.1% 2 ครั้ง

	NaOH 0.1 %	ด่างหลังการล้างยีสต์ครั้งที่ 1	น้ำด่างหลังการล้างยีสต์ครั้งที่ 2	ยีสต์ครีมที่ผ่านการล้างน้ำด่าง 2 ครั้ง
พีเอช	14	7.8	7.3	7.4

ปริมาณความชื้นของยีสต์ครีมที่ผ่านการล้างด้วยน้ำด่างแล้ว = 82.3 %

ผลการทดลองที่ 3 การเปรียบเทียบความสะอาดของครีมยีสต์ ระหว่างการล้างด้วยด่าง 1 ครั้งและ 2 ครั้ง

ตารางที่ 9 แสดงพีเอชในการศึกษาการล้างยีสต์ด้วยน้ำด่างครั้งเดียว

ตัวอย่างที่	2	3	4	5	6
พีเอช	7.52	7.01	7.44	7.38	7.22

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	7	8	9	10	11
พีเอช	7.38	7.37	7.25	7.31	7.30

ปริมาณสีฮอพที่มีปนเปื้อนอยู่ในครีมยีสต์ ให้ผลดังนี้

+++ ได้แก่ตัวอย่างที่ 2 และ 3 (มีปริมาณสีฮอพมากกว่าตัวอย่างที่ 1)

++ ได้แก่ตัวอย่างที่ 7 (มีปริมาณสีฮอพพอๆกับตัวอย่างที่ 1)

+ ได้แก่ตัวอย่างที่ 4,5,6,8,9,10 และ 11 (มีปริมาณสีฮอพน้อยกว่าตัวอย่างที่ 1)

จากการทดลองนี้พบว่า ควรใช้ตัวอย่างที่ 4 หรือ 8 เพราะครีมยีสต์มี ปริมาณฮอพน้อยกว่าตัวควบคุม (ตัวอย่างที่ 1) แต่ที่ควรใช้ที่สุด คือ ตัวอย่างที่ 8 เพราะสีของ ครีมยีสต์ขาวกว่าตัวอย่างที่ 4

ผลการทดลองที่ 4 การทดลองเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดฮอพ

ตารางที่ 10 แสดงค่าพีเอชของแต่ละตัวอย่างทั้ง 4 ตัวอย่าง เพื่อเปรียบ เทียบความสามารถในการกำจัดฮอพ

ตัวอย่างที่	1	2		3	4
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2		
ยีสต์+ด่างที่ใช้ล้าง	5.10	7.05	6.57	3.80	4.89
สารละลายที่ผ่านการล้างครั้งที่ 1	4.68	4.00		3.71	4.84
สารละลายที่ผ่านการล้างครั้งที่ 2	3.37	3.51		3.14	4.02
สารละลายที่ผ่านการล้างครั้งที่ 3	3.44	3.26		3.38	3.67

ตัวอย่างที่ 1 คือ กำจัดฮอพ 1 ครั้ง
ตัวอย่างที่ 2 คือ กำจัดฮอพ 2 ครั้ง
ตัวอย่างที่ 3 คือ ตัวควบคุม (สารละลาย NaCl 0.85 %)
ตัวอย่างที่ 4 คือ กำจัดฮอพด้วยด่างรีไซเคิล

ผลการทดลองที่ 5 การทำให้เซลยีสต์แตกด้วยวิธีออโตไลซีส และการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

ตารางที่ 11 แสดงค่าพีเอช ในยีสต์ออโตไลเซส

ตัวอย่างที่	1	2	3	4
พีเอช	5.48	5.92	5.77	5.56

ของเหลวสีน้ำตาลที่ได้จากการทำ ยีสต์ออโตไลซีท เรียกว่า ยีสต์ออโตไลเซท
วัดเป็นปริมาตรได้ = 40 % ของปริมาณครีมยีสต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในยีสต์ออโตไลเซส

ตารางที่ 12 แสดงปริมาณโปรตีนในยีสต์ออโตไลเซสก่อนนำไปทำให้เข้มข้น

ชนิดของตัวอย่าง	ปริมาตรของกรดที่แท้จริง (ลบ blank แล้ว) (มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน	เปอร์เซ็นต์โปรตีน
ยีสต์ที่ debittering 1 ครั้ง	4.4	0.31	1.92
ยีสต์ที่ debittering 2 ครั้ง	4.4	0.31	1.92
ยีสต์ที่ debittering 1 ครั้ง โดยใช้ สาร ละลาย Nacl 0.85%	4.9	0.34	2.14
ยีสต์ที่ debittering 1 ครั้งโดยนำด่างกลับมาใช้ใหม่	5.1	0.36	2.23

ปริมาตร blank = 0.1 มิลลิลิตร

ตารางที่ 13 แสดงปริมาณโปรตีนในยีสต์ออโตไลเซสหลังนำไปทำให้เข้มข้น

ชนิดของตัวอย่าง	ปริมาตรของกรดที่แท้จริง(ลบ blank แล้ว) (มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน	เปอร์เซ็นต์โปรตีน
ยีสต์ที่ debittering 1 ครั้ง	8.7	0.53	3.72
ยีสต์ที่ debittering 2 ครั้ง	3.6	0.25	1.58
ยีสต์ที่ debittering 1 ครั้ง โดยใช้ สาร ละลาย Nacl 0.85%	10.3	0.72	4.50
ยีสต์ที่ debittering 1 ครั้งโดยนำด่างกลับมาใช้ใหม่	3.6	0.25	1.58

ปริมาตร blank = 0.1 มิลลิลิตร

ผลการทดลองที่ 6 การหาปริมาณความขม

ตารางที่ 14 แสดงปริมาณความขมของทั้ง 4 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	1	2	3	4
ปริมาณความขม (bitterness มี หน่วย เป็น BUs)	14	10	25	18
% ยอพที่ลดลง	54%	60%	-	28%

<u>หมายเหตุ</u> ความขมที่วัดได้ เป็นการวัดจากปริมาณอัลฟาแอซิด

ผลการทดลองที่ 7 การนำยีสต์ออโตไลเซสไปทำให้เป็นผงแห้ง โดยใช้เครื่อง spray dryer

ผงยีสต์แห้งมีลักษณะเป็นสีครีมละเอียด มีกลิ่นคล้ายกลิ่นเนื้อตามธรรมชาติ รสชาติเหมือนรสของกรดกลูตามิกในซอสปรุงรส และมีลักษณะที่เข้มข้นมากเมื่อชิมดูแต่เพียงน้อยนิดจะมีรสขม

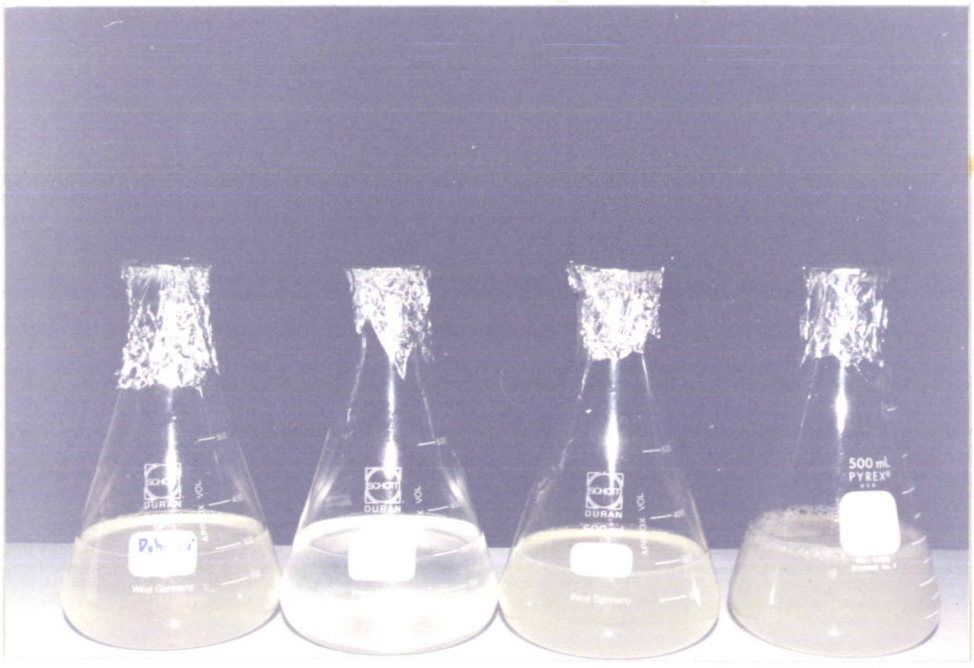
รูปที่ 3 แสดงสีของน้ำด่างที่ใช้ล้างสเปิ้นท์บลูเวอร์ยีสต์ซ้ายไปขวา

ขวดที่ 1 แสดงยีสต์ที่ล้างด้วยด่าง 1 ครั้ง

ขวดที่ 2 แสดงยีสต์ที่ล้างด้วยด่าง 2 ครั้ง

ขวดที่ 3 แสดงยีต์ที่ล้างด้วย NaCl 0.85 %

ขวดที่ 4 แสดงยีสต์ที่ล้างด้วยน้ำด่างที่นำกลับมาใช้ (recycle alkaline)



รูปที่ 4 แสดงสีของน้ำกลั่นที่ใช้ล้างด่างออก

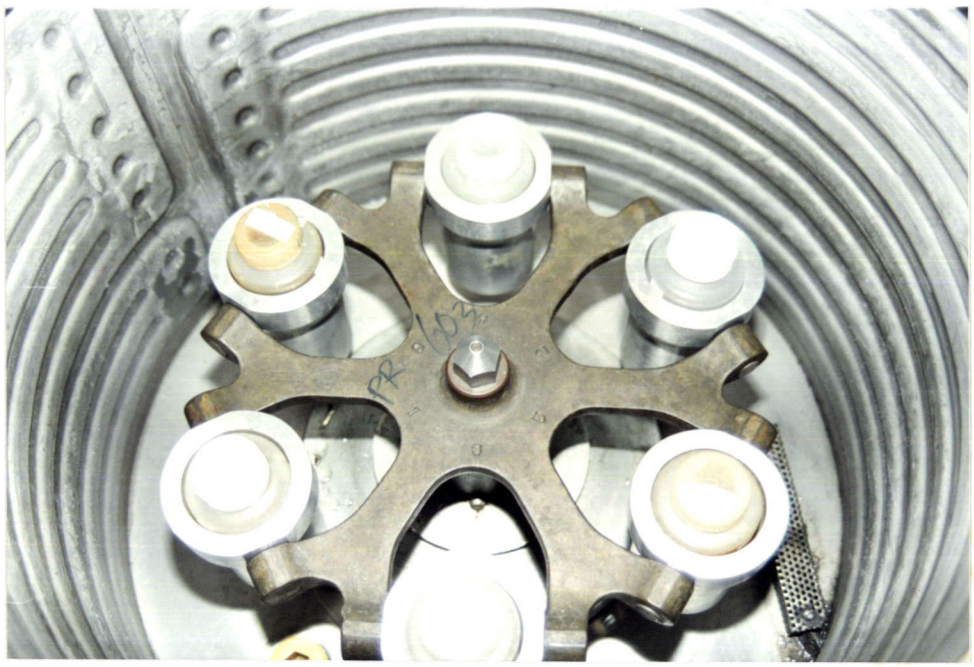
รูปที่ 5 แสดงสีของน้ำแต่ละขั้นเริ่มจาก ขวดแรกเป็นสีของน้ำด่าง ขวดที่ 2,3,4 เป็นน้ำกลั่นที่ใช้ใน การล้างยีสต์ 1,2,3 ตามลำดับและรูปสุดท้ายเป็นการเปรียบเทียบกับน้ำกลั่นธรรมดา

รูปที่ 6 แสดงการวัดพีเอช

รูปที่ 7 การนำยีสต์ไปทำออโตไลซีสโดยใช้ incubator shaker

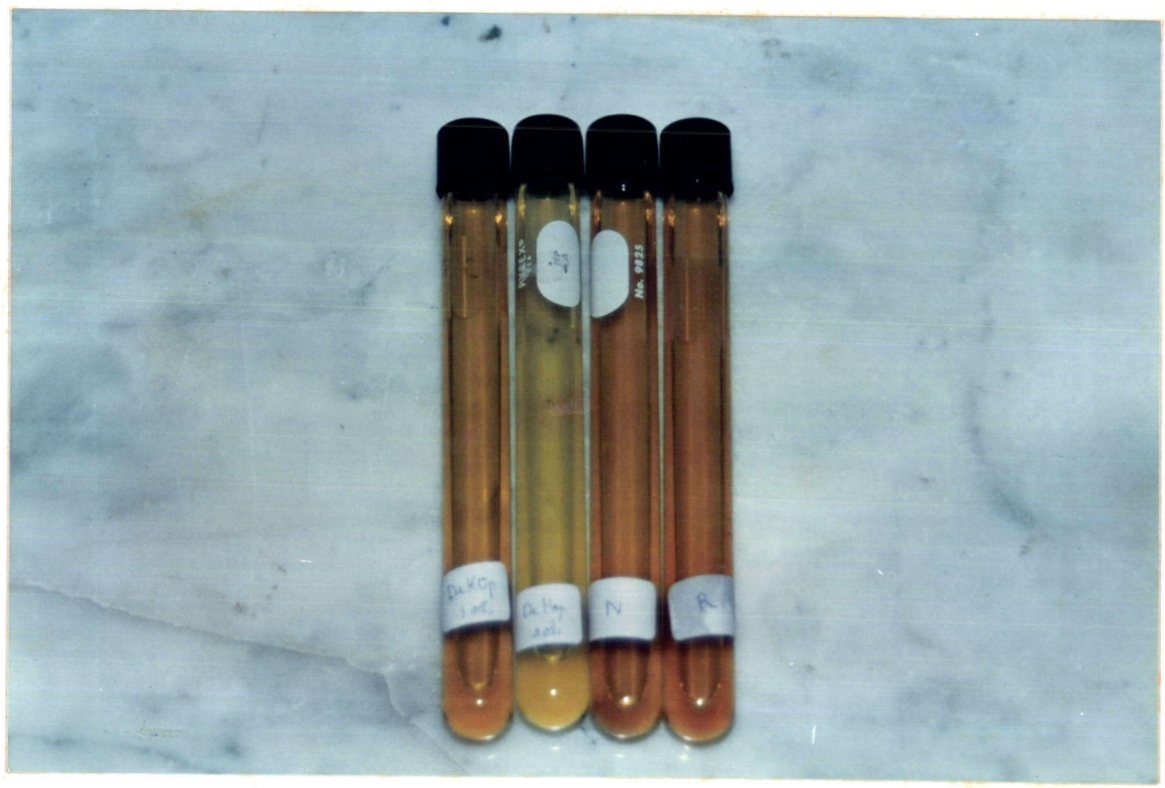
รูปที่ 8 ลักษณะยีสต์ที่ผ่านการออโตไลซีสที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

รูปที่ 9 การชั่ง balane เพื่อปั่นเซลออก



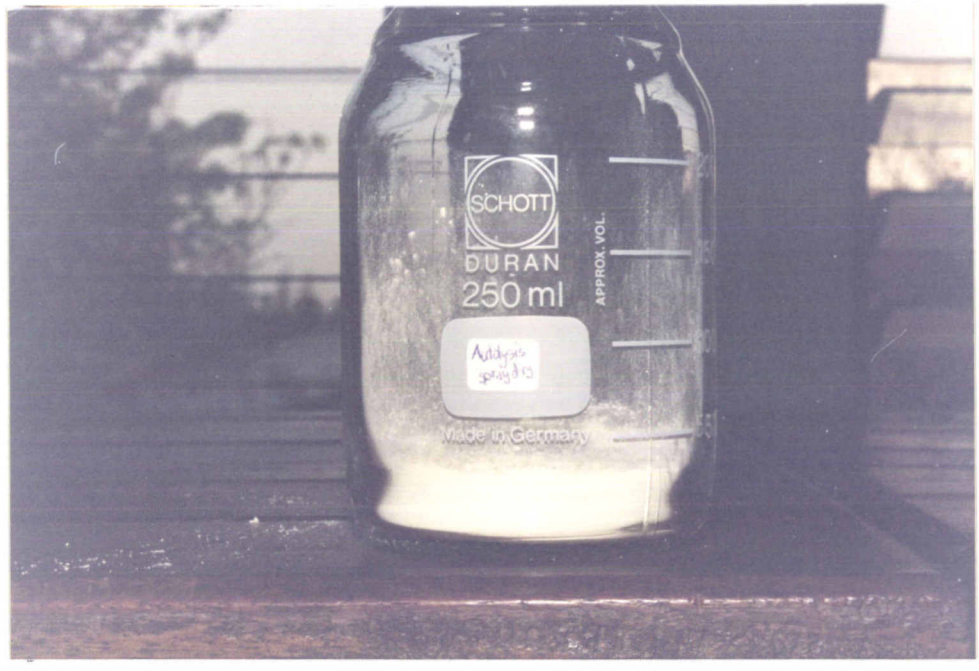
รูปที่ 10 การนำไปปั่นแยกเศษเซลล์และเซลล์ที่ยังไม่แตกออก

รูปที่ 11 รูปออโตไลเซทที่แยกชั้นเมื่อตั้งทิ้งไว้



รูปที่ 12 ยีสต์ออโตไลเซท ที่แยกเศษเซลออกมาแล้ว

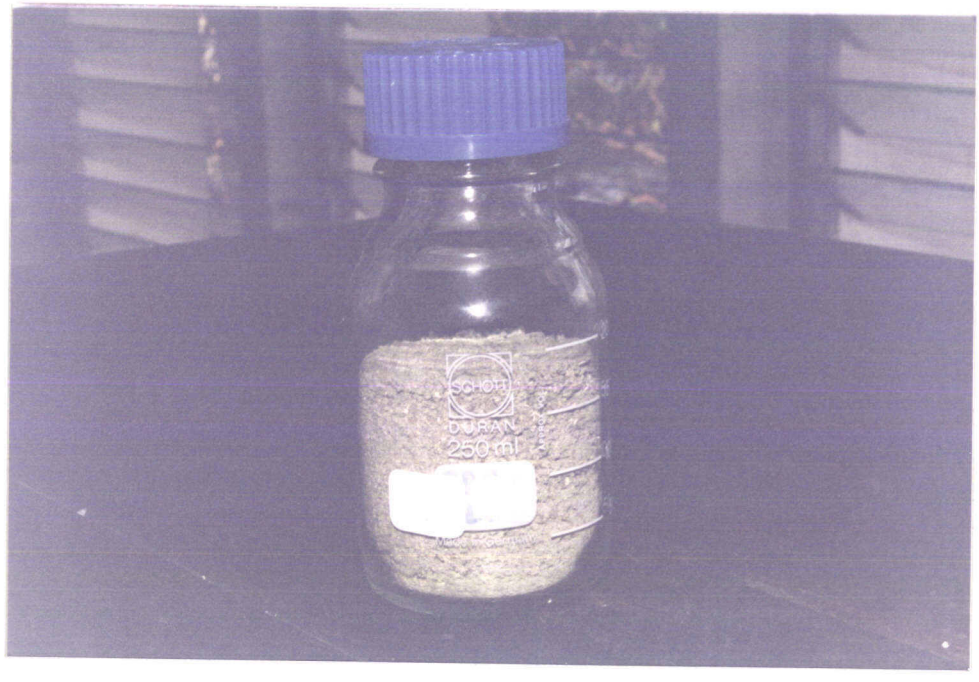
รูปที่ 13 เครื่อง Spray dryer



รูปที่ 14 แสดงยีสต์สกัดที่ผ่านการทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง spray dryer

รูปที่ 15 แสดงยีสต์สกัดที่ผ่านการทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง spray dryer

รูปที่ 16 แสดงยีสต์สกัดที่ผ่านการทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง spray dryer



รูปที่ 17 ฮอพที่แยกออกมาจากยีสต์ขณะทำการล้าง

รูปที่ 18 เครื่องวัดปริมาณของแข็ง (Solid content)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ในความพยายามที่จะผลิตสารให้กลิ่นรส จากยีสต์ที่ผ่านกระบวนการหมักเบียร์จนหมดสภาพการหมักถือเป็นกากของเสีย มีขั้นตอนสำคัญมาก คือ การล้างตัวเซลล์ยีสต์ให้สะอาด เพราะยีสต์เหล่านี้ ในขณะที่หมักเบียร์อยู่นั้น ตัวเซลล์ยีสต์จะดูดซับเอาฮอพ เข้าไปไว้ในบริเวณผิวหน้าของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ตัวเซลล์ยีสต์ มีลักษณะที่ปนเปื้อนฮอพซึ่งมีสีเขียว จำเป็นจะต้องกำจัดส่วนฮอพนี้ออกจากผิวเซลล์ให้มากที่สุดวิธีการล้างโดยน้ำธรรมดาไม่ได้ผล คือ ฮอพจะไม่หลุดออกมาจากเซลต้องใช้ด่างเพื่อไปกระตุ้นให้เซลล์ยีสต์คายเอาฮอพส่วนออกมาจากผลการทดลองพบว่าการใช้ด่าง สารละลาย NaOH เข้มข้น 0.1 % ล้างยีสต์ 2 ครั้งครั้งละ 10 นาที จะให้ผลในการกำจัดฮอพออกไปได้ถึง 60 % ทั้งนี้หลังจากการล้างยีสต์ด้วยด่าง NaOH 0.1 % ต้องนำไปล้างน้ำกลั่นอีก 3 ครั้งเพื่อล้างด่าง และสิ่งที่ปนเปื้อนอื่นๆ ออกให้หมด วิธีนี้เป็นวิธีที่ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการล้างด่าง 0.1 % เพียงครั้งเดียว และใช้เวลาในการคนยีสต์ให้เข้ากับน้ำด่าง 30 นาที และตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาที วิธีนี้ลดปริมาณฮอพได้ 44 % ส่วนอีกวิธีหนึ่งที่ทำการทดลองเปรียบเทียบ คือการใช้น้ำด่างที่ผ่านการล้างยีสต์มาแล้วหนึ่งครั้ง นำมาล้างยีสต์ โดยใช้เวลาที่ล้าง 10 นาที ให้ผลในการกำจัดฮอพเพียง 28 %

ปริมาณน้ำด่างที่ใช้ในการล้างยีสต์ปริมาณที่เหมาะสม คือ ปริมาณน้ำด่างจะเป็น 2 เท่า ของปริมาณน้ำหนักยีสต์ เพราะเป็นปริมาณที่ไม่มากเกินไปและไม่น้อยเกินไป ที่จะทำให้ยีสต์ และน้ำด่างสัมผัสกับได้ดี

วิธีการทำให้เซลล์แตกด้วย การใช้วิธีออโตไลซีส ที่ 45 องศาเซลเซียส 36 ชั่วโมง ด้วยสภาพดังกล่าว ได้ยีสต์ออโตไลเซท ที่มีลักษณะสีน้ำตาลเข้มใส มีกลิ่นคล้ายเนื้อ (aroma like meat flavour) รสชาติคล้ายกลูตามิกที่ใส่ในอาหาร

ภาคผนวก ก

กรรมวิธีการผลิตเบียร์

1. นำข้าวมอลต์มาร่อนเอาสิ่งสกปรกออกเสียก่อน แล้วจึงนำมาบดโดยเครื่องบดส่วนปลายข้าวก็นำมาเข้าเครื่องบดเช่นกัน

2. ขั้นตอนการต้มอยู่ในส่วนของ brew house ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

mash I

1. นำข้าวมอลต์และปลายข้าวต้มรวมกันในอัตราส่วนเท่า ๆ กัน ในน้ำ 45 hl อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส

2. เพิ่มอุณหภูมิต่อไปจนอุณหภูมิได้ 76 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 นาที และต้มต่อไปอีก 15 นาที

3. เพิ่มอุณหภูมิต่อไปจนอุณหภูมิได้ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 10 นาที และต้มต่อไปอีก 20 นาที

4. หลังจากนั้นจึง pump ไปถังพักอีกถังหนึ่ง

mash II

1. ใส่น้ำเย็น อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ปริมาณ 80 hl แล้วใหข้าวมอลต์ที่เหลือลงมาให้หมด และต้มอยู่ที่อุณหภูมินี้ 10 นาที

2. pump จาก mash I มารวมกันใช้อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 10 นาที

3. เพิ่มอุณหภูมิต่อไปจนได้ อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 10 นาที และต้มต่อไปอีก 15 นาที

4. เพิ่มอุณหภูมิต่อไปจนอุณหภูมิได้ 72 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 8 นาที และต้มต่อไปอีก 25 นาที

5. เพิ่มอุณหภูมิต่อไปจนได้ 78 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 7 นาที

ขั้นตอนในการต้มน้ำก็เพื่อเปลี่ยนแป้งที่มีอยู่ในข้าวมอลท์ให้กลายเป็นน้ำตาลและในส่วนของ mash I ต้องมีการใส่ปลายข้าวเพื่อช่วยในเรื่อง hope และเป็นการลดต้นทุนการผลิตด้วย

3. ขั้นตอนการทดลอง

เมื่อต้มเรียบร้อยแล้ว ก็จะ pump น้ำ wort ขึ้นไปหม้อกรอง เพื่อกรองกากข้าวมอลต์ ใช้อุณหภูมิ 78 องศาเซลเซียส และก็จะมีการ sparging น้ำ 3 ครั้งที่อุณหภูมิ 78 องศาเซลเซียส ครั้งละประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นจึงจ่ายลงไปถังพักน้ำ wort เพื่อรอการ pump ไปยังถังต้มน้ำ wort

4. ขั้นตอนการต้มน้ำ wort

2. เพิ่มอุณหภูมิเป็น 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 20 นาที และต้มต่อไปอีก 90 นาที เหลือปริมาตร 161 hl

5. เติมน้ำตาลและฮอพ เพื่อช่วยให้เบียร์มีรสดี มีกลิ่นหอม และป้องกันไม่ให้เบียร์เสียง่ายและช่วยให้ฟองเบียร์อยู่ได้ทน

6. เมื่อต้มได้ที่แล้วจึง pump ขึ้นไปยังถังตกตะกอน หลังจากนั้นจึงผ่านน้ำ wort เข้า plate cooler ซึ่งจะสามารถลดอุณหภูมิจาก 94 องศาเซลเซียส ให้เหลือประมาณ 10 องศาเซลเซียส การให้ความเย็นแก่น้ำ wort นี้เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมาก เพราะหากไม่รักษาด้วยความเย็น wort จะเสื่อมคุณภาพและเสียง่าย

7. น้ำ wort ที่ผ่าน plate cooler ก็จะถ่ายไปยังถังหมักเพื่อเติมยีสต์ซึ่งใน brew ที่ 1-3 จะมีการเติมก๊าซออกซิเจนเพื่อให้เป็นอาหารแก่ยีสต์ก่อนเข้าถังหมักส่วน 3 brew ที่เหลือไม่ต้องเติม (1 ถังหมักจะต้องใช้น้ำ wort ถึง 6 brew) นอกจากนี้เชื้อยีสต์ที่จะมาผสมจะต้องเป็นเชื้อยีสต์ที่มีความบริสุทธิ์และดี เพราะเบียร์จะมีคุณภาพดีหรือเลว จะมีชื่อเสียงเพียงใดจะขึ้นอยู่กับยีสต์เป็นสำคัญ และจะหมักที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์

8. หลังจากหมักแล้วก็จะถ่ายเก็บที่ถังเก็บเบียร์ โดยผ่าน plate cooler อุณหภูมิ inlet 1 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ outlet -1 องศาเซลเซียส และเก็บไว้ประมาณ 2 สัปดาห์

9. ผ่านเบียร์จากถังเก็บเข้าเครื่องกรอง 2 ส่วนดังนี้

ส่วนที่หนึ่ง จะเป็นถังใส่ผงกรอง น้ำเบียร์ก็จะผ่านมาลงที่นี่ ซึ่งน้ำเบียร์บางส่วนก็จะไปพักที่ buffer tank ถ้าน้ำเบียร์ไม่พอก็จะเอาเบียร์จาก buffer tank นี้ไปกรองเพราะขณะกรองจะต้องมีน้ำเบียร์หล่อตลอดท่อ ส่วนผงกรองที่ใช้มี 6 ชนิดคือ

- hyflo
- standard
- dicalolite
- cellulose
- bk 75
- pvpp

และมีการเติม vitamin C ไปในส่วนนี้ด้วย

ส่วนที่สอง จะมีการกรองผ่านตะแกรงละเอียดอีกครั้งหนึ่ง แล้วก็ทิ้งผงกรองส่วนที่เหลือออกไป

10. ผ่านน้ำเบียร์ที่ได้ ไปเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

11. ผ่านเบียร์ไปยังถังเก็บ (pressure tank) เพื่อรอการบรรจุทั้งเบียร์บรรจุขวดและเบียร์สด

11.1 เบียร์บรรจุขวด

1. ผ่านจากถังเก็บมาโรงบรรจุ โดยจะผ่านการกรองอีกครั้งด้วย cellulose membrane
2. บรรจุขวด และผ่านการฆ่าเชื้อ (pasteurisation) โดยจะแบ่งเป็น 4 zone ด้วยกันคือ

zone 1 : 8 องศาเซลเซียส → 30 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 10 นาที

zone 2 : 30 องศาเซลเซียส → 55 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 10 นาที

zone 3 : 55 องศาเซลเซียส → 61 องศาเซลเซียส ใช้วเลา 10 นาที

zone 4 : 61 องศาเซลเซียส → 55 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 10 นาที

ในส่วน zone ที่ 3,4 จะเป็นส่วน pasteurisation และในส่วนการพาสเจอร์ไรส์นี้จะมีการคำนวณค่า PU (Pasteurisation Units) ซึ่งค่านี้ควรจะอยู่ประมาณ 15-25 PU/min

3. ปิดจุกและผ่านเครื่องตรวจ (inspector) ดูตะกอนผงที่อาจติดมาหลังจากนั้นจึงนำมาปิด foil และปิดฉลาก และผ่านเข้าเครื่องบรรจุหีบห่อเพื่อรอการจำหน่าย

11.2 เบียร์สด

1. เบียร์จาก pressure tank จะผ่าน cooler plate ไปยังถังพักใหญ่ ที่เตรียมไว้บรรจุ
2. ถังเบียร์สดจะผ่านการล้างโดยเข้าเครื่อง จะมี 4 หัวฉีดคือ

- หัวฉีดที่ 1 เป็นหัวฉีดโซดาไฟ
- หัวฉีดที่ 2 เป็นหัวฉีดน้ำ
- หัวฉีดที่ 3 เป็นหัวฉีด steam
- หัวฉีดที่ 4 เป็นหัวฉีดที่จะนำเบียร์เข้า

3. ปิดที่ปิดถังและปิดฉลากรอการจำหน่าย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล

1.1 นำ volumn metric flask 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 400 มิลลิลิตร

1.2 ดูดสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 99.99 % (conc.) 10 มิลลิลิตร ใส่ลงไปใน volumn metric flask

1.3 เติมน้ำกลั่นให้ครบขีดขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร แล้วเขย่า ทำฉลากไว้ เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้

2. สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.85 %

2.1 นำ volumn metric flask 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 300 มิลลิลิตร

2.2 ชั่งโซเดียมคลอไรด์ (analysis grade) 85 กรัม นำมาละลายในบีกเกอร์ 500 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 300 มิลลิลิตร

2.3 เทสารละลายในข้อ 1.2 ใส่ใน volumn metric flask ในข้อ 2.1 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เขย่า เก็บสารละลายในขวดสีชา ทำฉลากเก็บไว้ใน cool room เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้

3. สารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ 25%

3.1 นำ volumn metric flssk 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 200 มิลลิลิตร

3.2 ชั่งโซเดียมคลอไรด์ (analysis grade) 250 กรัม ละลายในบีกเกอร์ 1000 มิลลิลิตร ที่มีน้ำอยู่ 600 มิลลิลิตร ค่อยๆ ละลายควรใช้น้ำหล่อเย็นข้างๆ บีกเกอร์ เพราะจะมีการคายความร้อนออกมา

3.3 น้ำสารละลายในข้อ 3.2 เทไปใน volumn metric flask ในข้อ 3.1 เติมน้ำให้ครบขีดบอกปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เขย่า เก็บสารละลายในขวดสีชา เขียนฉลากปิดไว้ เก็บสารละลายไว้ 12 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้

4. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1%

4.1 นำสารละลายใน ข้อ 3 มา 80 มิลลิลิตร ตวงโดยกระบอกตวง

4.2 เตรียมภาชนะถังพลาสติกทนด่างขนาด 20 ลิตร เติมน้ำกลั่นไป 2 ลิตร

4.3 เทสารในข้อ 4.1 ลงไปในถังในข้อ 4.2 ใช้ไม้พายเหล็กคนสารแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปจนถึงขีดบอกปริมาตร 20 ลิตร เขียนฉลากปิดไว้ เก็บไว้ในห้อง cold room ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้

5.1 นำ volumn metric flask 100 มิลลิลิตร มาเติมเอธิลแอลกอฮอล์ 95 % 20 มิลลิลิตร

5.2 ชั่ง bromocesol green 0.083 กรัม และ methyl red 0.016 % ใช้ analysis grade ละลายสารทั้ง 2 ตัวในบีกเกอร์ 100 มิลลิลิตร 2 ใบ ที่มีเอธิลแอลกอฮอล์อยู่บีกเกอร์ ละ 20 มิลลิลิตร

5.3 เทสารทั้ง 2 บีกเกอร์ลงไปใน volumn metric flask ในข้อ 5.1 เติมเอธิลแอลกอฮอล์ ลงไปให้ครบขีดบอกปริมาตร 100 มิลลิลิตร ติดฉลากไว้ เก็บในขวดสีชาในตู้เย็น เก็บไว้ 12 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้

ภาคผนวก ค

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณและคุณภาพของโปรตีน

(Qualitative and Quantitative Methods for Proteins Determination)

การวิเคราะห์หาปริมาณและคุณภาพของโปรตีน มีทั้งวิธีหาโดยตรง การตรวจหาโดยทางอ้อม ได้แก่ วิธี เจลดาห์ล (Kjeldahl method) ซึ่งอาศัยหลักการหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่อยู่ในสารตัวอย่าง และเปลี่ยนค่าไนโตรเจนที่ได้เป็นค่าโปรตีน โดยใช้ค่าคงที่ตัวหนึ่งเป็นตัวคูณวิธีนี้ จะทำให้ได้ค่าโปรตีนอย่างหยาบๆ เนื่องจากในสารตัวอย่างอาจมีสารประกอบชนิดอื่นที่ไม่ใช่โปรตีนและมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น กรดนิวคลีอิค เป็นต้น

การหาปริมาณโปรตีน โดยวิธีทางตรงนั้นสามารถหาได้หลายวิธีที่นิยมใช้กันมี ดังนี้ คือ

1. อัลตร้าไวโอเล็ตสเปคโตรโฟโตเมททรี่ (Ultraviolet spectrophotometry)
2. วิธีไบยูเรท (Biuret method)
3. วิธีลาวรี่ (Lowry's method)
4. วิธีกรดไบซินโคนินิค (Bicinchoninic acid method)
5. วิธีแบรดฟอร์ด (Bradford's method หรือ Dye-binding method)
6. วิธีใช้สารเงิน (Silver-binding method)

วิธีหาโปรตีนเหล่านี้ ยังคงเป็นวิธีการหาแบบกึ่งวิเคราะห์ปริมาณ ทั้งนี้ เนื่องจากเรามักจะไม่สามารถใช้โปรตีนที่บริสุทธิ์มาเป็นตัวมาตรฐานเปรียบเทียบปริมาณได้ เพื่อความสะดวกจึงมักจะใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นตัวเปรียบเทียบมาตรฐานอีกประการหนึ่งวิธีการหาปริมาณโปรตีนส่วนมาก มักใช้หลักการการเกิดสีโดยการเกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโนบางกลุ่ม แล้ววัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ฉะนั้นค่าโปรตีนที่วัดได้อาจเบี่ยงเบนไปขึ้นกับชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนเหล่านั้น ในสารโปรตีนตัวอย่างนอกจากนี้ ถ้าเป็นโปรตีนชนิดที่มีองค์ประกอบของสารอื่นร่วมอยู่ด้วย เช่น คาร์โบไฮเดรทก็จะทำให้ค่าของปริมาณโปรตีนคลาดเคลื่อนจากค่าที่เป็นจริงได้อีกด้วย

1. อัลตร้าไวโอเล็ตสเปคโตรโฟโตเมททรี่ (Ultraviolet spectrophotometry)

คือการวัดปริมาณโปรตีนด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 280 nm โดยอาศัยหลักการที่ว่าโปรตีนจะถูกดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเล็ตที่มากที่สุด ที่ความยาวคลื่นดังกล่าวทั้งนี้ เนื่องจากกลุ่มฟีนอล Phenolic group) ของกรดอะมิโนไทโรซีนและกลุ่มอินโดล (Indolic group) ของกรดอะมิโนทริปโตแฟนของโปรตีนมีความสามารถดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร นั่นเอง การวัดโปรตีนด้วยวิธีนี้ ค่อนข้างจะไม่แม่นยำขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของโปรตีนนั้นๆ และยังต้องทราบค่า

จึงจะตรวจวัดได้ในกรณีที่สารตัวอย่างไม่บริสุทธิ์และมีการเจือปนของกรดนิวคลีอิกจะต้องทำการวัดค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และ 260 นาโนเมตร ค่าที่วัดได้จะนำมาคำนวณหาค่าการวัดค่าโปรตีนได้ดังนี้

Protein (mg/ml) = 1.55A280 - 0.76 A260

ถ้าตัวทำละลาย (Solvent) สามารถดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ได้จะต้องมีการวัดค่า Blank (Sovent เปล่าๆ)เสียก่อนแล้วทำการหักลบออกจากค่าที่ได้จากค่าที่ได้จากการวัดโปรตีนตัวอย่าง

อย่างไรก็ตาม วิธีหาปริมาณโปรตีนวิธีนี้ มีข้อดีที่ว่าสามารถทำได้ง่ายรวดเร็วและสารโปรตีนตัวอย่างจะยังคงเหมือนเดิมไม่เสื่อมเสียไปสามารถนำไปใช้ทดลองต่อไปได้ การวัดที่ 280 นาโนเมตร จะต้องใช้ Quatz cuvettes เท่านั้น

2. วิธีไบยูเรต (biuret method)

วิธีอาศัยหลักการที่ว่า Cu^{2+} สามารถจับกับไนโตรเจนอะตอมของพันธะเปปไทด์ได้ทำให้เกิดเป็นสีม่วง ซึ่งจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540-560 นาโนเมตร (2) วิธีนี้มีข้อดีที่ว่าหลักการวัดแทบจะไม่ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนในโปรตีนและการแทรกแซงจากกรดอะมิโนเดี่ยวๆ ก็ไม่มีเนื่องจากสารละลายจากคอปเปอร์จะทำปฏิกิริยากับพันธะเปปไทด์เท่านั้น อย่างไรก็ตามวิธีนี้ ไม่มีความไวเพียงพอจะวัดได้ต่อเมื่อโปรตีนในสารตัวอย่างมีปริมาณ 1-6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ บัฟเฟอร์บางชนิดที่มีสารเคมี tris และแอมโมเนียจะมีผลแทรกแซงปฏิกิริยาของไบยูเรทได้ ดังนั้นการวัดโปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตจึงไม่เหมาะที่จะใช้วิธีนี้

วัสดุและสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายไบยูเรท (Biuret reagent)

ละลาย $CuSO_4.5H_2O$ 1.5 กรัม และโซเดียมโปแตสเซียมทาเทรต 6 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร, แล้วเติม 10 % (w/v) โซเดียมไฮดรอกไซด์ 300 มิลลิลิตร จากนั้น เติมน้ำจนมีปริมาตร 11 มิลลิลิตร ใส่โปแตสเซียมไอโอไดด์ 1 กรัม แล้วเก็บในขวดพลาสติกในที่มืด การใส่โปแตสเซียมไอโอไดด์จะช่วยไม่ให้คอปเปอร์ถูกรีดิ๊วซ์จึงเก็บสารละลายได้นาน

วิธีการทดลอง

1. เติมสารละลายไบยูเรต 2.5 มิลลิลิตร ในสารละลายตัวอย่าง (ที่มีโปรตีนประมาณ 3 มิลลิกรัม) 0.5 มิลลิลิตร
2. ตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
3. วัดค่า Absorbance ที่ 540 นาโนเมตร โดยใช้ Blank เป็น Sample buffer 0.5 มิลลิลิตร แทน
4. สำหรับ Standard curve ทำโดยใช้ BSA แทนความเข้มข้นระหว่าง 1-5 มิลลิกรัม

5. เปรียบเทียบค่าของโปรตีนในสารตัวอย่างได้จาก Standard curve

3. วิธีลาวรี่ (Lowry's method)

เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุดวิธีนี้ประยุกต์มาจากวิธีไบยูเรทโดยที่เริ่มแรกจะให้สารละลายคอปเปอร์ไปทำปฏิกิริยากับโปรตีนภายใต้สภาวะที่เป็นด่างจากนั้น เติมสารละลาย Folin - Ciocalteau (Phosphomolybdic-phosphotungstic mixed acid ลงไปกรดนี้ จะไปรีดิ๊วซ์คอปเปอร์คอมเพล็กซ์ให้เป็นสารละลายสีน้ำเงินเข้มปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมที่จะใช้หาปริมาณคือระหว่าง 0.1-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งทำให้วิธีนี้มีความไวมากกว่าวิธีของไบยูเรต (3)

วัสดุและสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลาย A : 1 %(w/v) คอปเปอร์ ซัลเฟส (CuSO4.5H2O)
2. สารละลาย B : 2 %(w/v) โซเดียม โปแตสเซียม ทาร์เทรต(Sodium potassium tartrate)
3. สารละลาย C : 0.2 โมล โซเดียม ไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)
4. สารละลาย D : 4 % (w/v) โซเดียม คาร์บอเนต (Sidium carbonate)

สารละลายเหล่านี้เก็บที่อุณหภูมิห้องได้

5. Folin- Ciocalteau reagent

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลาย E โดยผสมสารละลาย C 49 มิลลิลิตร กับสารละลาย D 49 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย A 1 มิลลิลิตร จากนั้น จึงใส่สารละลาย B 1 มิลลิลิตร สารละลาย E ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการทดลอง

2. เจือจาง Folin-Ciocalteau reagent ในอัตราส่วน 1:1 ด้วยน้ำกลั่นเรียกว่า สารละลาย F

3. ใช้สารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน (โดยมีค่าโปรตีนไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัม) 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย E 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้นาน 10 นาที

4. ใส่สารละลาย F 0.25 มิลลิลิตร ลงในหลอดในข้อ 3

5. เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที

6. วัด Absorbance ที่ 750 นาโนเมตร โดยใช้ Sample buffer เป็น Blank ทำตามขั้นตอน 3-6

7. เตรียม Standard curve โดยใช้ BSA ความเข้มข้นระหว่าง 0.05-0.3 มิลลิลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4. วิธีใช้กรดไบซินโคนินิค (Bicinchoninic acid method)

วิธีนี้ ค้นพบโดย Smith et al ในปี 1985 (4) วิธีนี้มีหลักการคล้ายคลึงกับวิธีของลาวรี่ยกเว้นการใช้กรดไบซินโคนินิค (BCA) แทน Folin-Ciocalteau ซึ่งมีข้อดีตรงที่วิธีนี้ไม่ถูกรบกวนโดยสารละลายที่พบว่ารบกวนวิธีลาวรี่โดยเฉพาะสารพวก Anionic, non-ionic และ Zwitterionic detergents ซึ่งเป็นสารที่ใช้เพื่อละลายโปรตีนปฏิกิริยาของ BCA จะเป็นสารละลายสีม่วงเข้มสามารถวัดได้ที่ Absorbance ที่ 562 นา-

โนเมตร ปริมาณโปรตีนในช่วงที่วัดได้จะอยู่ในระหว่าง 0.1-1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

วัสดุและสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลาย A : 1%(w/v) $BCA0Na_2'$,
   2%(w/v) โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate),
   0.16 % (w/v) โซเดียมทาร์เทรต(Sodium tartrate),
   0.4%(w/v)โซเดียมไฮดรอกไซด์(Sodiumhydroxide)
   0.95% (w/v)โซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate)

ควรจะให้ได้ PH 11.25 ถ้าไม่ได้ให้ปรับด้วย 50 % w/v Sodium hydroxide หรือผง โซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate)

2. สารละลาย B : 4%(w/v) $Cuso_4.5H_2O$

สารทั้งสองมีความเสถียรมากที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลาย C โดยผสมสารละลาย A 100 ส่วน สารละลาย B 2 ส่วน สารละลาย C จะมีสีเขียวและมีความเสถียรไม่เกิน 1 อาทิตย์ที่อุณหภูมิห้อง

2. ใส่สารตัวอย่างลงในหลอดทดลอง 100 ไมโครลิตร (มีปริมาณโปรตีนระหว่าง 10-120 ไมโครลิตร) ตามด้วยการใส่สารละลาย C 2 มิลลิลิตร

3. เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที ที่ 34 องศาเซลเซียส

4. วัด Absorbance ที่ 562 นาโนเมตร โดยใช้ Sample buffer 100 ไมโครลิตร เป็น blank ทำตามขั้นตอน 2-4 เปรียบเทียบผลกับ Standard curve ที่ใช้ BSA

5. วิธีแบรดฟอร์ด (Bradford's method or dye-binding method)

วิธีของแบรดฟอร์ด (5) อาศัยหลักการที่ว่าสาร Coomassie Brilliant Blue G-250 เมื่อจับกับโปรตีนแล้ว ทำให้เกิดการเปลี่ยนความยาวคลื่น (Wavelength) ของการดูดกลืนแสงจาก 465 นาโนเมตร (สีแดง) เป็น 595 นาโนเมตร (สีน้ำเงิน) Bradford's reagent เป็นสารประกอบของ Coomassie Brilliant Blue G-250 ซึ่งเตรียมในสารละลายกรด เช่น Phosphoric acid หรือ Perchloric acid

วิธีแบรดปอร์ดเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วใช้เพียงขั้นตอนเดียววิธีนี้ จะมีความไวต่อการทดสอบสูงโดยสามารถตรวจโปรตีนที่มีปริมาตรระหว่าง 0.2-1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้สามารถจะทำ Microassay ได้ โดยใช้ปริมาตรโปรตีน 5-100 ไมโครกรัม อย่างไรก็ตามสีของ Coomassie Brilliant Blue มักจะติดผิวแก้ว ซึ่งสามารถทำความสะอาดโดยแช่ Glass cuvettes ใน 0.1 โมล HCl แล้ว ล้างด้วยน้ำและ Acetone นอก

จากนี้ ยังพบว่าสี Coomassie Blue มักจะจับกับกรดอะมิโน Arginine และ Aromatic amino acids มากกว่ากรดอะมิโนตัวอื่นๆ และวิธีนี้ ก็มีการรบกวนจากสารเคมีชนิดอื่น เช่น สาร Detergents ที่มีความเข้มข้นมากกว่า 0.1% และสารประเภทบัฟเฟอร์ที่มีฤทธิ์เป็นด่างมากๆ เป็นต้น

วัสดุและสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. Dye reagent : ละลาย Coomassie Brilliant Blue F-250 ใน 95% 50 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากันดีแล้วเติม 85 % (w/v) กรดฟอสฟอริค (Phosphoric acid 100 มิลลิลิตร จากนั้น เติมน้ำให้เป็น 1 ลิตรแล้วกรองหรือจะสั่งซื้อสารละลายสำเร็จรูปจากบริษัทตัวแทนก็ได้

วิธีการทดลอง

วิธีมาตรฐาน

1. ใส่ Dye reagent 5 มิลลิลิตร ในสารตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร (มีปริมาณโปรตีน 20-140 ไมโครกรัม)

2. เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้นาน 5-30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

3. วัด Absorbance ที่ 595 นาโนเมตร โดยใช้ Sample buffer 0.1 มิลลิลิตร เป็น Blank

Microassay

1. ใส่ Dyereagent 0.2 มิลลิลิตร ในสารตัวอย่าง 0.8 มิลลิลิตร (มีปริมาณโปรตีน 1-20 ไมโครกรัม)

2. เขย่าให้กันและตั้งทิ้งไว้นาน 5-30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

3. วัด Absorbance ที่ 595 นาโนเมตร โดยใช้ Sample buffer 0.8 มิลลิลิตร เป็น Blank

6. วิธีการใช้ซิลเวอร์ (Silver-binding method)

วิธีนี้มีความไวสูงมากเหมาะสำหรับสารตัวอย่างที่มีปริมาณโปรตีนต่ำมากระหว่าง 150-20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร วิธีนี้ดัดแปลงมาจากหลักการใช้ซิลเวอร์ในการย้อมแถบโปรตีนที่แยกโดย Polyacrylamide gel eletrophoresis นั้นเอง แต่เป็นการวัดความเข้มของสีที่เกิดจากปฏิกิริยา ซิลเวอร์จับกับโปรตีนโดยวัด Absorbance ที่ 420 นาโนเมตร (6)

วัสดุและสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลาย A : 7.5 %(w/v) tween 20 , 100 มิลลิโมล โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate)

2. สารละลาย B : 2.5 % glutaradehyde สารนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง โดยเตรียมจาก Stock 25 % ซึ่งเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

3. สารละลาย C : Ammoniacal dilver solution มีวิธีการเตรียมดังนี้ 2.5 % (w/v) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide 1.4 มิลลิลิตร และ 29 % แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (Ammonium hydroxide 0.2 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 18.2 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ 0.2 % (w/v) ซิลเวอร์ไนเตรท (Silver nitrate) 0.2

มิลลิลิตร โดยใส่ลงไปทีละหยด

4. สารละลาย D : 3%(w/v) โซเดียมไธโอซัลเฟต (Sodium thiosulphate) สารละลายนี้ ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

วิธีทดลอง

1. ใส่สารละลาย A 11 ไมโครลิตร ลงในสารตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร(มีโปรตีน 15 นาโนกรัม - 2 ไมโครกรัม)

2. Centrifuge ที่ 450 กรัม นาน 5 นาที ใน Bio-Gel P-2 Column ขนาด 2 มิลลิลิตร โดยต้อง Pre-equilibrate ด้วยสารละลาย A เข้มข้น 10 เท่า

3. เติมน้ำกลั่น 0.9 มิลลิลิตร เพื่อทำให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตร

4. เติมสารละลาย B 20 ไมโครลิตร และ Vortex นาน 2 วินาที

5. เติมสารละลาย C 200 ไมโครลิตร และ Vortex นาน 2 วินาที

6. ตั้งทิ้งนาน 10 นาที (เท่านั้น) ที่อุณหภูมิ

7. เติมสารละลาย D 40 ไมโครลิตร

8. วัด Absorbance ที่ 420 นาโนเมตร โดยใช้ Sample buffer 100 ไมโครลิตร เป็น Blank

ตารางที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการหาโปรตีนโดยวิธีต่าง ๆ

method and sensitive	chemical interfernce	protein/protein variation	technique speed complexity
Absorbance(10 ไมโครกรัม)	ปานกลาง	มีผลมาก	เร็วละง่าย
Kjeldahl (1 ไมโครกรัม)	ปานกลาง	มีผลน้อย	ช้าและยุ่งยากมาก
Biuret(100 ไมโครกรัม)	ปานกลาง	มีผลน้อย	ปานกลาง
Lowry(1 ไมโครกรัม)	สูง	มีผลมาก	ปานกลาง
Bradford(1 ไมโครกรัม)	เล็กน้อย	มีผลมาก	เร็วและง่าย
Bicincho(1 ไมโครกรัม)	เล็กน้อย	มีผลมาก	เร็วและง่าย

อ้างอิง

ชมรมเทคโนโลยีทางอาหารและชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, "การสกัดสารปรุงแต่งกลิ่นรสจากยีสต์", เคลินิวส์, 23 พฤษภาคม 2537.

วิวัฒน์ หวังเจริญ, "ยีสต์ออโตไลเสท : สารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารจากยีสต์" , อาหาร , ปีที่ 23 (เมษายน - มิถุนายน 2536), 83-97.

ศูนย์สถิติการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, "เอกสารสถิติการเกษตรเลขที่ 445", พิมพ์ที่ห้างหุ้นส่วนจำกัด ธนโชติการพิมพ์, กรุงเทพฯ, 2536

The Analysis Commitee of the EBC (edit), Analysis - EBC, 2nd., Elsevier Publishing Company:New York, 1963.

Anthony H.Rose, The Yeast Vol.2, 2nd edition, School of Biological Sciences, University of Bath, Avon, United Kingdom, 1987.

Bishop, L.R., J. Inst. Brew., 73:525,1967.

Braford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilization the principle of ptotein-dye binding, Anal. Biochem.,12:248-254,1976.

Brener, M.W., Vigilante, S. and Owades, J.K., Amer. Brewer., 40, 1956

Cook, A.H. (edit), The Chemistry and Biology of Yeast, 1st. ed., United State of America:Acadamic, 1958.

Gerald Reed, Ph.D. and Henry J.Peppler, Ph.D., Yeast Technology, 1st.ed., West port, Connecteut, United state of America:The AVI Publish Company, Inc., 1972.

Goldbery, M.L., Quantitative assay for submicrogram amounts of ptotein, Anal. Biochem., 51:240-246, 1973.

Howard, G.A., J. inst. Brew., 74:249,1968.

Krystal, G., C. Macdral, B. Munt, and S. Ashwell, A method for quantitating nanogram amounts of soluble ptotein using the principle of silver binding, Anal. Biochem., 148:451-460, 1985.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A. Lewis Farr, and R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193:265-275, 1951.

Phaff, H.J. miller, M.W., and Mrak, E.M., The Life of Yeast, United State of America:Harvard, 1966.

Rigby, F.L., and Bethune, J.K., J. Inst. Brew., 61:332,1955.

Scopes, R.K., Measurement of protein by spectrophotometer at 205 nm., Anal. Biochem., 59:277-282, 1974.

Smith, P.K., R.J. Krohn, G.T. Hermasow, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.P. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Gocke, B.J. Olson, and D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, Anal. Chem., 150:76-85, 1985.

Technical Committee and Editorial Board A.S.B.C., Methods of Analysis of The American Society of Brewing Chemists, 6th.ed., P.O. Box 2146 Maclison 5, Wis : Executive Secretary, 1958.

Verzele, M. and Dekeukeleire, D., Chemistry and Analysis of Hop and Beer Bitter Acid, Netheland:Elsevier, 1991.