สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ความพยายามในการกำจัดความขมของฮอพจาก Spent yeast โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตรกราฟี

นางสาวชนิตโชต เดชวิศิษฏ์สกุล
นางสาวปราณี กิตติอนงค์
นางสาวสุนันทา วงศ์ยืน
นางสาวสุภาภรณ์ วงศ์แสนสุขเจริญ

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2539

ปพ.
ช153ด
2539
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....28150
วัน, เดือน, ปี.....17 ก.ค. 2540

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Elimination of hop's bitterness from Spent yeast by column chromatography

Ms. Chanitchote Detvisitsakun

Ms. Pranee Kittianong

Ms. Sunanta Wongyean

Ms. Supaporn Wongsansukcharoen

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 Institue of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ ความพยายามในการกำจัดความขมของฮอพออก
จาก Spent yeast โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

โดย นางสาวชนิตโชต เตชวิศิษฏ์สกุล
นางสาวปราณี กิตติอนงค์
นางสาวสุนันทา วงศ์ยืน
นางสาวสุภาภรณ์ วงศ์แสนสุขเจริญ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.เรียม เตชะโสภณมณี
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....

(ผศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต) หัวหน้าภาค

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

.....

(ผศ.ดร.เรียม เตชะโสภณมณี) ประธานกรรมการ

.....

(ผศ.มาลินี ตันติยาภรณ์) กรรมการ

.....

(ผศ.ดร.มาลินี ชัยศุภกิจสินธุ์) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ ความพยายามในการหาวิธีกำจัดฮอพออกจากยีสต์ที่ได้จากการหมักเบียร์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

โดย 1. นางสาวชนิตโชต เดชวิศิษฏ์สกุล
2. นางสาวปราณี กิตติอนงค์
3. นางสาวสุนันทา วงศ์ยืน
4. นางสาวสุภาภรณ์ วงศ์แสนสุขเจริญ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. เรียม เตชะโสภณมณี
ปีการศึกษา 2539

Spent yeast ที่ได้จากการหมักเบียร์นั้นจะมีความขมของฮอพติดอยู่ ในการกำจัดความขมดังกล่าวจะใช้หลักการของคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยมีอลูมินาและซิลิกาเจล เป็นตัวดูดซับฮอพไว้ ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีการทดลองกำจัดความขมนี้โดยการใช้ด่าง แต่ประสบกับปัญหาน้ำเสียที่เกิดขึ้นมากถึง 12 เท่า นอกจากนั้นก็ได้มีการทดลองใช้เอนไซม์ไคติเนสในการย่อยผนังเซลล์ยีสต์เพื่อให้ปลดปล่อยฮอพ แต่เนื่องจากเอนไซม์มีราคาแพงมาก จึงไม่คุ้มค่าต่อการลงทุน

ในการทดลองกำจัดความขมโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีนี้จะเริ่มต้นโดยการเตรียมออโตไลเสทยีสต์ จากนั้นจึงทำการบรรจุคอลัมน์ด้วยอลูมินาและซิลิกาเจล สำหรับใช้เป็นเฟสที่อยู่กับที่ ส่วนตัวอีลูทที่ใช้คือ เอทิลแอลกอฮอล์ ที่ความเข้มข้น 20% v/v และ 40%v/v โดยเราจะทำการเก็บตัวอย่างเป็น 3 ส่วน จากนั้นก็นำตัวอย่างดังกล่าวไปตรวจหาความขมของฮอพ ซึ่งผลการทดลองพบว่าสามารถลดความขมของ Spent yeast ลงได้โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title **Elimination of hop's bitterness by column chromatography**

Name **1. Ms. Chanitchote Detvisitsakun**

2. Ms. Pranee Kittianong

3. Ms. Sunanta Wongyean

4. Ms. Supaporn Wongsansukcharoen

Special Project Advisor **Assist. Prof. Dr. Ream Techasophonmani**

Academic Year **1996**

Abstract

Spent yeast from beer fermentation has bitter taste because of hop . (A kind of herb is used in the process of beer fermentation.) So we have to eliminate this bitterness for increasing economic values. There are two previous experiments : one experiment used alkaline for eliminating hop's bitterness from yeast's cell but encountered with wastewater problem and another experiment used chitinase enzyme to degrade yeast's cell wall. The latter experiment gave satisfied results but the price of enzyme is too expensive when compares with an advantage we will get. In our experiment we had an attempt to eliminate hop's bitterness by the method of column chromatography . Autolysated yeast was used as a starting material and silica gel or alumina used as stationary phase. The eluent was ethylalcohol at the concentration of 40% v/v and 20% v/v. Samples were taken 3 parts for measuring the bitterness. From our experimental results we found that hop's bitterness could be eliminated from spent yeast by column chromatography.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.เรียม เตชะโสภณมณี ผศ.ดร.มาลินี ชัยศุภกิจสินธุ์ และ ผศ.นวลพรรณ ณ ระนอง ผู้ซึ่งให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน ตลอดจนคอยให้คำปรึกษาและกำลังใจ ขอขอบพระคุณ คุณสุธีร์ ปรางค์ทอง ที่ให้ยีสต์มาใช้ในการทดลอง ขอขอบคุณ คุณออมศรี ชลานน ผู้ให้ความกรุณาในการตรวจวัดความขม จากบริษัท บุญรอด เบเวอร์รี่ จำกัดและขอขอบคุณ คุณศุภชัย ชวนศักดิ์ ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการบรรจุคอลัมน์ และที่ลืมเสียมิได้คือเพื่อน ๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูปภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร	3
เบียร์	3
ยีสต์	6
ฮอพ	17
โครมาโตกราฟี	21
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	31
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการวิจารณ์	36
บทท 5 สรุปผลการทดลอง	45
ภาคผนวก	
เอกสารอ้างอิง	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอส	13
ตารางที่ 2	แสดงองค์ประกอบของฮอพ	18
ตารางที่ 3	แสดงส่วนประกอบของแอลฟาแอซิด	19
ตารางที่ 4	การแบ่งเทคนิคและวิธีการแยกตามชนิดของเฟส	24
ตารางที่ 5	ตัวทำละลายที่ใช้ในการดีเวลลอป เรียงตามโพลาริตีจากน้อยไปมาก	30
ตารางที่ 6	แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในยีสต์ที่นำมาจาก Decantor	36
ตารางที่ 7	แสดง pH ในยีสต์ออโตไลเสท	36
ตารางที่ 8	แสดงผลการวัดความขม โดยใช้ตัวอีลูทด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 40%(v/v)	37
ตารางที่ 9	แสดงผลการวัดความขม โดยใช้ตัวอีลูทด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 20%(v/v)	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1	ขบวนการผลิตเบียร์	5
รูปที่ 2	ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ยีสต์	7
รูปที่ 3	รายละเอียดของฮอพ	20
รูปที่ 4	คอลัมน์ที่ใช้ในการทำโครมาโตกราฟี	25
รูปที่ 5	ตัวดูดซับที่ใช้เป็นเฟสที่อยู่กับที่ในการทำ คอลัมน์โครมาโตกราฟี เรียงตามโพลาริตี	26
รูปที่ 6	สรุปแผนผังวิธีการทดลองทั้งหมด	35
รูปที่ 7	แสดง Spent yeast	39
รูปที่ 8	แสดงลักษณะของยีสต์ครีมเบียร์ที่นำมาจาก Decanter และนำไปผ่านการอบแห้ง	39
รูปที่ 9	แสดงลักษณะตะกอนฮอพที่อยู่ภายนอก (ซ้าย) และภายในเซลล์ (ขวา)	40
รูปที่ 10	แสดงลักษณะของยีสต์ครีมที่สะอาดที่ผ่าน การล้างน้ำเกลือ 0.85%	40
รูปที่ 11	แสดงยีสต์ออโตไลเสท (ก)และยีสต์ออโตไลเสทที่ผ่าน การเซนตริฟิวก์แล้ว(ข)	41
รูปที่ 12	แสดงคอลัมน์ที่บรรจุด้วย ซิลิกาเจล	41
รูปที่ 13	แสดงคอลัมน์ที่บรรจุด้วย อลูมินา	42
รูปที่ 14	แสดงการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างในคอลัมน์	42
รูปที่ 15	แสดงสารตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี ช่วงก่อนสีเหลือง (ก) ช่วงสีเหลือง (ข) ช่วงหลังสี่เหลือง (ค)	43
รูปที่ 16	เครื่องเขย่าที่ใช้ในการหาความขม	43
รูปที่ 17	เครื่องเซนตริฟิวก์ที่ใช้ในการปั่นฮอพ	44
รูปที่ 18	เครื่อง UV Spectrophotometer ที่ใช้ในการวัดความขม	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ในปัจจุบันนี้ปริมาณยีสต์ที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมผลิตสุรา เบียร์ แอลกอฮอล์ มีปริมาณยีสต์เหลือทิ้ง และไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นทุกปี เนื่องจากความต้องการบริโภคสินค้าเหล่านี้มีเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นถ้าไม่นำยีสต์เหล่านี้มาใช้ให้เกิดประโยชน์ก็จะทำให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมา ตัวอย่างเช่น ในการผลิตเบียร์ จะมี Spent Yeast ซึ่งมีความขมอยู่ในปริมาณที่มาก และไม่สามารถจะนำมาใช้ประโยชน์ได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาทางในการลดความขมออกจากยีสต์ ซึ่งได้มีผู้ทำการศึกษาทดลองใช้ด่างกำจัดความขมออกจากยีสต์ พบว่าสามารถกำจัดความขมออกจากยีสต์ได้ดี แต่เกิดปัญหาเรื่องน้ำเสียที่เกิดจากการล้างยีสต์ ดังนั้นจึงมีการศึกษาหาแนวทางใหม่เพื่อลดปัญหาดังกล่าว โดยได้มีการนำเอนไซม์ไคติเนสและ ไลติเคส มาใช้ในการกำจัดความขม แต่พบว่าได้ผลไม่ดีเท่าที่ควร และใช้ต้นทุนในการกำจัดสูง เนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้มีความบริสุทธิ์ ซึ่งมีราคาแพงและผลที่ได้ไม่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องคิดค้นหาเทคนิคใหม่ ๆ ในการกำจัดความขมออกจากยีสต์ต่อไป ดังนั้นโครงงานพิเศษนี้จึงเกิดขึ้นเพื่อศึกษาหาแนวทางในการลดปัญหาน้ำเสียที่เกิดขึ้น และลดปัญหาในด้านต้นทุนการผลิต โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทำการศึกษาวิธีการกำจัดฮอพ (debittering) ออกจาก Spent Yeast โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี
2. เพื่อศึกษาแนวทางในการลดปัญหาน้ำเสีย และลดต้นทุนในการกำจัดความขม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขอบเขตของปัญหาพิเศษ

กำจัดความขมออกจาก Spent yeast โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ซึ่งในการทำจะหาตัวอีลูทที่เหมาะสมและไม่เป็นอันตราย นอกจากนี้ยังเลือกเฟสที่อยู่กับที่ให้เหมาะสมที่จะจับส่วนขมของฮอพด้วย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ลดต้นทุนและปริมาณน้ำเสียที่เกิดขึ้นจากการกำจัดความขมของฮอพออกจาก Spent yeast โดยวิธีการใช้เอนไซม์และการใช้ด่าง
2. เพิ่มคุณค่าทางเศรษฐกิจของ Spent yeast

ขั้นตอนในการดำเนินงาน

1. ตรวจสอบคุณสมบัติของ Spent yeast
2. หาความขมที่เหลืออยู่ในครีมยีสต์หลังจากล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85 %
3. การทำออโตไลเสทยีสต์
4. การเตรียมและการแยกออโตไลเสทยีสต์กับฮอพออกจากกันด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี
5. การวัดความขมของออโตไลเสทยีสต์ เมื่อผ่านการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
บทตรวจเอกสาร

เบียร์ (Beer)

ตามความหมายดั้งเดิมนั้นเบียร์หมายถึง เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ได้จากกระบวนการหมักของข้าวมอลต์ น้ำฮอพ (Hop) และยีสต์ แต่ในปัจจุบันนี้มีเพียงประเทศเยอรมันประเทศเดียวเท่านั้นที่มีการผลิตเบียร์ตามความหมายนี้ แต่ประเทศอื่นๆ จะมีการใช้ธัญพืชอื่นๆ ผสมกับข้าวมอลต์ในการผลิตเบียร์ ธัญพืชที่ใช้ได้แก่ ข้าวโพด ข้าว และข้าวสาลี เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตเนื่องจากข้าวมอลต์มีราคาสูง ซึ่งในกระบวนการผลิตเบียร์นั้นยีสต์จะมีบทบาทสำคัญที่สุด โดยนอกจากจะเป็นตัวการในการเปลี่ยนน้ำตาลในวอร์ต(Wort)ให้เป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์แล้วยังผลิตสารอื่น ๆ ที่ระเหยได้ และระเหยไม่ได้หลายชนิดในปริมาณเล็กน้อย และสารเหล่านี้เป็นตัวให้กลิ่นรสแก่เบียร์ เบียร์ที่ผลิตได้ดีหลายชนิดด้วยกันขึ้นอยู่กับสี

ขั้นตอนที่สำคัญในการผลิตเบียร์มี 4 ขั้นตอนหลัก ๆ ได้แก่

1. การผลิตมอลต์ (Malting)

นำข้าวบาร์เลย์มาแช่ที่อุณหภูมิ 10-15 องศาเซลเซียส และทิ้งไว้ให้งอกที่อุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน แยกต้นอ่อนที่ได้ส่วนที่เหลือคือมอลต์ ซึ่งจะมีเอนไซม์พวก แอลฟา-อะมัยเลส และโปรติเอส มอลต์ที่ได้จะนำมาใช้ในการทำแมช (Mash) ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การทำแมช (Mashing)

เป็นการนำข้าวมอลต์มาบดและแช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60-75 องศาเซลเซียส และเติมธัญพืชอื่นๆ เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี ข้าวโพด หรือข้าวลงไปเพิ่มด้วยเพื่อให้เอนไซม์ที่มีอยู่แล้ว เปลี่ยนแปลงจากธัญพืช ให้เป็นน้ำตาล

3. การต้มวอร์ต (Wort)

หลังจากทำแมชแล้ว ของเหลวที่สกัดได้จากข้าวมอลต์คือ วอร์ต จะถูกกรองออกมาโดยใช้ถังหมักที่เรียกว่า ลอร์เธอร์ตัน (Lauter tun) ของแข็งที่แยกวอร์ตออกไปแล้วเรียกว่า Spent gain ซึ่งมีคุณค่าทางอาหารและสามารถใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ วอร์ตที่แยกได้จะนำไปต้มกับฮอพ เป็นเวลา 60-90 นาที

4. การหมัก (Fermentation)

วอร์ตที่เตรียมเรียบร้อยแล้วจะนำมาใช้ในการหมักเบียร์ด้วยเชื้อยีสต์ การหมักเบียร์ในสมัยโบราณจะไม่มีการเติมเชื้อยีสต์ลงไป แต่จะอาศัยเชื้อยีสต์จากธรรมชาติที่ติดมากับธัญพืชที่ใช้หมัก

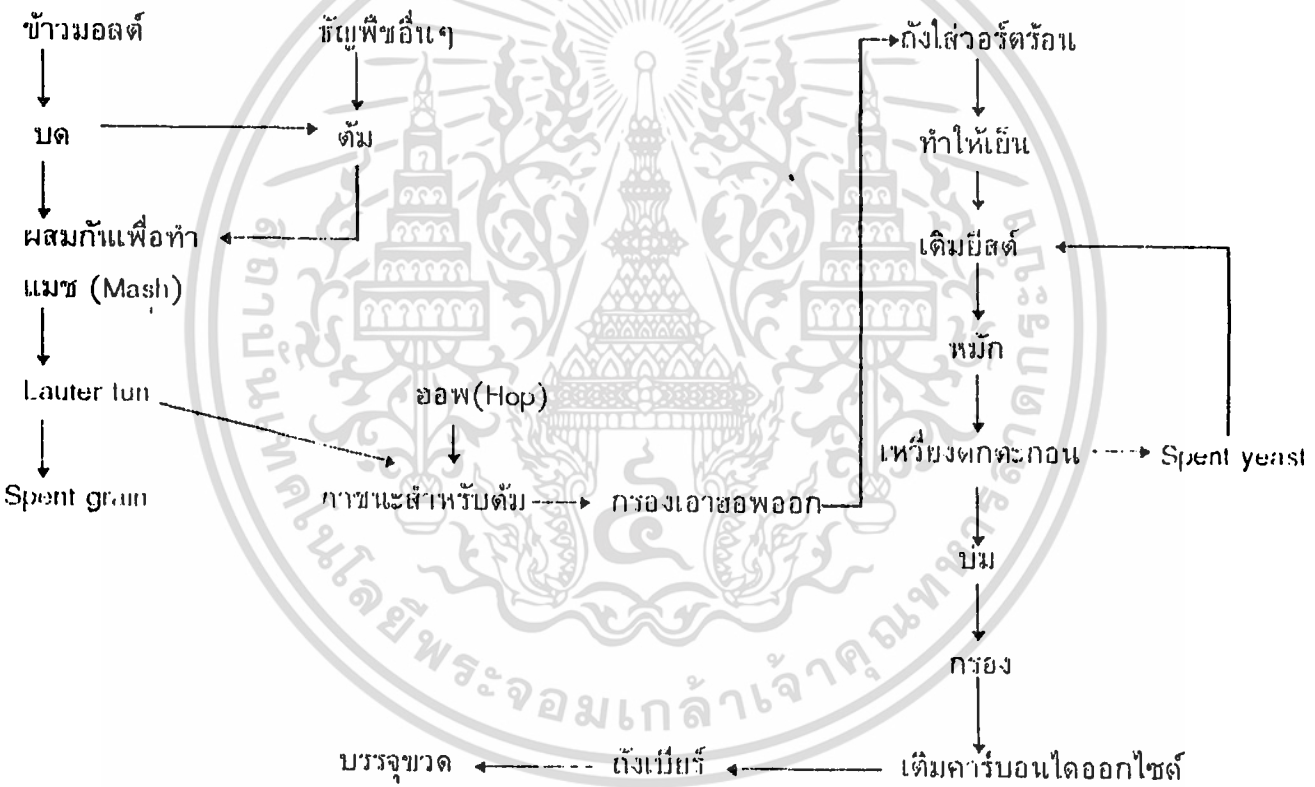
ในปัจจุบันมีเบียร์เพียงบางชนิด ที่ยังใช้การหมักด้วยเชื้อธรรมชาติ คือ Gueuze Beer และ Lambic Beer ของประเทศเบลเยี่ยม

สำหรับเบียร์ที่มีการผลิตกันมากทั่วโลกในปัจจุบันมี 2 ชนิด คือ Ale Beer และ Lager Beer

Ale Beer ใช้กระบวนการหมักแบบ Top fermentation ใช้เชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae*

Lager Beer ใช้กระบวนการหมักแบบ Bottom fermentation ใช้เชื้อยีสต์สายพันธุ์*Saccharomyces uvarum (S.carlsbergensis)*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ แผนผังการผลิตเบียร์

ยีสต์ (Yeast)

คุณลักษณะโดยทั่วไปของยีสต์

ปัจจุบันนี้อุตสาหกรรมหมักที่ใช้ยีสต์ในการผลิตจัดเป็นอุตสาหกรรมหมักที่ใหญ่ที่สุด คือมีจำนวนเงินหมุนเวียนมากที่สุด ซึ่งอุตสาหกรรมเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ก็เป็นอุตสาหกรรมหนึ่งที่ใช้ยีสต์ในการผลิตโดยที่ยีสต์แสดงบทบาทที่สำคัญในกระบวนการทำเบียร์ไม่เฉพาะแต่การเปลี่ยนน้ำตาลในการหมักน้ำเวิร์ท (wort) ให้เป็นเอธานอลและคาร์บอนไดออกไซด์เท่านั้น แต่มันจะผลิตสารประกอบที่ไม่ให้กลิ่นรสและสารประกอบที่ให้กลิ่นรสต่างๆ ที่ก่อให้เกิดเป็นกลิ่นรสทั้งหมดของเบียร์ จนได้เป็นความกลมกลืนเหมาะสมก่อนที่จะเข้ากระบวนการทำให้เบียร์ใส ยีสต์ที่ใช้หมักเบียร์ คือ จีนัส *Saccharomyces* มี 2 สปีชีส์ที่สำคัญ ซึ่งแต่ละสปีชีส์จะขึ้นกับชนิดของกระบวนการผลิตเบียร์

เบียร์ส่วนใหญ่ถูกผลิตโดยการหมักที่กัน (bottom fermentation process) ในการใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces uvarum* ยีสต์สายพันธุ์นี้มักจะเหลือเป็นสารแขวนลอยเมื่อจำกัดเวลาในการหมักขณะที่การหมักกำลังดำเนินกิจกรรม หลังจากนั้นยีสต์ส่วนใหญ่จะตกตะกอนลงที่กันถังหมัก สายพันธุ์นี้ส่วนใหญ่ถูกใช้ในเยอรมันและอเมริกาเหนือเพื่อผลิต lager beer และอีกชนิดหนึ่ง *Saccharomyces cerevisiae* ถูกใช้ในการผลิต ale คือถูกผลิตโดยยีสต์ชนิดที่ทำการหมักอยู่บริเวณด้านบนของอาหาร และส่วนใหญ่จะเกาะตัวกันที่ผิวหน้าของของเหลวที่ใช้หมักหลังจากการหมักนั้นสมบูรณ์แล้ว ale คือเบียร์ที่นิยมกันในอังกฤษและ ไอร์แลนด์ แม้จะมีความแตกต่างกันในพฤติกรรมการหมักของทั้ง 2 สปีชีส์ แต่จัดอยู่ในกลุ่ม *S. cerevisiae* เหมือนกันจนถึงทุกวันนี้อุตสาหกรรมการหมักเบียร์ยังมีความแตกต่างอย่างต่อเนื่องของทั้ง 2 สายพันธุ์นี้

สายพันธุ์ของยีสต์ในการทำเบียร์โดยทั่วไปเป็นโพลีพลอยด์หรือ แอนยูพลอยด์ที่มีจำนวนโครโมโซมที่ไม่แน่นอน คือ มีหลายๆชิ้นส่วนของโครโมโซมถูกพบในสายพันธุ์แฮพพลอยด์ภายใต้สภาวะนี้ดังเช่นสายพันธุ์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมไม่มีการเกิดเมททิงไทป์ (mating type) เพราะสายพันธุ์มีการเกิดสปอร์น้อยมากๆ และสปอร์ส่วนใหญ่ก็ไม่มีชีวิตต่อไปได้ แม้ว่าจะอยู่ภายใต้สภาวะการงอกที่เหมาะสมเนื่องด้วย

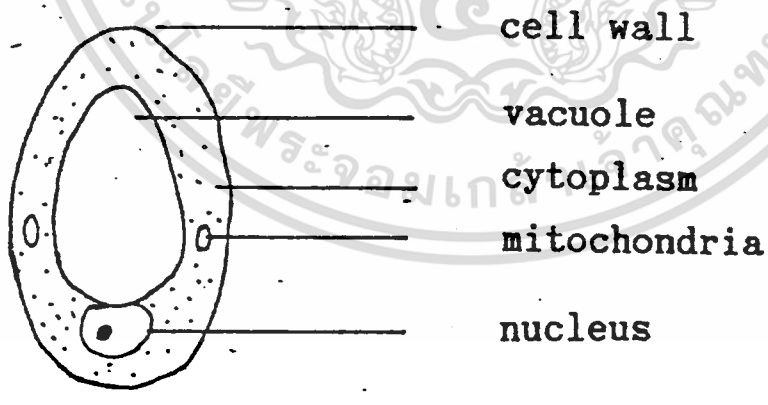
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โพลีพลอยด์ที่สูงของพวกมันและระดับของรีคอมบิเนชัน(recombination)ต่ำ สายพันธุ์ที่ใช้ในการทำเบียร์นี้มีพันธุกรรมที่มีความเสถียรมากและจุดอ่อนน้อยที่จะเกิดเป็นแรงในการกลายพันธุ์ การคัดเลือกโพลีพลอยด์ที่มีความเสถียรของยีนสูงๆ ที่สำหรับการทำเบียร์ให้เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนนี้เพื่อสนับสนุนการผลิตที่มีคุณภาพคงที่และผลิตเบียร์ในโรงหมักเบียร์โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง

สัณฐานวิทยาของยีสต์

เซลล์ยีสต์ที่มีขนาดแตกต่างกันออกไป มีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 1-5 ไมโครเมตร ยาวตั้งแต่ 5-30 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่เซลล์จะเป็นรูปไข่แต่มีบางชนิดที่ยาวกว่า บางชนิดเป็นรูปทรงกลมแต่ละสปีชีส์จะมีลักษณะเฉพาะของตนเอง แต่อย่างไรก็ตามขนาดและรูปร่างอาจแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับอายุ และสภาพแวดล้อม ยีสต์ไม่มีโครงสร้างที่ใช้ในการเคลื่อนที่ดังนั้นจึงเคลื่อนที่ไม่ได้

โครงสร้างต่าง ๆ ของเซลล์ยีสต์



รูปที่ 2 ส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แคปซูล (capsule) เป็นโครงสร้างที่ห่อหุ้มเซลล์ โดยยีสต์บางชนิดจะปล่อยสารที่มีลักษณะเป็นเมือกหนืด หรือเหนียวออกมาหุ้มเซลล์ แคปซูลมักเป็นสารพวกโพลีแซคคาไรด์ รวมทั้งเฮทเทอโรโพลีแซคคาไรด์ แมนแนน และสารที่คล้ายแป้ง

ผนังเซลล์ (cell wall) ผนังเซลล์ยีสต์จะบางเมื่อเซลล์อายุยังน้อยแต่จะหนาขึ้นตามอายุ ความหนาของผนังประมาณ 1/7 ของเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ ส่วนประกอบส่วนใหญ่ของผนังเซลล์ได้แก่ :

1. กลูแคน (glucan) หรือเรียกเซลลูโลสของยีสต์ ต่างกับเซลลูโลสที่เป็น เบต้า-1,3-ลิงค์เกจ หรือ เบต้า-1,6-ลิงค์เกจ ซึ่งเซลลูโลสเป็น เบต้า-1,4-ลิงค์เกจ มี 30-35 เปอร์เซ็นต์

2 . แมนแนน (mannan) เป็นโพลีเมอร์ของแมนโนสมี 30 เปอร์เซ็นต์

3. ลิปิด มี 8.5-13.5 เปอร์เซ็นต์

4. โปรตีน มี 6-8 เปอร์เซ็นต์ *S.cerevisiae*

5. ไคติน มี 1-2 เปอร์เซ็นต์

6. ที่เหลือเป็นสารอินทรีย์ เช่น เกลือฟอสเฟต

เยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) องค์ประกอบเหมือนเยื่อหุ้มเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอื่นคือ เป็นไลโปโปรตีนและมีหน้าที่ควบคุมการผ่านเข้าออกของสาร

ไซโตพลาส มีลักษณะครึ่งเหลวครึ่งแข็ง ประกอบด้วยสารโปลีแซคคาไรด์ที่สะสมอยู่ คือ ไกลโคเจน นอกจาก นี้มี RNA และโปรตีนอยู่มาก นอกจากนี้ยังมีไรโบโซมและออกาเนลอื่น เช่น ไมโตคอนเดรีย และ มีระบบเยื่อในไซโตพลาส

นิวเคลียส โครงสร้างทั่วไปเหมือนนิวเคลียสของเซลล์ของพวกยูคารีโอตทั่วๆ ไป แต่จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอน พบว่าโครงสร้างภายในบางอย่างขาดไป เช่น

1. ไม่มีการสร้าง spindle เมื่อมีการแตกหน่อ

2. เยื่อหุ้มนิวเคลียสยังคงอยู่ตลอดเวลาขณะมีการแบ่งเซลล์

3. ขณะมีการแตกหน่อ นิวเคลียสจะคอดเข้าไปและส่วนหนึ่งจะไปยังเซลล์ที่เป็นหน่อ อีกส่วนหนึ่งจะอยู่ที่เซลล์เดิม

แวคคิวโอล เซลล์ยีสต์อาจมีแวคคิวโอล 1 หรือ หลายอัน เห็นชัดเจนกว่าโครงสร้างอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อินคลูชัน ยีสต์บางสปีชีส์จะมีโวลูทิน แกรนูล (volutin granule) ซึ่งเป็นกรานูลของโปลีฟอสเฟต บางชนิดมีกรานูลไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรือโปรตีน บางสปีชีส์สะสมไขมันถึง 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ก็มีไกลโคเจน เอนไซม์ วิตามิน รงควัตถุ ซึ่งอาจเป็นสีเหลือง สีส้ม สีชมพู หรือสีน้ำตาล นอกจากนี้ยังอาจพบไซโตโครม ฮีโมโกลบิน และฟลาวิน

สรีรวิทยาของยีสต์

เนื่องจากยีสต์มีความแตกต่างกันไปมากเพราะแบ่งออกได้ถึง 3 กลุ่ม ดังที่กล่าวแล้วสรีรวิทยาก็ย่อมจะแตกต่างกันออกไปมากเช่นกัน สรีรวิทยาที่จะนำมาศึกษากันก็คือ กระบวนการผลิตพลังงาน

ยีสต์ที่นำมาศึกษากันมากก็คือ ยีสต์ขนมปัง (baker's yeast) และยีสต์ที่ใช้ผลิตแอลกอฮอล์ (brewer's yeast) ซึ่งเป็นยีสต์ในจีนัส *Saccharomyces* ซึ่งเป็นยีสต์ที่สามารถเปลี่ยนเมตาโบลิซึมจากการเฟอร์เมนต์ไปเป็นการหายใจแบบใช้ออกซิเจนได้ และพลังงานที่ได้ต่างกันถึง 19 เท่า หลุยส์ ปาสเจอร์ (Louis Pasteur) เป็นคนแรกที่ชี้ให้เห็นว่ายีสต์ที่กำลังเฟอร์เมนต์เมื่อพ่นอากาศเข้าไป การเฟอร์เมนต์จะลดลงและกลูโคสจะเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ ซึ่งปรากฏการณ์นี้เรียกว่า " พาสเจอร์ เอฟเฟค" (Pasteur effect) ความรู้นี้นำไปใช้ในการผลิตยีสต์ที่ใช้ทำขนมปัง เพราะไม่ต้องการแอลกอฮอล์แต่ต้องการเซลล์มากๆ แต่ต้องมีความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำๆ ถึงจะทำให้น้ำตาลเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ ถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลสูงภายใต้สภาพที่มีออกซิเจนมักจะเกิดการออกซิเดชั่นไม่สมบูรณ์ ซึ่งผลลัพธ์ที่ตามมาก็คือมีการสะสมกรดอินทรีย์ซึ่งเป็นสารที่เป็นสารตัวกลางในวัฏจักรเครป ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า **"Crabtree effect"** หรือ **"Glucose effect"**

กระบวนการหมักของยีสต์

เมื่อใส่กลูโคสลงในอาหารที่เลี้ยง *S.cerevisiae* กลูโคสจะเข้าสู่เซลล์โดยระบบการนำเข้าซึ่งอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อเข้าสู่เซลล์แล้วจะเปลี่ยนแปลงไปสมการ

กลูโคส ⟶ 2 เอทานอล + 2 คาร์บอนไดออกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณเอทานอลที่ยีสต์สามารถผลิตได้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ ถ้าให้น้ำตาลเพียงพอจะให้แอลกอฮอล์ 12-14 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ซึ่งปริมาณนี้จะเกิดได้อย่างรวดเร็ว แต่เมื่อมีแอลกอฮอล์ขนาดนี้แล้วจะทำให้การหมักเกิดช้าลง ปริมาณสูงสุดที่ทำได้คือ 18-19 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ซึ่งระดับนี้ต้องอาศัยยีสต์บางพันธุ์ซึ่งคัดเลือกไว้เป็นพิเศษและต้องอาศัยเวลาหลายเดือน อุณหภูมิและความเข้มข้นของน้ำตาลต้องควบคุมให้เหมาะสมกับยีสต์สายพันธุ์นั้น

ออโตไลซิส (autolysis)

สารโมเลกุลใหญ่ (macromolecule) ทั้งหมดที่มีอยู่ในเซลล์ยีสต์เป็นตัวทำให้เซลล์ยีสต์สามารถมีชีวิตอยู่ต่อไปได้ สารเหล่านี้จะลดน้อยลงจากเซลล์ โดยเยื่อหุ้มที่มีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน ซึ่งมีกลไกที่สำคัญในการสนับสนุนค้ำจุนรูปร่างและขนาดของเซลล์ที่เหลืออยู่

ออโตไลซิส คือ กระบวนการที่ เป็นองค์ประกอบของเซลล์ถูกทำให้ละลายโดยการกระตุ้นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อย ซึ่งก็มีอยู่ภายในเซลล์ตามธรรมชาติการออโตไลซิส สามารถทำได้โดยการนำมาประยุกต์ โดยการควบคุมสภาวะอย่างรอบคอบและระมัดระวัง เช่น อุณหภูมิ พีเอช เวลา และการเติมสารที่ช่วยเพิ่มการเกิดออโตไลซิส การตายของยีสต์มีสาเหตุมาจากความสับสนไม่เป็นระเบียบภายในเซลล์ และการยอมรับเอนไซม์ที่ย่อยอย่างอิสระ รวมไปถึงการเข้าจับโดยขาดการพิจารณาต่อสับสเตรตที่จำเพาะเจาะจงเหล่านั้น การเข้าจับนี้มีสาเหตุมาจากโมเลกุลเหล่านั้น (macromolecule) ขาดการตอบสนองเพราะถูกทำลายไป ซึ่งเหมือนกับการที่โปรตีนและกรดนิวคลีอิก ถูกย่อยจนเป็นหน่วยพื้นฐานที่สามารถละลายน้ำได้ ในธรรมชาติความไม่เป็นระเบียบภายในเซลล์นี้มีผลต่อผนังเซลล์ คือ เกิดการรั่วของผนังเซลล์และสูญเสียความสมบูรณ์ของคุณสมบัติเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ และเปิดโอกาสให้สารประกอบที่ละลายน้ำได้รั่วไหลออกจากเซลล์ไป

กลิ่นรสสุดท้ายและผลที่ได้จากสารสกัดในกระบวนการที่ถูกควบคุมอย่างดีโดยมากขึ้นกับอุณหภูมิ และ พีเอชระหว่างการมีชีวิตอยู่และความเข้มข้นของยีสต์และชนิดของกรดที่ใช้ในขบวนการ บางสภาวะที่สารสกัดที่ได้มาให้กลิ่นรสสูง ซึ่งอาจเป็นกลิ่นรสที่ไม่สำคัญจึงมีความพยายามผลิตสารสกัดที่ให้กลิ่นรสที่พึงพอใจจำนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากแทน ความพยายามวิจัย คือ สิ่งจำเป็นเพื่อที่หาสภาวะที่เหมาะสมดังเช่น ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นรสที่น่าพึงพอใจ

ปกติกรดที่ใช้เพื่อทำการละลายระหว่างการออโตไลซิสส่วนมาเป็นเอนไซม์ เช่น โปรตีเอส นิวคลีเอส หรือ ฟอสโฟไดเอสเตอเรส เอธิลอะซีเตทถูกใช้บ่อยๆ ในการเพิ่มการออโตไลซิสและยังช่วยควบคุมการปนเปื้อนให้มีน้อยลงมาก ในกลุ่มโปรตีเอส เช่น ปาเปน ซึ่งเป็นที่รู้กันว่าจะช่วยเพิ่มสารที่สกัดได้มากยิ่งขึ้นแต่เฉพาะในการทำออโตไลซิสที่ใช้เวลานานๆ เช่น ที่ปฏิบัติกันในประเทศอเมริกา อังกฤษ และออสเตรเลีย การเติมปาเปนจะมีผลน้อยมากเมื่อการออโตไลซิสอยู่ระหว่างเวลาที่สั้นกว่า 20 ชั่วโมง เช่นที่ปฏิบั ติกันในประเทศญี่ปุ่นและฝรั่งเศส

วิธีการทำออโตไลซิสถูกทำให้เหมาะสมเพื่อผลิตยีสต์สกัดที่มีเกลือโซเดียมต่ำ ซึ่งก็จะเป็นการได้เปรียบต่อการยอมรับอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร แม้กระนั้นรสชาติอ่อนนุ่มของสารสกัดนี้ ผู้ผลิตก็มีความพยายามที่จะพัฒนากลิ่นและรสโดยการรวมกับส่วนประกอบอื่นๆ ยีสต์สกัดที่มีโซเดียมต่ำเริ่มเข้ามาเป็นส่วนประกอบที่สำคัญเพิ่มมากขึ้นในอาหารของคนไข้และสูตรอาหารเด็กอ่อน

ออโตไลซิสหรือการย่อยด้วยตัวเองของเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตอยู่ จะยอมรับได้เมื่อ yeast slurry มีของแข็งเหลืออยู่ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ จะถูกกระทำที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เวลา 24-36 ชั่วโมง ที่พีเอชประมาณ 5.5 การแตกของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่นี้เริ่มต้นโดยการทำงานของเบต้า (1-3) กลูโคเนสและโปรตีเอสที่มีอยู่ภายในเซลล์ เบต้า (1-6) กลูโคสเนสและแมนแนนเอสก็มีส่วนร่วมในการละลายที่ผนังเซลล์ และมีเอนไซม์โปรติโอไลติกที่สำคัญ 4 ชนิด ที่มีบทบาทสำคัญในระหว่างการแตกตัวของเซลล์ คือ

1. โปรติเนส ysc A
2. โปรตีเนส ysc B
3. คาร์บอกซีเป็ปติเดส ysc Y
4. คาร์บอกซีเปปติเดส ysc

ทั้ง 4 ชนิดนี้จะอยู่ในแวคคิวโอล (vacuole) เอนไซม์เหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งซึ่งอยู่ในส่วนนอกของไซโตพลาสซึมของแวคคิวโอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายใต้สภาวะการออโตไลซีสของยีสต์ เริ่มจะตายหลังจากทั้งหมดของเซลล์เริ่มมีการจำกัดการใช้การแมคโครโมเลกุลขึ้น สภาวะนี้สามารถทำให้เกิดความไม่เป็นระเบียบภายในเซลล์ยีสต์ ซึ่งก็เป็นเครื่องหมายบอกถึงการเริ่มต้นของการเกิดขบวนการออโตไลซีส โดยเริ่มจากการทำลายผนังกั้นของแมตริกส์ในเซลล์ ด้วยการปล่อยเอนไซม์โปรติโอไลติกออกจากแวคคิวโอล เพื่อป้องกันการเกิดเซลล์แมตริกต์ใหม่ขึ้น การทำงานของเอนไซม์นี้อย่างแรกคือ ยับยั้งการกระตุ้นระหว่างการฟอร์มตัวของสารที่ซับซ้อน (complex) โดยการทำปฏิกิริยาโดยตรงกับตัวยับยั้งที่มีปริมาณใกล้ๆกัน

การเติมโปรติเนส ysc A โปรติเนสแวคคิวโอลที่เหมือนกับโปรติเนส ysc A โปรติเนส ysc B คาร์บอกซีเปปติเดส ysc Y คาร์บอกซีเปปติเดส ysc S และอะมิโนเปปติเดส เกี่ยวข้องกับโปรตีนที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจงอย่างสูงและการย่อยเปปไทด์ ภายใต้สภาวะธรรมชาติ เอนไซม์นี้ส่วนมากมีลักษณะการให้เหมือนในเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ คือสามารถที่จะค้ำจุนแหล่งอะมิโนในแวคคิวโอลที่เป็นสิ่งที่ทำให้โปรตีนในเซลล์ที่ไม่ต้องการหมดไป เพื่อที่จะสร้างโปรตีนขึ้นมาใหม่ ภายใต้สภาวะออโตไลซีสเอนไซม์เหล่านี้จะทำให้โปรติโอไลติก เอนไซม์จำเป็นต้องย่อยโดยขาดการพิจารณาในการเข้าจับกับโปรตีนที่อยู่ที่แมตริกส์ของไซโตพลาสซึม เช่นเดียวกับเอนไซม์นิวคลีเอสที่มีในเซลล์ก็เริ่มทำปฏิกิริยากับอาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอ โดยลดจากโพลีนิวคลีโอไทด์ไปเป็น โมโนนิวคลีโอไทด์ นิวคลีโอไซด์ จนในที่สุดเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ที่ละลายได้ในอาหารรอบๆตัวยีสต์ได้ ที่บริสุทธิ์เพื่อเพิ่มยีสต์สกัดสดๆ ตามธรรมชาติ จะไปเพิ่มการยับยั้งของตัวยับยั้งคือ โปรติเนส ysc B และ คาร์บอกซีเปปติเดส ysc Y แต่จะมีผลน้อยในการดำเนินการที่ยาวนานในเอนไซม์โปรติโอไลติก ภายใต้สภาวะเหนี่ยวนำของออโตไลซีส (pH 5.5 , อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอส

	proteinase yscA	proteinase yscB	proteinase yscy	proteinase yscs
type	acid endopeptidase	serine endopeptidase	serine exopeptidase	metallo (Zn^{2+}) exopeptidase
optimum pH	2-6	6-7	4-7	7
optimum T(°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 1^{A} pepstatin,etc.	protein 1^{13}_{2} chymostatin, etc	protein 1^{0} Hg^{2+}	EDTA
cellular role	protein degradation	protein degradation	protein degradation	protein degradation

ผนังเซลล์ซึ่งโดยทั่วไปแข็งและเป็นตัวแสดงรูปร่างของเซลล์ เมื่อคิดถึงการละลายที่เกิดจากอัลคาไลน์ ละลายเบต้า-กลูแคนภายในเนื้อเยื่อ ที่เนื้อเยื่อ ที่เนื้อเยื่อชั้นกลางมีการละลายเบต้า-กลูแคนของอัลคาไลน์และเนื้อเยื่อชั้นนอกของกลูโคโปรตีนในที่ซึ่งคาร์โบไฮเดรตถูกฟอสฟอรีเลทเป็นแมนแนน ผนังเซลล์ของยีสต์มีไคตินอยู่ประมาณ 1% โพลีเมอร์ของเอ็นอะซิทิล-กลูโคซามีนเป็นเส้นตรง ซึ่งมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โอกาสในการเกิดบัดสการ์ (bud scar) ชั้นกลูแคนจะเป็นตัวอย่างในการผสมสาร โพลีแซคคาไรด์ชั้นกลูแคน ส่วนประกอบหลัก ประกอบด้วย 85%เป็น เบต้า-(1-3) ลิงค์กลูแคน และส่วนน้อย ประมาณ 15% จะเกิดกิ่งเบต้า(1-6)กลูแคน ระหว่าง ลูกโซ่ที่มีการเชื่อมกัน

เอนไซม์กลูโคเนสสามารถแยกได้จากยีสต์ และก็เป็นที่รู้กันว่าสามารถ ไฮโดรไลซ์เบต้า(1-3) และ เบต้า(1-6) ของกลูแคนได้กลูโคเนสมีส่วนในขบวน การเกิดหน่อ แต่กระนั้นภายใต้การเกิดออโตไลติก เบต้า(1-3) กลูโคเนสด้วยการ สนับสนุนจากเอนไซม์โปรติเนส ก็สามารถทำลายผนังเซลล์ กระบวนการนี้สามารถ เพิ่มขึ้นโดยการปล่อยให้ถูกจับโดยเอ็กเทอร์นอลโปรตีเอส ช่วงแรกเหมือนการเกิด โอกาสหนึ่งกับปาเปนตามด้วยการเติมด้วยไลติกกลูโคเนส เอนไซม์ขณะนี้มีประโยชน์ ในการค้า เพื่อที่จะพัฒนาปริมาณสารสกัดที่ได้

ยีสต์ที่ใช้ในการหมักเบียร์จะแตกต่างจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักอื่นๆ โดยยีสต์ที่ใช้ใส่ในถังหมักสามารถใช้ยีสต์จากถังหมักเก่าได้ไม่จำเป็นต้องเตรียม เซลยีสต์ใหม่ทุกครั้งเหมือนการหมักอื่นๆ ในการหมักเบียร์จะเติมยีสต์ใหม่ในกรณีที่ ยีสต์เก่ามีจุลินทรีย์อื่นปะปนอยู่หรือยีสต์เก่าเริ่มตายลง แต่ก่อนที่จะนำยีสต์เก่ามาใช้ หมักต่อจะต้องนำยีสต์มาล้างเพื่อลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียและเป็นการกำจัด อนุภาคโปรตีนและเซลยีสต์ที่ตายแล้วออกไป ซึ่งการล้างยีสต์ในขั้นแรกจะนำ Slurry ของยีสต์มาปรับพีเอชให้ลดลงเป็น 2.5-3.0 ด้วยกรดฟอสฟอริค หรือกรดซัลฟูริค และนำมาล้างด้วยน้ำ อาจเติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตลงไปด้วยเพื่อฆ่าเชื้อโรคอื่นๆ แต่จะไม่ใช้ยาปฏิชีวนะใส่ลงไปเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ยีสต์ที่ผ่านการหมักแล้วจะใช้ซ้ำอีกประมาณ 7-10 ครั้ง ขึ้นอยู่กับคุณภาพ ของยีสต์หลังจากนั้นจะไม่ใช้อีกซึ่งจะเรียกยีสต์ที่ใช้แล้วว่า **"Spent Yeast"** ซึ่ง Spent Yeast นี้มีฮอพติดอยู่ที่ผนังเซลล์ด้านนอกสุดของตัวยีสต์ โดยสามารถล้างฮอพส่วนนี้ ออกได้โดยใช้น้ำหรือน้ำเกลือ (0.85%) และฮอพอีกส่วนหนึ่งจะติดอยู่ภายในเซลล์ ยีสต์ โดยยีสต์จะดูดซึมฮอพส่วนนี้เข้าไปแล้วเปลี่ยนรูปจาก แอลฟาแอซิด ไปเป็น เบต้าแอซิด ซึ่งไม่สามารถล้างออกได้ด้วยวิธีธรรมดา ดังนั้น Spent Yeast ที่ผ่าน การหมักเบียร์แล้วจะมีความขมทำให้ เมื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารแล้ว ผลิตภัณฑ์นั้นก็จะยังคงมีความขมอยู่อีก จึงไม่เป็นที่ต้องการของตลาดดังนั้นจึงจำ เป็นต้องล้างฮอพส่วนนี้ออกโดยการล้างด้วยด่าง (โซเดียมไฮดรอกไซด์) หรือกำจัด ออกโดยใช้เทคนิคโครมาโตรกราฟี ซึ่งกล่าวถึงต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหตุผลสำคัญที่เราจำเป็นต้องสกัดความขมออกจากยีสต์ก็มีวัตถุประสงค์ที่สำคัญคือต้องการจะนำยีสต์ที่ปราศจากความขมแล้วนำทำยีสต์สกัดซึ่งยีสต์สกัดมีคุณค่าทางอาหารสูง และมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารดังนี้

1. **Hydration, water absorption, water binding** คุณสมบัติของยีสต์โปรตีน ที่ช่วยทำให้อาหารดูดอมน้ำได้ดีขึ้น ซึ่งจะใช้ได้ดีกับอาหารประเภทเนื้อ ผลิตภัณฑ์จากเนื้อและขนมอบ

2. **Solubility** โปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้ดี ควรใช้ส่วนสกัดจากยีสต์ในการทำเครื่องมือที่เป็นอาหารเสริมได้เป็นอย่างดี เช่น เครื่องดื่มที่คล้ายคลึงกับไมโล หรือโอวัลติน เป็นต้น

3. **Viscosity** คุณสมบัติที่ทำให้ของเหลวนั้นเข้มข้น จึงเหมาะที่ใช้กับอาหารประเภทเครื่องดื่มเสริมสุขภาพ ซุป ซอส หรือ ครีม ได้เป็นอย่างดี

4. **Gel forming** คุณสมบัติของส่วนสกัดจากยีสต์ในการเกิดเจลนั้นมีบทบาทสำคัญมากในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์นม (dairy products) เช่น เนยแข็ง นมเปรี้ยว โยเกิร์ต การแข็งของไข่ขาว texturized proteins และ โด การเกิดเจลนี้ยังช่วยทำให้อาหารดูดน้ำได้ดีขึ้นและคุณสมบัติอื่นๆ เช่น ทำให้ข้นเหนียว (thickening adhesion) และฟองอยู่ทน (emulsion foam- stabilizing effects) เป็นต้น

5. **Emulsifying properties** ตัวเชื่อมน้ำกับน้ำมันให้เข้ากันจึงควรใช้ในการผลิตอาหารที่เราคุ้นเคยหลายชนิดที่เป็น นม ครีม ไอศกรีม เนย เนยแข็ง น้ำสลัดข้น เป็นต้น นอกจากนี้ยังจะช่วยให้อาหารที่กล่าวมาแล้วมีความคงตัว (stability)

6. **Foaming properties** ฟองในอาหาร คือ ฟองอากาศที่เกิดขึ้นในอาหารที่เป็นของเหลวนั่นเอง คุณสมบัตินี้ใช้ได้อย่างดีกับครีมเหลว และขนมหวานเช่นพวก mash mellow เป็นต้น

7. **Cohesive , Elasticity** คือ ความสามารถของโปรตีนที่จะทำปฏิกิริยากับสารอาหารอื่นๆ ให้เกิดเป็นเนื้อเดียวกันในลักษณะแข็ง (solid) หรือกึ่งแข็ง (semi-solid) คุณสมบัตินี้ใช้กับอาหารจำพวก ไส้กรอก เนยแข็ง เนยเทียม เป็นต้น

8. **Fat absorption** คุณสมบัติในการดูดซึมไขมัน มีความสำคัญมากในการทำให้อาหารพวกเนื้อ และเนื้อเทียม ส่วนในอาหารแบบไทยๆ อาจใช้ได้ดีกับพวกหมูสับ เนื้อสับเทียมที่ให้ในพวกบะหมี่ หรือก๋วยเตี๋ยวสำเร็จรูป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. **Flavor binding** ช่วยรักษากลิ่นของอาหาร กลิ่นของอาหารนั้นเกิดจากสารที่ระเหยได้ซึ่งมีน้อยมากในชั้นผิวของอาหาร โปรตีนในส่วนสกัดจากยีสต์จะช่วยให้อาหารนั้นเก็บกลิ่นได้ดีขึ้น ซึ่งมีความสำคัญในอาหารทั่วไป และในอดีตที่ผ่านมาการใช้ส่วนสกัดจากยีสต์จะเน้นไปในทางการใช้คุณสมบัติข้อนี้

10. **Texturization** โปรตีนเป็นโครงสร้างสำคัญที่ทำให้เกิดลักษณะเนื้ออาหารดีขึ้น ควรใช้กับเนยแข็ง ไส้กรอก และแป้งโด

โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกอาหารที่ผลิตโดยกระบวนการอัดพอง (extrusion) ซึ่งได้แก่พวกอาหารขบเคี้ยว (snack) ที่เด็กชอบมากในสมัยนี้ซึ่งบรรจุในภาชนะบรรจุอย่างสวยงาม อาหารเหล่านี้จะมีคาร์โบไฮเดรทเป็นส่วนประกอบสำคัญปีหนึ่งๆ คงจะขายกันไม่ต่ำกว่าหลายร้อยล้านบาทขึ้นไป ซึ่งเด็กรับประทานเล่นแล้วไม่ได้ประโยชน์อะไรมาก หากผู้ผลิตจะใส่ส่วนสกัดจากยีสต์เข้าไป นอกจากจะทำให้กลิ่นหอม และรสชาดดีขึ้นแล้ว ยังจะช่วยให้มีคุณค่าทางอาหารมากขึ้น จะเห็นได้ว่าส่วนสกัดจากยีสต์ สามารถใช้กับอาหารที่คนไทยคุ้นเคยกันได้มากมายหลายชนิด ในประเทศไทยก็มีวัตถุที่จะใช้ทำส่วนสกัดจากยีสต์ได้มากมาย ตัวอย่างเช่น ยีสต์จากโรงงานทำเบียร์ โรงงานทำเหล้า หรือโรงงานผลิตแอลกอฮอล์ เป็นต้น ยีสต์ที่ได้จากโรงงานเหล่านี้ถือว่าเป็นผลพลอยได้ หากไม่ได้นำไปใช้หรือกำจัดให้ถูกต้องจะเป็นตัวทำให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมอย่างมาก ซึ่งครีมยีสต์ที่เรานำมาใช้ในโครงงานพิเศษนี้ก็คือ ยีสต์ที่ได้จากโรงงานทำเบียร์ ดังรายละเอียดที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ฮอพ (HOP)

ฮอพและคุณสมบัติของฮอพ

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

ฮอพเป็นพืชที่มีดอกเพศเดียวโดยจะขึ้นปนอยู่กับพืชอื่น ๆ ในทางการค้าจะมีความต้องการต้นฮอพตัวเมียเพราะสามารถให้ดอกได้ดอกฮอพจะมีต่อมลูปูลิน (lupulin) อยู่ที่บริเวณกลีบดอก ซึ่งติดอยู่กับแกนของดอกหรือโคนดอก ในดอกจะมียางสีเหลืองหรืออาจมีสีขาวน้ำตาล ซึ่งจะมีสีใดก็ขึ้นกับอยู่ส่วนประกอบของกรดที่ทำให้ขม (bitter acid)

ฮอพเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่ทำให้เกิดรสขมในเบียร์ โดยเริ่มมีบทบาทเมื่อศตวรรษที่ 19 ในอดีตฮอพมีประโยชน์ 2 แง่ คือ ใช้เป็นอาหารเหมือนกับผักชีฝรั่งและใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรม ในยุคที่ยังไม่มีการค้นพบการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรเซชัน (Pasteurization) ปัจจุบันหน้าที่ของฮอพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ จุลินทรีย์ได้ถูกมองข้ามไป แต่มีบทบาทในการผลิตเบียร์แทน

ประมาณ 1/5 ของน้ำหนักแห้งของฮอพประกอบไปด้วยลูปูลิน ซึ่งมีองค์ประกอบสำคัญของฮอพ คือกรดขมและไขมันจำเป็น กรดขมประกอบไปด้วยแอลฟาแอซิด (α-acid) และ เบต้าแอซิด (β-acid) องค์ประกอบของสารเหล่านี้จะผสมกันและจะอยู่ ในรูปยาง (resin) ซึ่งมี 2 รูป คือแข็งและอ่อน ถ้าละลายในสารละลายอินทรีย์จะอยู่ในรูปอ่อน (soft resin) เมื่อผ่านอากาศเข้าไปจะเกิด การออกซิเดชันของกรดขม จะเปลี่ยนรูปเป็น illdofined products ซึ่งจะไม่มีความอ่อนนุ่มและจะแข็งในสารละลายอินทรีย์ (hard resin) ฮอพประกอบไปด้วยสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ผสมกันอยู่ องค์ประกอบของฮอพแสดงในตารางที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

28150

ตารางที่ 2 แสดงองค์ประกอบของฮอพ

Nature	Weight (%)
alpha acids	2-12
amino acids	0.1
beta acid	1-10
cellulose	40-50
chlorophyll	-
essential oil	0.5-5
monosaccharides	2
oils and fatty acids	trace to 25%
pectin	2
polyphenols	2-5
protein	1
water	10
waxes and steroides	8-12

การกำหนดค่าของฮอพสามารถดูได้จากกลิ่นของฮอพต่อปริมาณที่ใช้ และอาจจะกำหนดค่าได้จากการเกิด hard resin และ soft resin แต่วิธีที่ดีที่สุดคือวัดปริมาณแอลฟาแอซิด (α-acid)

แอลฟาแอซิด ประกอบด้วยฮิวมูโลน (Humulone) โคฮิวมูโลน(cohumulone) แอดฮิวมูโลน (adhumulone) 20-25% และอนุพันธ์ของฮิวมูโลนอีกหลายชนิด โดยมีแอดฮิวมูโลน 10-15% โคฮิวมูโลน 20-25% และฮิวมูโลน 35-75% (ดังตารางที่ 3) ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของฮอพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงส่วนประกอบของแอลฟาแอซิด (α-acid)

α-acid	Acyl R	%
Humulone	$CH_2CH(CH_3)_2$	35-37
Cohumulone	$CH(CH_3)_2$	20-65
Adhumulone	$CH(CH_3)CH_2CH_3$	10-15
Prehumulone	$CH_2CH_2CH(CH_3)_2$	1-10
Posthumulone	CH_2CH_3	1-3

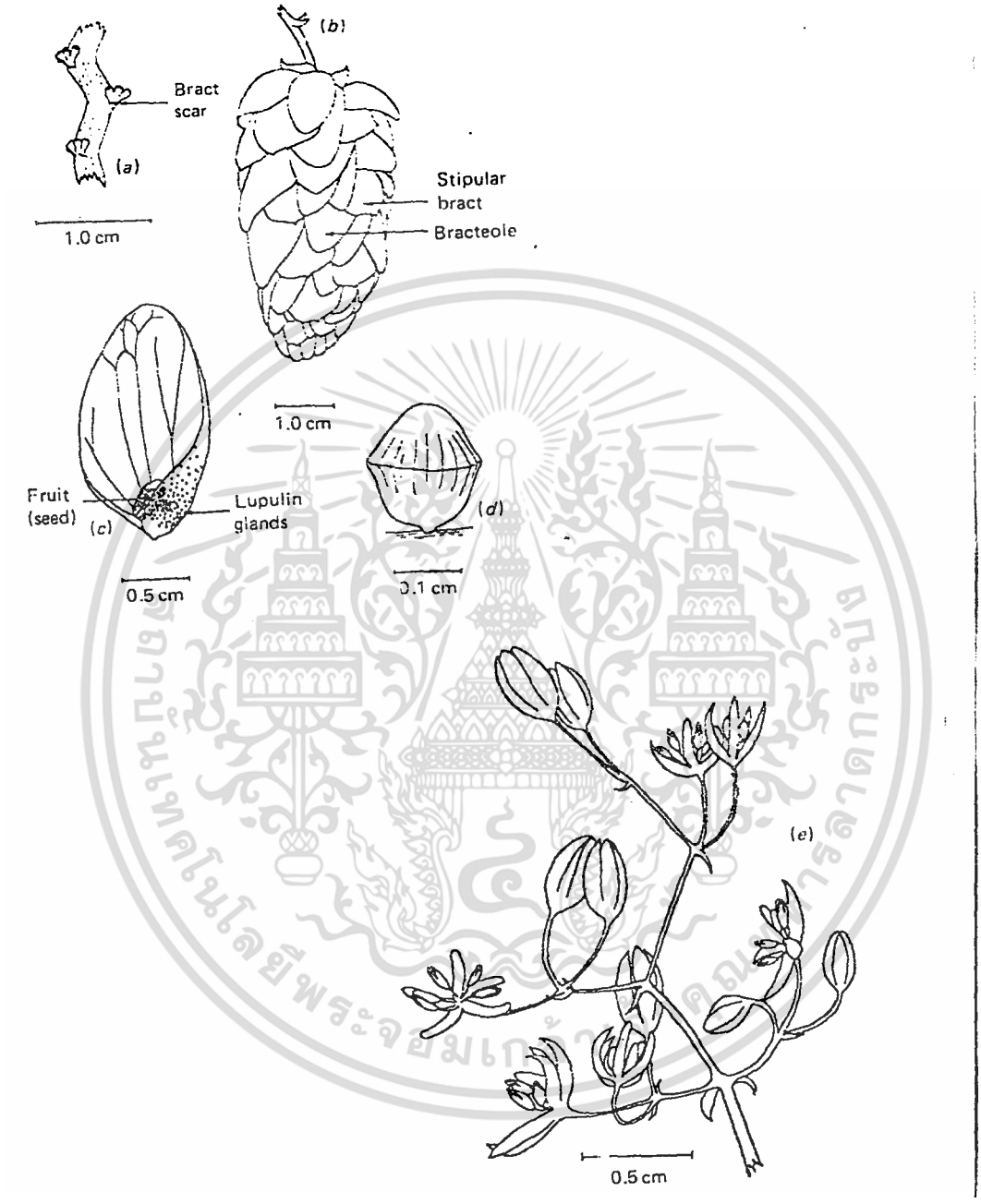
การใช้ฮอพในการผลิตเบียร์

วัตถุประสงค์หลักของการใช้ฮอพในการผลิตเบียร์ คือต้องการให้แอลฟาแอซิด (α-acid) ในฮอพเปลี่ยนเป็นไอโซแอลฟาแอซิด (iso-α-acid) ในเบียร์ ซึ่งในการผลิตเบียร์ ปริมาณแอลฟาแอซิด จะสามารถเปลี่ยนเป็นไอโซแอลฟาแอซิด ได้เพียง 20-35% เท่านั้น แอลฟาแอซิดอีก 65-80% จะถูกนำไปใช้ในรูปของการเกิดไอโซเมอไรเซชัน (isomerization) กับสารตัวอื่น ๆ ในการหมักไป 40-65% ที่เหลือก็อยู่ในขั้นตอนการกรอง และอยู่ในโฟมในขั้นตอนของการหมัก

แอลฟาแอซิด สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์แต่ไม่สามารถละลายได้ในน้ำจึงได้อาศัยคุณสมบัตินี้ในการสกัดฮอพด้วยเมทิลคลอไรด์ (methyl chloride) และ อะซิโตน (acetone) แต่เนื่องจากสารทั้ง 2 ตัวนี้มีพิษและเป็นอันตรายต่อสภาพแวดล้อม ปัจจุบันจึงเปลี่ยนมาใช้เอทานอลและเฮกเซนแทน ข้อดีของการใช้เอทานอลสกัดแอลฟาแอซิดในฮอพ คือ แอลฟาแอซิดที่ได้จะเปลี่ยนเป็นไอโซแอลฟาแอซิดได้ง่าย เราเรียกแอลฟาแอซิดที่เปลี่ยนเป็น ไอโซแอลฟาแอซิดได้ง่ายนี้ว่าการสกัดก่อไอโซเมอร์

การเกิดไอโซเมอไรเซชันของแอลฟาแอซิดได้ไอโซแอลฟาแอซิดนั้น ไอโซแอลฟาแอซิด ที่ได้จะมี 2 รูปคือ ซิส-ไอโซแอลฟาแอซิด (cis-iso-α acid) และทราน-ไอโซแอลฟาแอซิด (tran-iso-α acid) รูปของไอโซแอซิด ที่แตกต่างกันนี้จะให้รสขมที่แตกต่างกันออกไป สัดส่วนของซิส-ไอโซแอลฟาแอซิด กับทราน-ไอโซแอลฟาแอซิดที่เหมาะสมจะให้รสขมที่เป็นธรรมชาติทำให้รสชาติเบียร์ที่ได้มีรสชาติดี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 แสดงส่วนประกอบของดอกฮอพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครมาโตกราฟี (Chromatography)

การแบ่งชนิดของโครมาโตกราฟี

เฟสที่เคลื่อนที่ได้ประกอบด้วย 2 ชนิด คือ ของเหลว และก๊าซ ดังนั้นวิธีโครมาโตกราฟีจึงแบ่งได้เป็น 2 แขนง ดังนี้คือ

1. **ก๊าซโครมาโตกราฟี** (Gas Chromatography) ประกอบด้วยเทคนิคและวิธีการวิเคราะห์ 2 วิธี คือวิธีที่ใช้ของเหลวเป็นเฟสที่อยู่กับที่ เรียกว่า gas-liquid chromatography(GLC) เฟสที่เขียนขึ้นก่อนหมายถึงเฟสที่เคลื่อนที่ได้ ส่วนเฟสที่เขียนตามมาทีหลังหมายถึงเฟสที่อยู่กับที่ และวิธีที่ใช้ของแข็งเป็นเฟสที่อยู่กับที่ เรียกว่า gas-solid chromatography(GSC)

2. **ลิควิดโครมาโตกราฟี** (Liquid Chromatography) วิธีโครมาโตกราฟีที่ใช้ของเหลวเป็นเฟสที่เคลื่อนที่ได้ สามารถแบ่งได้อีกหลายวิธีขึ้นอยู่กับเทคนิคของการทำโครมาโตกราฟี คือ

ก. <u>การทำโครมาโตกราฟีแบบแผ่น</u> ที่เรียกว่า plane chromatography ถ้าเฟสที่อยู่กับที่เป็นเฟสที่เป็นของเหลวจะ เรียกว่า Liquid-Liquid Chromatograp(LLC) ตัวอย่างเช่น การทำ Paper Chromatography (PC) หรือ Thin-Layer Chromatography (TLC) บางชนิด ถ้าเฟสที่อยู่กับที่เป็นของแข็งเรียกว่า Liquid-Solid Chromatography (LSC) ตัวอย่างเช่น การทำ Thin-Layer Chromatography

ข. <u>การทำโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์</u> (Column Chromatography) การทำโครมาโตกราฟีแบบนี้เป็นที่รู้จักกันดี และใช้กันมากทั่ว ๆ ไป สามารถใช้ได้กับเฟสที่อยู่กับที่ที่เป็นของเหลวซึ่งเรียกว่า LLC ก็ได้หรือที่เป็นของแข็งซึ่งเรียกว่า LSC ก็ได้เช่นกัน การทำลิควิดโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์นี้ ได้ถูกพัฒนาโดยใช้ความดันช่วย เพื่อทำให้การแยกดีขึ้น ทำให้เกิดเทคนิคใหม่ที่เรียกว่า High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ค. <u>ถ้าเฟสที่อยู่กับที่เป็นของแข็งที่สามารถแลกเปลี่ยนไอออนได้</u> เช่น เรซิน จะทำให้เกิดเทคนิคการวิเคราะห์ที่เรียกว่า ion exchange chromatography

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง. ถ้าเฟสที่อยู่กับที่คือสารที่ไม่สามารถเกิดการดูดซับ หรือแบ่งส่วน หรือแลกเปลี่ยนไอออน แต่เป็นสารที่สามารถกีดขวางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารตัวอย่าง เนื่องจากมีรูพรุนให้สารตัวอย่างผ่านเข้าไปได้จะเรียก เทคนิคของการวิเคราะห์นี้ว่า เอกซ์คลูชันโครมาโตกราฟี (exclusion chromatography)

เมื่อพิจารณากลไก (mechanism) ที่เกิดขึ้นในการทำโครมาโตกราฟี พบว่าประกอบด้วย 2 กระบวนการ คือ

1. กระบวนการดูดซับ (Adsorption) กระบวนการนี้เกิดขึ้นเมื่อใช้ที่อยู่กับที่เป็นของแข็ง ที่เรียกว่า LSC การดูดซับจะขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวของของแข็งด้วย

2. กระบวนการแบ่งส่วน (Partition) กระบวนการนี้เกิดขึ้นเมื่อใช้เฟสที่อยู่กับที่เป็นของเหลวที่เรียกว่า LLC ดังนั้น การแบ่งประเภทของโครมาโตกราฟีสามารถจัดแบ่งได้อีกแบบหนึ่ง คือ แบ่งเป็น โครมาโตกราฟีแบบดูดซับ (Adsorption Chromatography) และโครมาโตกราฟีแบบแบ่งส่วน (Partition Chromatography)

คอลัมน์โครมาโตกราฟี

ตามปกติสารที่จะนำมาวิเคราะห์เป็นสารที่ไม่บริสุทธิ์มีสิ่งเจือปนต่าง ๆ รวมอยู่ด้วยเสมอ ดังนั้นก่อนทำการวิเคราะห์จำเป็นต้องแยกสารที่สนใจออกจากสิ่งเจือปนก่อน เพื่อป้องกันไม่ให้รบกวนการวิเคราะห์ ดังนั้น การศึกษาเทคนิคและวิธีการแยกสารจึงจำเป็นอย่างมากสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี วิธีการแยกจึงจัดเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาทางเคมีวิเคราะห์

กระบวนการแยกเกิดขึ้นได้เมื่อเกิดการแพร่กระจายของสารที่สนใจระหว่างเฟสสองเฟส ถ้ามีสาร 2 ชนิดที่อัตราส่วนของการแพร่กระจายระหว่างเฟสสองเฟสต่างกัน จะทำให้สามารถแยกสารทั้งสองชนิดออกจากกันโดยง่าย โดยเฉพาะถ้าอัตราส่วนของการแพร่กระจายของสารทั้งสองต่างกันมาก ๆ จะสามารถแยกสารทั้งสองออกจากกันได้โดยทำการแยกเพียงครั้งเดียว การแยกที่ทำได้อย่างสมบูรณ์โดยใช้การแยกเพียงครั้งเดียว เรียกว่า Single-stage process ถ้าสารผสมแต่ละตัวมีค่าอัตราส่วนของการแพร่กระจายแตกต่างกันไม่มาก การแยกให้สมบูรณ์สามารถทำได้โดยใช้กระบวนการแยกหลาย ๆ ครั้ง เรียกว่า Multi-Stage process เทคนิคที่เกิดขึ้นในกระบวนการแยกคือเกิดการแบ่งส่วนของสารที่สนใจระหว่างเฟสสองเฟส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นเทคนิคการแยกนี้จึงมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Fractionation technique ซึ่งสามารถแบ่งได้อีกหลายแบบแล้วแต่ชนิดของเฟสว่าเป็นของแข็ง ของเหลว หรือก๊าซ ดังแสดงในตารางที่ 4

เทคนิคการแยกตามที่แสดงในตารางที่ 4 เกี่ยวข้องกับเฟส 2 เฟส ที่มีเฟสหนึ่งเป็นเฟสที่อยู่กับที่(Stationary phase) ส่วนอีกเฟสหนึ่งเป็นเฟสที่เคลื่อนที่ได้ (Mobile phase) เฟสที่อยู่กับที่ต้องเป็นของแข็งหรือของเหลว ส่วนเฟสที่เคลื่อนที่ได้อาจเป็นของเหลวหรือก๊าซ

กลไกต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในการทำคอลัมน์โครมาโตรกราฟี สามารถใช้เป็นหลักในการอธิบายทฤษฎีและหลักการของโครมาโตรกราฟีทั่ว ๆ ไปโดยตั้งทฤษฎีคนแรกคือ A.J.P Martin และ R.L.M Synge โดยการพิจารณาส่วนที่เล็กที่สุดของคอลัมน์ ที่ใช้ในการทำโครมาโตรกราฟี ซึ่งประกอบด้วยเฟสที่อยู่กับที่และเฟสที่เคลื่อนที่ เมื่อโมเลกุลของสารตัวอย่างผ่านไปในคอลัมน์จะกระจายระหว่างเฟสทั้งสอง การกระจายขึ้นอยู่กับสัมประสิทธิ์ของการกระจาย เมื่อการกระจายถึงสมดุล ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่อยู่ในแต่ละเฟส จะเป็นไปตามกฎการกระจายคือ

$$Kd = \frac{Cs}{Cm}$$

Cs คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่อยู่ในเฟสที่อยู่กับที

Cm คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่อยู่ในเฟสที่เคลื่อนที่ได้

ค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจาย (kd) จะมีความสัมพันธ์กับความเร็วของการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างตามเฟสเคลื่อนที่ได้ขณะทำการพัฒนา เมื่อค่า Kd เพิ่มขึ้น ค่าเฉลี่ยของอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของตัวอย่างจะลดลง คือ ปริมาณสารตัวอย่างชอบอยู่ในเฟสอยู่กับที่มากกว่าที่จะกระจายไปอยู่ในเฟสที่เคลื่อนที่ได้ แสดงว่าถ้ามีสารตัวอย่างที่ต่างกัน ทำให้สามารถแยกตัวอย่างนั้น ๆ ออกจากกันได้ การพิจารณาอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่าง สามารถพิจารณาได้จากระยะเวลาที่โมเลกุลของสารตัวอย่างใช้อยู่ในเฟสที่เคลื่อนที่ได้หรือเฟสที่อยู่กับที่ ดังนั้น ถ้าโมเลกุลของสารตัวอย่างใช้เวลาอยู่กับเฟสที่อยู่กับที่มากกว่าเฟสที่เคลื่อนที่ แสดงว่าอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของสารมีค่าน้อยหรือ Kd มีค่ามาก แต่ถ้าโมเลกุลของสารตัวอย่างใช้เวลาอยู่กับเฟสที่อยู่กับที่น้อยกว่าเฟสที่เคลื่อนที่ได้ แสดงว่า อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างมีค่ามาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

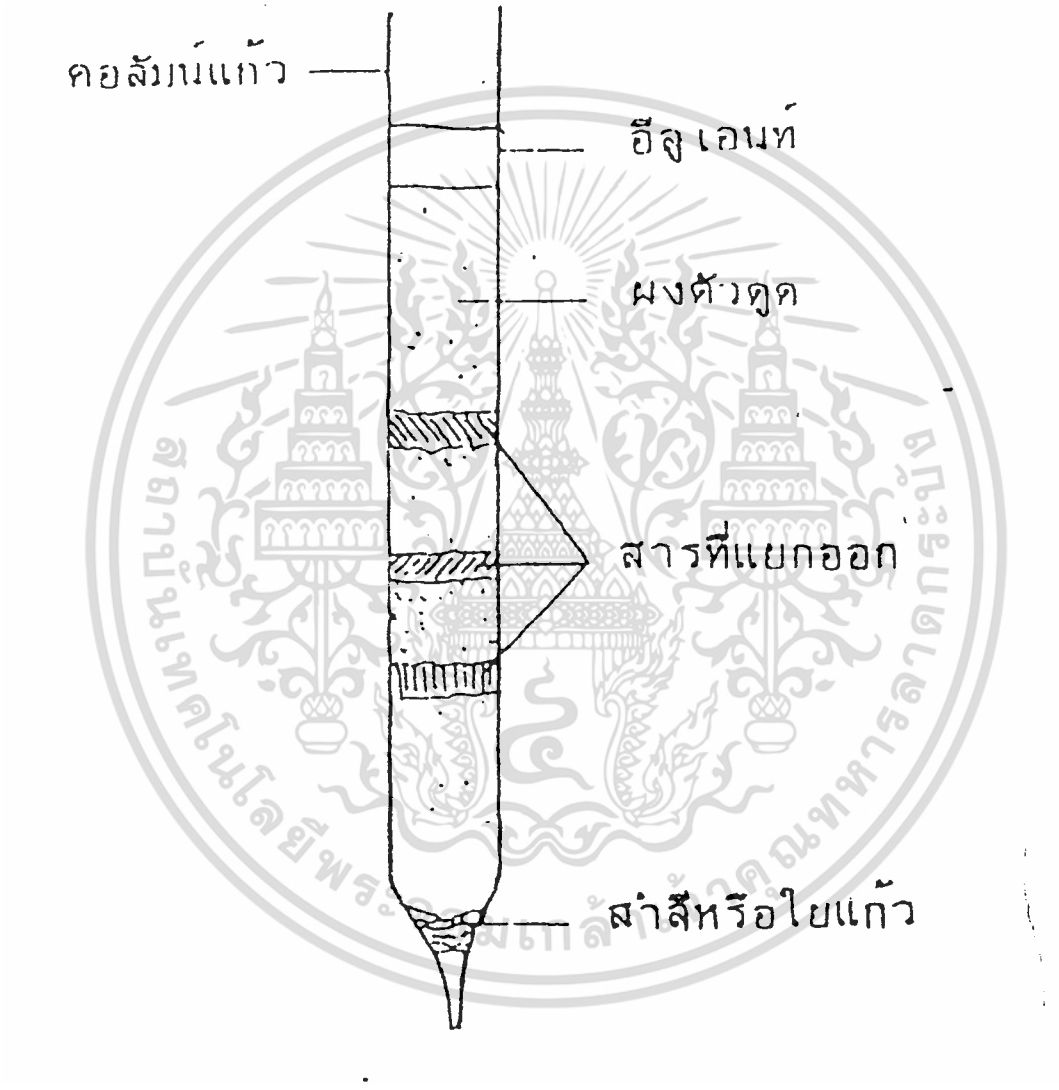
ตารางที่ 4 การแบ่งเทคนิคและวิธีการแยกตามชนิดของเฟส

ชนิดของเฟส	ชื่อของกระบวนการวิเคราะห์	เฟสสารตัวอย่าง	เฟสอีกเฟสหนึ่ง
Solid-Liquid	1. Precipitation	สารละลาย	ของแข็งคือตะกอนที่เกิดขึ้น
	2. Electrodeposition	สารละลาย	ของแข็งคือโลหะที่เกาะที่ขั้ว
	3.Adsorption-Chromatography	สารละลาย	ตัวดูดซับที่เป็นของแข็ง
	4.Thin-layer Chromatography	สารละลาย	ตัวดูดซับที่เป็นของแข็งยึดอยู่บนแผ่นกระจก
	5. Ion-Exchange Chromatography	สารละลาย	ของแข็งคือเรซินสำหรับแลกเปลี่ยนไอออนที่มีประจุ
Liquid-Liquid	1. Extraction	สารละลาย	ของเหลวที่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกับสารละลายตัวอย่าง
	2.Paper Chromatography	สารละลาย	ตัวทำละลายที่อยู่ในกระดาษ
	3. Thin layer Chromatography	สารละลาย	ตัวทำละลายที่อยู่ในของแข็งที่เป็นผงยึดอยู่บนแผ่นกระจก
Liquid-Gas	1. Distillation	ก๊าซ	ของเหลวที่เกิดจากการควบแน่น
	2.Gas-Liquid Chromatography	ก๊าซ	ตัวทำละลายที่ยึดอยู่กับของแข็งช่วย
Gas-Solid	1. Gas-Solid Chromatography	ก๊าซ	ตัวดูดซับที่เป็นของแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคนิคในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี

คอลัมน์ที่ใช้ในโครมาโตกราฟี มีลักษณะเป็นหลอดแก้วกลวง ปลายข้างขึ้นทำให้เล็กลง เมื่อต่อเข้ากับตัวควบคุม การไหลของตัวทำละลายดังแสดงในรูป



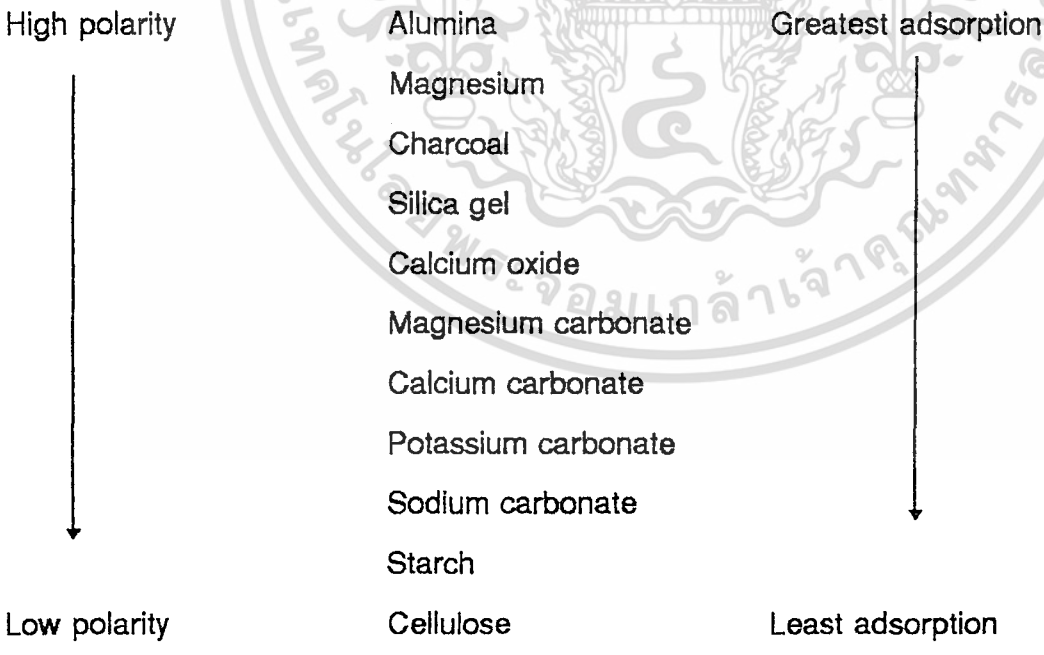
รูปที่ 4 คอลัมน์ที่ใช้ในการทำโครมาโตกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาดของคอลัมน์มีได้หลายขนาด ตั้งแต่เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-5 เซนติเมตร และยาว 10-50 เซนติเมตร ขนาดและความสูงของเฟสที่อยู่กับที่ที่บรรจุในคอลัมน์ จะมีผลต่ออัตราการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ ถ้าเฟสที่อยู่กับที่มีขนาดเล็กและบรรจุในคอลัมน์สูงมาก ๆ ทำให้การไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ช้ามาก ทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน สิ่งสำคัญในการโครมาโตกราฟีทุกชนิด คือ ต้องการให้ประสิทธิภาพดีที่สุด

การวิเคราะห์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีสามารถทำขั้นตอนดังนี้คือ

1.**เตรียมคอลัมน์** ที่ปลายล่างของคอลัมน์ต้องถูกปิดไว้ด้วยใยแก้วหรือสำลี เพื่อป้องกันไม่ให้ของแข็งที่บรรจุในคอลัมน์ไหลออกจากคอลัมน์ได้ จากนั้นนำเฟสที่อยู่กับที่ ซึ่งทำให้อยู่ในรูปSlurryแล้ว เทลงในคอลัมน์รอให้ของแข็งนอนก้น แล้วไขตัวทำละลายทิ้งไปส่วนหนึ่ง อย่าให้คอลัมน์แห้ง จากนั้นเทสารดังกล่าว(Slurry)ลงในคอลัมน์อีก แล้วทำเช่นเดิม จนได้ความสูงตามต้องการ และตัวทำละลายเกือบแห้งคืออยู่เหนือของแข็งเพียงเล็กน้อย สำหรับของแข็งที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ต้องมีคุณสมบัติที่มีโพลาริตีมากกว่าเฟสเคลื่อนที่ การเลือกใช้ของแข็งต้องให้เหมาะสมกับชนิดของตัวอย่าง



รูปที่ 5 ตัวดูดซับที่ใช้เป็นเฟสที่อยู่กับที่ในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี เรียงตามโพลาริตี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทฤษฎีการอีลูทในโครมาโตกราฟี (Theories of Elution Chromatography)

เมื่อนำสารตัวอย่างที่ละลายในเฟสที่เคลื่อนที่ใส่ลงในส่วนบนของคอลัมน์ จะเกิดการแบ่งส่วนระหว่างเฟสที่อยู่กับที่กับเฟสที่เคลื่อนที่ เมื่อเราเติมเฟสที่เคลื่อนที่เข้าไปในคอลัมน์อีก คือ เติมตัวอีลูท (eluent) มันจะผลักดันด้วยแรงขับ (driving force) ให้เฟสที่เคลื่อนที่ที่มีสารตัวอย่างละลายอยู่เคลื่อนที่ลงในคอลัมน์ สารตัวอย่างที่ถูกพาลงมาจะพบกับเฟสที่อยู่กับที่ส่วนใหม่ ก็จะเกิดการแบ่งส่วนระหว่างเฟสทั้งสองอีก เมื่อเติมตัวอีลูทต่อไปอีกเรื่อย ๆ ก็จะทำให้สารตัวอย่างถูกพาลงมาส่วนล่างของคอลัมน์อีก จนในที่สุดออกจากคอลัมน์ เพราะว่าการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างสามารถเกิดขึ้นได้ เนื่องจากการพาของเฟสเคลื่อนที่หรือตัวอีลูทเท่านั้น ฉะนั้น อัตราเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างในคอลัมน์ จึงขึ้นอยู่กับเศษส่วนของเวลาที่สารตัวอย่างอยู่ในเฟสที่เคลื่อนที่ ถ้าสารตัวอย่างที่นำมาใส่ในคอลัมน์ มีตัวถูกละลายมากกว่าหนึ่งชนิด และตัวถูกละลายมีค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจายหรือสัมประสิทธิ์ของการแบ่งส่วนต่างกัน พบว่าความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายนั้นต่างกัน ทำให้สามารถแยกตัวถูกละลายทั้งสองชนิดออกจากกัน ถ้าโมเลกุลของตัวถูกละลายทุกตัวมีความประพฤติเหมือนกัน และการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของตัวถูกละลายสามารถเคลื่อนที่ได้เท่ากันหมด เราจะได้โครมาโตแกรมที่เป็นอุดมคติโซนของแต่ละตัวถูกละลายที่เรียกว่า แบนด์หรือพีก จะไม่เกิดการกระจาย

แต่เนื่องจากโมเลกุลของตัวถูกละลายทุกตัวมีความประพฤติไม่เหมือนกัน บางโมเลกุลเคลื่อนที่เร็ว บางโมเลกุลเคลื่อนที่ช้า ทำให้โครมาโตแกรมที่ได้เป็นแบนด์หรือพีกที่มีความกว้าง(band broadening) ระยะเวลาที่ใช้ในการอีลูทสารแต่ละชนิดออกมาเรียกว่า รีเทนชันไทม์

ลักษณะของแบนด์หรือพีกที่ได้จะกว้างหรือแคบมากน้อยแค่ไหน ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหลายอย่าง คือ

1. การใส่สารตัวอย่างในคอลัมน์

2. การแพร่กระจายของสารตัวอย่างในคอลัมน์ จากบริเวณที่มีความเข้มข้นสูง สู่บริเวณที่มีความเข้มข้นต่ำ (logitudinal diffusion)

3. การไหลของโมเลกุลของสารตัวอย่างในคอลัมน์ มีทิศทางที่แตกต่างกัน และได้ระยะทางที่ต่างกัน เพราะขนาดและรูปร่างของเฟสที่อยู่กับที่ในคอลัมน์แตกต่างกัน (Eddy diffusion)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. โมเลกุลของสารตัวอย่างไม่สามารถเกิดสมดุลขึ้นระหว่างเฟสที่เคลื่อนที่และเฟสที่อยู่กับที่ได้ (non equilibrium mass transfer)

มันเป็นไปไม่ได้ที่จะใส่สารตัวอย่างลงในคอลัมน์ โดยพร้อมกันหมดทุกโมเลกุล การใส่สารตัวอย่างที่กระจายเป็นวงกว้างจะมีผลให้ได้แบนด์ที่กว้าง เมื่อแบนด์ของสารตัวอย่างที่ใส่ลงไปมีความกว้างมาก ก็จะมีผลทำให้การแยกได้แบนด์ที่กว้าง หรือแยกออกจากกันได้ไม่ดีเท่าที่ควร ด้วยเหตุผลนี้เวลาใส่สารตัวอย่างลงในคอลัมน์ หรือหยดสารตัวอย่างลงบนกระดาษ หรือเพลตในการทำ paper chromatography หรือ thin layer chromatography ต้องพยายามทำให้เป็นวงที่เล็กที่สุดเท่าที่จะทำได้

. สำหรับการควบคุมขนาดขององค์ประกอบ 3 ข้อหลัง สามารถทำได้โดยควบคุมอัตราเร็วของการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ ขนาดของสารที่บรรจุในคอลัมน์หรือเฟสที่อยู่กับที่และขนาดของคอลัมน์ แบนด์จะมีความกว้างมากขึ้น ถ้ามีการกระจายเพิ่มขึ้น ซึ่งเกิดจากสารตัวอย่าง อยู่ในคอลัมน์เป็นเวลานานเกินไป การที่จะทำให้สารตัวอย่างไม่อยู่ในคอลัมน์นานเกินไปสามารถทำได้โดยเพิ่มอัตราเร็วของการไหลของการไหลของเฟสเคลื่อนที่แต่ถ้าเพิ่มอัตราเร็วของการไหลของเฟสเคลื่อนที่ก็จะมีผลในการแยกของสารตัวอย่างผสมเกิดขึ้นไม่ดี ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องควบคุมให้อัตราเร็วของการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ก็จะมีผลให้การแยกของสารตัวอย่างเกิดขึ้นสารผสมแยกออกจากกันได้ ถ้าโมเลกุลของสารตัวอย่างไม่สามารถเกิดสมดุลขึ้น ระหว่างเฟสที่เคลื่อนที่กับเฟสที่อยู่กับที่ได้ พบว่ามันจะใช้เวลาอยู่กับเฟสหนึ่งมากกว่าที่มันควรจะเป็นซึ่งมีผลทำให้แบนด์ที่ได้กว้าง เมื่อเพิ่มอัตราของการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่จะมีผลทำให้มีเวลาน้อยที่จะทำให้สารตัวอย่างเกิดสมดุลระหว่างเฟสทั้งสอง เมื่อขาดการสมดุลเกิดขึ้นก็จะมีผลทำให้แบนด์ที่ได้กว้างนั่นเอง สรุปได้ว่าในกรณีที่เกิดการแพร่กระจายของสารตัวอย่างขึ้น จะทำให้แบนด์ที่ได้กว้าง การทำให้การแพร่กระจายลดลงสามารถทำได้โดยการเพิ่มอัตราการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ แต่ถ้าเพิ่มอัตราการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ให้เร็วขึ้น จะมีผลทำให้สารตัวอย่างไม่สามารถเกิดสมดุลระหว่างเฟสที่เคลื่อนที่และเฟสที่อยู่กับที่ได้เพราะมีเวลาน้อย ก็จะเป็นสาเหตุทำให้แบนด์กว้างขึ้น แสดงว่าการเพิ่มอัตราการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่สามารถทำให้แบนด์กว้างก็ได้ แคบก็ได้ ขึ้นอยู่กับว่าองค์ประกอบใดมีผลมากกว่ากัน ถ้าสมดุลระหว่างเฟสทั้งสองเกิดขึ้นได้รวดเร็วมาก การเพิ่มอัตราการไหลก็ทำให้แบนด์ที่ได้แคบลง เพราะสามารถขจัดผลของการเกิดการแพร่กระจาย ไม่สามารถทำให้แบนด์แคบลงได้ ดังนั้น การควบคุมอัตราเร็วเพื่อขจัดผลของการแพร่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระจายไม่สามารถทำให้แบนด์แคบลงได้ ดังนั้นการควบคุมอัตราเร็วของการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ได้ จึงเป็นสิ่งสำคัญมากในการทำโครมาโตกราฟีต้องมีการทดลองค้นคว้าและวิจัย เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สามารถทำให้ได้แบนด์ที่ดีและสามารถแยกได้

. 2.**ใส่สารตัวอย่าง** วิธีใส่สารตัวอย่างให้ใช้ปิเปตดูดสารตัวอย่างให้ได้ขนาดตามต้องการ แล้วใส่ลงในคอลัมน์อย่างระมัดระวัง พยายามปล่อยสารตัวอย่างออกจากปิเปตให้ใกล้ส่วนบนของของแข็งที่บรรจุในคอลัมน์ให้มากที่สุด อย่าทำให้สารตัวอย่างกระจายไปติดข้างคอลัมน์ สารตัวอย่างจะอยู่บนส่วนบนสุดของคอลัมน์

3. **ทำการอีลูท** เมื่อใส่สารตัวอย่างลงในคอลัมน์เรียบร้อยแล้ว ให้เติมตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสที่เคลื่อนที่ หรือตัวอีลูท ตัวอีลูทจะไหลลงสู่คอลัมน์ตามแรงดึงดูดของโลกเราสามารถปรับขนาดของอัตราการไหลได้ ถ้าไหลเร็วเกินไป สามารถช่วยทำให้ไหลเร็วขึ้นได้โดย ใช้เครื่องดูดช่วย เมื่อให้เวลาในการอีลูทเพียงพอและเหมาะสม สารตัวอย่างที่เป็นสารผสมจะสามารถแยกจากกันได้ การเลือกใช้ตัวอีลูทขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ ถ้าต้องการอีลูทสารละลายตัวอย่างที่เป็นโพลาร์ ต้องใช้ตัวทำละลายที่มีโพลาริตีสูงในบางครั้งพบว่าการใช้ตัวอีลูทเพียงตัวเดียวไม่สามารถอีลูทสารผสมทุกตัวในสาร ตัวอย่างออกจากคอลัมน์ได้ ต้องมีการเปลี่ยนตัวอีลูทให้เหมาะสมกับสารแต่ละตัว

4.เก็บสารตัวอย่างที่ออกจากคอลัมน์ สารละลายที่ถูกอีลูทออกจากคอลัมน์สามารถเก็บได้เป็นส่วน ๆ (fraction) แล้วนำแต่ละส่วนไปวิเคราะห์ต่อไป เมื่อสามารถหาปริมาณของสารตัวอย่างในแต่ละส่วนได้ ก็ทำให้สามารถสร้างเส้นโค้งของการอีลูทได้ (elution curve) และศึกษาได้ว่าส่วนใดของสารละลายที่ออกจากคอลัมน์จะมีสารตัวอย่างมากที่สุด และถ้าต้องการเก็บสารตัวอย่างให้ได้สมบูรณ์ จะต้องเก็บตั้งแต่ส่วนใดถึงส่วนใด

5.การวัดปริมาณสารตัวอย่างที่ถูกอีลูทออกจากคอลัมน์ (Detection) สารตัวอย่างที่ถูกอีลูทออกจากคอลัมน์เป็นส่วน ๆ สามารถนำมาวิเคราะห์หาปริมาณได้หลายวิธี คือ ใช้การวิเคราะหทางแสง (optical method) เช่น UV ,IR และ fluorescenceเป็นต้นหรือใช้การวิเคราะห์ทางเคมีวิเคราะห์เชิงไฟฟ้า (electroanalytical method) เช่น การทำโวลแทมเมตรี การวัดค่าการนำไฟฟ้า และวัดค่าศักย์ไฟฟ้า เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ตัวทำละลายที่ใช้ในการดีเวลลอปเรียงตามโพลาริตีจากน้อยไปมาก

ตัวทำละลาย	ค่าคงที่ไดอิเล็กตริก
n-Hexane	1.9
Isooctane	1.9
Cyclohexane	2.0
Carbontetrachloride	2.2
Dioxane	2.2
Benzene	2.3
Xylene	2.3
Toluene	2.4
Carbodisulfide	2.6
di-iso-propylether	3.9
Diethylether	4.3
Chloroform	4.8
n-Butylacetate	5.0
phenyl chloride	5.7
Ethyl acetate	6.0
Acetic acid	6.3
tetrahydrofuran	7.6
Dichloro methane	9.1
Pyridine	13.2
iso-propane	13.8
n-Butanol	17.9
Acetone	21.5
n-propanol	22.5
Ethanol	25.0
Methanol	33.6
Acetonitrile	38.8
Water	81.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. บีกเกอร์ ขนาด 50,150,250 และ 500 มิลลิลิตร
2. หลอดทดลอง
3. หลอดเซนตริฟิวก์ (Centrifuge)
4. หลอดหยด
5. ฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร
6. กรวยแก้ว
7. แท่งแก้วคน
8. คอลัมน์แก้ว ขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซ็นติเมตร สูง 54 เซ็นติเมตร
9. ลูกยาง
10. สายยาง
11. กระบอกตวง
12. ขวดปรับปริมาตร
13. ขาตั้งและที่จับ
14. ที่ใส่หลอดทดลอง
15. ช้อนตักสาร
16. พาราฟิล์ม
17. ปิเปต 1 และ 10 มิลลิลิตร
18. แผ่นพลาสติก
19. เครื่องชั่ง

สารเคมี

1. ซิลิกาเจล (Silica Gel)
2. อลูมินา (Alumina Gel)
3. น้ำกลั่น
4. แอลกอฮอล์ 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับวัดความขมโดยเฉพาะ

อุปกรณ์

- หลอดเซนตริฟิวก์และฝาปิดที่ทำมาจากโพลีโพพิลีน (polypropylene) โดยเฉพาะ
- ปิเปตขนาด 0.5 10 และ 20 มิลลิลิตร
- เซนตริฟิวก์ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที
- rotary shaker ที่มีแอมปลิจูด 2-3 เซ็นติเมตร
- UV spectrophotometer และต้องใช้ silica cell ที่มี slit width น้อยกว่า 2 มิลลิลิตร

สารเคมี (reagent)

- กรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มัล (N) ต้องใช้ reagent grade
- iso-octane (2,2,4-trimetyl-pentane) ต้องเป็น spectroscopic grade

วิธีทดลอง

1. ขั้นตอนการล้างยีสต์

นำครีมยีสต์ (Bottom-fermenting brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* จากบริษัท บุญรอดบริวเวอรี่ จำกัด) จำนวน 30 กรัม ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (ทำหลายๆ ฟลาสก์) เติมน้ำกลั่น (Deionized water, DI-water) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร (อัตราส่วน1:3) คนให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) เพื่อให้ฮอพตกตะกอนลงมาจากนั้นนำครีมยีสต์มาล้างน้ำซ้ำอีกประมาณ 2-3 ครั้ง จนกระทั่งไม่มีตะกอนฮอพตกลงมาอีก

2. นำครีมยีสต์ไปวัดพีเอชด้วยกระดาษวัดพีเอช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การตรวจหาความชื้น

1. ชั่งยีสต์ครีมเบียร์ 30 กรัม นำไปเกลี่ยบนพลาสติกแบน
2. นำไปอบแห้งในเตาอบ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส
3. นำยีสต์ครีมเบียร์ที่ผ่านการอบแห้งแล้วนำไปชั่งน้ำหนักที่หายไป

4. นำครีมยีสต์ที่ผ่านการล้างแล้วมาทำออโตไลเสท (Autolysate)

โดยนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

5. นำไปปั่นแยก

ผนังเซลล์ยีสต์ออกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

6. นำยีสต์ออโตไลสิทไปสกัดความขมด้วยวิธีโครมาโตกราฟี (Liquid column chromatography)

โดยมีซิลิกาเจล และอลูมินาเป็น Stationary Phase และใช้แอลกอฮอล์ 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นตัวชะ (elute) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

<u>การแยกด้วยคอลัมน์การแยกด้วยคอลัมน์</u>

5.1. นำเฟสทีอยู่กับที่ (ตัวดูดซับ) มากวนกับตัวทำละลายให้ได้เป็น slurry ในการทดลองเฟสที่อยู่กับที่ที่ใช้คือ ซิลิกาเจลและอลูมินา ส่วนตัวทำละลายที่ใช้คือ เอธานอล 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ฉะนั้นในการทดลองจะได้คอลัมน์ที่ใช้ในการแยกความขมออกจากยีสต์ออโตไลเสท 4 คอลัมน์ดังนี้

ก. คอลัมน์ที่มีเฟสที่อยู่กับที่คือ ซิลิกาเจล ตัวทำละลายคือ เอทานอล 20 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

ข. คอลัมน์ที่มีเฟสที่อยู่กับที่คือ ซิลิกาเจล ตัวทำละลายคือ เอทานอล 40 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

ค. คอลัมน์ที่มีเฟสที่อยู่กับที่คือ อลูมินา ตัวทำละลายคือ เอทานอล 20 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง. คอลัมน์ที่มีเฟสที่อยู่กับที่คือ อลูมินา ตัวทำละลายคือ เอทานอล 40 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

5.2 เท slurry ลงในคอลัมน์ให้ได้ความสูง 30 เซ็นติเมตร (วัดขั้นมาจากปลายคอลัมน์)

5.3 เทยีสต์ออโตไลเสทปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์

5.4 เติมตัวทำละลายลงในคอลัมน์ เพื่อทำการชะยีสต์ออโตไลเสทออกมา โดยทำการเติมตัวทำละลายลงในคอลัมน์ตลอดเวลาอย่าให้คอลัมน์แห้ง

5.5 ทำการเก็บตัวอย่างที่ออกจากคอลัมน์ 3 ส่วน คือ ส่วนก่อนที่สารละลายเป็นสีเหลือง ส่วนที่สารละลายเป็นสีเหลือง และส่วนหลังสารละลายเป็นสีเหลือง

7. นำไปวัดความขุ่น

6.1 ปิเปตตัวอย่างออโตไลเสทมา 10 มิลลิลิตร

6.2 เติมกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มัล จำนวน 0.5 มิลลิลิตร

6.3 ใส่กลาสบีด 3 เม็ด (ต้องใส่ให้จำนวนเท่ากันเพื่อความสมดุล)

6.4 เติมไอโซออกเทน 20 มิลลิลิตร แล้วปิดฝาหลอดเซนตริฟิวก์ให้แน่น เพื่อป้องกันการระเหยหรือการซึมออกสู่ภายนอกของไอโซออกเทน

6.5 นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

6.6 นำไปปั่นอีก 4 นาที ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที

6.7 นำเฉพาะส่วนใสด้านบน ซึ่งเป็นส่วนของไอโซออกเทนที่สกัดเอาอัลฟาแอซิดไว้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร โดยใช้ไอโซออกเทนเป็นแบลงค์ (blank)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 6 สรุปแผนผังวิธีการทดลองทั้งหมด

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

ผลการทดลองที่ 1 การทดลองหาคุณลักษณะของยีสต์ครีม

1. แหล่งเก็บตัวอย่าง : จากตะกอนเบียร์ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงรีดเอาน้ำเบียร์ออกไปมากที่สุดด้วย Decantor

2. ลักษณะ : เป็นครีมข้นไม่ไหล สามารถตักได้

3. สี : เขียวปนเทาคล้ำ

4. pH : 6.5

5. ความชื้น : 75.58%

ตารางที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในยีสต์ที่นำมาจาก Decantor

จำนวนชุดการทดลอง	น้ำหนักก่อนอบ	น้ำหนักหลังอบ	เปอร์เซ็นต์ความชื้น
1	30.48	23.11	75.43
2	30.63	23.35	75.73
เฉลี่ย	30.56	23.23	75.58

หมายเหตุ : น้ำหนักกระทงของตัวอย่างที่ 1 = 0.48

น้ำหนักกระทงของตัวอย่างที่ 2 = 0.63

ตารางที่ 7 แสดงค่า pH ในยีสต์ออโตไลเสท

ตัวอย่างที่	1	2	3
pH	6.5	6.5	6.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองที่ 2 การทดลองวัดความขม

ครีมยีสต์ตั้งต้นมีความขม = 26 BUs
ยีสต์ออโตไลเสทมีความขม = 16 BUs
(ใช้ครีมยีสต์ที่ล้างด้วยน้ำอัตรา 1:3)
เอทานอล 40%(v/v) = 4 BUs
เอทานอล 20%(v/v) = 3 BUs

ตารางที่ 8 บรรจุคอลัมน์ด้วยอลูมินาและซิลิกาเจล
อีลูทด้วยแอลกอฮอล์ 40%(v/v)

fraction	ซิลิกาเจล (bitterness unit)	อลูมินาเจล (bitterness unit)
1 ของเหลวใสไม่มีสี (ก่อนเหลือง)	4	3
2 ของเหลวใสสีเหลือง (เหลือง)	-	4
3 ของเหลวใสสีเหลืองอ่อน ๆ (หลังเหลือง)	4	3

หมายเหตุ : เนื่องจากเกิดความผิดพลาดระหว่างการทดลองในช่วงของเหลวใส
สีเหลืองที่ใช้ซิลิกาเจล จึงไม่อาจรายงานผลการทดลองได้

จากตารางแสดงผลการทดลอง พบว่าค่าความขมที่วัดได้จากสารตัวอย่างมีค่าเท่ากับ หรือใกล้เคียงกับค่าความขมที่วัดได้จากเอทานอล 40 %(v/v) ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าสารตัวอย่างที่ได้จากคอลัมน์ คือ เอทานอล 40 %(v/v) ที่ใช้เป็นตัวอีลูท โดยที่ความขมของอัลฟาแอซิดไม่ได้ถูกสกัดให้ออกมาด้วยเลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

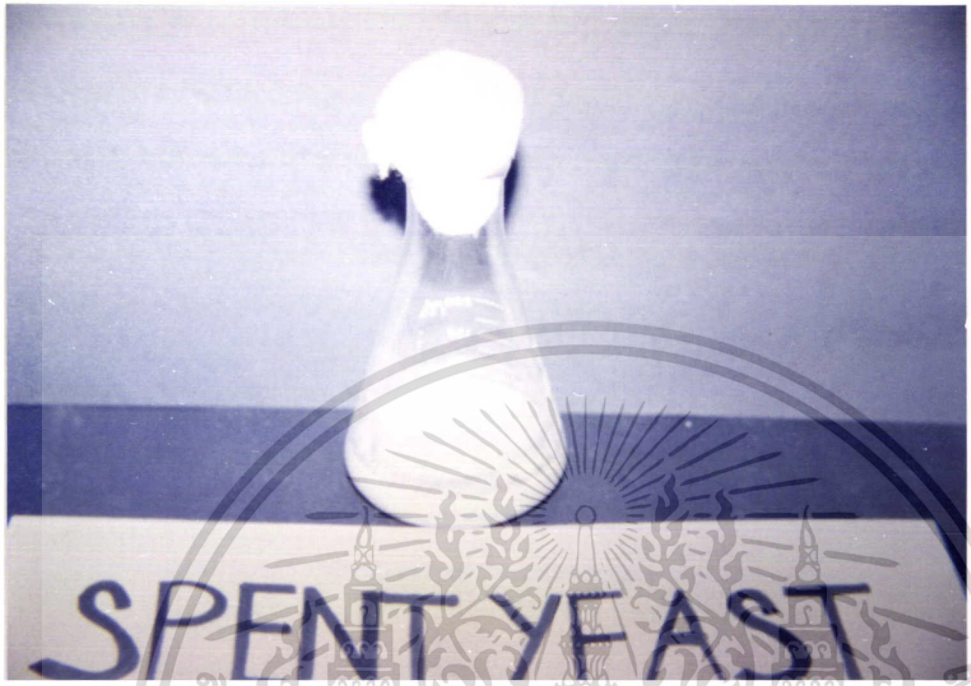
ตารางที่ 9 บรรจุคอลัมน์ด้วยอลูมินาและซิลิกาเจล อีลูทด้วยแอลกอฮอล์ 20%(v/v)

fraction	ซิลิกาเจล (bitterness unit)	อลูมินาเจล (bitterness unit)
1 ของเหลวใสไม่มีสี (ก่อนเหลือง)	3	2
2 ของเหลวใสสีเหลือง (เหลือง)	6	-
3 ของเหลวใสสีเหลืองอ่อน ๆ (หลังเหลือง)	2	-

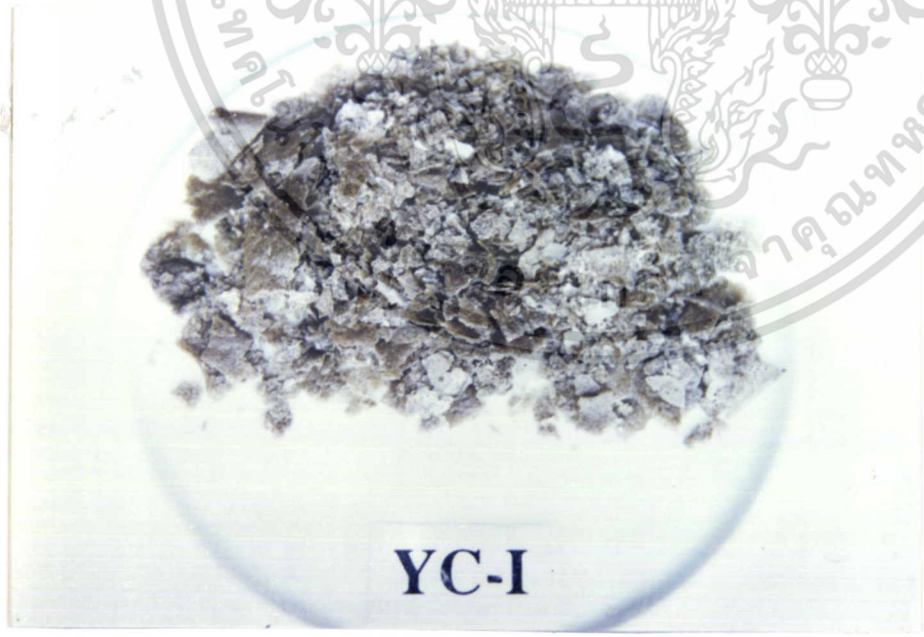
หมายเหตุ : สำหรับข้อมูลที่ใช้อลูมินาที่ขาดหายไปนั้นเนื่องจากสารละลายที่เก็บได้เป็นของเหลวใสไม่มีสีเท่านั้น ดังนั้นจึงไม่สามารถแยกและเก็บสารตัวอย่างเป็น 3 ช่วงได้

จากตารางแสดงผลการทดลอง พบว่าค่าความขมที่วัดได้ในช่วงของเหลวใสไม่มีสีนั้น มีค่าเท่ากับที่วัดได้จากเอทานอล 20%(v/v) ที่ใช้เป็นตัวอีลูท ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าสารดังกล่าวคือ เอทานอล 20% (v/v) แต่สำหรับช่วงของเหลวใสสีเหลืองที่ใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสที่อยู่กับที่นั้น มีค่าความขมมากกว่าสารตัวอย่างอื่นๆ สรุปได้ว่าช่วงของเหลวสีเหลืองนี้จะมีความขมของฮอพออกมาด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

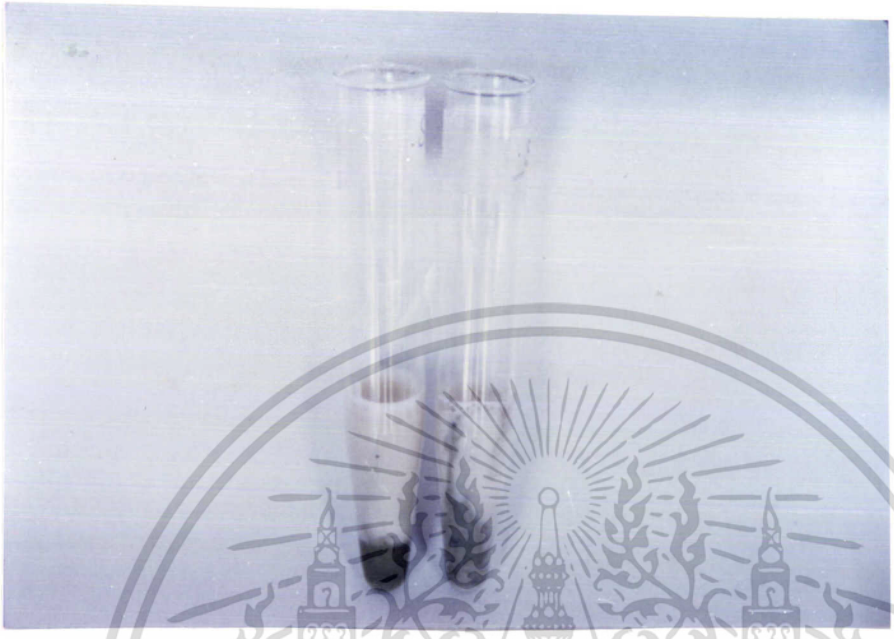


รูปที่ 7 แสดง Spent yeast



รูปที่ 8 แสดงลักษณะของยีสต์ครีมเบียร์ที่นำมาจาก Decanter และนำไปผ่านการอบแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 แสดงลักษณะตะกอนฮอพที่อยู่ภายนอก (ซ้าย) และภายในเซลล์ (ขวา)

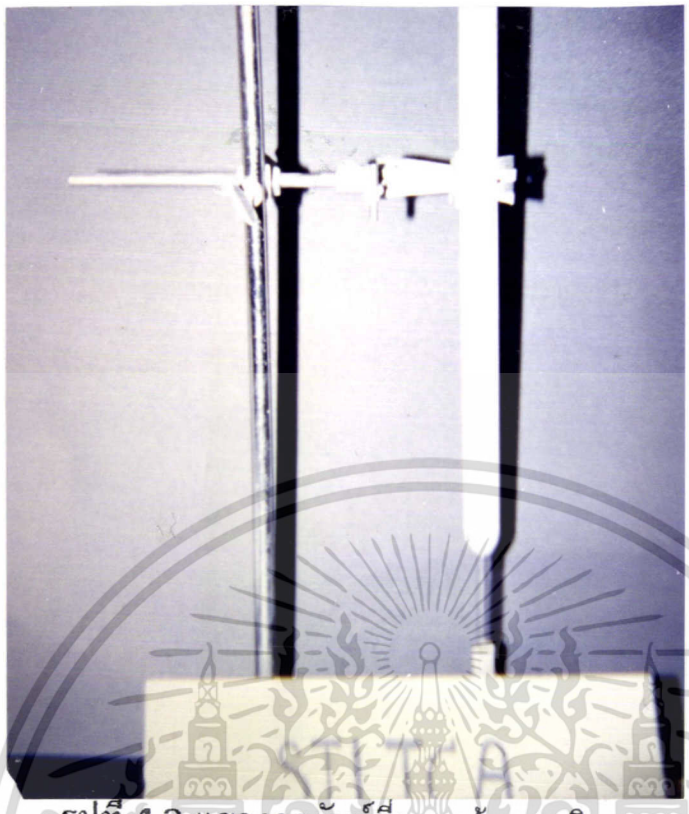
รูปที่ 10 แสดงลักษณะของยีสต์ครีมที่สะอาดที่ผ่านการล้างน้ำเกลือ 0.85 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

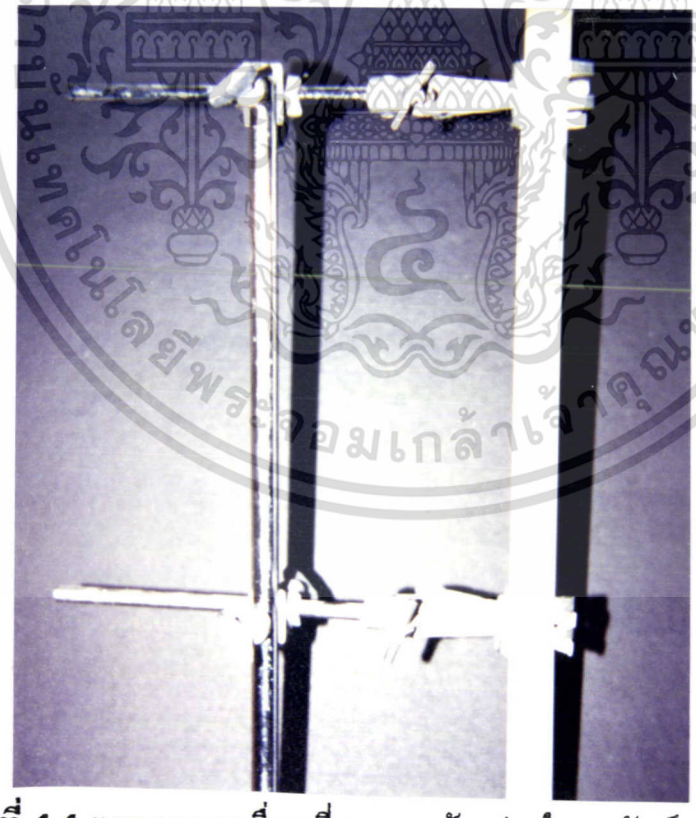
รูปที่ 11 แสดงยีสต์ออโตไลเสท (ก) และ
ยีสต์ออโตไลเสทที่ผ่านการเซนตริฟิวก์แล้ว (ข)

รูปที่ 12 แสดงคอลัมน์ที่บรรจุด้วย ซิลิกาเจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

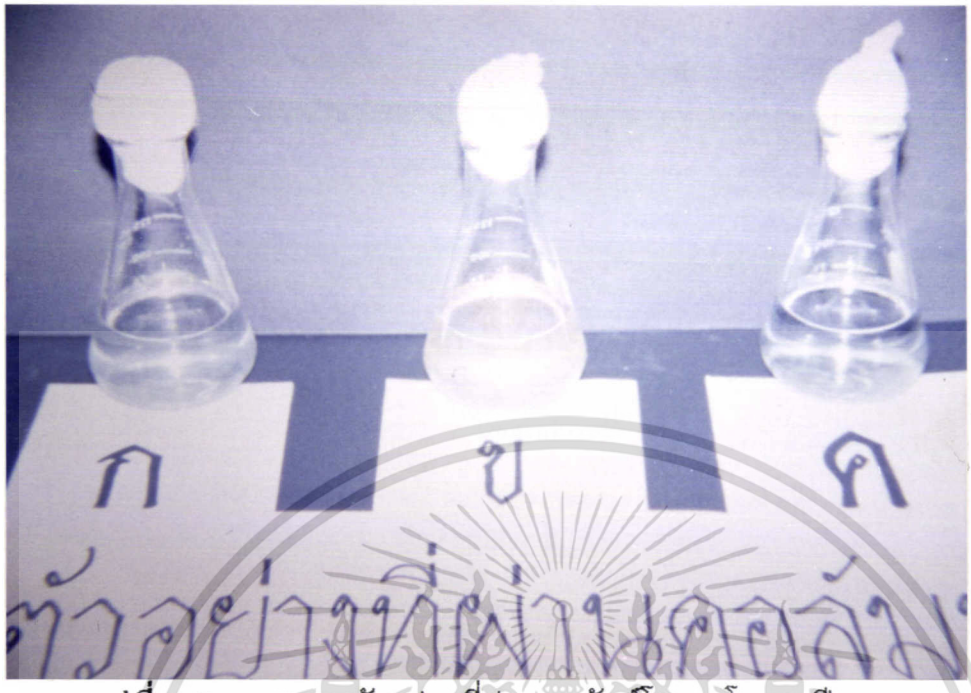


รูปที่ 13 แสดงคอลัมน์ที่บรรจุด้วย อลูมินา



รูปที่ 14 แสดงการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างในคอลัมน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 15 แสดงสารตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี
ช่วงก่อนสีเหลือง (ก) ช่วงสีเหลือง (ข) ช่วงหลังสีเหลือง (ค)

รูปที่ 16 เครื่องเขย่าที่ใช้ในการหาความขม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 17 เครื่องเซนตริฟิวก์ที่ใช้ในการปั่นฮอพ

รูปที่ 18 เครื่อง UV Spectrophotometer ที่ใช้ในการวัดความขม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

1. จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าของเหลวใสไม่มีสี (ก่อนสีเหลือง) และของเหลวใสสีเหลืองอ่อน(หลังเหลือง) เมื่อนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร แล้วไปเทียบกับค่ามาตรฐาน จะได้ค่าออกมาใกล้เคียงหรือเท่ากับค่าที่วัดได้จากเอทานอล 40% (ปริมาตร/ปริมาตร) และ 20% (ปริมาตร/ปริมาตร) ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าสารดังกล่าวคือ เอทานอล 40%(ปริมาตร/ปริมาตร) และ 20% (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่เราใช้เป็นตัวอีลูท สำหรับช่วงของเหลวสีเหลืองนั้น พบว่า ค่าที่วัดได้มีค่ามากกว่าค่าที่วัดได้จากเอทานอลที่ใช้เป็นตัวอีลูท ดังนั้นในช่วงดังกล่าวจึงน่าจะมีสารที่ให้ความขมปนออกมาด้วย แต่น้อยมาก เนื่องจากส่วนมากจะติดอยู่ภายในคอลัมน์
2. ในการใช้ซิลิกาเจลกับอลูมินาเป็นเฟสที่อยู่กับที่นั้น จากการศึกษาพบว่าอลูมินามีความเป็นขั้วสูง (high polarity) ดังนั้นจึงทำให้ระยะเวลาในการเก็บกักสารตัวอย่างจะยาวนานกว่าการใช้ซิลิกาเจล เมื่อเราใช้ความสูงของเฟสที่อยู่กับที่เท่ากัน และจากการศึกษายังพบว่า ความขมของฮอพนั้นจะละลายได้น้อยมากในน้ำแต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล เฮกเซน และเอทานอล ดังนั้น อลูมินาซึ่งมีความเป็นขั้วสูงมากจึงมีความสามารถที่จะดูดซับสารได้มากกว่าซิลิกาเจล จึงทำให้สารตัวอย่างดังกล่าวเคลื่อนที่ได้ช้ามาก ระยะเวลาในการเก็บกักในคอลัมน์จึงนานมาก และไม่สามารถแยกกรดขมของฮอพออกมาได้ เนื่องจากภายในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยอลูมินา จะไม่สามารถแยกออกมาเป็นแถบสีให้เห็นได้ ดังนั้นจึงทำให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างสารได้ เพราะฉะนั้นจึงสามารถสรุปได้ในขั้นนี้ว่า การใช้ซิลิกาเจล มีแนวโน้มว่าจะสามารถใช้แยกกรดขมของฮอพออกมาได้มากกว่าการใช้อลูมินา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. จากการศึกษาพบว่า กรดขมของฮอพสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์ที่กรดขมสามารถละลายได้ดีส่วนใหญ่เป็นสารก่อมะเร็ง (Carcinogen) และมีอันตรายแต่ยกเว้นสำหรับเอทานอลเท่านั้น ที่ไม่ก่อให้เกิดปัญหาข้างต้น ดังนั้นเอทานอลจึงเป็นสารที่เหมาะสมที่จะเป็นตัวอีลูทในเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีนี้
4. สำหรับแนวทางในการพัฒนาในอนาคตนั้นควรมีการทำการทดลองเพิ่มเติมดังนี้
   4.5 ควรศึกษาเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ซิลิกาเป็นเฟสที่อยู่กับที่ และใช้เอทานอลเป็นตัวอีลูทโดยเอทานอลที่ใช้ควรอยู่ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 20-40%(ปริมาตร/ปริมาตร) เนื่องจากถ้าใช้ความเข้มข้นของเอทานอลมากเกินกว่า 40% (ปริมาตร/ปริมาตร) จะมีผลทำให้สารโปรตีนในยีสต์ออโตไลเสท เสียสภาพได้ (denature) และความเข้มข้นดังกล่าว ก็เป็นความเข้มข้นที่พบได้ในเหล้าที่สามารถดื่มกันได้
   4.6 เนื่องจากในกระบวนการแยกกรดขมของฮอพออกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีนี้จะมีต้นทุนในการผลิตสูงมาก ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาหาแนวทางใหม่ในการลดต้นทุนการผลิตลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

วิธีการบรรจุคอลัมน์

1. ปิดที่ปลายด้านล่างของคอลัมน์ด้วยใยแก้วหรือสำลี เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวของแข็งที่เราต้องการจะบรรจุในคอลัมน์ไหลออกมาได้

2. เติมตัวทำละลายลงไปในคอลัมน์ที่ระดับความสูงระดับหนึ่ง จากนั้นให้ปล่อยของปล่อยของเหลวดังกล่าว(ตัวทำละลาย) ออกทางด้านล่างของคอลัมน์บางส่วนเพื่อไล่อากาศที่อยู่ที่ปลายคอลัมน์ จากนั้นเราจะต้องดูว่าให้มีตัวทำละลายอยู่ในคอลัมน์ระดับหนึ่ง

3. นำของแข็งที่เราต้องการบรรจุในคอลัมน์สำหรับเป็นเฟสที่อยู่กับที่นั้นมากวนผสมกับตัวทำละลายตัวเดียวกันกับที่เราบรรจุไว้ในคอลัมน์แล้ว ทำการกวนผสมจนได้สารละลายที่มีลักษณะค่อนข้างข้น

4. เทสารผสมไว้แล้วในข้อ 3 ลงในคอลัมน์ ค่อย ๆ ปล่อยตัวทำละลายที่บรรจุไว้ในคอลัมน์ออกขณะเดียวกันก็ทำการเคาะคอลัมน์ตลอดเวลาโดยใช้ลูกยางหรือสายยาง ทั้งนี้เพื่อจะได้ให้ของแข็งซึ่งเป็นเฟสที่อยู่กับที่นั้นมีการจัดเรียงตัวกันอย่างสม่ำเสมอโดยต้องไม่มีฟองอากาศและมีผิวหน้าที่เรียบเสมอ ไม่เกิดการแยกเป็นชั้น ๆ โดยในการทำต้องค่อย ๆ เติมสารละลายผสมในข้อ 3 ลงไปทีละน้อย พร้อมกันนั้นก็เปิดให้ตัวทำละลายไหลออกมาและเคาะคอลัมน์ตลอดเวลาจนกว่าจะได้ความสูงของเฟสที่อยู่กับที่ตามต้องการ

5. พยายามรักษาระดับของตัวทำละลายในคอลัมน์ให้สูงกว่าเฟสที่อยู่กับที่ตลอดเวลา โดยต้องไม่ปล่อยให้คอลัมน์แห้งเป็นอันขาดเพราะว่าถ้าคอลัมน์แห้งจะเกิดการแยกชั้นของเฟสที่อยู่กับที่ซึ่งจะส่งผลให้ไม่สามารถแยกสารออกจากกันได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กำเนิด สุภัณวงษ์. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ . 2534

ธวัชชัย ศรีวิบูลย์, รศ. เคมีวิเคราะห์ 2. มหาวิทยาลัยรามคำแหง:โรงพิมพ์สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. 2534

ประดิษฐ์ มีสุข, ผศ. คู่มือปฏิบัติการอินทรีย์เคมีและชีวเคมีเบื้องต้น. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ : กรุงเทพฯ.

พรศักดิ์ กิติกุล และ ยุทธพงษ์วงษ์กรวรเวช. "ความพยายามในการหาวิธีและสภาวะในการกำจัดฮอพออกจากยีสต์แทนการใช้ด่าง". โครงงานพิเศษ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 2538

วิวัฒน์ หวังเจริญ รมณี สงวนดีกุล และ สุเมธ ตันตระเธียร. " การผลิตยีสต์ออโตไลเสทเพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสเนื้อ ". อาหาร. 24 (กรกฎาคม - กันยายน 2537). 198-188

I.S.Hough.The biotechnology of Malting and Brewing. Cambridge Studies in biotechnology7.

J.J.Kirkland and P.E.Antle. J Chromatogr.Sci. 15, (1977).

M.Verzele and D.DE. Chemistry analysis of hop and beer bitter acid. Kenkeleire Else vier amsterdam-London-NewYork-Tokyo. 1991.

N.Hadden et al. Basic Liquid Chromatography. Varian Aerograph, Walnut Creek, Calif. 1971.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้