



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเบียร์จากข้าวไทยเป็นส่วนประกอบหลักโดยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนองและการประยุกต์ใช้ในการผลิตเบียร์ระดับกึ่งอุตสาหกรรม

**Optimization of beer production from Thai rice malt based using response surface methodology and application in pilot-scale brewing**

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเบียร์จากข้าวไทยเป็นส่วนประกอบหลักโดยวิธีพื้นที่  
ผิวตอบสนองและการประยุกต์ใช้ในการผลิตเบียร์ระดับกึ่งอุตสาหกรรม

**Optimization of beer production from Thai rice malt based using response surface  
methodology and application in pilot-scale brewing**

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รศ.ดร. โชคชัย วนภู

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2556-2557

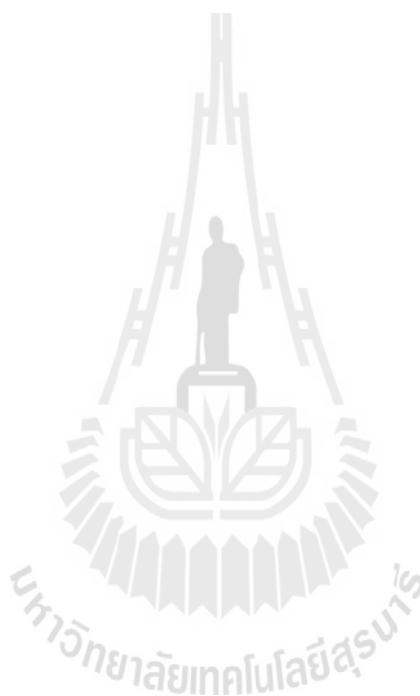
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2558

## กิตติกรรมประกาศ

กระผมขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่สนับสนุนทุนวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ นายอาทิตย์ กองแก้ว นายฐปนวิษฐ์ หมั่นแจ้ง และนางสาวภัทรพร พลชนะ ที่ช่วยทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จ ลุล่วงไปด้วยดี

รศ. ดร. โชคชัย วนภู



## บทคัดย่อ

การหาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตเบียร์จากข้าวไทยเป็นส่วนประกอบหลักโดยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนองและการประยุกต์ใช้ในการผลิตเบียร์ระดับกึ่งอุตสาหกรรม

การผลิตเบียร์, ข้าวมอลต์, วิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง, การผลิตเบียร์ระดับกึ่งอุตสาหกรรม

การวิจัยนี้ได้ทำการศึกษา และผลิตเบียร์โดยใช้ข้าวเป็นส่วนประกอบหลัก มีวัตถุประสงค์เพื่อลดต้นทุนการผลิตเบียร์ และเพิ่มมูลค่าของข้าวไทย ข้าวที่ใช้ในการศึกษานี้คือ ข้าวพันธุ์ผสม CP13 ซึ่งข้าวพันธุ์ดังกล่าวได้นำมาทำมอลต์ โดยการทำให้งอกที่ 1, 3, 5, 7 และ 9 วัน จากนั้นทำการหาค่าคุณภาพของมอลต์ข้าวที่ได้ พบว่า ค่า extract content และค่า Free amino nitrogen (FAN) ของมอลต์ข้าว จะเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 3 ถึงวันที่ 9 ให้ค่า extract content สูงสุดที่ 46% อย่างไรก็ตาม ค่า extract content ของมอลต์ข้าวน้อยกว่า ค่า extract content ของมอลต์บาร์เลย์ที่ใช้ผลิตเบียร์โดยทั่วไปที่ 80% สำหรับมอลต์ข้าววันที่ 9 ให้ค่า FAN สูงสุดที่ 145 มิลลิกรัมต่อมอลต์ 100 กรัม ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ FAN ที่พบใน มอลต์บาร์เลย์ที่ 150 มิลลิกรัมต่อมอลต์ 100 กรัม ค่า malting loss ของมอลต์ข้าวในวันที่ 7 และ 9 ของการงอกมีค่ามากกว่า 20% ซึ่งไม่เหมาะสมกับการผลิตมอลต์สำหรับทำเบียร์ เนื่องจากจะทำให้ต้นทุนการผลิตเบียร์ค่อนข้างสูง การศึกษาผลของเอนไซม์สองชนิด ได้แก่ เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนสูง เอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย และมอลต์บาร์เลย์ เพื่อใช้ในการเพิ่มคุณสมบัติของน้ำเวิร์ท โดยใช้วิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (RMS) และวิเคราะห์ความเหมาะสมของแบบจำลองโดยใช้ค่า *p-value* ผลการศึกษาพบว่า เวลาในการงอก เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และมอลต์บาร์เลย์ มีผลต่อค่า extract content ผลผลิตของน้ำเวิร์ท และปริมาณ fermentable sugar ในขณะที่การงอกของข้าว เอนไซม์โปรติเอส มีผลต่อ FAN ในน้ำเวิร์ท อย่างไรก็ตาม เอนไซม์โปรติเอสที่มีอยู่ในมอลต์ข้าว มีผลต่อค่า FAN มากกว่าเอนไซม์โปรติเอสที่เติมเข้าไป นอกจากนี้ยังได้มีการวิเคราะห์สถานะ และปริมาณเชิงตัวเลขที่เหมาะสมต่อกระบวนการ mashing บนพื้นฐานของเวลาในการงอก และปริมาณมอลต์ข้าว

การผลิตเบียร์ระดับกึ่งอุตสาหกรรม พบว่า ปริมาณ fermentable sugar ทั้งหมดของน้ำเวิร์ทของข้าวที่งอก 5 วัน และข้าวมอลต์ 50% ไม่มีความแตกต่างกับเวิร์ทมาตรฐานที่ความเข้มข้นเท่ากัน อย่างไรก็ตาม ปริมาณน้ำตาลมอลโตสในน้ำเวิร์ทมาตรฐาน มีค่ามากกว่าน้ำเวิร์ทจากการทดลอง ประมาณ 3 เท่า ซึ่งในขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ของน้ำเวิร์ทจากการทดลองค่อนข้างสูง คือ ประมาณ 33% ของปริมาณ fermentable

sugar ทั้งหมด ส่วนเวลาในการงอกของมอลต์ข้าว และมอลต์บาร์เลย์สามารถเพิ่มการนำไปใช้ของ reducing sugar และ FAN ของยีสต์น้ำเวิร์ท อย่างไรก็ตาม การใช้ reducing sugar ของยีสต์สูงสุดคือ 70% ซึ่งน้อยกว่าค่ามาตรฐานที่ 80% เนื่องจาก พบปริมาณน้ำตาล maltotriose หลงเหลืออยู่ และอาจเป็นสาเหตุทำให้ปริมาณเอทานอลในตัวอย่างเบียร์ค่อนข้างต่ำ ปริมาณข้าวยังมีผลทำให้สีของตัวอย่างเบียร์เข้มขึ้น เนื่องมาจากกระบวนการ Maillard reaction ของเปลือกข้าวในระหว่างกระบวนการ mashing และ wort boiling

ปริมาณ isoamyl alcohol ในตัวอย่างเบียร์ ที่ทำการทดลองอยู่ในช่วง 570 – 700 ppm ซึ่งมีมากกว่า ปริมาณ isoamyl alcohol ในเบียร์มาตรฐานประมาณ 10 เท่า ปริมาณข้าว และเวลาในการงอกของข้าว มีผลทำให้เกิดการสร้างสารประกอบกลุ่ม ester เพิ่มขึ้น ได้แก่ isoamyl acetate, ethyl octanoate และ ethyl decanoate เนื่องจาก ในข้าวมีสารประกอบกลุ่ม volatile fatty acid ค่อนข้างสูง ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ สารประกอบกลุ่ม ester ในการทดสอบทางประสาทสัมผัสของเบียร์ โดยใช้ข้าวเป็นส่วนประกอบหลัก พบว่า เวลาในการงอกของข้าว ไม่มีผลเมื่อมีการใช้มอลต์บาร์เลย์ที่ 50% ในทางกลับกันเวลาในการงอกของข้าว มีผลทางประสาทสัมผัส เมื่อมีการใช้ข้าวมอลต์มากกว่า หรือเท่ากับ 70% ผู้ทำการทดสอบได้ตัดสินตัวอย่างเบียร์ที่มี ส่วนผสมของมอลต์ข้าว 50% อยู่ในเกณฑ์ดี ในขณะที่ตัวอย่างเบียร์ที่มีส่วนผสมของมอลต์ข้าว 70% อยู่ใน เกณฑ์ปกติ และสามารถดื่มได้



## Abstract

### **Optimization of beer production from Thai rice malt based using response surface methodology and application in pilot-scale brewing**

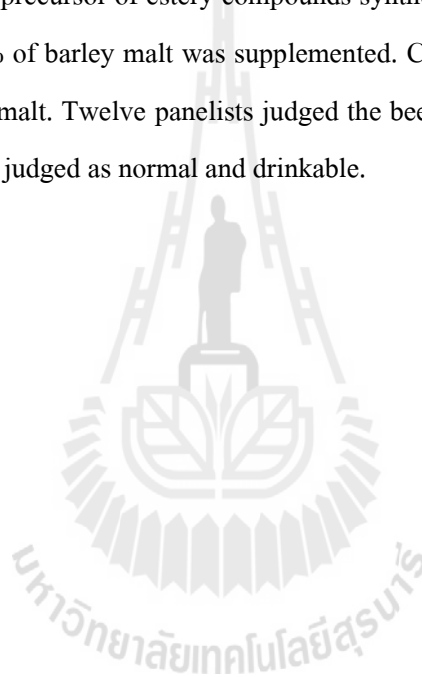
Beer production, Rice malt, Response surface methodology, Pilot-scale brewing

In order to reduce the cost of beer production, using rice as major ingredient in brewing process was investigated and established. Productions of rice malt (Hybrid Rice CP13) in 1st, 3rd, 5th, 7th, and 9th days of germination were carried out. Extract content and FAN constantly increased during the 3rd to 9th days of germination. The maximum extract content presented in 9th days of germination, but the extract content of rice not reached the typical brewing malt (80%). On the 9th day of germinated malt, it provided FAN for 145 mg/100 g malt, which was insignificant difference with FAN in malt barley (150 mg/100 g malt). On the other hand, the rice malt from 7<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> days of germination was negligible because of more than 20% malting loss. Commercial enzymes including heat stable  $\alpha$ -amylase, bacterial protease, and malt barley were supplemented for improving the qualities of wort for brewing before optimization using RSM technique. The suitability of this model was analyzed and expressed as *p*-value. Germination time of rice, commercial  $\alpha$ -amylase, and barley addition affected on extract content, yield, and fermentable sugar of wort. Whereas, germination time of rice and bacterial protease affected on FAN in wort. However, protease that generated in germinated malt showed higher impact on FAN than commercial enzyme addition. The numerical appropriate conditions for mashing condition based on germination time and rice malt ratios were determined.

Fifty-liters of beer productions of each treatment was done. Total fermentable sugars of wort from malt obtained at 5th day of germination at 50% were insignificant difference with standard wort at the same concentration. However, maltose concentration in standard wort was higher approximately 3 times than experimental wort, whereas amount of glucose from experimental wort was high about 33% of total fermentable sugar. Germination time of rice malt and barley malt addition improved both reducing sugar and FAN consumption. Nevertheless, the highest utilization of reducing sugar from the experiment was 70%,

which was lower than reducing sugar from malt barley wort at more than 80% utilization. The lack of maltotriose consumption occurred in every treatments, which might be the main cause of low ethanol production. Rice malt ratio influenced on the color of beer due to the Maillard reaction of rice husk during mashing and wort boiling.

Isoamyl alcohol in experimental beer was 570 – 700 ppm, which 10 times higher than its beer standard. The rice malt ratio and germination time improved the formation of estery compounds in final beer including isoamyl acetate, ethyl octanoate, and ethyl decanoate. This might be due to the high level of volatile fatty acid, which is the precursor of estery compounds synthesis. Qualities of rice malt had no effect on sensory score when the 50% of barley malt was supplemented. Conversely, the ratio of rice malt to 70% influenced the qualities of rice malt. Twelve panelists judged the beer from 50% of rice malt as good, while beer from 70% of rice malt was judged as normal and drinkable.



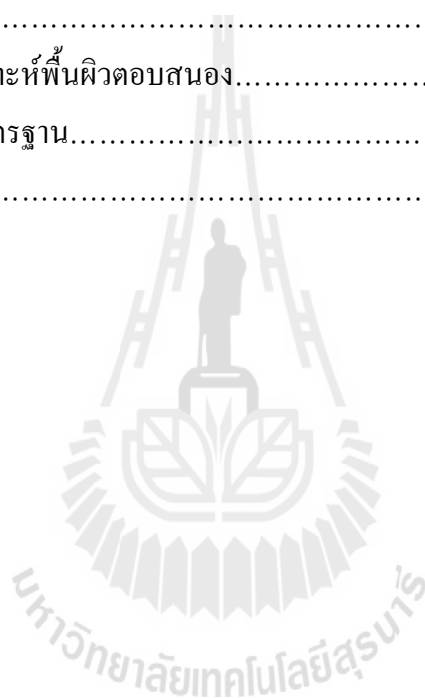
## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อ.....	ข
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
1.1 ความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 สมมุติฐานของการทดลอง.....	3
1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดของการศึกษา.....	3
<b>บทที่ 2 ทบทวนงานวิจัย.....</b>	<b>4</b>
<b>บทที่ 3 วิธีการทดลอง</b>	
3.1 วัสดุ .....	10
3.1.1 ข้าวและสายพันธุ์ของข้าวบาร์เลย์.....	10
3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์.....	10
3.1.3 เอนไซม์ทางการค้า.....	10
3.1.4 Hop.....	10
3.2 คุณภาพของข้าว.....	10
3.3 การผลิตมอลต์จากข้าว.....	11
3.4 การหาสภาวะของการทำมอลต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเป็นน้ำวีร์ท.....	11
3.4.1 เวลาที่ใช้ในการทำมอลต์.....	10
3.4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการทำมอลต์โดยใช้ RSM.....	12
3.5 การหมักในระดับห้องปฏิบัติการ.....	13
3.5.1 การเตรียมเชื้อยีสต์.....	13
3.5.2 สภาวะที่ใช้ในการหมัก.....	13
3.6 การหมักในถังหมักขนาด 50 ลิตร.....	14



3.7	วิธีการวิเคราะห์.....	14
3.7.1	การวิเคราะห์คุณภาพของมอลต์.....	14
3.7.1.1	การสูญเสียน้ำหนักของมอลต์ (Malting loss).....	14
3.7.1.2	การวัดความสามารถของเอนไซม์ $\alpha$ -amylase และ $\beta$ -amylase ในมอลต์.....	14
3.7.1.3	สารสกัดของมอลต์.....	15
3.7.1.4	อะมิโนไนโตรเจนอิสระ (Free amino nitrogen; FAN) ของมอลต์.....	16
3.7.1.5	อุณหภูมิของการ gelatinization.....	17
3.7.2	การวิเคราะห์คุณภาพของน้ำเวิร์ท และเบียร์.....	17
3.7.2.1	Viable cell count.....	17
3.7.2.2	น้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเวิร์ท.....	17
3.7.2.3	อะมิโนไนโตรเจนอิสระ (Free amino nitrogen; FAN) ของน้ำเวิร์ท.....	17
3.7.2.4	ปริมาณของสารสกัดของน้ำเวิร์ท.....	18
3.7.2.5	น้ำตาลที่สามารถนำไปใช้หมักได้ (fermentable sugar) และเอทานอลในน้ำ wort และเบียร์.....	18
3.7.2.6	การประกอบที่สามารถระเหยได้และแอลกอฮอล์หนักในเบียร์.....	19
3.7.2.7	สีของเบียร์.....	20
3.7.3	การวิเคราะห์รสสัมผัสของเบียร์.....	20
3.8	การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	21
<b>บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง</b>		
4.1	การวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการและคุณสมบัติทางกายภาพของข้าว.....	22
4.2	การศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการออกต่อคุณภาพของข้าวมอลต์.....	22
4.3	อิทธิพลของเวลาในการ mashing ต่อคุณภาพของเวิร์ท.....	26
4.4	ผลการศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเวิร์ท โดยใช้ RSM.....	27
4.4.1	การประเมินค่าและความเหมาะสมของแบบจำลอง.....	27
4.4.2	การวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง.....	31
4.4.3	การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำเวิร์ท.....	39
4.5	การหมักในถังขนาดเล็ก.....	40
4.5.1	ปริมาณ fermentable sugar ในน้ำเวิร์ทที่ผ่านการหมัก.....	40

4.5.2 ผลของเวลาที่ใช้ในการงอก ปริมาณของเอนไซม์ทางการค้า การเติมมอลต์จากข้าวบาร์ เลย์ ต่อรูปแบบของกระบวนการหมัก.....	41
4.6 การทำเบียร์ในถังขนาดใหญ่และคุณภาพของเบียร์.....	46
4.6.1 องค์ประกอบทางเคมีและองค์ประกอบที่สามารถระเหยได้ของเบียร์.....	46
4.6.2 การประเมินรสชาติของเบียร์.....	49
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	53
เอกสารอ้างอิง.....	55
ภาคผนวก.....	58
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง.....	58
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐาน.....	60
ประวัติผู้แต่ง.....	67



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1	ขั้นตอนการทำมอลต์.....11
3.2	ตัวแปรและระดับของตัวแปรต่างๆ.....12
3.3	ความเข้มข้นของสารมาตรฐานของสารประกอบที่สามารถระเหยได้.....20
4.1	แสดงองค์ประกอบทางเคมีของข้าวลูกผสม CP13.....22
4.2	คุณภาพของข้าวมอลต์ที่ช่วงเวลาต่างๆเปรียบเทียบกับข้างเปลือกและมอลต์ของข้างบาร์เลย์.....25
4.3	ค่า $F$ -value และ $p$ -value ของตัวแปรอิสระใน polynomial models.....28
4.4	ค่า regression coefficient ของแบบจำลอง.....30
4.5	การเปรียบเทียบของค่าที่ได้จากการประเมิน โดยใช้โมเดลกับค่าที่ได้จากการทำการทดลอง.....32
4.6	ค่าเชิงตัวเลขของการผลิตน้ำเวิร์ท โดยอาศัยพื้นฐานของเวลาที่ใช้ไกรงอกและสัดส่วนของมอลต์จากข้าว และการประมาณค่าคุณภาพของน้ำเวิร์ท.....40
4.7	ปริมาณของ fermentable sugar และสัดส่วนของน้ำตาลในชุดการทดลองของน้ำเวิร์ท.....42
4.8	ร้อยละของ FAN และการใช้น้ำตาลรีดิวส์ในน้ำเวิร์ท ที่ทำการหมัก.....46
4.9	ชนิดของ fermentable sugar ต่างๆ ก่อนและหลังทำการหมัก.....47
4.10	ค่า pH ปริมาณของเอทานอล และสีของเบียร์.....48
4.11	สารประกอบที่สามารถระเหยได้ในเบียร์.....51

## สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 แผนผังกรรมวิธีการผลิตเบียร์.....	5
2.2 กลไกการงอกของข้าว.....	6
2.3 แผนผังกระบวนการผลิตเอทานอลจากกลูโคส.....	8
4.1 ปริมาณของ FAN และ extract content ในเวิร์ท ที่ได้จาก 50% ของข้าวที่ทำการงอก 3 วัน ที่ทำการเติม commercial enzymes ที่ 0.25 กรัมต่อ 100 กรัมมอลต์ ของเอนไซม์ $\alpha$ -amylase และ protease .....	26
4.2 กราฟของพื้นที่ผิวดอกสนองระหว่างค่า extract content ต่อ เวลาที่ใช้ในการงอก (germination time) ของข้าว และสัดส่วนของมอลต์จากข้าว เมื่อทำการเติม 0.25 กรัมต่อ100 กรัมของมอลต์ ของเอนไซม์ commercial $\alpha$ -amylase และ protease และเอนไซม์ commercial $\alpha$ -amylase และ protease ที่ทำการงอกเป็นเวลา 3 วันและใช้สัดส่วนของมอลต์จากข้าวอยู่ที่ 75%.....	35
4.3 กราฟของพื้นที่ผิวดอกสนองระหว่างค่า FAN ต่อ เวลาที่ใช้ในการงอก (germination time) ของข้าว และสัดส่วนของมอลต์จากข้าว เมื่อทำการเติม 0.25 กรัมต่อ100 กรัมของมอลต์ ของเอนไซม์ commercial $\alpha$ -amylase และ protease และเอนไซม์ commercial $\alpha$ -amylase และ protease ที่ทำการงอกเป็นเวลา 3 วัน และใช้สัดส่วนของมอลต์จากข้าวอยู่ที่ 75%.....	36
4.4 กราฟของพื้นที่ผิวดอกสนองและ contour plotระหว่างค่า % yield ต่อสัดส่วนของมอลต์จากข้าวเมื่อทำการเติม 0.25 กรัมต่อ100 กรัมของมอลต์ ของเอนไซม์ commercial $\alpha$ -amylase และ protease.....	37
4.5 กราฟของพื้นที่ผิวดอกสนองระหว่างค่า % yield ต่อสัดส่วนของมอลต์จากข้าว และปริมาณของเอนไซม์ commercial $\alpha$ -amylase ที่ทำการงอกเป็นเวลา 3 วันและทำการเติม 0.25 กรัมต่อ100 กรัมของมอลต์ ของเอนไซม์ commercial protease และเอนไซม์ commercial $\alpha$ -amylase และ protease ที่ทำการงอกเป็นเวลา 3 วันและใช้สัดส่วนของมอลต์จากข้าวอยู่ที่ 75%.....	38
4.6 กราฟของพื้นที่ผิวดอกสนองของค่า total fermentable sugar content ต่อเวลาที่ใช้ในการงอกและสัดส่วนของมอลต์จากข้าว เมื่อทำการเติม 0.25 กรัมต่อ100 กรัมของมอลต์ ของเอนไซม์ commercial $\alpha$ -amylase และ protease .....	39
4.7 การเปลี่ยนแปลงตามเวลาของจำนวนเซลล์, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, FAN, และเอทานอล ระหว่างกระบวนการหมัก ของตัวอย่างที่ทำการ mashing ที่แตกต่างกัน .....	44

4.8 การเปลี่ยนแปลงตามเวลาของ fermentable sugar ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลฟรุกโตส, น้ำตาลมอลโตส และน้ำตาลมอลโตรไทรโอส ระหว่างกระบวนการหมัก ของตัวอย่างที่ทำการ mashing ที่แตกต่างกัน.....45

4.9 กราฟไฟแรงแมงมุมของการทดสอบรสสัมผัสของเบียร์.....52



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เบียร์จัดอยู่ในจำพวกเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ (alcoholic beverage) ซึ่งได้จากการหมักโดยยีสต์ โดยส่วนใหญ่ใช้บาร์เลย์มอลต์เป็นแหล่งอาหารของยีสต์สำหรับการสร้างแอลกอฮอล์ อย่างไรก็ตามบาร์เลย์ที่ใช้ในการผลิตเบียร์นั้นไม่สามารถปลูกในประเทศเขตร้อนชื้นได้และต้องนำเข้าจากต่างประเทศเท่านั้น

ข้าว (*Oryza sativa*) เป็นพืชที่มีความสำคัญมากเช่นเดียวกับข้าวสาลีและข้าวโพด ซึ่งได้มีการเพาะปลูกมากกว่า 100 ประเทศทั่วโลก ข้าวเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญที่สุดซึ่งมีผู้บริโภคเกินกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรทั่วโลก โดยทั่วโลกมีพื้นที่การปลูกข้าวรวมกันประมาณ 154 ล้านเฮกตาร์ และปริมาณข้าวที่ผลิตได้ทั้งหมดประมาณ 731 ล้านตันทั่วโลก (Zhao *et al.*, 2010) ข้อจำกัดของการใช้ข้าวในการผลิตเบียร์คือ เนื่องจากมีปริมาณแป้ง (starch) ที่ค่อนข้างสูงคือประมาณ 85-90%, อุณหภูมิในการเจลาติไนส์ของแป้งข้าวที่สูง (70-85 °ซ) และมีปริมาณโปรตีนต่ำ (5-8%) ซึ่งไม่เพียงพอต่อการเมตาบอลิซึมของยีสต์ (Kanze, 2004) แต่อย่างไรก็ตามโรงงานผลิตเบียร์ได้นำข้าวมาเป็นส่วนผสมข้างเคียง (adjunct) เพื่อลดต้นทุนการผลิต ยิ่งไปกว่านั้น ข้าวที่ใช้เป็น adjunct ยังมีคุณสมบัติช่วยปรับปรุงกลิ่นและรสชาติของเบียร์ให้ดีขึ้น และเปลือกของข้าวยังมีคุณสมบัติเป็นสารช่วยกรอง (filter aid) ซึ่งทำให้กระบวนการแยกกาก (lautering) ของเบียร์มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าสารช่วยกรองที่ขายตามท้องตลาด (Goldammer, 2000; Villar *et al.*, 2004)

วิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response surface methodology) เป็นเทคนิคทางสถิติและคณิตศาสตร์ซึ่งมีประโยชน์ทางการปรับปรุง, พัฒนาและหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิต เทคนิคดังกล่าวถูกคิดค้นโดย Box และ Wilson เมื่อปี ค.ศ. 1951 (Myers and Montgomery, 2002) วิธีการดังกล่าวใช้หลักการของสมการการถดถอย (Regression equation) เพื่อใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์ของตัวแปรต้น (Variables) ที่มีต่อตัวแปรตาม (Responses) รวมไปถึงปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างตัวแปรสองชนิดขึ้นไป และยังสามารถใช้สมการดังกล่าวในการหาปริมาณตัวแปรต้นที่เหมาะสมต่อตัวแปรตามที่สุดได้อีกด้วย (Giovanni, 1983)

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการส่งออกข้าวได้มากเป็นอันดับหนึ่งของโลก ดังนั้น ข้าวจึงเป็นพืชที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาและนำมาผลิตเป็นเบียร์ โดยที่ผ่านมานั้น ได้มีผู้ศึกษาการใช้ธัญพืชชนิดอื่นๆ ในการผลิตเบียร์ เช่น ข้าวสาลี, ข้าวฟ่าง, บัควีท รวมไปถึงข้าวแทนการใช้บาร์เลย์เพื่อคิดค้นเบียร์รูปแบบใหม่ๆ (Agu and Palmer, 1998; Igyor *et al.*, 2001; Odibo *et al.*, 2002; Salubchua *et al.*, 2005; Wijngaard and Arendt, 2006) สำหรับในประเทศไทยได้มีการศึกษาและประยุกต์ใช้ข้าวไทยในการผลิตมอลต์และเบียร์เช่นกัน Usansa

และคณะได้ทำการศึกษาและผลิตมอลต์จากข้าวไทย 6 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยข้าวเจ้า 3 ชนิด และข้าวเหนียว 3 ชนิด และได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของข้าวมอลต์ที่ผลิตได้ พบว่า สภาวะที่เหมาะสมกับการผลิตมอลต์คือ ที่อุณหภูมิ 30°C ใช้เวลาแช่ข้าว 24 ชั่วโมงและทำการรอกที่ 4-5 วัน ข้าวที่เหมาะสมกับการนำมาผลิตมอลต์คือ ข้าวเหนียวดำ เนื่องจากเนื่องจากมีปริมาณเอนไซม์แอลฟา และเบต้า-อะไมเลสที่ค่อนข้างสูง (12 และ 6.7 ยูนิตตามลำดับ) อีกทั้งยังมีค่าอุณหภูมิที่ทำให้เกิดเจล (Gelatinization temperature) ที่เหมาะสมคือ 73.3°C มีค่าการสูญเสียในระหว่างการรอก (malting loss) ที่ร้อยละ 14.3 (Usansa *et al.*, 2009; Usansa *et al.*, 2011) และพบว่าข้าวต่างสายพันธุ์จะให้คุณสมบัติของมอลต์แตกต่างกันตั้งแต่ขั้นตอน steeping, germination, kilning และ mashing นอกจากนี้ปริมาณเอนไซม์กลุ่มอะไมเลสและโปรติเอสมีความสำคัญอย่างมากในการ mashing ซึ่งทำให้ activity ของเอนไซม์มีความแตกต่างกันมาก โดยพบว่าเอนไซม์เหล่านี้ยังไม่สามารถย่อยสลายแป้งและโปรตีนได้มากพอ ซึ่งทั้งหมดส่งผลให้คุณภาพน้ำเวิร์ท, การหมักแอลกอฮอล์และคุณภาพเบียร์มีความแตกต่างกันมาก ส่วน Moonjai และคณะได้ทำการศึกษาและผลิตเบียร์จากข้าวที่ผ่านการรอก 3 วัน พบว่า เบียร์ที่ผลิตจากข้าวมอลต์ทั้งหมด (100% rice malt) จะให้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ต่ำ (2.0%) และมีค่าความพึงพอใจที่ต่ำเมื่อทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสทั้งจากลักษณะปรากฏ กลิ่น และรสชาติ แต่พบว่ามีปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นเมื่อมีการใช้มอลต์จากข้าวฟ่างและข้าวสาลีร่วมด้วย (5.0%) อย่างไรก็ตามเบียร์ที่ผลิตได้ยังมีความหวานที่สูงอยู่ ทั้งนี้เนื่องจากกระบวนการหมักที่ยังไม่สมบูรณ์ (Moonjai, 2005)

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือ การใช้ประยุกต์เอนไซม์กลุ่มอะไมเลสและโปรติเอสทางการค้า และการใช้บาร์เลย์มอลต์เป็นส่วนผสมในการผลิตเบียร์โดยใช้ข้าวมอลต์เป็นส่วนประกอบหลัก โดยใช้เทคนิคพื้นที่ผิวตอบสนองและประยุกต์ใช้การผลิตเบียร์ในระดับกึ่งอุตสาหกรรม

## 2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบวิธีการผลิตเบียร์โดยใช้ข้าวมอลต์เป็นส่วนประกอบหลัก เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับข้าวไทยและลดต้นทุนการผลิตเบียร์ โดยมีวัตถุประสงค์ย่อยดังนี้

1. เพื่อศึกษากรรมวิธีการผลิตข้าวมอลต์จากข้าวไทยและวิเคราะห์คุณภาพของข้าวมอลต์ที่ผลิตได้
2. เพื่อศึกษาและหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในกระบวนการผลิตน้ำเวิร์ท (wort) จากข้าวมอลต์โดยใช้วิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง
3. เพื่อศึกษากระบวนการหมักเบียร์และตัวแปรต่างๆ ในถังหมักขนาดเล็ก
4. เพื่อผลิตเบียร์ โดยใช้ข้าวเป็นส่วนประกอบหลักในระดับกึ่งอุตสาหกรรม และวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี ทางกายภาพและทางประสาทสัมผัสของเบียร์ที่ได้

### 3. กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย (Conceptual Framework)

ข้าวมอลต์มีศักยภาพในการใช้เป็นส่วนประกอบหลักของการผลิตเบียร์ ซึ่งสามารถทำได้โดยการปรับปรุงและพัฒนากระบวนการผลิตเบียร์ให้เหมาะสมกับข้าวมอลต์ และการเติมเอนไซม์กลุ่มอะไมเลสและโปรติเอสทางการค้าร่วมกับการใช้บาร์เลย์มอลต์

### 4. ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนา ได้แก่ ความชื้น, โปรตีน, ไขมัน, คาร์โบไฮเดรต, โยอาหาร และเถ้า รวมไปถึงคุณสมบัติทางกายภาพของข้าว ได้แก่ อุณหภูมิเจลาดีไนซ์และเปอร์เซ็นต์การงอกของข้าวที่ใช้ในการศึกษา
2. ทำการผลิตข้าวมอลต์และวิเคราะห์คุณภาพของข้าวมอลต์ที่ผลิตได้
3. ทำการผลิตน้ำเวียร์ทในระดับเล็กโดยใช้เอนไซม์กลุ่มอะไมเลสและโปรติเอสทางการค้าและบาร์เลย์มอลต์ที่แตกต่างกัน และหาปริมาณที่เหมาะสมของตัวแปรแต่ละชนิดโดยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง
4. ทำการหมักน้ำเวียร์ทในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อศึกษาตัวแปรในกระบวนการหมัก เช่น เวลาในการหมัก อัตราการสร้างเอทานอล อัตราการบริโภคน้ำตาลแต่ละชนิดของยีสต์ และการเจริญเติบโตของยีสต์
5. ทำการผลิตเบียร์ในระดับกึ่งอุตสาหกรรมและวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี กายภาพ และทางประสาทสัมผัส



## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

เบียร์ เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่ผ่านมากระบวนการหมัก จากผลิตภัณฑ์จำพวกธัญพืช เบียร์ เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดแรกของโลก เริ่มผลิต 6,000 ปีก่อนคริสตกาล โดยชนชาติ บาบิโลเนียน เบียร์เป็นที่รู้จักในสมัยอียิปต์โบราณและเมโสโปเตเมีย โดยมีการผสมพืชอีกชนิดชนิดเข้าไปคือ ฮอปส์ ทำให้มีกลิ่นหอมรสชาติขม และสามารถรักษาคุณภาพของเบียร์ให้เก็บได้นานขึ้น

องค์ประกอบหลักในการหมักเบียร์คือ น้ำ ข้าวมอลต์ (คือเมล็ดข้าวอบแห้งหรือคั่ว ของเมล็ดธัญพืชที่งอกแล้ว โดยปกติใช้เมล็ดข้าวบาร์เลย์) ฮอปส์ และ ยีสต์ และยังมีส่วนผสมอื่น ๆ เรียกว่า แอดจังก์ (adjunct) หรือ ส่วนผสมข้างเคียง ซึ่งเป็นส่วนผสมที่นอกเหนือจากส่วนผสมหลัก

- น้ำ : เนื่องจากน้ำนั้นเป็นองค์ประกอบหลักของเบียร์ คุณสมบัติของน้ำที่ใช้จึงมีผลต่อรสชาติของเบียร์

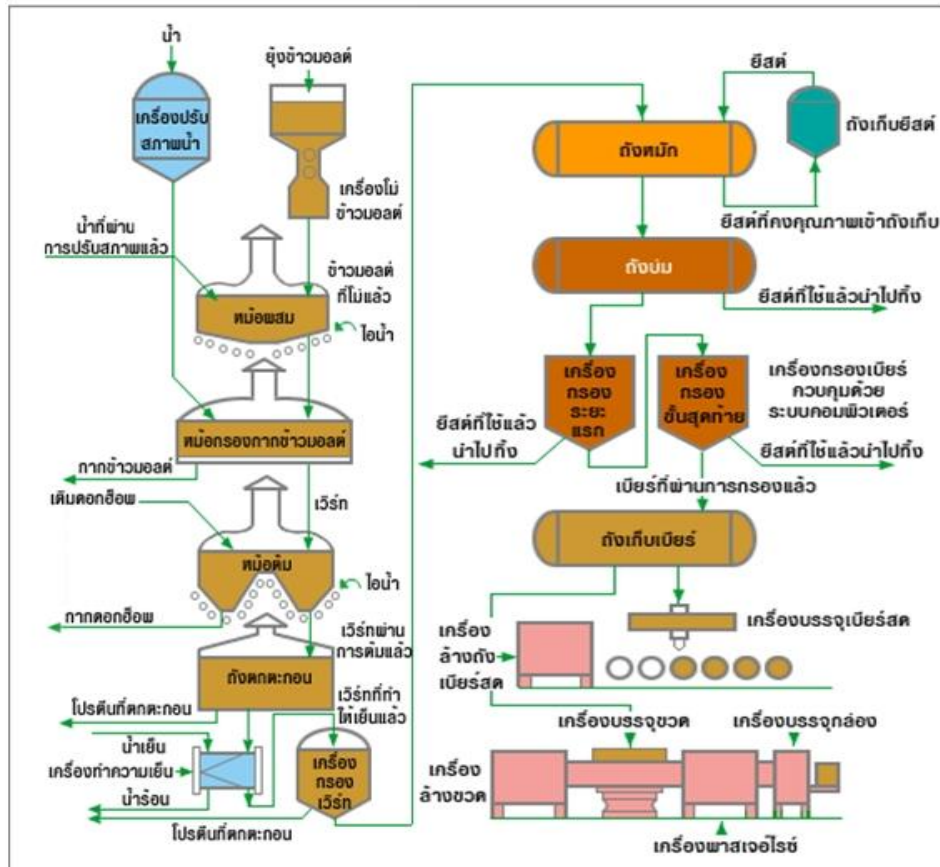
- มอลต์ : เมล็ดข้าวมอลต์ จากข้าวบาเลย์นั้นเป็นชนิดที่นิยมใช้มากที่สุด เนื่องจากมีปริมาณปริมาณเอนไซม์อะไมเลส (amylase enzyme) สูง ซึ่งทำให้กระบวนการแตกตัวของแป้งเป็นน้ำตาลนั้นเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว นอกเหนือจากข้าวมอลต์จากข้าวบาเลย์แล้ว เมล็ดธัญพืชอื่น ๆ เช่น ข้าวสาลี (wheat) ข้าวเจ้า (rice) ข้าวโพด (maize) ข้าวโอ๊ต (oat) และ ข้าวไรย์ (rye) ทั้งแบบที่ทำเป็นข้าวมอลต์ และ เมล็ดปกติยังสามารถใช้เป็นส่วนผสมอีกด้วย

- ฮอปส์ : ส่วนผสมซึ่งให้รสขมในเบียร์ เพื่อสมดุลรสหวานจากมอลต์ นอกจากนั้นยังมีผลเป็นยาปฏิชีวนะ ต่อต้านจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ไม่ใช่ยีสต์ ส่งผลต่อการหมัก

- ยีสต์ : ใช้ในกระบวนการหมักเพื่อย่อยสลายน้ำตาล ที่สกัดจากเมล็ดธัญพืช ให้เป็นแอลกอฮอล์ และ คาร์บอนไดออกไซด์ ยีสต์ที่ใช้แบ่งเป็น 2 ประเภทคือ ยีสต์หมักลอยผิว ยีสต์หมักนอนก้น

### กรรมวิธีการผลิตเบียร์

กรรมวิธีการผลิตเบียร์สามารถแบ่งได้เป็น 4 ขั้นตอนหลักๆ ได้แก่ การทำมอลต์ (malting), การผลิตเวิร์ท (wort production), การหมักเบียร์ (fermentation) และการบ่ม (beer ageing or maturation) แผนผังการผลิตเบียร์แสดงได้ดังรูปที่ 2.1



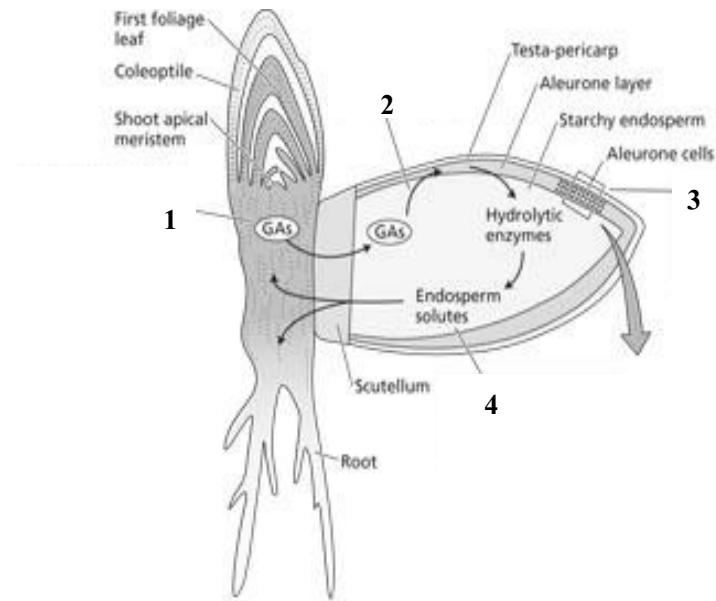
รูปที่ 2.1 แผนผังกรรมวิธีการผลิตเบียร์

1. การทำมอลต์ (malting) วัตถุประสงค์ของการทำมอลต์ คือ เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของธัญพืชให้มีความเหมาะสมในการนำมาผลิตเป็นเบียร์ ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ที่มีความจำเป็นต่อการผลิตน้ำเวิร์กในขั้นตอนต่อไป การทำมอลต์สามารถแบ่งออกได้ดังนี้

1.1 การแช่ข้าว (Steeping) การแช่ข้าวมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ข้าวมีความชื้นที่สูงขึ้นเพื่อทำให้เกิดความเหมาะสมในขั้นตอนการงอกต่อไป โดยปกติแล้ว ความชื้นที่เหมาะสมที่สุดในการงอกของข้าวนั้นอยู่ที่ประมาณ 35% (Gamlath *et al.*, 2008)

1.2 การงอก (Germination) ขั้นตอนนี้คือการตอนการผลิตมอลต์เพื่อใช้ในการทำเบียร์ทำได้โดยการทิ้งข้าวให้มียากาศไหลผ่าน (air rest) โดยมีการควบคุมอุณหภูมิและความชื้น ซึ่งควบคุมอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสมนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของข้าว ในระหว่างกระบวนการงอก ฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน (Gibberellic acid, GA) จะถูกสังเคราะห์ขึ้นในส่วนของคัพภะ (embryo) และแพร่ไปยังเยื่ออาร์โลน (aleurone layer) เพื่อให้เกิดกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ ได้แก่ แอลฟา และเบตา-อะไมเลส โปรติเอส และอื่นๆ และแพร่

ออกมายังส่วนที่เป็นแป้ง (starch endosperm) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะย่อยแป้งในเมล็ดข้าวให้เป็นอาหารสำหรับการสร้างเป็นยอดและรากต่อไป (Briggs, 1998) กลไกการงอกของข้าวแสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 กลไกการงอกของข้าว

- 1) GA ถูกสังเคราะห์ขึ้นในส่วนของคัพภะ
- 2) แพร่เข้าไปยังเชื้ออาวุธโคน
- 3) GA กระตุ้นการสร้างเอนไซม์ ได้แก่  $\alpha$ - และ  $\beta$ -อะไมเลส โปรติเอสและอื่นๆ และแพร่ ออกมายังส่วนที่เป็นแป้ง
- 4) เอนไซม์ย่อยสารประกอบขนาดใหญ่ (macromolecule) ให้เป็นสารประกอบขนาดเล็กลง (micromolecule)

**1.3 การอบมอลต์ (klining)** วัตถุประสงค์ของการอบมอลต์คือลดปริมาณความชื้นในมอลต์จาก 43% ลงเหลือประมาณ 5% ทำให้โดยผ่านลมร้อนเข้าไปในเมล็ดมอลต์เพื่อดึงเอาความชื้นออกมา การลดลงของความชื้นในมอลต์ช่วยชะลอกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีในมอลต์ อีกทั้งยังเพิ่มอายุการเก็บของมอลต์ นอกจากนี้กระบวนการอบมอลต์ยังช่วยทำให้เกิดการสร้างสีและกลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์เบียร์ ซึ่งเกิด

จากกระบวนการเมลลาร์ด (Maillard reaction) (Palmer, 2006) หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการอบมอลต์แล้ว รากและยอดของมอลต์จะถูกกำจัดออก

**2. การผลิตเวิร์ท (wort production)** กระบวนการนี้จะเป็นการผลิตน้ำหมักเบียร์เพื่อใช้ในการสร้างแอลกอฮอล์และกลั่นรสเฉพาะตัวโดยยีสต์ กรรมวิธีการผลิตเวิร์ทแบ่งออกได้ดังนี้

**2.1 การต้มมอลต์ (mashing)** กระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่สำคัญที่สุดในการผลิตน้ำเวิร์ท โดยมอลต์ที่บดแล้วจะถูกนำมาผสมกับน้ำในอัตราส่วนที่เหมาะสม และบ่มไว้ที่อุณหภูมิแตกต่างกันพร้อมกับการกวน วิธีดังกล่าวจะช่วยกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ ให้ทำหน้าที่ตามอุณหภูมิที่เหมาะสม ตัวอย่างเช่น เอนไซม์โปรติเอส ซึ่งทำหน้าที่ย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนมีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 50°C เอนไซม์เบตา-อะไมเลสซึ่งทำหน้าที่ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลมอลโตส (maltose) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 63°C

**2.2 การกรองเวิร์ท (lautering)** ทำหน้าที่แยกน้ำเวิร์ทออกจากกากมอลต์ หรือที่เรียกว่า spent grain เพื่อให้ได้น้ำเวิร์ทที่มีความใส และเหมาะสมกับกระบวนการต่อไป

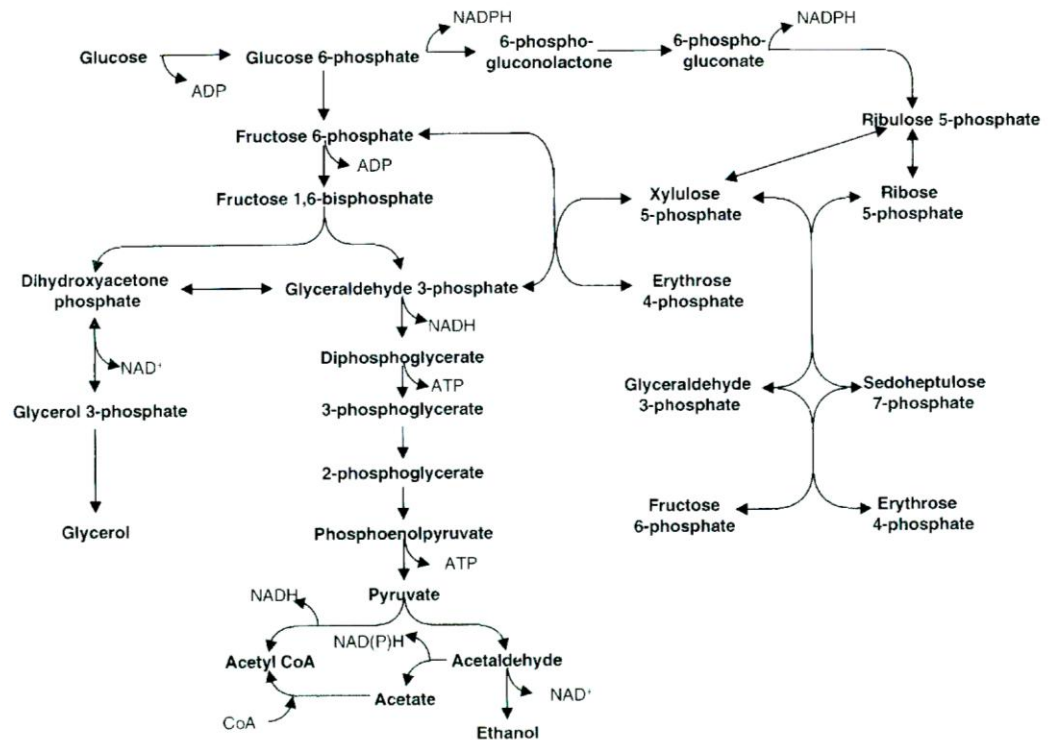
**2.3 การต้มฆ่าเชื้อเวิร์ทและการเติมฮ็อพส์ (wort boiling and hopping)** ขั้นตอนดังกล่าวจะทำการต้มน้ำเวิร์ทให้เดือดประมาณ 1 ชั่วโมง และในระหว่างการต้มจะมีการเติมฮ็อพส์ (hops) วัตถุประสงค์ของกระบวนการดังกล่าวมีดังนี้

- หยุดกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดในกระบวนการต้มมอลต์
- ฆ่าจุลินทรีย์เชื้อทั้งหมดที่มีในน้ำเวิร์ท ซึ่งได้แก่ แบคทีเรีย รา ยีสต์ ที่อาจก่อให้เกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์ในผลิตภัณฑ์เบียร์
- ตกตะกอนโปรตีนที่ยังหลงเหลืออยู่ในน้ำเวิร์ทที่อาจก่อให้เกิดความขุ่นในเบียร์
- กระตุ้นให้เกิดการสร้างสารประกอบไดเมทิล ซัลไฟด์ (dimethyl sulfite, DMS) ซึ่งสารดังกล่าวเป็นสารที่ทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะตัวในเบียร์ โดยมีปริมาณที่ยอมรับได้ในช่วง 30-100  $\mu\text{g/L}$  (Bamforth, 2009; Hansen, 1999)

- สกัดสารประกอบที่ให้ความขมออกจากฮ็อพส์
- ทำให้ผลิตภัณฑ์เบียร์มีสีที่ชัดเจน

### 3. การหมักเบียร์ (Beer fermentation)

วัตถุประสงค์หลักของการหมักเบียร์คือ การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลและกรดอะมิโนโดยยีสต์ ที่เติมลงไป ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน โดยยีสต์จะบริโภคน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุลและเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิก (pyruvic acid) 2 โมเลกุล ผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) และจากสภาวะไร้อากาศ กรดไพรูวิกจะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และ ATP อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการเติมอากาศเข้าไปเมื่อเริ่มต้นกระบวนการ (wort aeration) เพื่อกระตุ้นการทำงานของยีสต์ที่เติมลงไป (Depraetere *et al.*, 2008) แผนผังกระบวนการผลิตเอทานอลแสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แผนผังกระบวนการผลิตเอทานอลจากกลูโคส

4. การบ่มเบียร์ (Aging and maturation) วัตถุประสงค์ของกระบวนการบ่มเบียร์คือ ปรับกลิ่นรสของเบียร์ให้มีความละมุนมากขึ้น การบ่มเบียร์ยังสามารถช่วยกำจัดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ออกไปได้ เช่น สารกลุ่มไดอะซีทิล (diacetyl) และกลุ่มสารประกอบซัลเฟอร์ โดยสารกลุ่มไดอะซีทิลหรือสารกลุ่มวิซิโนล ไดคิ

โตน (vicinal diketones, VDKs) เป็นสารที่ทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดีในเบียร์ เมื่อมีปริมาณอยู่ในช่วง 0.1 – 0.14 มก./ลิตร

การบ่มเบียร์ยังทำช่วยให้เบียร์มีความคงตัวมากยิ่งขึ้น ซึ่งส่วนมากจะบ่มเบียร์ที่อุณหภูมิต่ำ (ประมาณ  $0^{\circ}\text{C}$ ) เพื่อให้เซลล์ยีสต์และสารแขวนลอยตกลงสู่ก้นถัง ทำให้เบียร์มีความใสมากขึ้น หรือบางที่อาจใช้วิธีการกรองเบียร์ผ่านตัวกรองด้วย



## บทที่ 3

### วิธีการศึกษา

#### 3.1 วัสดุ

##### 3.1.1 ข้าวและสายพันธุ์ของข้าวบาร์เลย์

ข้าวที่ใช้สำหรับการทำมอลต์และเบียร์เป็นข้าวเมล็ดสั้น สายพันธุ์ CP13 ซึ่งได้รับการสนับสนุนจาก บริษัทเจริญโภคภัณฑ์ มหาชนจำกัด ส่วนมอลต์ของข้าวบาร์เลย์ที่ใช้สำหรับทำเบียร์ได้รับการสนับสนุนจาก บริษัทขอนแก่นบรูเวอรี่ จำกัด

##### 3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* no.34 ซึ่งใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ ซึ่งได้มาจากมหาวิทยาลัย Munich (TUM), Weihenstephan, Germany

##### 3.1.3 เอนไซม์ทางการค้า

เอนไซม์ Termamyl SC<sup>®</sup> ซึ่งเป็น heat stable  $\alpha$ -amylase ซึ่งมี 120 kiloNovo unit (KNU) และเอนไซม์ Nuetrase<sup>®</sup> ซึ่งเป็นเอนไซม์ protease ของบริษัท Novozymes Inc.

##### 3.1.4 ฮีบส์ (Hop)

ฮีบส์อัดเม็ดชนิด Hopsteiner P90 (4.3 %  $\alpha$ -acid) ของบริษัท Hopsteiner, Mainburg, Germany

#### 3.2 คุณภาพของข้าว

การวิเคราะห์องค์ประกอบพื้นฐานของข้าว ประกอบด้วย ปริมาณความชื้น ปริมาณเส้นใย ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณไขมัน ปริมาณเถ้า และปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่สามารถนำไปใช้ได้จะถูกวิเคราะห์ตาม AOAC (1990) ร้อยละของการงอกจะทำการวัดด้วยวิธี EBC (1998)

### 3.3 การผลิตมอลต์จากข้าว

ขั้นตอนของการทำมอลต์จะทำการแช่เมล็ดข้าว สลับกับการผึ่งอากาศ ซึ่งสรุปอยู่ในตารางที่ 3.1 อุณหภูมิที่ใช้ในการทำการงอกและความชื้นสัมพัทธ์ในตู้บ่มจะถูกควบคุมที่ 30°C และ 99 % ตามลำดับ ข้าวงอกจะถูกเก็บที่ 1, 3, 5, 7 และ 9 วัน หลังจากเริ่มทำการงอก และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนของรากและต้นจะถูกแยก และนำไปเก็บที่ 4°C คุณภาพของมอลต์จะถูกประเมินโดยการวิเคราะห์ค่าการสูญเสียน้ำหนัก (malting loss), อะมิโนไนโตรเจนอิสระ (free amino nitrogen ; FAN), ค่า extract content, อุณหภูมิของการ gelatinization, วัดความสามารถในการเกิดย่อยของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase และ  $\beta$ -amylase

ตารางที่ 3.1 ขั้นตอนการทำมอลต์

1 <sup>st</sup> day- 2 <sup>nd</sup> day	3 <sup>rd</sup> day – 4 <sup>th</sup> day	5 <sup>th</sup> day - 6 <sup>th</sup> day	7 <sup>th</sup> day - 8 <sup>th</sup> day	9 <sup>th</sup> day
Steeping 8 h	Steeping 4 h	Steeping 10 h	Steeping 20 h	Steeping 24 h
Air rest 4 h	Air rest 8 h	Air rest 2 h	Air rest 4 h	
Steeping 8 h	Steeping 4 h	Steeping 10 h		
Air rest 4 h	Air rest 8 h	Air rest 2 h		

### 3.4 การหาสภาวะของการทำมอลต์ที่เหมาะสมการผลิตเป็นน้ำเวิร์ท

#### 3.4.1 เวลาที่ใช้ในการทำมอลต์

เวลาที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ protease (ที่ 50°C) และเวลาที่ใช้สำหรับการ saccharification (ที่ 95°C) จะถูกประเมิน การทำโปรเกรมของอุณหภูมิจะเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 50 °C เป็นเวลา 30 - 90 นาที ตามด้วย 63 °C เป็นเวลา 40 นาที และ 95 °C เป็นเวลา 30 – 90 นาที สภาวะของการทำมอลต์ ประกอบด้วย ข้าวที่ทำการงอกเป็นเวลา 3 วัน สัดส่วนของมอลต์จากข้าว, ปริมาณของเอนไซม์ทางการค้าของ  $\alpha$ -amylase ที่ 0.25 กรัมต่อ 100 กรัมของมอลต์ และเอนไซม์ protease ที่ 0.25 กรัมต่อ 100 กรัมของมอลต์ คุณภาพของน้ำเวิร์ท จะถูกวิเคราะห์ โดยทำการวัด ร้อยละของ extract content, FAN, และ ปริมาตรที่สามารถกรองได้



### 3.4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการทำมอลต์โดยใช้ RSM

น้ำ เวิร์ท ที่ได้จากการทำ mashing ในอ่างน้ำร้อน (Julabo TW12) โดยนำมอลต์ที่ผ่านการบด 50 กรัม เติมน้ำ 250 มิลลิลิตร และทำการกวนที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมจากการทดสอบในหัวข้อ 3.4.1 ถูกนำมาใช้ น้ำ เวิร์ท จะถูกนำมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman®, ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 110 มิลลิเมตร) และนำมาทำการวิเคราะห์คุณภาพของน้ำ เวิร์ท การออกแบบการทดลองจะใช้ Design Expert software เวอร์ชัน 7.1 (Stat-Ease Inc., USA) การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเบียร์โดยใช้มอลต์จากข้าวจะทำการตั้งค่าของโปรแกรม RSM โดยใช้แบบ face center composite design ซึ่งจะทำการเลือกตัวแปรที่ใช้ในการวิเคราะห์ 4 ชนิด ได้แก่ เวลาที่ใช้ในการงอกของข้าว ( $x_1$ ), สัดส่วนของมอลต์จากข้าวและบาร์เล่ ( $x_2$ ), ปริมาณของเอนไซม์ทางการค้าที่เติมประกอบด้วย Termamyl SC® ( $x_3$ ), และ Neutrase® ( $x_4$ ) ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ตัวแปรและระดับของตัวแปรต่างๆ

Variables	Codes	Variable levels		
		-1	0	1
Germination time of rice (days)	$x_1$	1	3	5
Rice malt (%)	$x_2$	50	75	100
$\alpha$ -amylase addition (g/100g malt)	$x_3$	0	0.25	0.5
Protease addition (g/100g malt)	$x_4$	0	0.25	0.5

หลังจากออกแบบ จำนวนตัวอย่างที่จะทำการทดสอบทั้งหมด 52 ชุด (2 ซ้ำ) ตัวแปรตามที่ทำ การวิเคราะห์ ได้แก่ extract content (%) ( $y_1$ ), ปริมาณของ FAN (มิลลิกรัมต่อลิตร) ( $y_2$ ), ค่า yield (%) ของน้ำ เวิร์ท ที่ทำหาปรับความหวานที่ 12°P (degree plato) ( $y_3$ ), และ fermentable sugar (กรัมต่อลิตร)

( $y_4$ ) ซึ่งเป็นผลรวมของน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส มอลโตส และมอลโตโรไตรโอส ค่าของตัวแปรตัวแปรตามแต่ละตัวจะแสดงออกอย่างเป็นเอกเทศ ซึ่งจะสัมพันธ์กับตัวแปรอิสระ

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำ เวิร์ท จะถูกเลือกโดยอาศัยเกณฑ์จาก ค่า extract content ของน้ำ เวิร์ท จะต้องมามีค่าไม่น้อยกว่า 80 %, ปริมาณของ FAN จะต้องอยู่ในช่วง 220 – 350 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่า yield ของน้ำ เวิร์ท จะต้องมามีค่าไม่น้อยกว่า 85%

### 3.5 การหมักในระดับห้องปฏิบัติการ

#### 3.5.1 การเตรียมเชื้อยีสต์

เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* No.34 ซึ่งทำการหมักแบบ bottom fermentation ได้ถูกทำการเตรียมโดยนำเชื้อ 2 ลูกปัดลงในอาหาร YM (มีองค์ประกอบของ สารสกัดยีสต์ 3 กรัมต่อลิตร สารสกัดมอลต์ 3 กรัมต่อลิตร แป้งโพทอน 5 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร) ที่มีปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำอาหารมาทำการเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการแยกเซลล์ยีสต์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที (Sorvall RC 5C plus, U.S.A.) และนำเซลล์ที่ได้ไปเติมลงไปใต้น้ำเวิร์ท ที่มีปริมาตร 1 ลิตร เพื่อทำเป็นหัวเชื้อ โดยการเลี้ยงเชื้อในน้ำเวิร์ท จะมีการให้อากาศเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์และทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 14°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของเซลล์จะถูกนับโดยใช้ Haematocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทำการคำนวณปริมาตรของหัวเชื้อ โดยต้องการเชื้อที่ความเข้มข้น  $1.2 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในน้ำเวิร์ท

#### 3.5.2 สภาวะที่ใช้ในการหมัก

วิธีการทำ mashing ที่เหมาะสมจะถูกเลือกเพื่อทำการศึกษาการหมักและการผลิตเบียร์ โดยน้ำเวิร์ท ที่ทำการเตรียมตามหัวข้อที่ 3.5.1 และทำการปรับความหวานที่ 12°P น้ำเวิร์ทที่ได้จะถูกนำมาฆ่าเชื้อโดยการต้มที่ 100°C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง น้ำเวิร์ทที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 3 ลิตรจะถูกนำมาลงไปในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่ทำการฆ่าเชื้อไว้แล้ว (Sartorius Biostat, Germany) เชื้อยีสต์ที่ทำการหมักแบบ bottom fermentation ที่  $1.2 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตรจะถูกเติมลงไป ที่อุณหภูมิ 14°C และทำการกวนที่ 50 รอบต่อนาที น้ำเวิร์ทที่ทำการหมักจะถูกเก็บทุกๆ 12 ชั่วโมงเพื่อทำการวัดค่า pH, ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต, ปริมาณ FAN, ปริมาณเอทานอล, และปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณของ fermentable sugar ในน้ำเวิร์ทจะถูกวิเคราะห์ ซึ่งประกอบไปด้วย น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส

มอลโตส และมอลโตริโตรไอส การหมักจะสิ้นสุดที่เวลา 120 ชั่วโมง และจะทำการวิเคราะห์ร้อยละของการใช้ FAN และน้ำตาลรีดิวซ์

### 3.6 การหมักในถังหมักขนาด 50 ลิตร

สถานะที่ได้จากการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการของการทำ mashing และการหมัก จะถูกประยุกต์ในการผลิตเบียร์ในถังหมักขนาด 50 ลิตร โดยจะใช้มอลต์ที่ทำการบดแล้ว 10 กิโลกรัมและเติมน้ำปริมาตร 50 ลิตร โปรแกรมของอุณหภูมิและเวลาจะถูกใช้ตามการทำในระดับห้องปฏิบัติการ เมื่อทำการ mashing เสร็จ น้ำเวิร์ทและกากจะถูกแยกออกจากกัน นำน้ำเวิร์ทไปต้มที่ 100°C เป็นเวลา 60 นาที และทำการเติมฮ็อบส์ ให้ได้ค่าความขมที่ 25 BU (มิลลิกรัมของสารที่ให้ความขมต่อลิตรของน้ำเวิร์ท) น้ำเวิร์ทที่ทำมาฆ่าเชื้อจะถูกนำมาทำให้ใสและทำให้เย็นที่ 14°C การทำการหมักจะทำตามสถานะที่ใช้ในการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำมาบ่มที่ 4°C เป็นเวลา 1 อาทิตย์ ตะกอนยีสต์จะถูกแยกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบอนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C และทำการอัดแก๊ส CO<sub>2</sub> ลงไปในถังเก็บความดันและบ่มที่ 4°C เป็นเวลา 1 อาทิตย์ คุณสมบัติทางกายภาพของเบียร์ ได้แก่ สี, การวิเคราะห์รสสัมผัส, และปริมาณของสารที่สามารถระเหยได้ ซึ่งได้แก่ แอลกอฮอล์, เอสเทอร์, อัลดีไฮด์, DMS, และ diacetyl จะถูกทำการวิเคราะห์

### 3.7 วิธีการวิเคราะห์

#### 3.7.1 การวิเคราะห์คุณภาพของมอลต์

##### 3.7.1.1 การสูญเสียน้ำหนักของมอลต์ (Malting loss)

การสูญเสียน้ำหนักของมอลต์จะทำการคำนวณตาม Nirmala และคณะ (2000) ดังสมการ:

$$\% \text{Malting loss} = \frac{\text{wt. of 100 grains} - \text{wt. of 100 malt}}{\text{wt. of 100 grains}} \times 100 \quad \text{----- (6)}$$

##### 3.1.7.2 การวัดความสามารถของเอนไซม์ $\alpha$ -amylase และ $\beta$ -amylase ในมอลต์

การวิเคราะห์ความสามารถในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase และ  $\beta$ -amylase จะทำตาม Iwouh และ Aina (1997) การสกัด crude เอนไซม์จะทำการสกัดโดยนำ 1 กรัมของมอลต์ที่ทำการบดมาเติม 9 มิลลิลิตรที่มีความเข้มข้นของ 50 mM ของ Tris.HCL ที่ pH 7.4 กับ 3 mM CaCl<sub>2</sub> และ 4 mM ของ NaCl จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และทำการเขย่าที่นาที่ 15 จากนั้น crude เอนไซม์จะถูกกรองผ่านสำลีและทำการปั่น

เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที ส่วนที่เป็นของเหลวจะถูกเก็บบนน้ำแข็งเพื่อรอการวิเคราะห์

ความสามารถในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase และ  $\beta$ -amylase จำทำการวัดหาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากย่อยแป้ง สำหรับเอนไซม์  $\alpha$ -amylase 0.5 มิลลิลิตรของ crude เอนไซม์จะถูกนำไปบ่มที่ 70°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อที่กระตุ้นความสามารถในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ในจุดที่ 0 นา 5 มิลลิลิตรของสารตั้งต้น ซึ่งประกอบด้วย 1 % (w/v) ของแป้งมันฝรั่ง ในบัฟเฟอร์ของ acetate (pH 5.5) ที่ความเข้มข้น 50 mM กับ 0.003 %  $\text{CaCl}_2$  จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที สำหรับความสามารถในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์  $\beta$ -amylase จำทำเหมือนกับการวิเคราะห์หาความสามารถในการทำปฏิกิริยาของ  $\alpha$ -amylase แต่จะทำการบ่มที่ 50°C โดยใช้สารตั้งต้นเป็น 1 % (w/v) ของแป้งมันฝรั่ง ในบัฟเฟอร์ของ Citrate (pH 3.6) ที่ความเข้มข้น 50 mM กับ 1 mM EDTA จากนั้นทำการวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ โดยทำการเติม 1 มิลลิลิตรของสารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid แล้วนำไปต้มที่ 100°C เป็นเวลา 5 นาที และทำการเจือจางด้วยน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm โดยใช้เครื่อง spectrophotometer (Ultrospec 2000, Pharamacia Biotech)

การทำกราฟมาตรฐานของกลูโคสจะทำการวัดความเข้มของแสงของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.8, และ 1 กรัมต่อลิตร โดยวิธีการจะทำเหมือนกับการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

### 3.7.1.3 สารสกัดของมอลต์

สารสกัดของมอลต์จากข้าวจะทำตาม EBC 4.5.1 (1998) โดยนำ 50 กรัม ของมอลต์บด เติมน้ำ 200 มิลลิลิตร ทำการกวนที่ 100 รอบต่อนาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิจนกระทั่งมีอุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจะทำการเพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 1°C เป็นเวลา 25 นาที เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจะถึง 70°C จะทำการเติมน้ำ 100 มิลลิลิตร ของน้ำที่มีอุณหภูมิ 70°C แล้วบ่มไว้ 60 นาที จากนั้นทำการลดอุณหภูมิลงจนถึงอุณหภูมิจึง แล้วทำการกรองแยกกาก จากนั้นนำน้ำ 200 มิลลิลิตร เติมลงไปในการที่กรองได้ แล้วกรองแยกตะกอนอีกครั้ง น้ำตาลที่สามารถละลายได้จะถูกวัดด้วย hand refractometer ที่อุณหภูมิ 20°C ค่า extract content จะคำนวณจากสมการ:

$$E_1[\%(m/m)] = \frac{P(M + 800)}{100 - P} \quad \text{----- (7)}$$

$$E_2[\%(m/m)] = \frac{E_1 \cdot 100}{100 - M} \quad \text{----- (8)}$$

เมื่อ

$E_1$  = ค่าสารสกัดของตัวอย่าง (% m/m)

$E_2$  = ค่าสารสกัดของมอลต์แห้ง (%m/m)

$P$  = ค่า extract content ในน้ำเวิร์ท (°P)

$M$  = ปริมาณความชื้นของมอลต์ (% m/m)

#### 3.7.1.4 อะมิโนไนโตรเจนอิสระ (Free amino nitrogen; FAN) ของมอลต์

FAN ของมอลต์จะถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี Ninhydrin (EBC 7.6, 1998) โดยนำ 2 มิลลิลิตรของผลผลิตที่ได้จากการทำ congress mash มาผสมกับ 1 มิลลิลิตรของรีเอเจนที่มีองค์ประกอบของ Ninhydrin 5 กรัมที่ละลายอยู่ในน้ำ 1 ลิตร ซึ่งมี  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100 กรัม,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  60 กรัม, และน้ำตาลฟรุกโตส 3 กรัม ทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองที่แช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 16 นาทีและทำให้เย็นที่  $20^\circ\text{C}$  จากนั้นเติมสารละลายเพื่อทำการเจือจาง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีองค์ประกอบของ  $\text{KIO}_3$  2 กรัม ในน้ำ 600 มิลลิลิตรและ 96% เอทานอล 400 มิลลิลิตร และทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร สารละลายไกลซีนมาตรฐานถูกเป็นตัวเปรียบเทียบ โดยมีปริมาณของไกลซีนที่ละลายอยู่ 0.172 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร ก่อนใช้จะทำการเจือจาง 100 เท่า ค่าปริมาณของ FAN จะถูกคำนวณตามสมการ:

$$FAN_M = \frac{F \cdot E'}{10 \cdot E_w} \quad \text{----- (9)}$$

เมื่อ

$FAN_M$  = อะมิโนไนโตรเจนอิสระในมอลต์ (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)

$F$  = อะมิโนไนโตรเจนอิสระในน้ำเวิร์ท (มิลลิกรัมต่อลิตร)

$E'$  = สารสกัดจากมอลต์แห้ง (%)

$E_w =$  น้ำหนัก (กรัม) ของสารสกัดใน 100 มิลลิลิตรของน้ำเวิร์ท (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)

### 3.7.1.5 อุณหภูมิของการ gelatinization

ตัวอย่างของมอลต์จากข้าวที่ทำการบดมาแล้วจะถูกร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.2 มิลลิเมตร อุณหภูมิของการ gelatinization จะถูกวิเคราะห์โดย rapid visco analyzer RVA Super 4 (Newsport Scientific, Warriewood, Australia) ตามที่ KeBler และคณะ (2005) รายงาน

## 3.7.2 การวิเคราะห์คุณภาพของน้ำเวิร์ท และเบียร์

### 3.7.2.1 Viable cell count

การนับจำนวนเซลล์ของยีสต์ในน้ำเวิร์ท ระหว่างทำการหมักจะใช้ Haemocytometer โดยนำตัวอย่างน้ำเวิร์ท หมักมาทำการเจือจางด้วยน้ำ DI แล้วทำการเติมสีย้อม (สารละลาย methylene blue มีปริมาณของ methylene blue 0.1 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร) และทำการนับใต้กล้องจุลทรรศน์

### 3.7.2.2 น้ำตาลรีดิวส์ในน้ำเวิร์ท

ปริมาณของน้ำตาลรีดิวส์ของน้ำเวิร์ท จะถูกวิเคราะห์ตาม Miller (1951) โดยนำ 1 มิลลิลิตรของน้ำเวิร์ท ที่ทำการเจือจางมาแล้วมาเติมสารละลาย DNS (มีองค์ประกอบของ 3,5-dinitrosalicylic acid 10 กรัม, 300 กรัม ของ  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$  ใน 200 มิลลิลิตร ของ 2N NaOH และทำการปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำ RO) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำสารผสมที่ได้ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวส์จะถูกคำนวณเทียบกับค่าที่ได้จากสารละลายมาตรฐานของกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, และ 1.0 กรัมต่อลิตร

### 3.7.2.3 อะมิโนไนโตรเจนอิสระ (Free amino nitrogen; FAN) ของน้ำเวิร์ท

FAN ของน้ำเวิร์ท และเบียร์จะถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี Ninhydrin (EBC 8.10, 1998) โดยนำ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่างมาเจือจางกับน้ำ DI 100 มิลลิลิตร จากนั้น นำ 1 มิลลิลิตรของตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้ว มาผสมกับ 1 มิลลิลิตรของรีเอเจน Ninhydrin ทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองที่แช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 16 นาทีและทำให้เย็นที่  $20^\circ\text{C}$  จากนั้นเติมสารละลายเพื่อทำการเจือจาง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

และทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร สารละลายไกลซีนมาตรฐานถูกเป็นตัวเปรียบเทียบ ค่าปริมาณของ FAN จะถูกคำนวณตามสมการ:

$$FAN(mg / L) = \frac{A_1 \times 2d}{A_2} \quad \text{----- (10)}$$

เมื่อ  $A_1$  = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm  
 $A_2$  = ค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 570 nm  
 $d$  = ค่าการเจือจางของตัวอย่าง

#### 3.7.2.4 ปริมาณของสารสกัดของน้ำเวิร์ท

ค่า extract content จะถูกวิเคราะห์หาปริมาณของน้ำตาลที่สามารถละลายได้ของน้ำเวิร์ท ระหว่างกระบวนการหมัก ด้วย hand refractometer ที่อุณหภูมิ 20°C ค่าของ extract content จะถูกคำนวณตามสมการ:

$$E[\%(m/m)] = \frac{P(M + W)}{100 - P} \quad \text{----- (11)}$$

เมื่อ  $E$  = ค่า extract content ของตัวอย่าง (% m/m)  
 $W$  = ปริมาณของน้ำต่อ 100 กรัมของมอลต์ (มิลลิลิตร)  
 $P$  = ค่า extract content ในน้ำเวิร์ท (°P)  
 $M$  = ค่าความชื้นของมอลต์ (% m/m)

#### 3.7.2.5 น้ำตาลที่สามารถนำไปใช้หมักได้ (fermentable sugar) และเอทานอลในน้ำเวิร์ท และเบียร์

น้ำตาลที่สามารถนำไปใช้หมักได้ ในน้ำเวิร์ท ที่ช่วงเวลาต่างๆ ของการหมักและในเบียร์ ซึ่งจะประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส และมอลโตรไทรโอส จะถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ตัววัดการหักเหแสง (Refractive Index; RI) การวิเคราะห์หารปริมาณจะทำการเทียบกับสารมาตรฐานของ น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส และมอล

ไตรไตรโอส ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, และ 1.0 กรัมต่อลิตร และสารละลายมาตรฐานของเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, และ 1.0 % v/v การวิเคราะห์ตัวอย่าง จะนำตัวอย่างมาทำการเจือจางที่อัตราส่วน 1 ต่อ 50 โดยใช้ น้ำ DI ในการเจือจาง แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45  $\mu\text{m}$  (Whatman<sup>®</sup> 47mm diameter) ตัวอย่างจะถูกฉีด 10  $\mu\text{L}$  ผ่านคอลัมน์ Vertisept<sup>™</sup> OA (300x7.8 mm) โดยใช้ น้ำ DI เป็นเฟสเคลื่อนที่ที่อัตรา 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 30°C

### 3.7.2.6 การประกอบที่สามารถระเหยได้และแอลกอฮอล์หนักในเบียร์

การประกอบที่สามารถระเหยได้และแอลกอฮอล์หนักในเบียร์จะทำการวัดด้วยวิธีมาตรฐาน EBC 9.12 (1998) โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography (CP3800) ที่ต่อกับ mass detector (1200L Quadrupole MS/MS) (Varian) โดยตัวอย่างจะถูกให้ความร้อนที่ 70°C และกวนที่ 600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ตัวอย่างของสารที่สามารถระเหยได้จะถูกเก็บโดย Polydimethylsiloxane (PDMS) fiber syringe

ตัวอย่างและสารมาตรฐานจะถูกฉีดและทำการแยกโดยคอลัมน์ WAX (60 m x 0.25 mm i.d. ; 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness) (Agilent, USA) โปรแกรมของคอลัมน์จะทำที่ 35°C เป็นเวลา 5 นาที และทำการเพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 6°C ต่อนาที จนถึง 230°C (รวมเวลาทั้งหมด 37.5 นาที) ทำการวัด electronic impact ที่ EI0 ที่ -70 eV ที่อุณหภูมิ 220°C อัตราการ scan ที่ 1 scan ต่อวินาที อัตราเร็วของแก๊สฮีเลียมที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที การระบุชนิดของสารที่สามารถระเหยได้จะอาศัยการเปรียบเทียบค่า retention time และ mass spectra กับข้อมูลมาตรฐาน NIST Mass spectral search Program สำหรับ NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library version 2.0 (National Institute of Standard and Technology, U.S.A.)



ตารางที่ 3.3 ความเข้มข้นของสารมาตรฐานของสารประกอบที่สามารถระเหยได้

Volatile compounds	Concentration levels (ppm)					
	1	2	3	4	5	6
DMS	5	10	20	30	40	50
Acetaldehyde	5	10	20	30	40	50
Isoamyl alcohol	10	20	40	60	80	100
Propanol	10	20	40	60	80	100
Isobutanol	10	20	40	60	80	100
Ethyl acetate	10	20	40	60	80	100
Isoamyl acetate	5	10	20	30	40	50
2-Phenyl ethyl acetate	10	20	40	60	80	100
Ethyl octanoate	10	20	40	60	80	100
Ethyl decanoate	10	20	40	60	80	100
Octanoic acid	10	20	40	60	80	100

### 3.7.2.7 สีของเบียร์

สีของเบียร์จะทำการวัดด้วยวิธี spectrophotometric ซึ่งจะทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 nm และคำนวณตาม EBC 8.5 (1998) ดังสมการ:

$$\text{Color (EBC units)} = A. f. 25 \quad \text{----- (12)}$$

เมื่อ  $A$  = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 430 nm (ใช้เซลล์ขนาด 10 mm)

$f$  = ค่าการเจือจาง

### 3.7.3 การวิเคราะห์รสสัมผัสของเบียร์

การวิเคราะห์รสสัมผัสของเบียร์จะใช้นักชิม 12 คน ที่มีประสบการณ์ในการดื่มเบียร์ โดยจะทำการให้คะแนนของแต่ละคุณลักษณะ ซึ่งจะมีคะแนน 5 ระดับของ ลักษณะที่ปรากฏภายนอกของเบียร์ กลิ่น รสชาติ รสสัมผัสในปาก และองค์ประกอบโดยรวมทั้งหมด โดยคะแนนระดับ 0 หมายถึง ไม่ชอบอย่างมาก, คะแนนระดับ

1 หมายถึง ไม่ชอบ, คะแนนระดับ 2 หมายถึง ปกติ, คะแนนระดับ 3 หมายถึง ชอบ, และคะแนนระดับ 4 หมายถึง ชอบอย่างมาก ส่วนองค์ประกอบโดยรวมทั้งหมด จะให้คะแนน 0 - 5 หมายถึง คะแนน 0 = ดื่มไม่ได้, คะแนน 1 = ดื่มได้แต่จะไม่สั่งอีก, คะแนน 2 = ดื่มได้ละขออีกแก้ว, คะแนน 3 = เยี่ยม, คะแนน 4 = เยี่ยมมาก, คะแนน 5 = สุดยอด

### 3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติใช้ SPSS เวอร์ชัน 14 (SPSS Inc.) โดยการทดลองทั้งหมดจะทำ 2 ซ้ำ การวิเคราะห์ทางสถิติจะทำการประเมิน Completely Randomized Design (CRD) การวิเคราะห์ความแปรผัน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ค่า  $p < 0.05$



## บทที่ 4

### ผลการศึกษา

#### 4.1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการและคุณสมบัติทางกายภาพของข้าว

ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการ ได้แก่ ความชื้น, โปรตีน, ไขมัน, คาร์โบไฮเดรต, ใยอาหาร และเถ้า รวมไปถึงคุณสมบัติทางกายภาพของข้าว ได้แก่ อุณหภูมิเจลลิตไนซ์ และเปอร์เซ็นต์การงอกของข้าวที่ใช้ในการศึกษา (ข้าวลูกผสม CP13) ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของข้าวลูกผสม CP13

Nutrients	Chemical composition (%)
Starch	61.8
Moisture content	11.5
Crude fiber	8.8
Crude protein (N=5.95)	7.5
Ash	7.3
Crude fat	3.0
Germination (%)	96.0
Gelatinization temperature (°C)	95.0

#### 4.2 การศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการงอกต่อคุณภาพของข้าวมอลต์

กระบวนการการผลิตข้าวมอลต์ จะทำโดยการแช่ (steeping) สลับกับการผึ่งข้าว (air rest) ดังในตารางที่ 3.1 อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการงอกจะถูกควบคุมที่ 30 องศาเซลเซียส และควบคุมค่าความชื้นสัมพัทธ์ที่ 99 เปอร์เซ็นต์ ในตู้บ่ม ตัวอย่างข้าวมอลต์ถูกเก็บที่ 1, 3, 5, 7, 9 วันหลังจากการทำงอก จากนั้น ตัวอย่างข้าวมอลต์ที่ได้ ถูกอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการแยกกล้าต้นและราก และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์คุณภาพของตัวอย่างข้าวมอลต์โดยทำการวิเคราะห์ malting loss, free amino

nitrogen (FAN), extract content, อุณหภูมิของการ gelatinization ของ  $\alpha$ -amylase และ อุณหภูมิของการ gelatinization ของ  $\beta$ -amylase

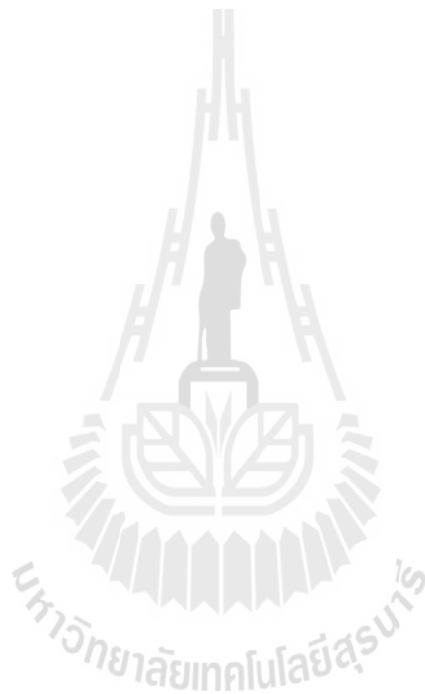
เมื่อนำตัวอย่างข้าวที่ทำการเก็บที่ 1, 3, 5, 7, and 9 วัน หลังทำการงอก มาทำการวิเคราะห์หาค่า malting loss, ปริมาณของ extract, ค่า FAN,  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -amylase activities ซึ่งแสดงดังในตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบกับข้าวเปลือก จากผลการทดลองข้าวมอลต์ จะมีการสูญเสียมวลระหว่างกระบวนการงอก เป็นผลจากการนำไปใช้ในกระบวนการสร้างต้น และรากของข้าว ซึ่งต้นและรากจะถูกแยกออกหลังจากทำการอบ ซึ่งทำให้อัตราของค่า malting loss เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกระบวนการงอก และเมื่อทำการเพาะเมล็ดข้าว ที่ วันที่ 7 และ 9 พบว่า ค่า malting loss จะอยู่ที่ 29% และ 38% ซึ่งในทางปฏิบัติแล้ว ค่า malting loss ที่ยอมรับ ในการทำมอลต์จะมีค่าได้ไม่เกิน 20% ซึ่งถ้าค่าของ malting loss สูงกว่า 20% จะทำให้ต้นทุนของการผลิต มอลต์และเบียร์สูงและไม่คุ้มกับการลงทุน

ค่า extract content ซึ่งหาได้จากการนำตัวอย่างข้าวมอลต์มาละลายในน้ำร้อนซึ่งองค์ประกอบหลักของ ค่า extract content คือน้ำตาลที่สามารถละลายได้ จากผลการทดลอง พบว่า เมื่อทำการงอกเป็นเวลา 1 วัน ค่า extract content ของข้าวมอลต์ที่ได้ มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับข้าวเปลือกที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม ที่  $P < 0.05$  ขณะที่ค่า extract content ของข้าวมอลต์ที่ได้จากการข้าวที่ทำการงอกเป็นเวลา 3-9 วัน ค่า extract content ของข้าวมอลต์ที่ได้สูงสุดอยู่ที่วันที่ 9 โดยมีค่า extract content อยู่ที่ 45.6% อย่างไรก็ตาม ค่า extract content ของข้าวมอลต์ ก็ยังต่ำกว่าค่า extract content ที่ได้จากบาร์เลย์มอลต์ ซึ่งมีค่า extract content อยู่ที่ 80% ทั้งนี้เนื่องจากข้าวมอลต์มีปริมาณของเอนไซม์ต่ำกว่าบาร์เลย์มอลต์ ซึ่งเป็นผลจากการทดสอบ  $\alpha$ -amylase activity ในการทำ mashing ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

ค่า FAN ของข้าวมอลต์เพิ่มขึ้นระหว่างกระบวนการงอกในวันที่ 3-9 ของการงอก สอดคล้องกับค่า extract content ที่ได้ ค่า FAN เป็นผลจากกระบวนการย่อยสลายโครงสร้างของโปรตีน ไปเป็นกรดอะมิโนและ โปรตีนขนาดเล็กโดยเอนไซม์ proteolytic

เอนไซม์ amyolytic ในมอลต์ ประกอบด้วย  $\alpha$ -amylase และ  $\beta$ -amylase ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับ กระบวนการย่อยแบ่งให้เป็นน้ำตาลที่สามารถใช้ในกระบวนการหมักของยีสต์ เพื่อเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลและ สารประกอบอื่นๆ โดยกระบวนการเมทาโบลิซึมของยีสต์ ความว่องไวของเอนไซม์ (unit) ของ  $\alpha$ -amylase และ  $\beta$ -amylase ในข้าวมอลต์ถูกวิเคราะห์โดยการวัดปริมาณของ reducing sugar (กรัม) ที่ผลิตได้จากการย่อย แบ่งเป็นเวลา 10 นาที ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เอนไซม์ amyolytic ในข้าวมอลต์ ที่ทำการงอกเป็นเวลา 1 วันมี ปริมาณของเอนไซม์ไม่แตกต่างจากข้าวเปลือกที่ใช้เป็นชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อทำการงอกเป็น

เวลา 3 วัน ข้าวมอลต์ที่ได้จะมีปริมาณของ เอนไซม์  $\alpha$ -amylase เพิ่มขึ้นอย่างมาก ขณะที่ปริมาณของเอนไซม์  $\beta$ -amylase จะเพิ่มขึ้นและเริ่มคงที่ในข้าวมอลต์ที่ทำการรอก เป็นเวลา 5 วัน และหลังจากนั้น ปริมาณของ เอนไซม์  $\beta$ -amylase จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในวันที่ 7 และ 9 ของการรอก ซึ่งผลที่ได้นี้จะมีความเกี่ยวข้องกับค่า extract content และเมื่อเปรียบเทียบค่า activity ของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase (1.052 Unit/g มอลต์) และ  $\beta$ -amylase (1.489 Unit/g มอลต์) ที่ได้จากบาร์เลย์มอลต์ พบว่าค่า activity ของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase และ  $\beta$ -amylase ของบาร์เลย์มอลต์สูงกว่าข้าวมอลต์ ที่ทำการรอกเป็นเวลา 5 วัน ที่ 2.67 และ 5.06 เท่า ตามลำดับ



ตารางที่ 4.2 คุณภาพของข้าวมอลต์ที่ช่วงเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับข้างเปลือก และมอลต์ของข้างบาร์เลย์.

Malt qualities	Control	Germinated time (days)					Barley malt
		1	3	5	7	9	
Malting loss (%)	0	3.99±0.73 <sup>a</sup>	8.78±1.30 <sup>b</sup>	17.57±1.68 <sup>c</sup>	29.16±0.68 <sup>d</sup>	38.92±0.98 <sup>e</sup>	>20
Extract content (%)	11.26±0.01 <sup>a</sup>	11.40±0.01 <sup>a</sup>	15.40±1.31 <sup>b</sup>	27.36±0.66 <sup>c</sup>	41.70±0.01 <sup>d</sup>	45.59±0.69 <sup>e</sup>	≈80 <sup>f</sup>
FAN (mg/100g malt)	5.22±0.43 <sup>a</sup>	18.76±3.59 <sup>a</sup>	44.70±4.88 <sup>b</sup>	118.45±1.29 <sup>c</sup>	136.41±4.88 <sup>d</sup>	144.54±3.73 <sup>e</sup>	≈150 <sup>e</sup>
Gelatinization temperature (°C)	96.0	95.1	ud	ud	ud	ud	≈70
Enzyme activities (Unit/ g malt)							
α - amylase	0.015±0.001 <sup>a</sup>	0.034±0.001 <sup>a</sup>	0.312±0.007 <sup>b</sup>	0.394±0.006 <sup>c</sup>	0.484±0.023 <sup>d</sup>	0.765±0.022 <sup>e</sup>	1.052±0.020 <sup>f</sup>
β - amylase	0.011±0.001 <sup>a</sup>	0.032±0.001 <sup>a</sup>	0.290±0.008 <sup>b</sup>	0.294±0.025 <sup>b</sup>	0.325±0.018 <sup>c</sup>	0.411±0.016 <sup>d</sup>	1.489±0.017 <sup>e</sup>

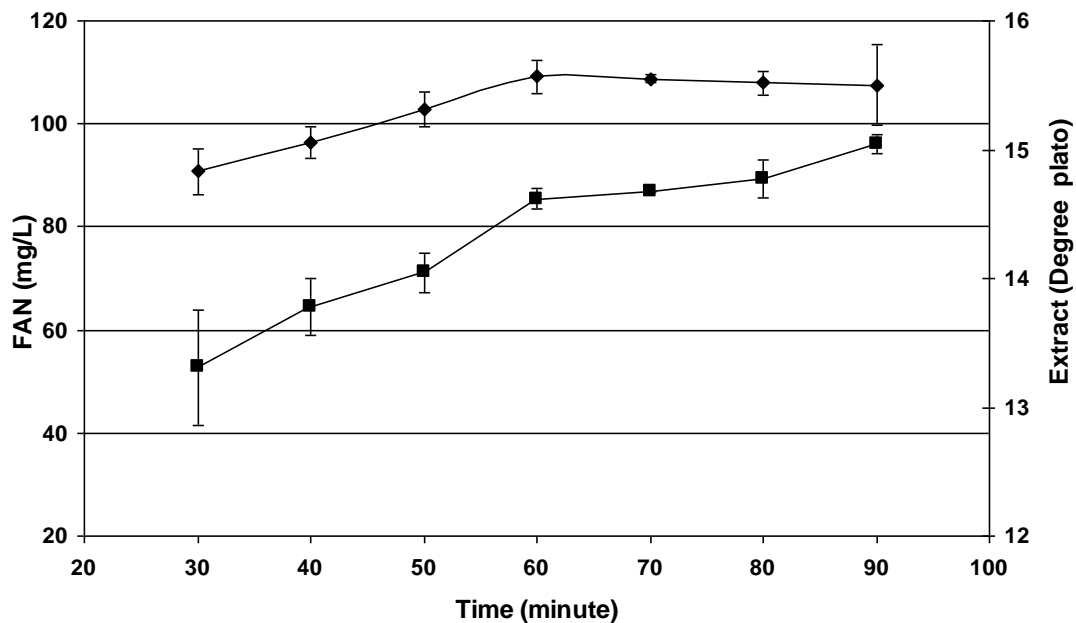
The difference superscript letter between the columns were significant difference at  $P \leq 0.05$

ud = undetectable

Enzyme activities (U) = weight of reducing sugars generation (g) from starch hydrolysis in 10 min per 1 g of malt

#### 4.3 อิทธิพลของเวลาในการ mashing ต่อคุณภาพของ เวิร์ท

ในการทดสอบอิทธิพลของเวลาในการ mashing เพื่อเร่งกิจกรรมของเอนไซม์ protease ที่  $50^{\circ}\text{C}$  และ กระบวนการย่อยที่  $95^{\circ}\text{C}$  ต่อคุณสมบัติของเวิร์ท ตัวอย่างข้าวที่ทำการรอกเป็นเวลา 3 วัน และ ทำการเติม commercial enzymes ได้แก่  $\alpha$ -amylase และ protease อย่างละ 0.25 กรัมต่อ 100 g ของมอลต์ ถูกใช้สำหรับการทดสอบ คุณภาพของเวิร์ท ที่ทำการวิเคราะห์ ได้แก่ กรดอะมิโนอิสระ (FAN) และปริมาณของน้ำตาลที่สกัดได้ (extract content)



รูปที่ 4.1 ปริมาณของ FAN (◆) และ extract content (■) ในเวิร์ท ที่ได้จาก 50% ของข้าวที่ทำการรอก 3 วัน ที่ทำการเติม commercial enzymes ที่ 0.25 กรัมต่อ 100 กรัมมอลต์

จากรูปที่ 4.1 แสดงปริมาณ FAN และ extract content ในเวิร์ท ที่ได้จากข้าวที่ทำการรอก 3 วัน ที่ทำการเติม commercial enzymes ที่ 0.25 กรัมต่อ 100 กรัมมอลต์ การเติมเอนไซม์ protease จะทำการเติมตั้งแต่เริ่มต้นของช่วงการย่อยโปรตีนที่  $50^{\circ}\text{C}$  และเอนไซม์  $\alpha$ -amylase จะทำการเติมตั้งแต่เริ่มต้นของช่วงการย่อยคาร์โบไฮเดรตที่  $95^{\circ}\text{C}$  ตัวอย่างของเวิร์ท จะถูกเก็บทุก 10 นาที ตั้งแต่ 30 นาที จนถึง 90 นาที ของเวลาในการ mash จากผลการทดสอบพบว่า อัตราของการปลดปล่อย FAN เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดช่วง 30-60 นาที และให้ค่า FAN สูงสุดที่ 110 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ commercial protease ร่วมกับเอนไซม์ proteolytic ที่มีอยู่ในข้าวและมอลต์จากข้าวบาร์เลย์ หลังจาก 60 นาทีของการ mashing ปริมาณ

ของ FAN จะคงที่ เนื่องจากปริมาณของโปรตีนในข้าวมีจำกัด (7.5%) นอกจากนี้ ผลของ extract content สอดคล้องกับค่า FAN ซึ่งให้ค่าของปริมาณน้ำตาลที่สามารถละลายได้ของเวิร์ท เพิ่มขึ้นเป็น 14.6°P หรือ ประมาณ 86.5% ของค่า extract ทั้งนี้เป็นผลมาจากกิจกรรมของ amylolytic enzyme ดังนั้น โปรแกรมของกรรมอุณหภูมิสำหรับการทดลอง คือ 45°C 5 นาที, 50°C 60 นาที, 95°C 60 นาที เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบจากรายงานการวิจัยของ Gorinstein et al. (1980) ที่ทำการศึกษาความเป็นไปได้ของการเติมมอลต์ของข้าวสาลี เป็น adjunct ร่วมกับการเติม commercial enzyme ในการทำ mashing โดยใช้สัดส่วนของมอลต์จากข้าวบาเลย์ ต่อมอลต์จากข้าวสาลี อยู่ที่ 65 ต่อ 35 พบว่า เมื่อทำการเติม 0.1% ของ commercial  $\alpha$ -amylase (Termamyl® 60L) จะได้ปริมาณของ extract content อยู่ที่ 72.0% และเมื่อทำการเติม commercial  $\alpha$ -amylase ร่วมกับ เอนไซม์  $\beta$ -glucanase จำให้ค่า extract content อยู่ที่ 72.5%

#### 4.4 ผลการศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเวิร์ท โดยใช้ RSM

##### 4.4.1 การประเมินค่าและความเหมาะสมของแบบจำลอง

น้ำเวิร์ท ที่ได้จากข้าวมอลต์จำถูกทำการวิเคราะห์ ซึ่งตัวอย่างเวิร์ท ที่ใช้จะมีความแตกต่างกันในเรื่องของการใช้เวลาในการรอก, สัดส่วนของข้าวมอลต์ และการเติมเอนไซม์ โดยจะทำการวิเคราะห์ ค่า extract content, ค่า FAN, ค่า yield และค่า fermentable sugar content โดยค่าที่ได้จะถูกนำมาคำนวณให้อยู่ในรูปแบบของสมการทางคณิตศาสตร์ โดยจะทำการวิเคราะห์ค่า  $p$ -value และ  $F$ -value สมการที่เหมาะสมจะถูกวิเคราะห์ค่า regression coefficient ได้แก่  $R^2$ , adjusted  $R^2$ , predicted  $R^2$ , %CV ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และ 4.4

ตารางที่ 4.3 แสดงค่า  $p$ -value และ  $F$ -value โดยถ้าค่า  $p$ -value ต่ำกว่า 0.05 จะหมายถึงตัวแปรตามเหล่านี้จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ 95% ซึ่งในการทดลองนี้ ค่า  $p$ -value ของโมเดลทั้งหมดต่ำกว่า 0.0001 ซึ่งหมายความว่า โมเดลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

การประมาณค่าของตัวแปรอิสระได้ถูกศึกษา โดยค่าสัดส่วนของข้าวมอลต์ ( $x_2$ ) และการเติมเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ( $x_3$ ) การประมาณค่าตัวแปรอิสระในโมเดลได้ถูกทดสอบ โดยพบว่า  $\alpha$ -amylase และการเติมเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ( $x_3$ ) มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อค่า extract content ของเวิร์ท ขณะที่เวลาที่ใช้ในการรอก ( $x_1$ ) และการเติมเอนไซม์ protease ( $x_4$ ) นั้น ไม่มีผลต่อค่า extract content ดังแสดงในตารางที่ 4.3

เมื่อพิจารณาถึงคุณภาพของเวิร์ท โดยดูจากค่า FAN พบว่า เวลาที่ใช้ในการรอก ( $x_1$ ), สัดส่วนของข้าวมอลต์ ( $x_2$ ) และการเติมเอนไซม์ protease ( $x_4$ ) มีผลต่อค่า FAN โดย เวลาที่ใช้ในการรอก ( $x_1$ )



และสัดส่วนของข้าวมอลต์ ( $x_2$ ) มี interaction กัน นอกจากนี้ ยังพบว่าเวลาที่ใช้ในการงอก ( $x_1^2$ ), และการเติมเอนไซม์ protease ( $x_4^2$ ) นั้น มีความสัมพันธ์กันใน quadratic terms

ตารางที่ 4.3 ค่า  $F$ -value และ  $p$ -value ของตัวแปรอิสระใน polynomial models.

Sources	Extract content		FAN		% Yield		Fermentable sugar	
	$F$ -value	$p$ -value	$F$ -value	$p$ -value	$F$ -value	$p$ -value	$F$ -value	$p$ -value
Model	11.08	< 0.001	43.67	< 0.001	11.11	< 0.001	70.92	< 0.001
Linear								
$X_1$	3.93	0.0605	159.65	< 0.001	3.49	0.0763	21.98	0.001
$X_2$	21.35	0.001	63.81	< 0.001	12.01	0.0024	257.62	< 0.001
$X_3$	11.23	0.0030	0.08	0.7794	25.94	< 0.001	54.97	< 0.001
$X_4$	-	-	124.96	< 0.001	-	-	-	-
Interaction								
$X_1 X_2$	-	-	23.27	0.0002	-	-	16.92	0.0005
$X_2 X_3$	7.78	0.0110	3.71	0.0719	5.98	0.0239	3.11	0.0932
Quadratic								
$X_1^2$	-	-	11.17	0.0041	-	-	-	-
$X_2^2$	-	-	-	-	8.14	0.0098	-	-
$X_3^2$	7.22	0.0151	3.38	0.0845	-	-	-	-
$X_4^2$	-	-	7.31	0.0156	-	-	-	-
Lack of fit	151.47	0.0640	3.48	0.4002	31.99	0.1385	1.92	0.5208

$p < 0.05$  = significant

เมื่อพิจารณาถึง ค่าสัดส่วนของมอลต์ และการเติมเอนไซม์  $\alpha$ -amylase พบว่าค่าเหล่านี้มีความสำคัญต่อค่า yield ของเวิร์ท ที่ได้ ขณะที่ เวลาที่ใช้ในการงอก ไม่มีผลต่อค่า yield ของเวิร์ท ที่ได้ ซึ่งบ่งชี้ได้ว่า ปริมาณของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ที่เติมลงไปในการทดลองมีผลต่อการทดลอง เนื่องจาก ข้าวมี activity ของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ต่ำและไม่เกี่ยวข้องกับระยะเวลาที่ใช้ในการงอก ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนของข้าวมอลต์และการเติมเอนไซม์  $\alpha$ -amylase อยู่ในรูปแบบ quadratic term

ค่า total fermentable sugar ในเวิร์ท จะเป็นค่าที่ได้จากผลรวมของน้ำตาล fermentable sugar ซึ่งประกอบด้วย กลูโคส ฟรุกโตส มอลโตส และ มอสโตไตรโอส โดยพบว่า เวลาที่ใช้ในการรอก, สัดส่วนของข้าวมอลต์ และการเติมเอนไซม์  $\alpha$ -amylase มีผลต่อค่า fermentable sugar content แต่ไม่มี interaction กัน ระหว่างเวลาที่ใช้ในการรอกและสัดส่วนของข้าวมอลต์ที่ทำการเติมลงไป

ตารางที่ 4.4 แสดงค่า linear, interaction และ quadratic regression coefficient ของโมเดล โดย เวลาที่ใช้ในการรอกมีผลในเชิงบวกต่อตัวแปรอื่นๆ ทั้งหมด และมีผลสูงสุดต่อค่า FAN จากผลดังกล่าว ระยะเวลาที่ใช้ในการรอกสามารถใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของเวิร์ท ได้ นอกจากนี้ สัดส่วนของมอลต์ มีผลต่อคุณภาพของเวิร์ท ในเชิงลบ โดยเฉพาะต่อค่า FAN ส่วนการเติมเอนไซม์  $\alpha$ -amylase มีผลในเชิงบวกต่อค่า yield, ค่า extract content และ ค่า fermentable sugar content แต่ไม่มีผลต่อค่า FAN นอกจากนี้ การเติมเอนไซม์ protease และระยะเวลาที่ใช้ในการรอกแสดงผลในเชิงลบต่อค่า FAN

ค่าคงที่ของความแปรผัน (coefficient of variation ; C.V.) เป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่แสดงถึงเปอร์เซ็นต์ของค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error) ที่ถูกประเมินค่าบนพื้นผิวของแบบโมเดล ซึ่งต้นแบบของโมเดลจะได้รับการยอมรับนั้น ค่า C.V. จะต้องต่ำกว่า 10% เมื่อพิจารณาถึงค่า fermentable sugar content และค่า FAN content ในเวิร์ท นั้น อยู่ในช่วงยอมรับได้ ขณะที่ เวลาที่ใช้ในการรอกและ ค่า yield มีค่า C.V. มากกว่า 10%

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ได้ถูกสร้างขึ้นจากข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Design-Expert software ได้สมการ ดังนี้ :

- Extract content (%) =  $123.56 + 2.86X_1 - 0.87X_2 - 63.66X_3 + 1.36X_2X_3$
- FAN (mg/L) =  $297.1 - 62.19X_1 - 2.4X_2 + 268.1X_3 + 439.68X_4 + 0.45X_2X_3 + 9.37X_1^2 - 330.0X_3^2 - 485.23X_4^2$
- Yield (%) =  $6.16 + 2.15X_1 + 2.28X_2 - 24.73X_3 + 0.95 X_2X_3 - 0.02X_2^2$
- Fermentable sugar content (g/L) =  $138.07 - 5.27X_1 - 1.22X_2 + 9.07X_3 + 0.11X_1X_2 + 0.38X_2X_3$

การใช้สมการที่ได้เพื่อการประมาณค่าความเป็นไปได้ของการทดลอง ค่าต่างๆ ในแบบจำลองจะถูกประเมินโดยใช้ค่าที่วัดได้ของตัวแปรตาม ณ จุดต่างๆ โดยจะทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่ได้จะถูกนำมาเปรียบเทียบ และจะต้องอยู่ในช่วง 95% ของค่า CI และจะต้องมีค่าความเชื่อมั่นอยู่ที่ 95% โดยค่าที่ได้แสดงอยู่ในตารางที่ 3 โดยพบว่า ค่า extract content และ ค่า yield ของเวิร์ท อยู่ในช่วง 95% ของความ

เชื่อมั่น จากผลการทดลอง แบบจำลองของ extract content และ ค่า yield ของเวิร์ท ได้รับการยอมรับเพื่อใช้เป็นโมเดลสำหรับการทำนายค่า FAN

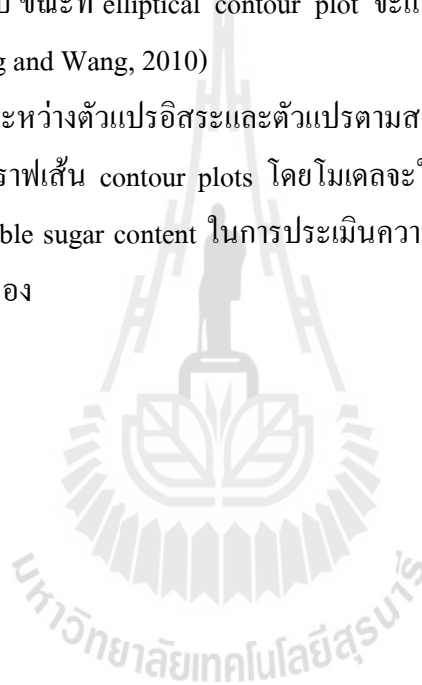
ตารางที่ 4.4. ค่า regression coefficient ของแบบจำลอง

Factors	Extract content (%)	FAN (mg/L)	Yield (%)	Fermentable sugar (g/L)
$\beta_0$	76.28	215.22	89.02	64.06
Linear				
$\beta_1$	5.71	55.69	4.30	5.89
$\beta_2$	-13.31	-35.20	-7.97	-20.15
$\beta_3$	9.66	-1.26	11.71	9.31
$\beta_4$	-	49.27	-	-
Interaction				
$\beta_1 \beta_2$	-	22.55	-	5.48
$\beta_2 \beta_3$	8.52	-9.01	5.97	2.35
Quadratic				
$\beta_1^2$	-	37.48	-	-
$\beta_2^2$	-	-	-11.83	-
$\beta_3^2$	-11.30	-20.63	-	-
$\beta_4^2$	-	-30.33	-	-
$R^2$	0.6784	0.9609	0.7353	0.9466
Adj. $R^2$	0.6172	0.9389	0.6691	0.9333
Pred. $R^2$	0.4570	0.9013	0.5285	0.8952
C.V.%	16.02	9.08	12.07	8.31

#### 4.4.2 การวิเคราะห์พื้นผิวดตอบสนอง

พื้นผิวดตอบสนองในเชิง 3 มิติและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงเส้น 2 มิติ สามารถวิเคราะห์จากสมการความสัมพันธ์ระหว่างพื้นผิวดตอบสนองและระดับของตัวแปรต่างๆ รูปแบบของความสัมพัทธ์ระหว่างตัวแปรจะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรทั้งสอง รูปแบบของ Contour plots เช่น Circular หรือ elliptical จะบ่งชี้ได้ว่าความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรทั้งสองนั้น มีความสัมพันธ์กัน อย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ โดย Circular contour plots จะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรทั้งสองนั้น ไม่ได้รับการยอมรับ ขณะที่ elliptical contour plot จะแสดงว่าตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์กัน อย่างมีนัยสำคัญ (Zhong and Wang, 2010)

ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตามสามารถประเมินได้จากกราฟ 3 มิติของพื้นผิวดตอบสนองและกราฟเส้น contour plots โดยโมเดลจะใช้ ค่า extract content, ค่า FAN, ค่า % yield และ ค่า fermentable sugar content ในการประเมินความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ตัวแปรโดยใช้กราฟ 3 มิติของพื้นผิวดตอบสนอง



ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบของค่าที่ได้จากการประเมินโดยใช้โมเดลกับค่าที่ได้จากการทำการทดลอง

Runs <sup>1</sup>	Extract content (%w/w)		FAN (mg/L)		Yield (%)	
	Predicted	Actual	Predicted	Actual	Predicted	Actual
	Values	Values	values	values	Values	Values
1	85.0 [78.9/98.16] <sup>2</sup>	87.3	261 [235.5/286.2]	233	86.60 [75.7/97.5]	88.0
2	88.8 [79.4/98.2]	89.2	239 [210.1/267.5]	252	97.70 [89.62/105.73]	95.9
3	94.6 [83.5/105.8]	86.8	269 [243.0/294.0]	258	86.00 [76.7/95.3]	92.9
4	89.4 [80.7/98.1]	85.3	293 [268.5/317.0]	274	100.75 [91.8/109.7]	96.4
5	88.8 [77.6/99.9]	80.9	274 [244.2/302.8]	245	99.57 [90.2/108.9]	92.2
6	86.9 [73.7/100.0]	81.2	284 [258.5/309.1]	253	91.19 [80.3/102.1]	91.7

<sup>1</sup> Runs 1 ;  $X_1 = 1$  day,  $X_2 = 50\%$ ,  $X_3 = 0.5\text{g}/100\text{g malt}$ ,  $X_4 = 0.5\text{g}/100\text{g malt}$

2 ;  $X_1 = 3$  days,  $X_2 = 60\%$ ,  $X_3 = 0.5\text{g}/100\text{g malt}$ ,  $X_4 = 0.5\text{g}/100\text{g malt}$

3 ;  $X_1 = 5$  days,  $X_2 = 50\%$ ,  $X_3 = 0.1\text{g}/100\text{g malt}$ ,  $X_4 = 0.1\text{g}/100\text{g malt}$

4 ;  $X_1 = 5$  days,  $X_2 = 70\%$ ,  $X_3 = 0.4\text{g}/100\text{g malt}$ ,  $X_4 = 0.2\text{g}/100\text{g malt}$

5 ;  $X_1 = 5$  days,  $X_2 = 90\%$ ,  $X_3 = 0.5\text{g}/100\text{g malt}$ ,  $X_4 = 0.25\text{g}/100\text{g malt}$

6 ;  $X_1 = 5$  days,  $X_2 = 100\%$ ,  $X_3 = 0.5\text{g}/100\text{g malt}$ ,  $X_4 = 0.5\text{g}/100\text{g malt}$

<sup>2</sup> [95% CI low/ 95% CI high]

จากรูปที่ 4.2A ผลของสัดส่วนของข้าวมอลต์และเวลาที่ใช้ในการงอกของข้าวต่อ extract content ของน้ำเวิร์ท ขณะที่เวลาที่ใช้การงอกของข้าวมีผลต่อ extract content เนื่องจากการ

เปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพของ rice kernels โดยจะทำลายโครงสร้างแกนของแป้งไปเป็น fermentation sugar (Kendall, 1995) ในทางตรงกันข้าม อิทธิพลของเวลาที่ใช้ในการงอกของข้าวจะลดลง เมื่อทำการลดสัดส่วนของข้าวมอลต์ (เพิ่มสัดส่วนของบาร์เล่่มอลต์) อย่างไรก็ตาม เวลาที่ใช้ในการงอกของข้าว ไม่มีผลต่อปริมาณของ extract content เมื่อทำการเติมบาร์เล่่มอลต์มากกว่า 50% ดังนั้น เอนไซม์ amylolytic ในระดับสูงในมอลต์จากข้าวบาร์เล่่สามารถย่อยโมเลกุลขนาดใหญ่ที่อยู่ในมอลต์จากข้าวทั้งสองชนิด ขณะที่มอลต์จากข้าวมีปริมาณของเอนไซม์น้อยกว่ามาก จึงไม่มีอิทธิพลต่อการย่อย นอกจากนี้ พบว่าเอนไซม์ heat stable amylolytic ยังทำให้ปริมาณของ extract เพิ่มขึ้นในน้ำเวิร์ท อย่างไรก็ตาม ค่า extract content จะคงที่ เมื่อทำการเติม  $\alpha$ -amylase ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.2 กรัมต่อ 100 กรัมของมอลต์ ขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ protease ไม่มีผลต่อปริมาณ extract content

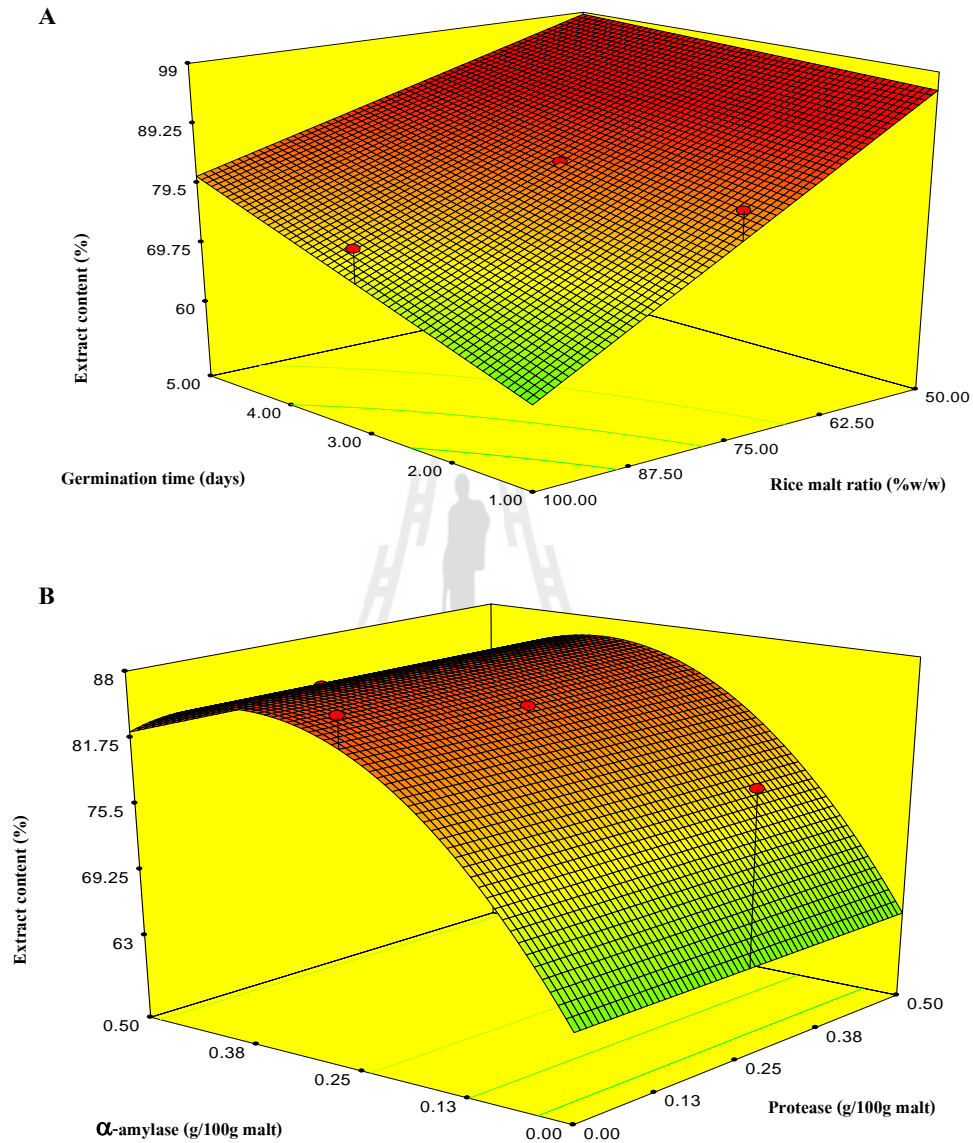
เมื่อทำการโปรแกรมของการ mashing เพื่อทำการย่อยโปรตีนโมเลกุลขนาดเล็กให้กลายเป็นเปปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนจะทำที่อุณหภูมิ 50°C โดยน้ำเวิร์ท จะต้องมีความเข้มข้นของ  $\alpha$ -amino nitrogen ไม่น้อยกว่า 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อจะได้เพียงพอที่จะใช้ในการเจริญของยีสต์และกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ส่วนกิจกรรมของ protease โดยใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับเอนไซม์ที่มาจากกระบวนการงอกของข้าว นั้น สามารถเพิ่มอัตราการปลดปล่อย  $\alpha$ -amino nitrogen แต่ตัวแปรทั้งสองไม่มีผลต่อกัน ในการทำ mashing วันแรก พบว่าข้าวมีปริมาณ protease อยู่ที่ 0.5 กรัมต่อ 100 กรัมของมอลต์ และเพิ่มเป็น 220 กรัมต่อ 100 กรัมของมอลต์ เมื่อทำการงอกเป็นเวลา 5 วัน โดยปราศจากการเติม protease ลักษณะของเส้นกราฟแบบ polynomial ของ FAN จะลดลง เมื่อทำการเติม protease ทางการค้า ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่า อัตราการผลิต FAN ลดลงอย่างช้าๆ เนื่องมาจากปริมาณของโปรตีนตั้งต้นที่มีอยู่อย่างจำกัดในมอลต์จากข้าว ในขณะที่เวลาที่ใช้ในการทำ mashing มากขึ้น จะมีผลต่อค่า FAN มากกว่าการเติมเอนไซม์ protease ทางการค้า ดังนั้น จากผลการทดลอง ค่า FAN ในน้ำเวิร์ท จะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เมื่อทำการเพิ่มเวลาที่ใช้ในการงอกนานขึ้น ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับ Markovic et al. (1995) ที่พบว่า การปลดปล่อย  $\alpha$ -amino nitrogen โดยใช้เอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์ protease จากข้าวบาร์เล่่และจากแบคทีเรีย นั้นมีประสิทธิภาพสูงกว่าการเติมเอนไซม์ protease จากแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว ขณะที่เอนไซม์  $\alpha$ -amylase มีผลต่อค่า FAN เพียงเล็กน้อย เป็นผลมาจากปริมาณของโปรตีนจากตัวเอนไซม์ ซึ่งส่งผลให้ค่า FAN เพิ่มขึ้น

กราฟพื้นผิวตอบสนองและกราฟ contour ของสัดส่วนของข้าวมอลต์และระยะเวลาที่ใช้ในการงอก (ใช้ปริมาณของ commercial  $\alpha$ -amylase และ protease ที่ 0.25 กรัมต่อ 100 กรัมมอลต์) ต่อค่า wort yield เมื่อทำการปรับความหวานที่ 12°P แสดงดังในรูปที่ 4.4A และ 4.4B ปริมาตรสูงสุดของน้ำ

เวิร์ท ที่สามารถกรองได้ ได้จากชุดการทดลองที่มีสัดส่วนมอลต์จากข้าวที่ 75% และเมื่อทำการเพิ่ม เวลาที่ใช้ในการกรองสามารถเพิ่มค่า wort yield ได้ โดยในกระบวนการกรองทั่วไป แกลบของข้าว มอลต์จะเป็นตัวกรองโดยธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการทำเบียร์ ทั้งในขั้นตอนของการ lautering และขั้นตอนการทำให้ใส (Clarification) นอกจากนี้ แกลบยังสามารถลดเวลาที่ใช้ในการ กรองและช่วยเพิ่มค่า wort yield (Villar et al., 2004) อย่างไรก็ตาม ค่า wort yield จะมีค่าลดลง เมื่อ สัดส่วนของมอลต์จากข้าวมีสัดส่วนมากกว่า 80%

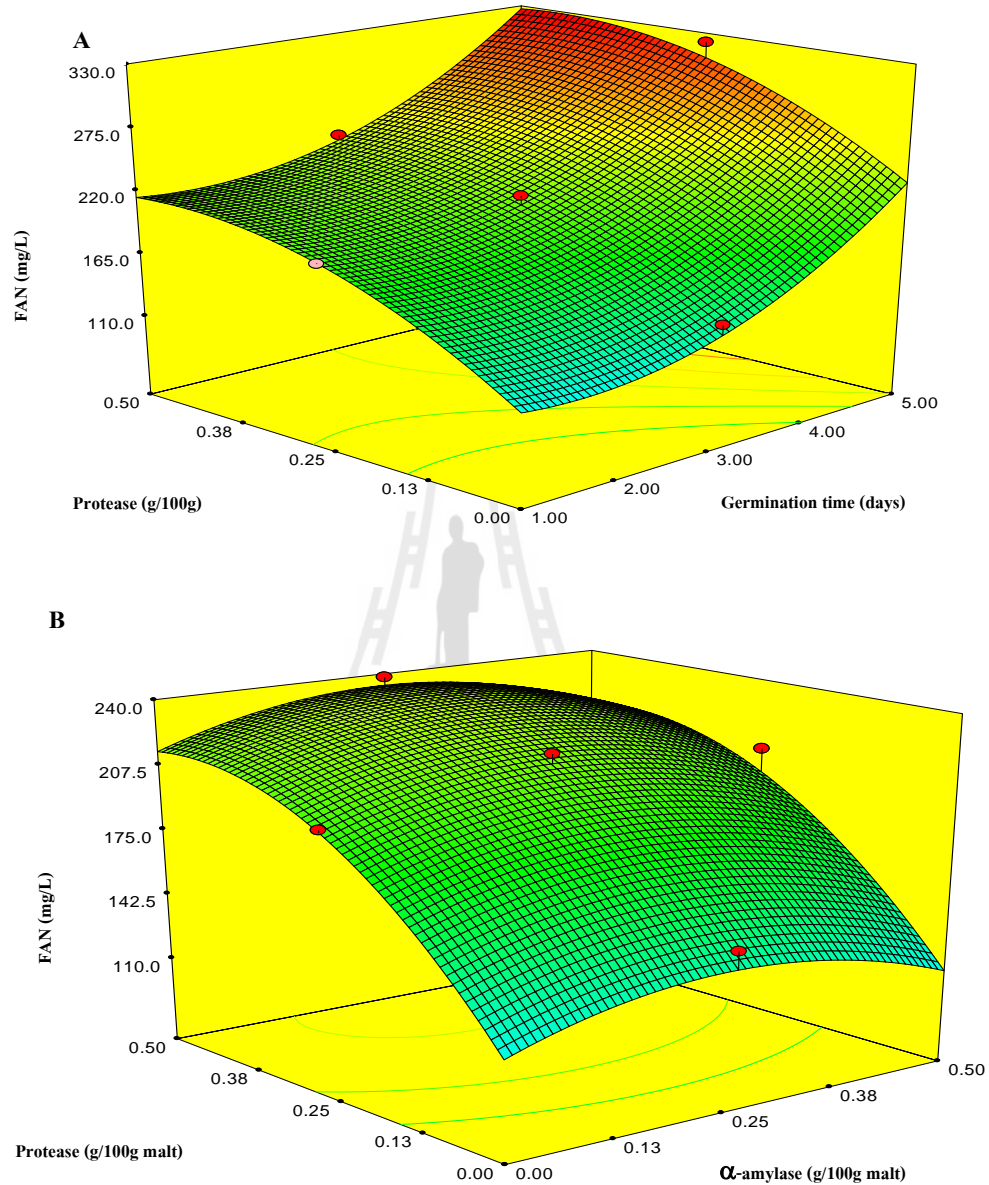
รูปที่ 4.6 แสดงผลของเวลาที่ใช้ในการกรองของข้าวและสัดส่วนของมอลต์จากข้าว ต่อผลรวม ของ fermentable sugar ซึ่งประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส มอลโตส และมอลโตริโตรไอส ปริมาณของสัดส่วนของมอลต์จากข้าวบาล์มีผลต่อปริมาณของ fermentable sugar ในน้ำเวิร์ท เป็นผล เนื่องมาจากปริมาณของเอนไซม์ amyolytic และปริมาณของ extract content ในการทำการกรองที่ใช้ เวลานานมากขึ้น จะมีผลต่อปริมาณของ fermentable sugar โดยมีสาเหตุจากโครงสร้างภายในของ endosperm ของข้าวมอลต์ การสร้างเอนไซม์ amyolytic และ proteolytic ในระหว่างกระบวนการกรอง



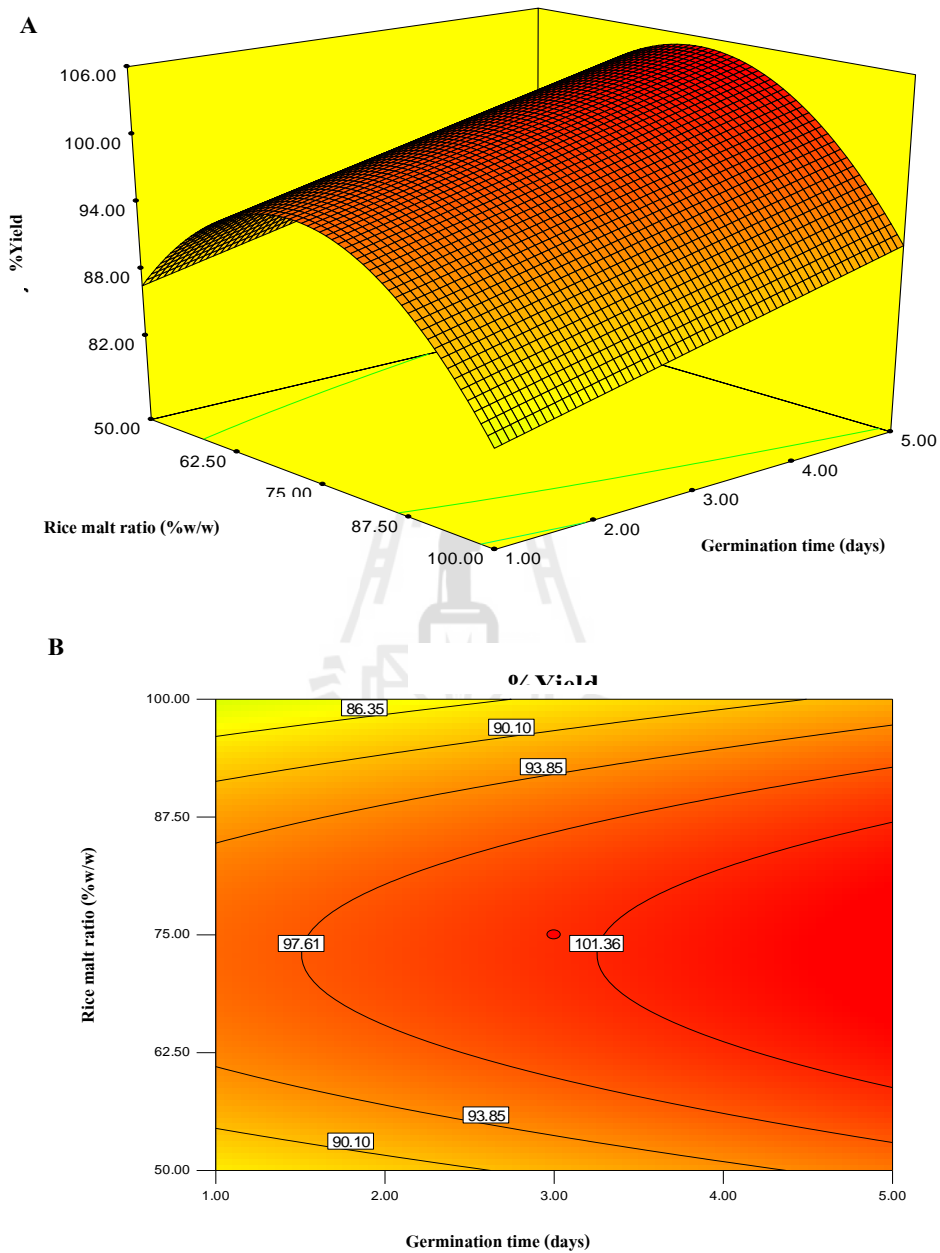


รูปที่ 4.2 กราฟของพื้นผิวตอบสนองระหว่างค่า extract content ต่อ (A) เวลาที่ใช้ในการงอก (germination time) ของข้าว และสัดส่วนของมอลต์จากข้าว เมื่อทำการเติม 0.25 กรัมต่อ 100 กรัมของมอลต์ ของเอนไซม์ commercial  $\alpha$ -amylase และ protease และ (B) เอนไซม์ commercial  $\alpha$ -amylase และ protease ที่ทำการงอกเป็นเวลา 3 วันและใช้สัดส่วนของมอลต์จากข้าวอยู่ที่ 75%

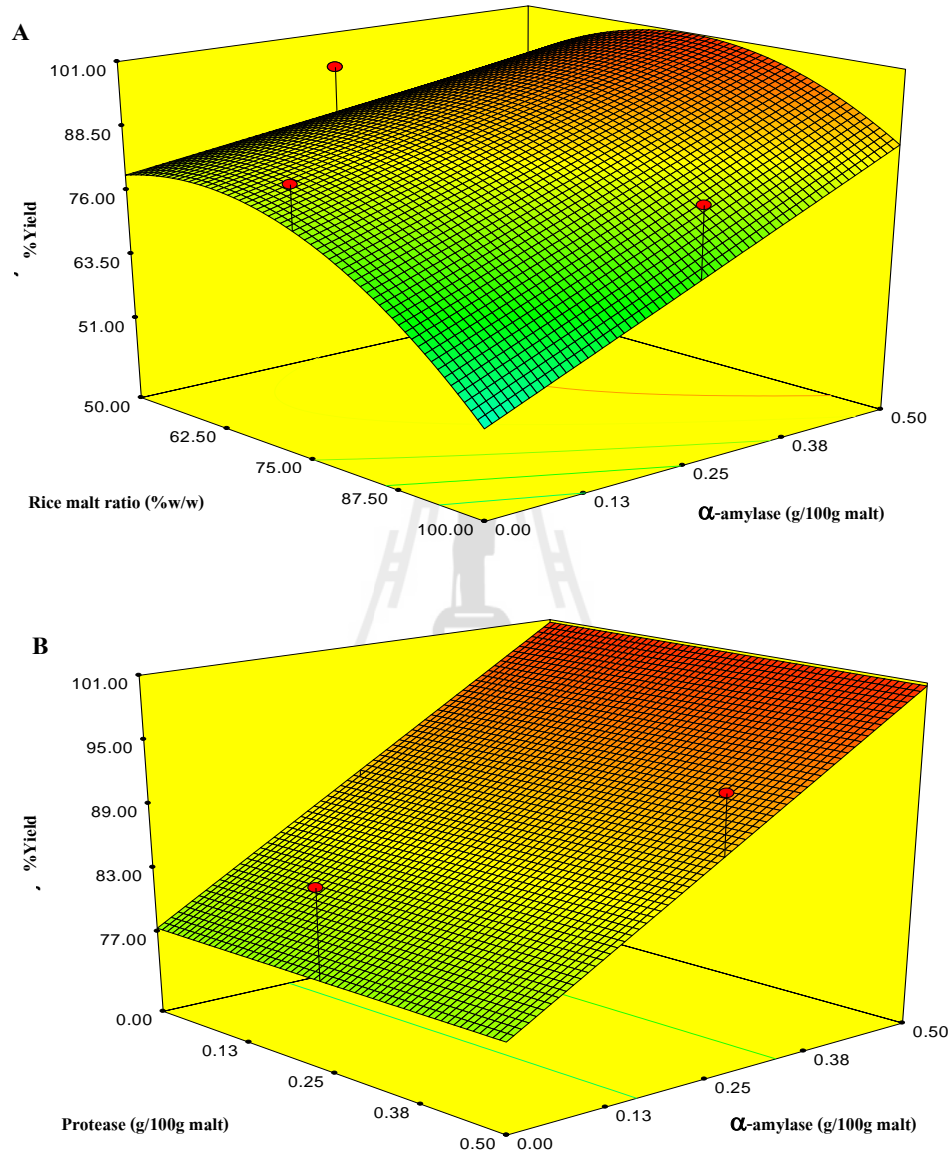




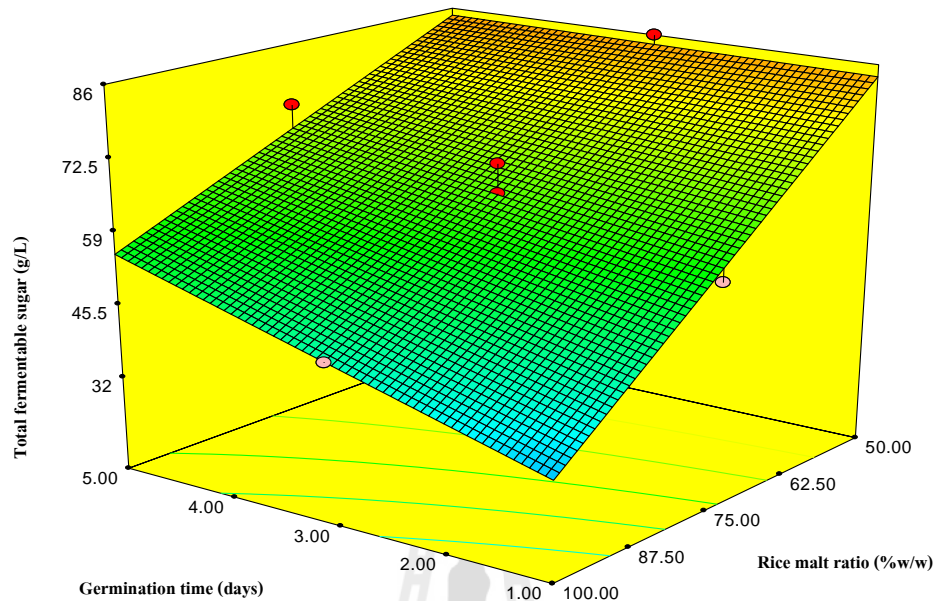
รูปที่ 4.3 กราฟของพื้นผิวตอบสนองระหว่างค่า FAN ต่อ (A) เวลาที่ใช้ในการงอก (germination time) ของข้าว และสัดส่วนของมอลต์จากข้าว เมื่อทำการเติม 0.25 กรัมต่อ 100 กรัมของมอลต์ ของเอนไซม์ commercial  $\alpha$ -amylase และ protease และ (B) เอนไซม์ commercial  $\alpha$ -amylase และ protease ที่ทำการงอกเป็นเวลา 3 วันและใช้สัดส่วนของมอลต์จากข้าวอยู่ที่ 75%



รูปที่ 4.4 กราฟของพื้นผิวตอบสนอง (A) และ contour plot (B) ระหว่างค่า % yield ต่อสัดส่วนของมอลต์จากข้าว เมื่อทำการเติม 0.25 กรัมต่อ 100 กรัมของมอลต์ ของเอนไซม์ commercial  $\alpha$ -amylase และ protease



รูปที่ 4.5 กราฟของพื้นผิวตอบสนองระหว่างค่า % yield ต่อ (A) สัดส่วนของมอลต์จากข้าว และปริมาณของ เอนไซม์ commercial  $\alpha$ -amylase ที่ทำการออกเป็นเวลา 3 วันและทำการเติม 0.25 กรัมต่อ 100 กรัมของมอลต์ ของเอนไซม์ commercial protease และ (B) เอนไซม์ commercial  $\alpha$ -amylase และ protease ที่ทำการออกเป็นเวลา 3 วันและใช้สัดส่วนของมอลต์จากข้าวอยู่ที่ 75%



รูปที่ 4.6 กราฟของพื้นผิวตอบสนองของค่า total fermentable sugar content ต่อเวลาที่ใช้ในการงอกและสัดส่วนของมอลต์จากข้าว เมื่อทำการเติม 0.25 กรัมต่อ 100 กรัมของมอลต์ ของเอนไซม์ commercial  $\alpha$ -amylase และ protease

#### 4.4.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำเวิร์ท

ค่าเชิงตัวเลขของสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการ mashing โดยใช้เวลาที่ใช้ในการงอก และสัดส่วนของมอลต์จากข้าวในการวิเคราะห์ดังในตารางที่ 4.6 ขอบเขตของการประเมินจะถูกเลือก โดยค่า extract content จะต้องไม่ต่ำกว่า 80% ค่า FAN ของน้ำเวิร์ท จะต้องอยู่ในช่วง 220-350 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่า yield ของน้ำเวิร์ท จะต้องไม่ต่ำกว่า 85% ขณะที่ปริมาณของ fermentable sugar ไม่ได้ถูกนำมาใช้ในการประเมิน ความเหมาะสมจะถูกประเมินโดยใช้ค่าที่ได้จากพื้นผิวตอบสนอง (Myers and Montgomery, 2002) ที่มีค่าเท่ากับ 1.000 ซึ่งชุดการทดลองที่มีความจำเพาะจะถูกใช้ในการประเมิน มอลต์จากข้าวที่ทำการงอกเป็นเวลา 5 วันจะให้ค่าสัดส่วนของข้าวมอลต์สูงสุดที่ 90% ร่วมกับการเติมเอนไซม์ commercial  $\alpha$ -amylase และ protease ที่ความเข้มข้น 0.4 กรัมต่อ 100 กรัมมอลต์ นอกจากนี้ เมื่อทดสอบคุณภาพของน้ำเวิร์ท เฉพาะในวันที่ 1 และ 3 ของการงอก ซึ่งให้ค่าสัดส่วนของข้าวอยู่ที่ 70 % ร่วมกับการเติมเอนไซม์ commercial  $\alpha$ -amylase และ protease ที่ความ

เข้มข้น 0.4 กรัมต่อ 100 กรัมมอลต์ และ 0.5 กรัมต่อ 100 กรัมมอลต์ นั้น สามารถผลิตน้ำเวิร์ท ที่มีคุณภาพและได้รับการยอมรับได้

**ตารางที่ 4.6** ค่าเชิงตัวเลขของการผลิตน้ำเวิร์ท โดยอาศัยพื้นฐานของเวลาที่ใช้ไกรงอกและสัดส่วนของมอลต์จากข้าว และการประมาณค่าคุณภาพของน้ำเวิร์ท

Batc	Germination	Rice malt	$\alpha$ -amylase	Protease	Extract	FAN	Yield
h	time (days)	(%)	(g/100g)	(g/100g)	(%)	(mg/L)	(%)
1-50	1	50	0.50	0.50	85	261	86.6
1-70	1	70	0.50	0.50	81	207	96.0
3-50	3	50	0.30	0.25	89.8	251	86.3
3-70	3	70	0.40	0.40	83.7	224	96.5
5-50	5	50	0.10	0.10	94.6	269	86.0
5-70	5	70	0.25	0.25	84.7	311	90.2
5-90	5	90	0.40	0.40	82.9	308	93.4

#### 4.5 การหมักในถังขนาดเล็ก

##### 4.5.1 ปริมาณ fermentable sugar ในน้ำเวิร์ท ที่ผ่านการหมัก

โปรแกรมของการทำ mashing จะทำทั้งหมด 7 ชุดการทดลอง โดยจะทำได้เวลาต่างๆ ของการงอกและ สัดส่วนของมอลต์จากข้าว โดยการนำน้ำเวิร์ท มาทำการฆ่าเชื้อที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและทำการเติม hops โดยจะทำการเติมที่ 25 BU ปริมาณของน้ำตาลที่สามารถใช้ในการหมักได้ ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส และมอนโตรไตรโอส จะถูกวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC และสัดส่วนของน้ำตาลจะถูกประเมิน (ตารางที่ 4.7) การเปลี่ยนแปลงของเมล็ดข้าวสามารถเพิ่มปริมาณของ fermentable sugar ในน้ำเวิร์ทได้ เมื่อทำการงอกเป็นเวลา 5 วัน พบว่าจะให้ปริมาณของ fermentable sugar สูงสุดอยู่ที่ 81.52 กรัมต่อลิตร ส่วนในวันที่ 1 และ 3 ของการงอก จะให้ปริมาณของ fermentable sugar อยู่ที่ 73.72 กรัมต่อลิตร และ 70.09 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ การเพิ่มขึ้นของน้ำตาลมอลโตสและกลูโคสที่ 33.97 กรัมต่อลิตรและ 26.79 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเพิ่มปริมาณ fermentable sugar ในน้ำเวิร์ทได้ ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของมอลต์จากข้าวนั้น มีผลอย่างมากต่อความเข้มข้นของ fermentable sugar และมีผล

มากกว่าการเติม commercial enzyme อย่างไรก็ตาม commercial enzyme จะมีผลมากขึ้น เมื่อสัดส่วนของมอลต์จากข้าวสูงกว่า 70 % เนื่องมาจากความขาดแคลนของเอนไซม์ของมอลต์จากข้าวที่สัดส่วนของมอลต์จากข้าวสูง การเติม commercial enzyme จะช่วยเพิ่มความเข้มข้นของ fermentable carbohydrate โปรตีนที่สามารถละลายได้ และ FAN ขณะที่องค์ประกอบทั้งหมดจะช่วยทำให้ความหนืดของน้ำเวิร์ท ลดลง อัตราการกรองมากขึ้น มีค่า yield สูงขึ้น และสามารถทำการเติมได้มากขึ้น (Denault et al. 1981; Good และ Halbert, 2003)

ปริมาณของ fermentable sugars ของน้ำเวิร์ท จากข้าวมอลต์ที่ทำการรอกเป็นเวลา 5 วัน ที่สัดส่วน 50 % นั้น มีความคล้ายคลึงกับน้ำเวิร์ท ของ Canadian lager ซึ่งมีองค์ประกอบของ fermentable sugar ที่ 85.80 % ที่ความหวาน 12 °P ขณะที่น้ำเวิร์ท ของชุดการทดลอง พบว่า

#### 4.5.2 ผลของเวลาที่ใช้ในการรอก ปริมาณของเอนไซม์ทางการค้า การเติมมอลต์จากข้าวบาร์เลย์ ต่อรูปแบบของกระบวนการหมัก

รูปที่ 4.7 แสดงการเปลี่ยนแปลงตามเวลาของปริมาณเซลล์, ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์, ความสามารถในการใช้ FAN, การผลิตเอทานอล, และการใช้ fermentable sugar (น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส มอลโตส และ มอนโตริโอส) ระหว่างกระบวนการหมัก ความเข้มข้นของเซลล์ที่แขวนลอยของชุดการทดลองทั้งหมด พบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในเวลา 36 ชั่วโมง และค่อยๆ ลดลงจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก ขณะที่ FAN ในน้ำเวิร์ท ของชุดการทดลองทั้งหมด พบว่าจะถูกใช้อย่างรวดเร็วตั้งแต่เริ่มต้นการหมัก (ชั่วโมงที่ 0) จนถึงชั่วโมงที่ 60 จากนั้นค่า FAN จะคงที่จนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมัก ตามรายงานของ Lekkas และคณะ (2007) รายงานว่า กรดอะมิโนในกลุ่ม A ที่มีความสามารถในการดูดซึมอย่างรวดเร็ว ซึ่งประกอบด้วยกรด glutamic, aspartic, asparagine, serine, threonine, lysine, และ arginine ในน้ำเวิร์ท จะถูกใช้จนหมดภายใน 15 ชั่วโมง หลังจากการเริ่มต้นกระบวนการหมัก ส่วนกลุ่ม B ที่เป็นกรดอะมิโนที่มีความสามารถในการดูดซึมปานกลาง ประกอบด้วย valine, methionine, leucine, isoleucine, และ histidine จะถูกใช้ในลำดับต่อมาอย่างช้าๆ จนกระทั่งถูกใช้จนหมด (Perpete และคณะ. 2005) จากรายงานของ Pickerell (1986) รายงานว่า ค่า FAN ในน้ำเวิร์ท เริ่มต้นจะมีผลต่ออัตราการนำ FAN ไปใช้, อัตราการใช้น้ำตาล, และอัตราการผลิตเอทานอล นอกจากนี้ยังมีอิทธิพลโดยตรงต่ออัตราการเจริญและมวลที่เพิ่มขึ้นของเซลล์ยีสต์

ตารางที่ 4.7 ปริมาณของ fermentable sugar และสัดส่วนของน้ำตาลในชุดการทดลองของน้ำเวิร์ท

Treatments	Fermentable sugar content (g/L)				Total (g/L)
	Glucose	Fructose	Maltose	Maltotriose	
1-50	17.87 <sup>b</sup> (25.50)	2.42 <sup>d</sup> (3.45)	31.72 <sup>e</sup> (45.26)	18.08 <sup>f</sup> (25.79)	70.09 <sup>e</sup>
1-70	16.74 <sup>a</sup> (25.67)	1.11 <sup>a</sup> (1.71)	27.45 <sup>d</sup> (42.09)	19.91 <sup>g</sup> (30.54)	65.21 <sup>d</sup>
3-50	21.75 <sup>f</sup> (29.51)	2.39 <sup>d</sup> (3.24)	31.66 <sup>e</sup> (42.94)	17.92 <sup>e</sup> (24.31)	73.72 <sup>f</sup>
3-70	19.34 <sup>c</sup> (33.15)	1.73 <sup>b</sup> (2.97)	22.28 <sup>b</sup> (38.19)	14.99 <sup>c</sup> (25.69)	58.33 <sup>b</sup>
5-50	26.79 <sup>g</sup> (32.87)	3.27 <sup>e</sup> (4.01)	33.97 <sup>f</sup> (41.68)	17.49 <sup>d</sup> (21.45)	81.52 <sup>g</sup>
5-70	20.55 <sup>d</sup> (34.65)	1.73 <sup>b</sup> (2.92)	22.89 <sup>c</sup> (38.58)	14.15 <sup>b</sup> (23.85)	59.32 <sup>c</sup>
5-90	21.34 <sup>c</sup> (38.67)	1.83 <sup>c</sup> (3.32)	19.02 <sup>a</sup> (34.46)	13.00 <sup>a</sup> (23.55)	55.19 <sup>a</sup>

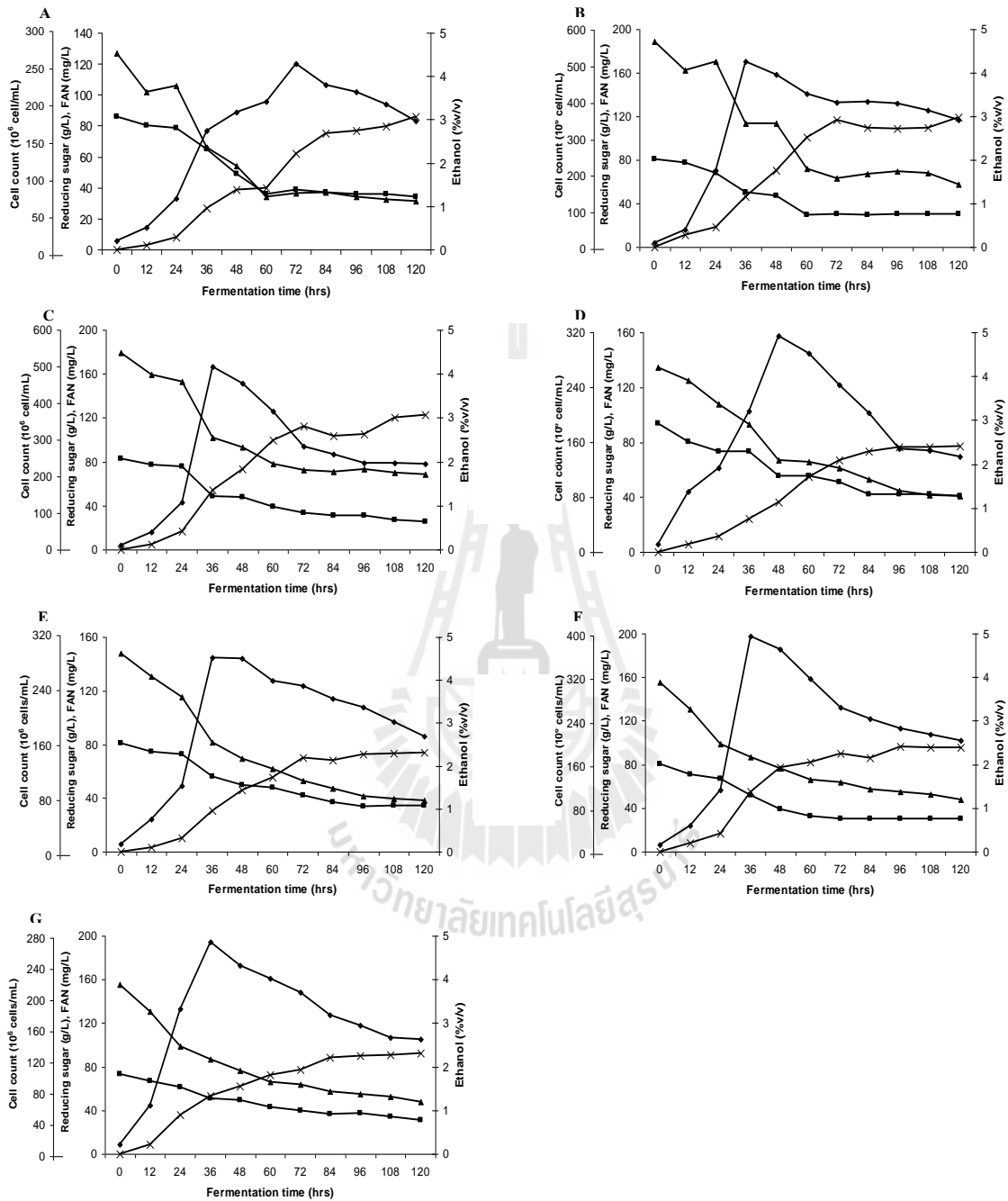
() = sugar ratio (%)

ในทุกชุดการทดลอง พบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว จะถูกใช้จนหมดภายในเวลา 36 ชั่วโมงหลังจากเริ่มกระบวนการหมัก ส่วนน้ำตาลมอลโตสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของน้ำตาลทั้งหมดนั้น ไม่ได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญระหว่างทำการหมัก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก maltase permease หรือการยับยั้งของการใช้น้ำตาลกลูโคสและ ฟรุกโตส (Patel และ Ingledew, 1973) น้ำตาลกลูโคสจะมีผลต่อโปรตีน *Mig1* complex และ *MAL*-activator คล้ายคลึงกับการ transcription ของ *MAL63* ซึ่งเป็นขั้นตอนหลักของน้ำตาลกลูโคสในการกระตุ้นการเมทาโบลิซึมของน้ำตาลมอลโตส (Novak และคณะ, 2004) แต่ในช่วงเวลาชั่วโมงที่ 36-80 ของการหมัก พบว่ามีการใช้น้ำตาลมอลโตสอย่างรวดเร็ว โดยจะถูกใช้ไปประมาณ 80-85 % ของน้ำตาลมอลโตสเริ่มต้น ขณะที่การลดลงของ fermentable sugar จะลดลงไปพร้อมกับการลดลงของน้ำตาลรีดิวส์ อย่างไรก็ตาม

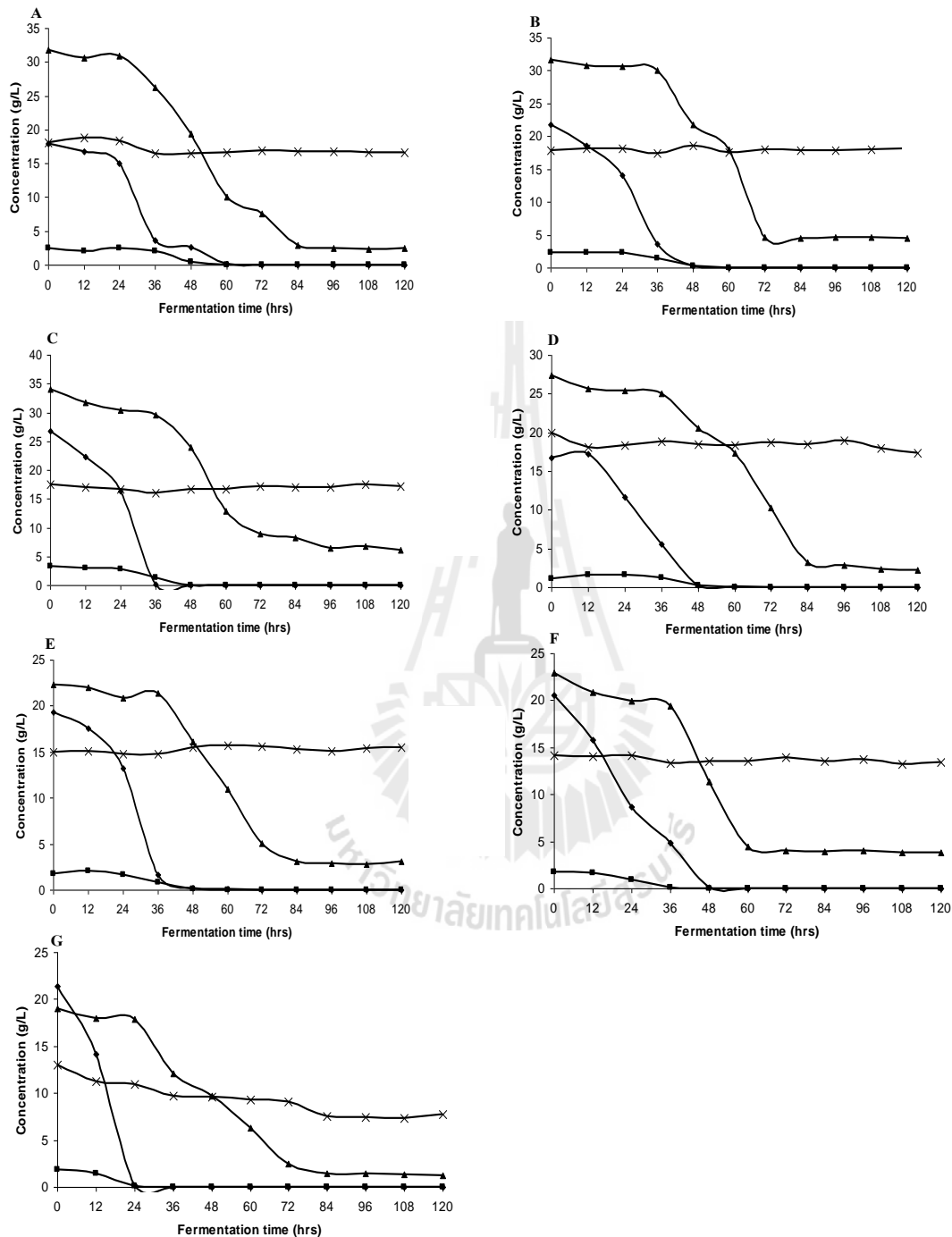
น้ำตาลมอลโทรไตรโอส ซึ่งเป็นน้ำตาล 3 โมเลกุลไม่ได้ถูกนำไปใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอล ส่วนโปรตีน AGT1 permease ซึ่งเป็น transporters ที่จะจำเพาะของเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase ซึ่งมีความจำเป็นในการขนส่งแบบใช้พลังงานของน้ำตาลมอลโทรไตรโอสผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Alves และคณะ, 2007) จากการศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการนำน้ำตาลมอลโทรไตรโอสไปใช้ของ Zheng และคณะ (1994) พบว่า ความสามารถในการนำน้ำตาลมอลโทรไตรโอสไปใช้นั้น ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์, ระดับของการ pitching, อุณหภูมิของการหมัก ค่า pH ของน้ำเวิร์ท และระดับของเอทานอล ขณะที่ ปริมาณและรูปแบบของไอออนนั้น ไม่มีผลต่อความสามารถในการใช้น้ำตาลมอลโทรไตรโอส การใช้ น้ำตาลมอลโทรไตรโอสจะเพิ่มขึ้น เมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิ 21°C ร่วมกับการกวน นอกจากนี้ ยัง พบว่ายีสต์ในกลุ่ม lager จะความสามารถในการใช้น้ำตาลมอลโทรไตรโอสมากกว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ ale แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบอัตราการใช้น้ำตาลกลูโคสและมอลโตสของยีสต์สายพันธุ์ lager และ ale พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งข้อบกพร่องของการใช้น้ำตาลมอลโทรไตรโอสนั้น เป็นหนึ่งในปัญหา ของโรงเบียร์ เช่น มีผลต่อรูปแบบของรสชาติของเบียร์







รูปที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงตามเวลาของจำนวนเซลล์ (●), ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (■), FAN (▲), และเอทานอล (x) ระหว่างกระบวนการหมัก ของตัวอย่างที่ทำกร mashing ที่แตกต่างกัน A) น้ำเวิร์ทของชุด 1-50, B) น้ำเวิร์ทของชุด 3-50, C) น้ำเวิร์ทของชุด 5-50, D) น้ำเวิร์ทของชุด 1-70, E) น้ำเวิร์ทของชุด 3-70, F) น้ำเวิร์ทของชุด 5-70, G) น้ำเวิร์ทของชุด 5-90



รูปที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงตามเวลาของ fermentable sugar ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส (◆), น้ำตาลฟรุกโตส (■), น้ำตาลมอลโตส (▲) และน้ำตาลมอลโตริโตรไอต (x) ระหว่างกระบวนการหมัก ของตัวอย่างที่ทำกร mashing ที่แตกต่างกัน A) น้ำเวิร์ทของชุด 1-50, B) น้ำเวิร์ทของชุด 3-50, C) น้ำเวิร์ทของชุด 5-50, D) น้ำเวิร์ทของชุด 1-70, E) น้ำเวิร์ทของชุด 3-70, F) น้ำเวิร์ทของชุด 5-70, G) น้ำเวิร์ทของชุด 5-90

ในตารางที่ 4.8 แสดงถึงร้อยละของ FAN และปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกรับใช้จนสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ 120 ชั่วโมง เวลาที่ใช้ในการรอกของมอลต์จากข้าวสามารถช่วยเพิ่มความสามารถในการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ร้อยละของการนำไปใช้จะสามารถบ่งชี้ถึงอัตราส่วนของ fermentable sugar และ FAN ที่ยีสต์ใช้ไปได้ เวลาที่ใช้ในการรอกของมอลต์จากข้าวสามารถเพิ่มการใช้น้ำตาลรีดิวซ์, FAN, และการเติมมอลต์จากข้าวบาร์เลย์ เบียร์ที่ผลิตได้จาก 50 % และทำการรอกเป็นเวลา 5 วัน จะให้ค่า FAN สูงสุดที่ 75 % และมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ไป 70 % ขณะเดียวกัน เบียร์จาก 90 % และทำการรอกเป็นเวลา 5 วัน จะให้ค่า FAN ที่ 57 % และมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ไป 50 % ในกระบวนการทำ mashing ที่ไม่สมบูรณ์และมีการเติมเอนไซม์ที่ไม่เพียงพอ จะเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ในน้ำเวิร์ท จะมีปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์, FAN, แคลคูลิน, โอลิโกแซคคาไรด์, non-fermentable sugar และ ปริมาณโปรตีน ที่สูงเกินไป

ตารางที่ 4.8 ร้อยละของ FAN และการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเวิร์ท ที่ทำการหมัก

Treatments	% Utilization	
	FAN	Reducing sugars
1-50	61.50	60.06
1-70	64.10	56.73
3-50	65.03	62.21
3-70	68.95	57.61
5-50	75.16	68.99
5-70	69.67	62.43
5-90	49.56	57.21

Significant  $P < 0.05$  in the same column

#### 4.6 การทำเบียร์ในถังขนาดใหญ่และคุณภาพของเบียร์

##### 4.6.1 องค์ประกอบทางเคมีและองค์ประกอบที่สามารถระเหยได้ของเบียร์

เบียร์ที่ผลิตได้ ยังคงมีปริมาณของน้ำตาลมอลโทสประมาณ 2.30 - 4.60 กรัมต่อลิตร ขณะที่การผลิตเบียร์ในถังขนาด 50 ลิตร ยังพบความบกพร่องของการใช้น้ำตาลมอลโทส ไตรโอส ซึ่งเป็นสาเหตุของการมีอยู่ของน้ำตาลมอลโทส ไตรโอสในผลผลิตเบียร์สุดท้าย (ตารางที่ 4.9) ปริมาณของเอ

ทานอลในเบียร์มีความเข้มข้นต่ำกว่าเบียร์ทางการค้า ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากยีสต์ไม่สามารถใช้น้ำตาลมอนโทไรโตรโอสได้ ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดได้จาก 50% ของการเติมมอลต์จากข้าวบาร์เลย์ โดยจะมีความเข้มข้นของเอทานอลอยู่ที่ 4.00% โดยปริมาตร ซึ่งต่ำกว่าเบียร์ทางการค้าที่มีความเข้มข้นอยู่ที่ 5.00% โดยปริมาตร (ตารางที่ 4.10) ปริมาณสัดส่วนของมอลต์จากข้าวมีผลต่อค่า pH และสีของเบียร์ เบียร์ที่ใช้มอลต์จากข้าวในสัดส่วนที่สูงจะมีค่า pH สูงและมีระดับของสีที่เข้มมากขึ้น เนื่องมาจากการ browning หรือ การเกิดปฏิกิริยา Maillard ของแอลบระหว่างการทำ mashing และขั้นตอนการต้มน้ำเวิร์ท สีของเบียร์ที่ทำมาจากชุดการทดลองที่มี 50% ของมอลต์จากข้าวจะมีสีประมาณ 20 EBC ส่วนสีของเบียร์ที่ทำมาจากชุดการทดลองที่มี 70% และ 90% ของมอลต์จากข้าวจะมีสีประมาณ 30-32 EBC (โดยค่ามาตรฐานของเบียร์ lager อยู่ที่ 20-50 EBC)

ตารางที่ 4.9 ชนิดของ fermentable sugar ต่างๆ ก่อนและหลังทำการหมัก

Batch	Sugar concentration before fermentation (g/L)				Sugar concentration after fermentation (g/L)			
	Glucose	Fructose	Maltose	Maltotriose	Glucose	Fructose	Maltose	Maltotriose
1-50	17.87	2.42	31.72	18.08	0	0	2.62	17.13
1-70	16.74	1.11	27.45	19.91	0	0	2.32	17.34
3-50	21.75	2.39	31.66	17.92	0	0	3.30	17.54
3-70	19.34	1.73	22.28	14.99	0	0	2.90	17.40
5-50	26.79	3.27	33.97	17.49	0	0	4.63	15.93
5-70	20.55	1.73	22.89	14.15	0	0	3.93	13.29
5-90	21.34	1.83	19.02	13.00	0	0	2.59	12.96

Significant  $P < 0.05$  in the same column

ตารางที่ 4.10 ค่า pH ปริมาณของเอทานอล และสีของเบียร์

Batch	pH	Ethanol (%v/v)	Color (EBC)
1-50	4.84	3.66 <sup>d</sup>	20.6 <sup>a</sup>
1-70	5.88	3.46 <sup>b</sup>	31.6 <sup>b</sup>
3-50	4.74	4.07 <sup>c</sup>	21.9 <sup>a</sup>
3-70	5.81	3.67 <sup>d</sup>	32.9 <sup>c</sup>
5-50	5.00	3.97 <sup>c</sup>	20.3 <sup>a</sup>
5-70	5.95	3.55 <sup>c</sup>	29.2 <sup>b</sup>
5-90	6.06	3.18 <sup>a</sup>	30.5 <sup>b</sup>

Significant  $P < 0.05$  in the same column

สารประกอบที่สามารถระเหยได้ ได้แก่ แอลกอฮอล์หนัก หรือ fusel alcohol สารประกอบที่เป็นเอสเทอร์ และกรดไขมันอิสระในเบียร์ได้ถูกทำการวิเคราะห์ แสดงในตารางที่ 4.10 พบว่าในเบียร์ที่ผลิตได้มี isoamyl alcohol หรือ 3-methyl-butanol จะมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 570-700 ppm ซึ่งสูงกว่าค่ามาตรฐานของเบียร์ที่ 60 ppm และ isobutanol อยู่ในช่วง 9-29 ppm ซึ่งมีค่ามาตรฐานของเบียร์อยู่ที่ 9.6 ppm การที่เบียร์ที่ได้มีปริมาณของ isoamyl alcohol ในระดับสูงนั้น มาจากการสร้างสาร intermediate ของ isoamyl alcohol ในปริมาณสูง ซึ่งได้แก่ leucine และ 2-phenylalcohol โดยกระบวนการสังเคราะห์ isoamyl alcohol และ isobutanol แสดงในรูปที่ 4.8 จากการศึกษาของ Calderbank และ Hommond (1994) พบว่า แอลกอฮอล์หนัก ได้แก่ isoamyl alcohol และ isobutanol เป็นผลมาจากกระบวนการสร้างเอสเทอร์ โดยพบว่าช่วงเวลาที่ 40 มีอัตราการผลิต isoamyl acetate สูงสุด ซึ่งเป็นเวลาที่ใกล้เคียงกับช่วงเวลาที่มิกิจกรรมของเอนไซม์ alcohol acetyl transferase (AAT) ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์เอสเทอร์ของ acetate ในกระบวนการสร้าง isoamyl acetate จะเกิดขึ้น โดยเฉพาะในน้ำเวิร์ท ที่ความถ่วงจำเพาะสูง (18°P) การเติม isobutanol ลงไป 400 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มอัตราการผลิต isoamyl acetate ระหว่างกระบวนการหมักของน้ำ เวิร์ท ที่มีความหนาแน่นปกติ (9.5°P) อย่างไรก็ตาม การเติม isobutanol ลงไป ก็ไม่มีผลต่อการสร้างสารประกอบเอสเทอร์อื่นๆ ได้แก่ ethyl acetate, isobutyl acetate และ ethyl hexanoate

การใช้มอลต์จากข้าวในระดับสูง และเวลาใช้ระยะเวลาในการงอกที่มากขึ้น จะช่วยเพิ่มการสังเคราะห์สารประกอบเอสเทอร์ในเบียร์มากขึ้น ซึ่งได้แก่ isoamyl acetate, ethyl octanoate, และ ethyl decanoate โดยในเบียร์ที่ผลิตจากมอลต์จากข้าวที่ทำการงอกเป็นเวลา 1, 3 และ 5 วัน มีปริมาณของ ethyl octanoate ที่ 1.3, 7.8 และ 9.9 ppm และมีปริมาณ ethyl decanoate ที่ 2.9, 9.1 และ 13.0 ppm ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบกรดไขมันอิสระในเบียร์ที่มีอยู่อย่างมากมาย ดังแสดงในตารางที่ 4.11 ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าว ปริมาณของกรด octanoic และกรด hexanoic จะพบอยู่ในช่วง 138.3-602.4 ppm และ 17.9-54.3 ppm ตามลำดับ เนื่องจากมอลต์จากข้าว นั้น มีปริมาณของไขมันในระดับสูง (ประมาณ 3 %) มากกว่ามอลต์จากข้าวบาร์เลย์ กรดไขมันที่สามารถระเหยซึ่งจะเป็นสารตั้งต้นของสารประกอบเอสเทอร์ ได้ถูกปลดปล่อยจากการทำงานของเอนไซม์ไลเปสระหว่างกระบวนการทำ mashing และจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อทำการงอกเป็นเวลานานมากขึ้น หรือทำการเพิ่มสัดส่วนของมอลต์จากข้าวให้มากขึ้น อย่างไรก็ตาม กรดไขมันที่สามารถระเหยได้นี้ เป็นสาเหตุหลักของรสชาติที่ไม่พึงประสงค์ในเบียร์ จากรายงานของ Šmogrovičová และ Dömény (1999) พบว่า ปริมาณของกรด hexanoic ที่ความเข้มข้น 5 ppm และกรด octanoic จะให้รสสัมผัสที่คล้ายกับ cheesy, goaty และ sweaty นอกจากนี้ Bosswell และคณะ (2002) ได้รายงานว่าการกวนระหว่างกระบวนการหมักของเบียร์สามารถเพิ่มสารประกอบเอสเทอร์บางชนิดและ fusel alcohol ได้ ซึ่งได้แก่ isoamyl acetate, isobutyl acetate และ isobutanol แต่ก็สามารถลดการเกิด ethyl acetate และ ethyl hexanoate ได้

#### 4.6.2 การประเมินรสชาติของเบียร์

การวิเคราะห์รสชาติของเบียร์จะใช้นักชิมเบียร์จำนวน 12 คน จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยจะทำการประเมินทั้งหมด 5 คุณลักษณะ ซึ่งประกอบด้วย ลักษณะที่ปรากฏภายนอกของเบียร์ กลิ่น รสชาติ รสสัมผัสในปาก และองค์ประกอบโดยรวมทั้งหมด การวิเคราะห์ลักษณะที่ปรากฏภายนอกของเบียร์ จะประเมินจากสายตา ได้แก่ ความใส สี พบว่าที่ 50 % ของมอลต์จากข้าวที่ทำการงอกที่เวลาต่างๆ ให้ค่าเฉลี่ยของคะแนนอยู่ที่ 3.0 (ชอบ) ส่วนที่ 70 % มอลต์จากข้าวที่ทำการงอกเป็นเวลา 1 วัน และ 3 วัน ได้คะแนน 1.5 (ไม่ชอบ) นอกจากนี้ ที่ 70 % มอลต์จากข้าวที่ทำการงอกเป็นเวลา 1 วัน และ 3 วัน ยังพบว่า มีปริมาณของแป้งที่ไม่ถูกย่อยและปริมาณของเด็คตริน ในระดับสูง ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความขุ่นในเบียร์

จากรูปที่ 4.9A แสดงให้เห็นถึงค่าคะแนนของเบียร์ที่ทำมาจาก 50 % มอลต์จากข้าวที่เวลาต่างๆ ของการงอก รสชาติและรสสัมผัสภายในปากจากชุดการทดลอง 3 ชุด ได้แก่ 1-50, 3-50 และ 5-

50 พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน โดยได้คะแนนอยู่ที่ 3.0 และ 3.2 ตามลำดับ ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่า รสชาติ และรสสัมผัสภายในปากของเบียร์ที่ทำจาก 50 % ของมอลต์จากข้าวนั้น ได้รับความชื่นชอบ ในรูปที่ 4.9B แสดงถึงคะแนนของการทดสอบรสสัมผัสของเบียร์ที่ทำจาก 70 % ของมอลต์จากข้าวที่เวลาต่างๆ ของการงอก โดยจะเห็นได้ว่าคะแนนของการทดสอบของคุณลักษณะทั้งหมดมีค่าน้อยกว่าเบียร์ที่ทำมาจาก 50 % มอลต์จากข้าว โดยเฉพาะในเบียร์ที่ทำจาก 70 % ของมอลต์จากข้าวที่ทำการงอกเป็นเวลา 1 วัน มีคะแนนต่ำมาก ที่ 1.0 ของรสชาติ กลิ่น และองค์ประกอบโดยรวมทั้งหมด ซึ่งถูกระบุว่าเป็นเบียร์ที่ไม่สามารถใช้ดื่มได้ จากเหตุดังกล่าว เบียร์ที่ทำจากมอลต์ของข้าวที่ทำการงอกเป็นเวลา 1 วัน จะมีสัดส่วนของเมล็ดที่ยังไม่ถูกย่อยเป็นส่วนมาก ขณะที่คะแนนของเบียร์จากข้าวที่ 70 % ที่ทำการงอกเป็นเวลา 3 วัน และ 5 วัน จะมีคุณลักษณะคล้ายกับเบียร์ที่ผลิตจาก 50 % มอลต์จากข้าว และให้คะแนนขององค์ประกอบโดยรวมทั้งหมด อยู่ที่ 2.0 ซึ่งสรุปได้ว่าสามารถดื่มได้ โดยสรุป คุณภาพของมอลต์จากข้าวไม่มีผลต่อคุณภาพของเบียร์ เมื่อทำการเติมร่วมกับ 50 % มอลต์จากข้าวบาร์เลย์ ส่วนการเพิ่มสัดส่วนของมอลต์จากข้าวที่ 70 % คุณภาพของมอลต์จากข้าวจะขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ใช้ในการงอก ซึ่งจะมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงภายในเมล็ด คุณสมบัติของการ gelatinization และปริมาณของเอนไซม์ที่จะเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการงอก รวมถึงปริมาณของ FAN ด้วย การได้รับการยอมรับของเบียร์จะแปรผันโดยตรงกับปริมาณของการเติมมอลต์จากข้าวบาร์เลย์และคุณภาพของมอลต์จากข้าว ข้อบกพร่องของรสชาติและกลิ่น รวมถึงคะแนนขององค์ประกอบโดยรวมทั้งหมด ของเบียร์ที่ผลิตโดยใช้มอลต์จากข้าวเป็นหลักนั้น จะอยู่ที่สารประกอบที่สามารถระเหยได้ที่อยู่ในเบียร์ (ตารางที่ 4.11) จะมีระดับของกรดไขมันที่สามารถระเหยได้ในระดับสูง ได้แก่ กรด octanoic กรด decanoic และกรด hexanoic ซึ่งเป็นสาเหตุของกลิ่นเหม็นหืนของเบียร์ ส่วน fusel alcohol ในเบียร์ โดยเฉพาะ isoamyl alcohol พบว่ามีความเข้มข้นสูงกว่ามาตรฐานถึง 10 เท่า นอกจากนี้ ความหวาน จะส่งผลต่อรสสัมผัส หลังการกลั่นของเบียร์ ซึ่งจะเกิดจากกลุ่มของ non-fermentable sugar ตัวอย่างเช่น maltotetraose, maltopentaose, เด็กตริน, และ โอลิโกแซคคาไรด์ และกระทั่งมอลโทไรโตรไอส ซึ่งเป็นผลอันเนื่องมาจากการขาดประสิทธิภาพของเอนไซม์ amyolytic โดยเฉพาะ  $\beta$ -amylase รวมถึงเวลาที่ใช้ในการทำ mashing หรือเวลาที่ใช้การทำปฏิกิริยา

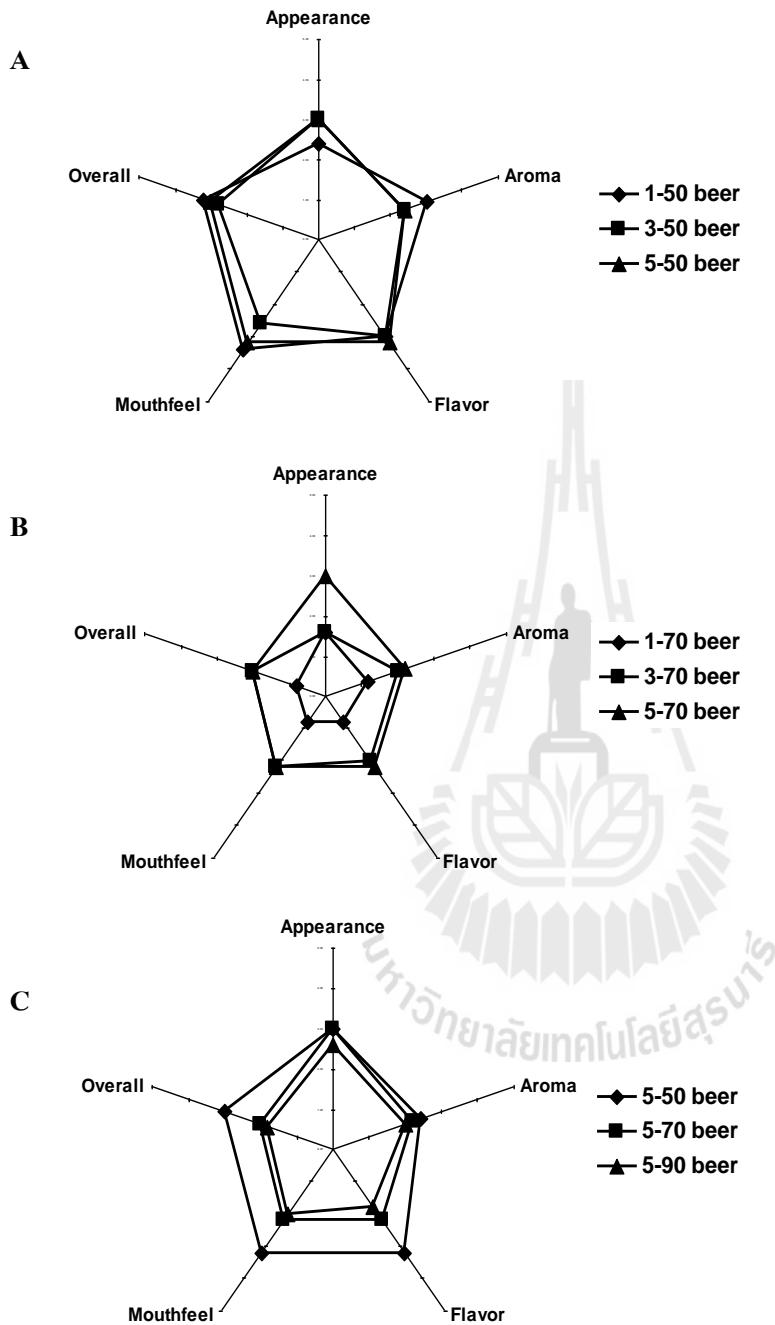
ตารางที่ 4.11 สารประกอบที่สามารถระเหยได้ในเบียร์

Compounds	Concentrations (ppm)						
	1-50	3-50	5-50	1-70	3-70	5-70	5-90
Isoamyl alcohol	674.9 <sup>bc</sup>	709.5 <sup>c</sup>	585.2 <sup>ab</sup>	648.4 <sup>abc</sup>	603.4 <sup>ab</sup>	619.1 <sup>abc</sup>	571.2 <sup>a</sup>
Isobutanol	28.4 <sup>c</sup>	19.9 <sup>bc</sup>	17.7 <sup>ab</sup>	26.8 <sup>bc</sup>	25.8 <sup>bc</sup>	21.1 <sup>bc</sup>	8.9 <sup>a</sup>
Isoamyl acetate	15.7 <sup>a</sup>	22.3 <sup>ab</sup>	18.6 <sup>a</sup>	20.3 <sup>ab</sup>	6.0 <sup>b</sup>	41.8 <sup>d</sup>	33.6 <sup>c</sup>
Ethyl octanoate	3.6 <sup>ab</sup>	2.0 <sup>a</sup>	4.0 <sup>ab</sup>	1.3 <sup>a</sup>	7.8 <sup>ab</sup>	9.9 <sup>b</sup>	10.5 <sup>b</sup>
Ethyl decanoate	7.1 <sup>abc</sup>	5.0 <sup>ab</sup>	6.9 <sup>abc</sup>	2.9 <sup>a</sup>	9.1 <sup>abc</sup>	3.0 <sup>c</sup>	12.5 <sup>bc</sup>
Octanoic acid	244.0 <sup>b</sup>	268.9 <sup>b</sup>	364.6 <sup>c</sup>	138.3 <sup>a</sup>	431.7 <sup>d</sup>	468.6 <sup>d</sup>	602.4 <sup>c</sup>
Hexanoic acid	41.2 <sup>c</sup>	41.3 <sup>bc</sup>	52.8 <sup>d</sup>	17.9 <sup>a</sup>	34.8 <sup>b</sup>	48.1 <sup>cd</sup>	54.3 <sup>d</sup>

Significant  $P < 0.05$  in the same row







รูปที่ 4.9 กราฟใยแมงมุมของการทดสอบรสสัมผัสของเบียร์

(A) 50 % ของมอลต์จากข้าวที่เวลาต่างๆ ของการรอก

(B) 70 % ของมอลต์จากข้าวที่เวลาต่างๆ ของการรอก

(C) วันที่ 5 ของการรอกของข้าวที่สัดส่วนต่างๆ

## บทที่ 5

### สรุปผลการศึกษา

ระยะเวลาที่ใช้ในการงอกมีอิทธิพลต่อคุณภาพของมอลต์จากข้าว ซึ่งส่งผลต่ออัตราการสูญเสียน้ำหนักของมอลต์, ปริมาณ FAN, ค่า extract content, และกิจกรรมของเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วย  $\alpha$ -amylase และ  $\beta$ -amylase ปริมาณของ extract content และ FAN จะมีการเพิ่มขึ้นในอัตราคงที่ ระหว่างที่ทำการงอกในช่วงวันที่ 3 ถึง 9 ของการงอก โดยพบว่าค่าของ extract content สูงที่สุดอยู่ที่การทำการงอกเป็นเวลา 9 วัน และมีปริมาณของ FAN ที่ 145 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของมอลต์ ซึ่งค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับปริมาณของ FAN ในมอลต์จากข้าวบาร์เลย์ (150 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของมอลต์) ขณะที่คุณภาพของมอลต์จากข้าวที่ทำการงอกเป็นเวลา 1 วันนั้น ให้ไม่แตกต่างกับข้าวเปลือก (ชุกควบคุม) ส่วนมอลต์จากข้าวที่ทำการงอกเป็นเวลา 7 และ 9 วัน ไม่ได้รับการยอมรับที่จะใช้สำหรับการทำเบียร์ เนื่องจากมีการสูญเสียน้ำหนักของมอลต์มากกว่า 20 % ของน้ำหนักเริ่มต้น เอนไซม์ทางการค้าของ heat stable  $\alpha$ -amylase, bacterial protease และมอลต์จากข้าวบาร์เลย์ ได้ถูกทำการเติม เพื่อปรับปรุงคุณภาพของน้ำเวิร์ทโดยใช้เทคนิคของ RSM ความเป็นไปได้ของแบบจำลองจะถูกวิเคราะห์ โดยพบว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการงอก, การเติมเอนไซม์ทางการค้าของ  $\alpha$ -amylase และการเติมมอลต์จากข้าวบาร์เลย์ จะมีผลต่อปริมาณของ extract content, ค่า yield, และปริมาณของ fermentable sugar ในน้ำเวิร์ท ขณะที่ระยะเวลาที่ใช้ในการงอกและการเติม bacterial protease จะส่งผลต่อค่า FAN ในน้ำเวิร์ท อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ protease ที่มีอยู่ในมอลต์นั้นจะมีความสำคัญต่อปริมาณของ FAN มากกว่าการเติมเอนไซม์ทางการค้า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ mashing จะอาศัยความสัมพันธ์กับระยะเวลาที่ใช้ในการงอกและสัดส่วนของมอลต์จากข้าวในการทำการศึกษา มอลต์จากข้าวที่ทำการงอกเป็นเวลา 5 วันจะมีปริมาณของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดสูงสุด ที่ 0.4 กรัมต่อ 100 กรัมของมอลต์

ปริมาณสุทธิของ fermentable sugar ของมอลต์ที่ทำการงอกเป็นเวลา 5 วัน โดยทำการเติมที่สัดส่วน 50 % พบว่ามีปริมาณไม่แตกต่างกับมาตรฐานของน้ำเวิร์ท อย่างไรก็ตาม ปริมาณของมอลโตสในน้ำเวิร์ทมาตรฐานจะมีปริมาณค่อนข้างสูง โดยจะมีอยู่ประมาณ 33 % ของ fermentable sugar ทั้งหมด เวลาที่ใช้ในการงอกของมอลต์จากข้าวและการเติมมอลต์จากข้าวบาร์เลย์จะช่วยเพิ่มปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์และเพิ่มความสามารถ ในการใช้ FAN นอกจากนี้ ในการทดลองพบว่า ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากมอลต์จากข้าว จะถูกใช้ไปสูงสุดที่ 70 % แต่ก็น้อยกว่าการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากมอลต์ของข้าวบาร์เลย์ ซึ่งจะอยู่ที่ 80 % การที่น้ำตาลมอลโตโรส ไตรโอสไม่ได้ถูกใช้ไปนั้น เป็นสาเหตุหลักของการผลิตเอทานอลที่ต่ำ สัดส่วนของข้าวมี

ความสำคัญต่อสีของเบียร์ เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยา Maillard ของแอลกอฮอล์ระหว่างกระบวนการทำ mashing และการต้มน้ำเวิร์ท

ปริมาณของ isoamyl alcohol ที่ได้จากการทดลองจะอยู่ในช่วง 570 – 700 ppm ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่ามาตรฐานของเบียร์ สัดส่วนของข้าวและระยะเวลาที่ใช้ในการงอกจะช่วยเพิ่มสารประกอบเอสเทอร์ในเบียร์ ซึ่งประกอบด้วย isoamyl acetate, ethyl octanoate, และ ethyl decanoate คุณภาพของมอลต์จากข้าวที่ทำการเติม 50 % ของมอลต์จากข้าวบาร์เลย์นั้น ไม่มีผลต่อคะแนนในการทดสอบรสสัมผัส นักชิมทั้ง 12 คนยอมรับเบียร์ที่ทำจากมอลต์ของข้าวที่สัดส่วน 50 % ส่วนที่สัดส่วน 70 นักชิมลงความเห็นว่าเป็นเบียร์ธรรมดาที่สามารถดื่มได้

การใช้มอลต์ที่ทำการงอกเป็นเวลา 5 วันเป็นส่วนผสมในการทำเบียร์ที่สัดส่วนมอลต์จากข้าวบาร์เลย์ต่อมอลต์จากข้าวที่ อัตรา 1 ต่อ 1 สามารถลดการใช้มอลต์จากข้าวบาร์เลย์ได้ถึง 50 % โดยไม่มีผลกระทบต่อรสชาติของเบียร์ ซึ่งมอลต์จากข้าวนั้นสามารถผลิตเองได้ภายในประเทศ จึงสามารถลดการนำเข้ามอลต์จากข้าวบาร์เลย์ได้ กระตุ้นให้เกิดการใช้วัตถุดิบภายในประเทศที่สามารถผลิตได้เอง และส่งเสริมการแปรรูปและเพิ่มมูลค่าของสินค้าทางการเกษตร



## อ้างอิง

- Agu, R. C. and Palmer, G. H. (1998). A reassessment of sorghum for lager beer brewing. **Bioresource Technology**. 66: 253-261.
- Alves, L. S., Herberts, R. A., Hollatz, C., Miletti, L. and Stambuk, U. B. (2007). Maltose and maltotriose active transport and fermentation by *saccharomyces cerevisiae*. **Journal of American Society of Brewing Chemist**. 65(2): 99-104.
- Bamforth, C. W. (2009). **Handbook of Alcoholic Beverage Series: Beer A Quality Perspective**. Academic Press.
- Boswell, C. D., Nienow, W. A. and Hewitt, C. J. (2002). Studies the effect of mechanical agitation on the performance of brewing fermentation: fermentation rate, yeast physiology and development of flavor compound. **Journal of American Society of Brewing Chemist**. 60(3): 101-106.
- Briggs, D. E. (1998). **Malts and Malting**. 1<sup>st</sup> ed. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall.
- Calderbank, J. and Hammond, J. R. M. (1994). Influence of higher alcohol availability on ester formation by yeast. **Journal of American Society of Brewing Chemist**. 52(2): 84-90.
- Denault, L. J., Glenister, P. R. and Chau, S. (1981). Enzymology of the mashing step during beer production. **Journal of American Society of Brewing Chemists**. 39(2): 46-52.
- Depraetere, F. A., Delvaux, F., Schutter, D. D., Williams, I. S., Winderickx, J. and Delvaux, F. R. (2008). The influence of wort aeration and yeast preoxygenation on beer staling processes. **Food Chemistry**. 107: 242-249.
- European Brewery Convention, EBC (1998). Analytica-EBC. Germany.
- Gamlatha, J., Aldreda, G. P. and Panozzob, F. J. (2008). Barley (1→3; 1→4)-β-glucan and arabinoxylan content are related to kernel hardness and water uptake. **Journal of Cereal Science**. 47: 365-371.
- Giovanni, M. (1983). Response surface methodology and product optimization. **Food Technology**. 37(11): 41-45.
- Goldammer, T. (2000). **The Brewer's Handbook**. Apex Publisher, U.S.A.

- Goode, D. L. and Halbert, C. (2003). Optimization of mashing conditions when mashing with unmalt sorghum and commercial enzymes. **Journal of American Society of Brewing Chemists**. 68(2): 69-78.
- Gorinstein, S., Kitov, S., Sarel, S., Berman, O., Berliner, M., Popovich, G. and Vermus, Y. (1980). Changes in the chemical composition of beer during the brewing process as a result of added enzymes. **Journal of American Society of Brewing Chemists**. 38(1): 23-26.
- Hansen, J. (1999). Inactivation of *MXR1* Abolishes Formation of Dimethyl Sulfoxide from Ditethyl Sulfoxide in *Saccharomyces cerevisiae*. **Apply Environmental Microbiology**. 65(9): 3915-3919.
- Igyor, M. A., Ogbonna, A. C. and Palmer, G. H. (2001). Effect of malting temperature and mashing methods on sorghum wort composition and beer flavor. **Process Biochemistry**. 36: 1039-1044.
- Keßler, M., Zarnkow, M., Kreis, S. and Back, W. (2005). Gelatinisation properties of different cereals and pseudocereals. **Msch. Brauwissenschaft** 9/10: 82-88.
- Kunze, W. (2004). **Technology Brewing and Malting**. 3<sup>rd</sup> ed. VLB Berlin, Germany.
- Lekkas, C., Stewart, G. G., Hill, A. E., Taidi, B. and Hodgson, J. (2007). Elucidation of the role of nitrogenous wort components in yeast fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**. 113(1): 3-8.
- Markovic, I., Deponte, R., Mari, V. and Johanides, V. (1995). Enzymic hydrolysis of protein grains mashing during barley spent grains mashing. **Process Biochemistry**. 30(5): 411-419.
- Miller, L. G. (1951). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. 31(3): 426-428.
- Moonjai, N. (2005). Comparative study of experimental beers brewed from rice malt with some starchy adjuncts. 31<sup>st</sup> Congress on Science and Technology at Suranaree University of Technology.
- Myers, R. H. and Montgomery, D. C. (2002). **Response Surface Methodology; Process and Product Optimization Using Designed Experiment**. 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley & Sons Inc, Canada.
- Novak, S., Zechner-Krpan, V. and Marić, V. (2004). Regulation of maltose transport and metabolism in *saccharomyces cerevisiae*. **Food Technology and Biotechnology**. 42(3): 213-218.
- Odibo, F. J. C., Nwankwo, L. N. and Agu, R. C. (2002). Production of malt extract and beer from Nigerian sorghum varieties. **Process Biochemistry**. 37: 851-855.

- Palmer, G. H. (2006). Barley and malt. In : Priest, F.G. and Stewart, G.G. (eds.). **Handbook of brewing**. 2<sup>nd</sup> ed. Taylor&Francis Group, CRC press.
- Patel, G. B. and Ingledew, W. M. (1973). Trends in wort carbohydrate utilization. **Applied Microbiology**. 26(3); 349-353.
- Perpete, P., Santos, G., Bodart, E. and Collin, S. (2005). Uptake of amino acid during beer production: The concept of a critical time value. **Journal of American Society of Brewing Chemist**. 63(1): 23-27.
- Pickerel, A. T. W. (1986). The influence of free alpha-amino nitrogen in sorghum beer fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**. 92; 568-571.
- Salubchua, J., Srakeaw, K. and Moonjai, N. (2005). Primary study of rice beer fermentation. 31<sup>st</sup> Congress on Science and Technology at Suranaree University of Technology.
- Šmogrovičová, D. and Dömény, Z. (1999). Beer volatile by-product formation at different fermentation temperature using immobilized yeasts. **Process Biochemistry**. 34: 785-794.
- Usansa U., Sompong N., Wanapu C., Boonkerd N., Teaumroong N. (2009). The influences of steeping duration and temperature on the  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylase activities of six Thai rice malt cultivars (*oryza sativa* L. indica). **J Inst Brew**. 115(2):140–147.
- Usansa U., Burberg F., Geiger E., Back W., Wanapu C., Arendt E.K., Kreisz S., Boonkerd N., Teaumroong N., Zarnkow M. (2011). Optimization of malting conditions for two black rice varieties, black non-waxy rice and black waxy rice (*oryza sativa* L. indica). **J Inst Brew**. 117(1): 39-46.
- Villar, J. C., Cañete, R. E. and Manganelly, E. A. (2004) Why adding rice hull ash can benefit beer clarification. **Filtration & Separation**. 41(6): 32-33.
- Wijngaard, H. H. and Arendt, E. K. (2006). Optimization of a mashing program for 100% malted buckwheat. **Journal of the Institute of Brewing**. 112 (1): 57-65.
- Zhao, R., Zhang, Z., Zhang, R., Li, M., Lei, Z., Utsumi, M. and Sugiura, N. (2010). Methane production from rice straw pretreated by a mixture of acetic–propionic acid. **Bioresource Technology**. 101: 990-994.
- Zheng, X., D'Amore, T., Russell, I. and Stewart, G. G. (1994). Factors influencing maltotriose utilization during brewery wort fermentations. **Journal of American Society of Brewing Chemist**. 52(2): 41-47.

**ภาคผนวก ก**  
**การวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง**

**ตารางที่ ก1** การออกแบบเพื่อวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง

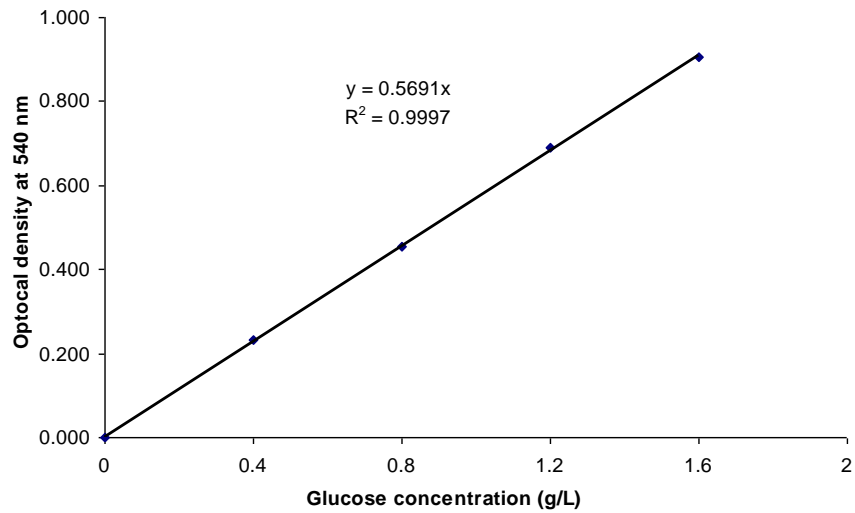
Runs	Coded value				Germinati on time (days)	Actual value		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>		Rice malt (%)	$\alpha$ -amylase (g/100g malt)	Protease (g/100g malt)
1	-1	-1	-1	1	1	50	0.00	0.50
2	0	1	0	0	3	100	0.25	0.25
3	0	0	1	0	3	75	0.50	0.25
4	1	-1	-1	1	5	50	0.00	0.50
5	1	1	-1	-1	5	100	0.00	0.00
6	1	1	1	-1	5	100	0.50	0.00
7	1	0	0	0	5	75	0.25	0.25
8	1	-1	1	-1	5	50	0.50	0.00
9	-1	-1	-1	-1	1	50	0.00	0.00
10	-1	-1	1	1	1	50	0.50	0.50
11	-1	1	-1	-1	1	100	0.00	0.00
12	0	0	0	-1	3	75	0.25	0.00
13	0	0	0	0	3	75	0.25	0.25
14	-1	0	0	0	1	75	0.25	0.25
15	-1	1	1	1	1	100	0.50	0.50
16	0	-1	0	0	3	50	0.25	0.25
17	-1	1	1	-1	1	100	0.50	0.00
18	-1	1	-1	1	1	100	0.00	0.50
19	0	0	0	1	3	75	0.25	0.50
20	1	1	-1	1	5	100	0.00	0.50
21	1	-1	-1	-1	5	50	0.00	0.00
22	-1	-1	1	-1	1	50	0.50	0.00
23	0	0	0	0	3	75	0.25	0.25
24	1	1	1	1	5	100	0.50	0.50
25	0	0	-1	0	3	75	0.00	0.25
26	1	-1	1	1	5	50	0.50	0.50

ตารางที่ ก2 ค่าตอบสนองของชุดการทดลองต่างๆ

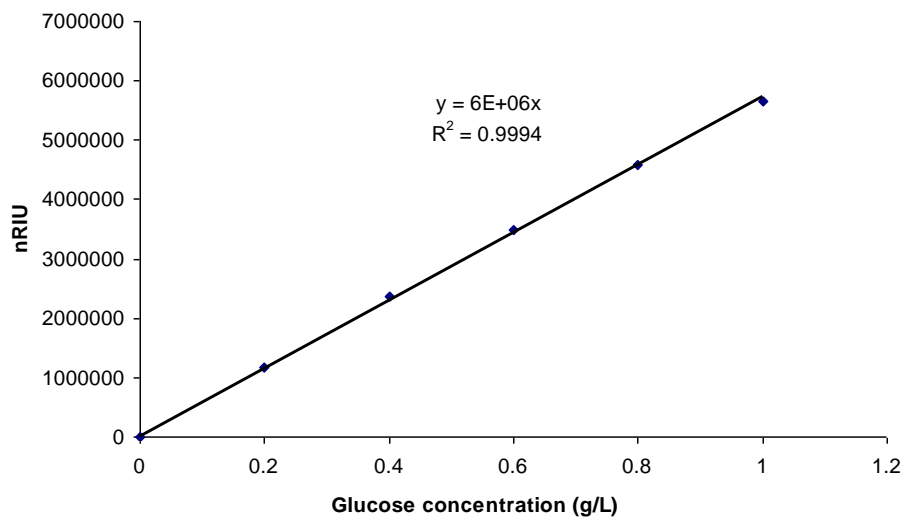
Runs	Coded value				Extract (%)	Responses value		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>		FAN (mg/L)	Yield (%)	Fermentable sugar (g/L)
1	-1	-1	-1	1	80.1.2	244	74.5	70.1
2	0	1	0	0	76.3	146	83.0	43.8
3	0	0	1	0	83.0	205	93.0	74.9
4	1	-1	-1	1	87.2	323	75.6	83.6
5	1	1	-1	-1	37.4	206	54.0	43.9
6	1	1	1	-1	76.6	201	83.6	66.7
7	1	0	0	0	87.1	322	87.4	74.4
8	1	-1	1	-1	88.3	245	85.3	97.7
9	-1	-1	-1	-1	84.0	153	77.6	81.0
10	-1	-1	1	1	90.6	259	86.8	96.3
11	-1	1	-1	-1	16.5	41	28.0	17.5
12	0	0	0	-1	87.0	145	87.1	68.7
13	0	0	0	0	84.1	217	84.6	64.3
14	-1	0	0	0	83.1	196	92.7	55.6
15	-1	1	1	1	76.4	140	89.6	48.6
16	0	-1	0	0	89.9	269	94.1	86.0
17	-1	1	1	-1	74.7	36	85.2	42.0
18	-1	1	-1	1	20.3	150	36.0	22.5
19	0	0	0	1	82.7	238	94.6	63.0
20	1	1	-1	1	79.5	323	77.2	46.1
21	1	-1	-1	-1	83.6	183	81.4	74.3
22	-1	-1	1	-1	81.9	146	87.0	87.3
23	0	0	0	0	82.7	203	87.1	69.8
24	1	1	1	1	79.5	256	86.3	61.4
25	0	0	-1	0	79.8	197	85.8	47.3
26	1	-1	1	1	91.2	309	105.5	78.9



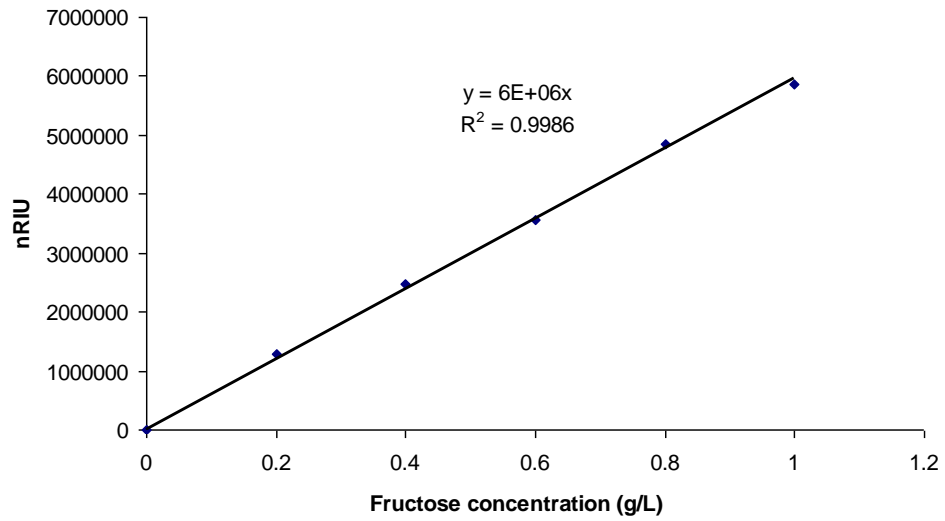
ภาคผนวก ข  
กราฟมาตรฐาน



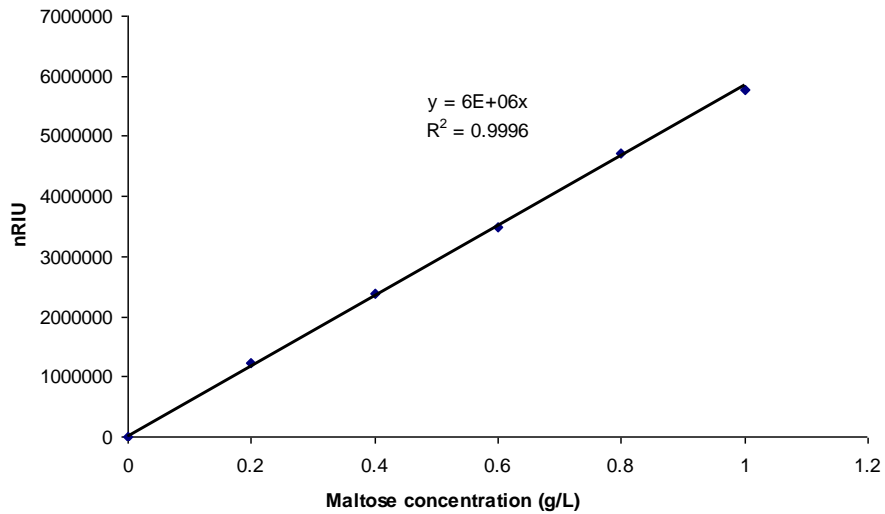
รูปที่ ข1 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกลูโคส วิเคราะห์โดยวิธี DNS



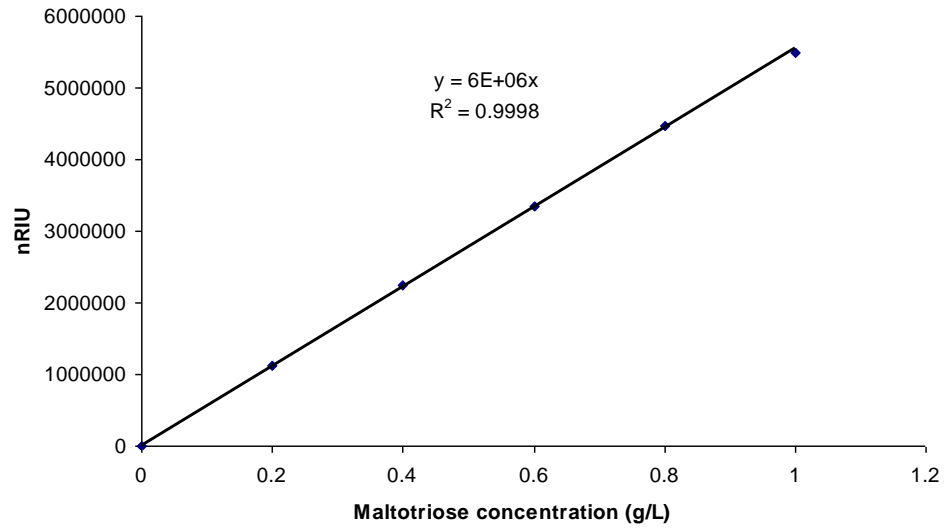
รูปที่ ข2 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกลูโคส วิเคราะห์โดยวิธี HPLC



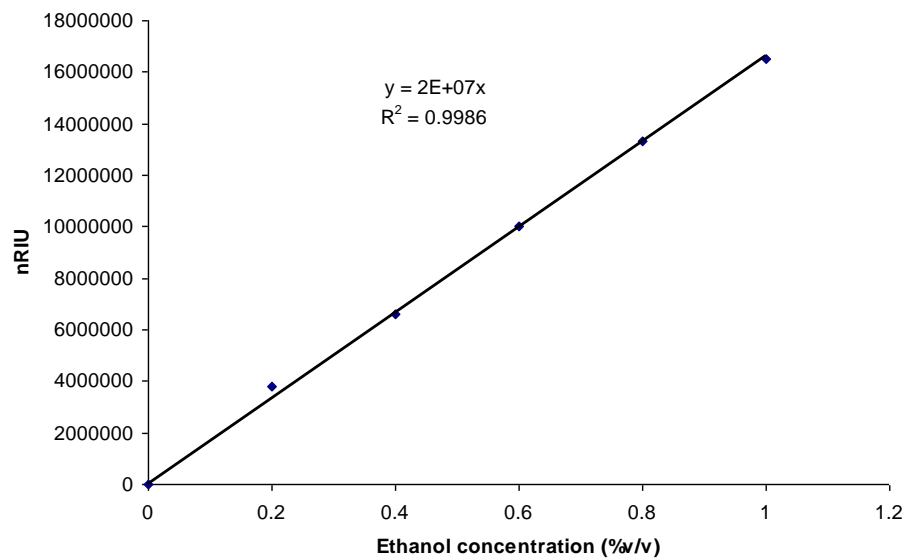
รูปที่ ข3 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานฟรุกโตส วิเคราะห์โดยวิธี HPLC



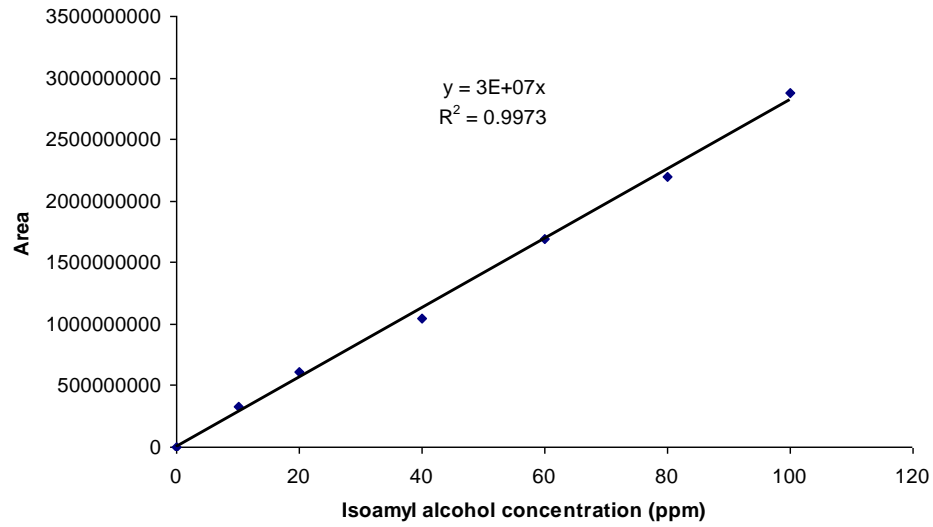
รูปที่ ข4 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานมอลโตส วิเคราะห์โดยวิธี HPLC



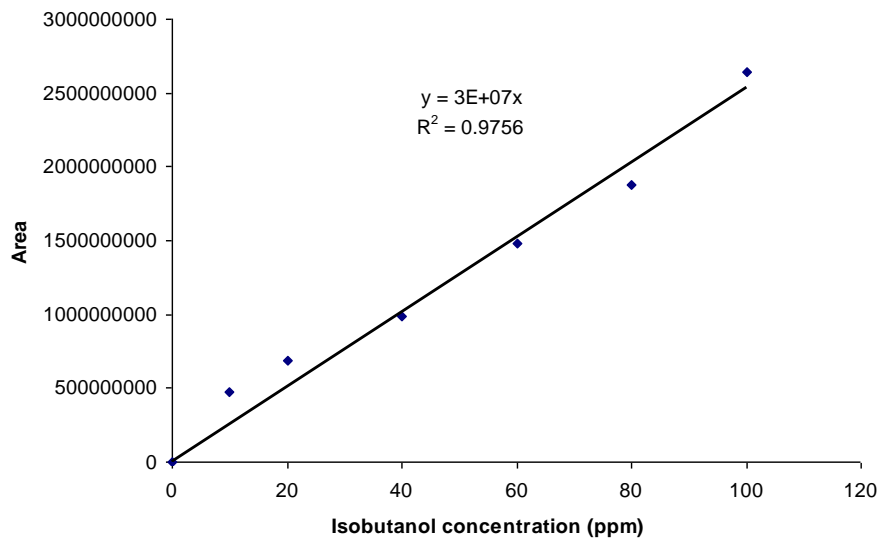
รูปที่ ข5 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานมอลโตไตรโอส วิเคราะห์โดยวิธี HPLC



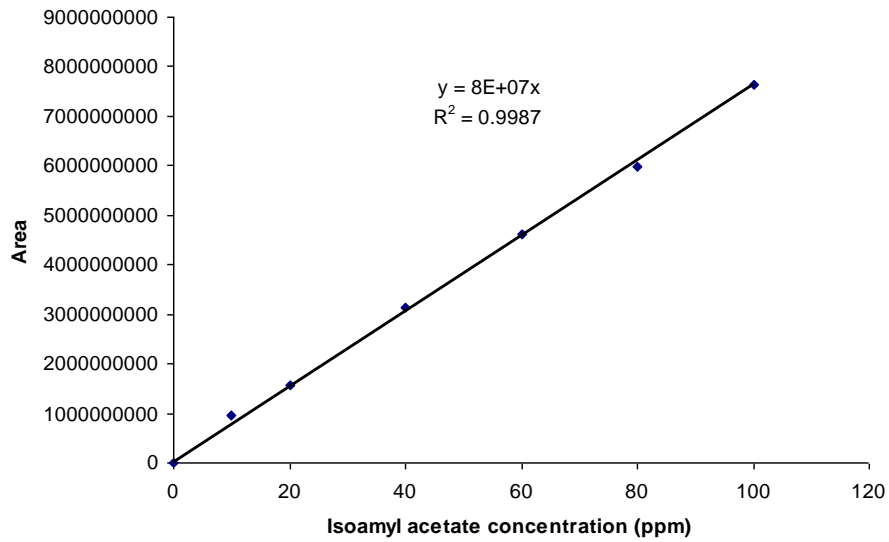
รูปที่ ข6 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเอทานอล วิเคราะห์โดยวิธี HPLC



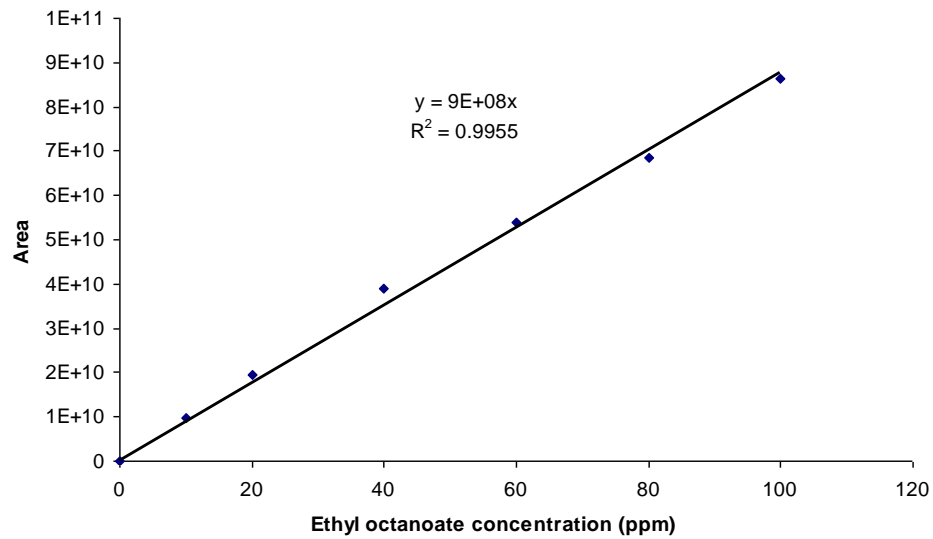
รูปที่ ข7 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ วิเคราะห์โดยวิธี GC-MS



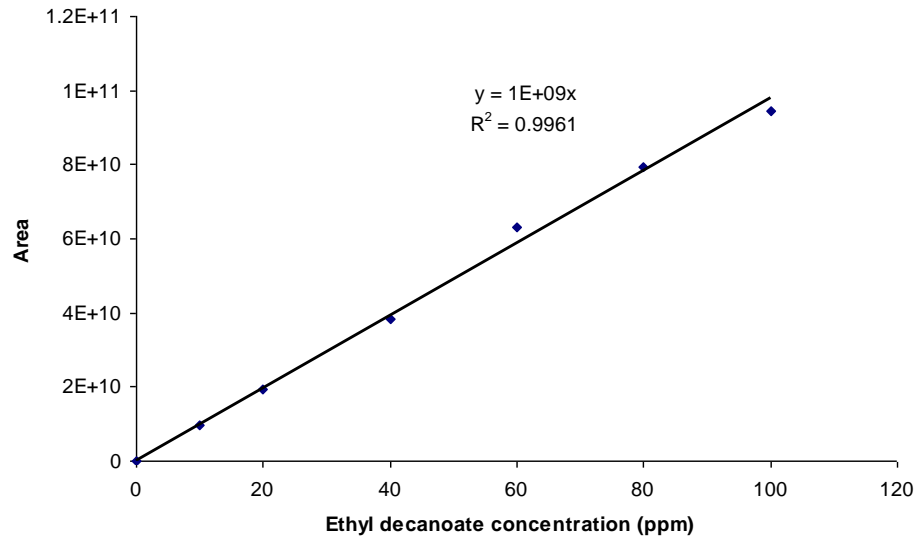
รูปที่ ข8 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน ไอโซบิลทานอล วิเคราะห์โดยวิธี GC-MS



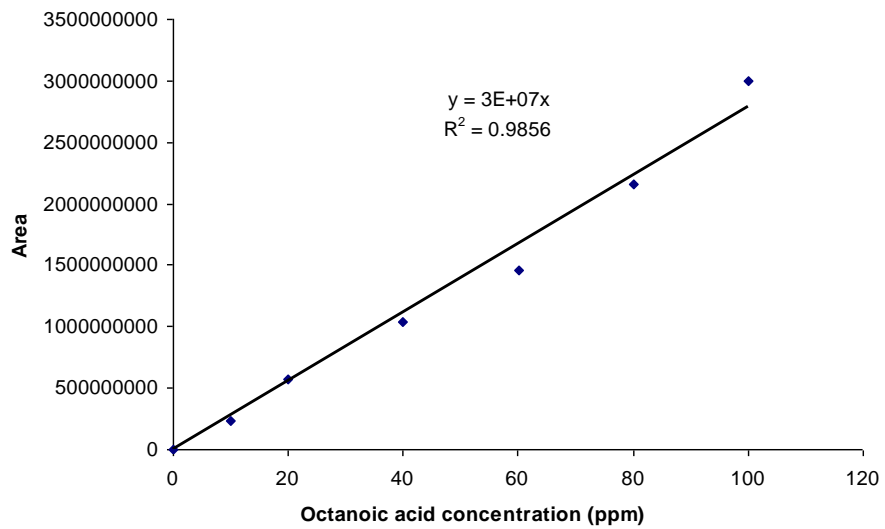
รูปที่ ๗9 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานไอโซเอมิล อะซิเตรท วิเคราะห์โดยวิธี GC-MS



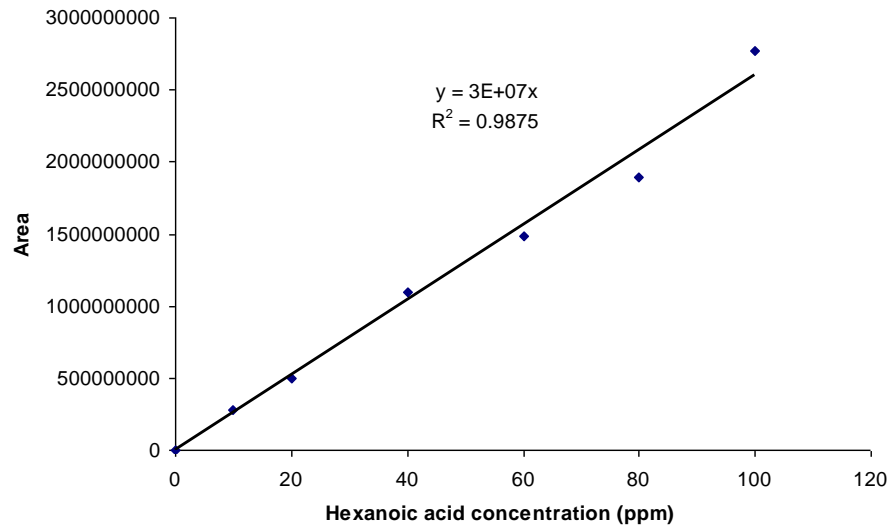
รูปที่ ๗10 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเอทิลออกทาโนเอท วิเคราะห์โดยวิธี GC-MS



รูปที่ ข11 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเอทิลเดคะโนเอท วิเคราะห์โดยวิธี GC-MS



รูปที่ ข12 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกรดออกตะโนอิก วิเคราะห์โดยวิธี GC-MS



รูปที่ ข13 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกรดเฮกซะโนอิก วิเคราะห์โดยวิธี GC-MS



## ประวัติผู้แต่ง

**Name:** Chokchai Wanapu (Intapruk)

**Sex:** Male

**Nationality:** Thai

**Religion:** Buddhism

**Home Address:** 114/246 Ratchsima-Pakthongchai Road, Nong Ja Bok, Muang, Nakhon ratchasima 30000, Thailand.

**Present Status:** Assistant Professor in Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima 30000, Thailand.

### **Education Background and Experience :**

From 1978 – 1982: B.Sc. (Chemistry) from Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiangmai University, Chiangmai, Thailand.

From 1982 – 1984: M.Sc. (Biochemistry) from Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

From 1991 - 1994: Ph.D. (Engineering in Biotechnology) from Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Osaka University, Osaka, Japan.

From 1996 – 1997: Head of Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkla 90110, Thailand.

From 1997 – 1999: Director of Center of Scientific and Equipment, Walailak University, Nakonsritummarat 80000, Thailand.

From 1999 – 2001: Director of Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima 30000, Thailand.

From 2002 – 2005: Manager of SUT's Farm, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima 30000, Thailand.



From 2006 – 2011: Chair, School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakonratchasima 30000, Thailand.

**Scientific Experiences:**

Plant and microbial molecular genetics.

Fermentation Techniques

Biopolymers

**Symposium:**

Krongjai, T. and **Wanapu, C.** (2004) The transformation of chitinase gene into grape plants. The 4<sup>th</sup> National Symposium on Graduate Research. 94.

Usansa, U., **Wanapu, C.** and Boonkerd, N. (2004) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. The 4<sup>th</sup> National Symposium on Graduate Research. 124.

Wongkalasin, K., **Wanapu, C.** and Rodtong, S. (2004) Selection of malolactic bacteria for wine fermentation. The 4<sup>th</sup> National Symposium on Graduate Research. 128.

Kuapunyakoon, T., **Wanapu, C.**, Boonkerd, N. and Chervin, C. (2004) What is the gene which expression depends ethylene receptor inhibition in berry of Cabernet Sauvignon at veraison. The 4<sup>th</sup> National Symposium on Graduate Research. 93.

Cheunkum, O. and **Wanapu, C.** (2002) Production of Lactic acid from cassava solid waste. The 3<sup>rd</sup> National Symposium on Graduate Research. 633-634.

Sripunya, P. and **Wanapu, C.** (2005) Selection of Yeast Strains Containing  $\beta$ -glucosidase for improving Aroma in Grape Wine. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0100.

Tasing, K., **Wanapu, C.**, Boonkerd, N., Wongkaew, S. (2005) Transformation of grape calli variety shiraz with *Leucaena* chitinase cDNA. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0109.

Wongkalasin, K., **Wanapu, C.** and Rodtong, S. (2005) Selection of malolactic bacteria for wine fermentation. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0116.

- Lertpinyochaithaworn, N., Sripiromrak, A. and **Wanapu, C.** (2005) Ma-Maow wine production. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0139.
- Usansa, U., **Wanapu, C.** and Boonkerd, N. (2005) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, F0028.
- Wanapu, C.**, Rattana, P., Teaumroong, N. and Boonkerd, N. (2005) Success stories of stainable factory Management for the Thai traditional alcoholic beverage enterprises. In International Symposium on “Corporate sustainability management – approaches and applications” 24-25 November 2005, Bangkok. Session 2B-3: 1-8.
- Boonkerd N., Teaumroong, N., **Wanapu C.** and Chankhun Y. (2005) Application of Bio and Bioorganic fertilizers in organic farming systems for sustainable agriculture. In International Symposium on “Corporate sustainability management – approaches and applications” 24-25 November 2005, Bangkok. Session 2B-4: 1-7.
- Muaenjang, T. and **Wanapu, C.** (2006) The study of ethanol production of thermotolerant yeast S1 strain. The 11<sup>th</sup> Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006 Bangkok.
- Sripiromrak, A. and **Wanapu, C.** (2006) Isolation and classification of thermotolerant yeast for ethanol production. The 11<sup>th</sup> Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006 Bangkok.
- Wasuwan, R., Boonkerd, N. and **Wanapu, C.** (2006) Classification and nitrogen fixation efficiency analysis of *Azolla* species in rice fields of Thailand. The 11<sup>th</sup> Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006 Bangkok.
- Usansa, U., Wanapu, C. and N. Boonkerd (2005) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. 31st Congress on Science and Technology of Thailand, Chaing Mai, 2005.
- Usansa U., Burberg, F. Geiger, E., Back W., Tea-umroong, N., **Wanapu, C.** Arendt, E. K., Kreis, S. and Zarnkow, M. (2008) The use of response surface methodology to optimize malting conditions of two black rice varieties (*Oryza sativa* L. indica) as a raw material for gluten- free foods. First International Symposium on Gluten-Free Products and Beverages, Cork, Ireland, September 2008.

- Usansa, U., Burberg, F. Geiger, E., Back W., Tea-umroong, N., **Wanapu, C.** Arendt, E. K., Kreis, S. and Zarnkow, M. (2009) The optimization of malting condition for Thai rice. 10th RGJ- Congress. Pattaya, April 2009.
- Usansa, U, Geiger, E., **Wanapu, C.** and Teaumroong, N. (2009) Improvement of nitrogenous content in wort produced from rice malt. ASBC Annual Meeting. Arizona, USA June 6-10, 2009.
- Kongkaew, A., Wanapu, C. and Usansa, U. (2010). Response surface optimization of wort production for brewing from rice malt using commercial enzymes and malt barley. The 16<sup>th</sup> Asian Agricultural Symposium on Agricultural Technology: Sufficiency Agriculture, August 25 – 27, 2010, Faculty of Agricultural Technology, KMITL, Bangkok, Thailand.
- Satsum, A, and **Wanapu, C.** (2010). FT-IR study for hydroxyapatite/alginate nanocomposite beads. The 3<sup>rd</sup> SUT Graduate Conference 2010, November 21 – 23, 2010, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.
- Li, L., **Wanapu, C.**, Huang, X., Huang Q., and Huang, T. (2010). Genetic variation of *Brassica napus* cultivars using SSR markers. The 3<sup>rd</sup> SUT Graduate Conference 2010, November 21 – 23, 2010, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.
- Kongkaew, A., Wanapu, C., and Usansa, U. (2010). Beer production from rice malt based in pilot scale brewing : chemical and sensorial properties approach. The 3<sup>rd</sup> SUT Graduate Conference 2010, November 21 – 23, 2010, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.
- Pinpeangchan, S, And **Wanapu, C.** (2012). Controlled releasing of urea fertilizer by biodegradable polymer with convertional encapsulation. Burapha University International Conference 2012, July 9-11, 2012, Burapha University, Chonburi Thailand.
- Ditsayabut, P., Kupittayanant P., and **Wanapu, C.** (2012). High selenium-Enriched Yeast Production. Burapha University International Conference 2012, July 9-11, 2012, Burapha University, Chonburi Thailand.
- Muaenjang, T., Ponchana P., and **Wanapu, C.** (2012). Improved Enzymatic Hydrolysis of Cassava Residue by Polyethylene Glycol Addition. School of Biotech, IAT, SUT 1<sup>st</sup> International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

- Satsum, A, and **Wanapu, C.** (2012). FT-IR study for Aiginate/Hydroxyapatite/latex Nanocomposite Beads. School of Biotech, IAT, SUT 1<sup>st</sup> International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.
- Pinpeangchan, S, And **Wanapu, C.** (2012). Controlled releasing of urea fertilizer by biodegradable polymer with convertional encapsulation. School of Biotech, IAT, SUT 1<sup>st</sup> International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.
- Ditsayabut, P., Kupittayanant P., and **Wanapu, C.** (2012). High selenium-Enriched Yeast Production. School of Biotech, IAT, SUT 1<sup>st</sup> International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.
- Pliansrithong P., Usansa U., and **Wanapu, C.** (2012).Protein Properties in Broken Rice for optimizing of Rice Ratio in Beer Production. School of Biotech, IAT, SUT 1<sup>st</sup> International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.
- Lertpinyochaithaworn N, and **Wanapu, C.** (2012). Effect of ethanolic on black-kernal rice flavonoids character. School of Biotech, IAT, SUT 1<sup>st</sup> International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

#### **Scientific Publication:**

- Intapruk, C.**, Tirawanchai, N., Wilairat, P. and Panyim, S. (1984) Application of cloned malaria parasite DNA in strain identification. Mahidol University Annual Research Abstracts 11, 297.
- Intapruk, C.** (1984) in Manual for international laboratory workshop "Genetic engineering techniques in tropical diseases research" to be published by WHO special programme for research and training in tropical diseases, 195-204.
- Wilairat, P., Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Tungpradubkul, S. and Panyim, S. (1984) Strain characterization of human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, by the use of a cloned parasite DNA probe. Microbial utilization of renewable resources. 4, 210-213.
- Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Wilairat, P., Yuthavong, Y. and Panyim, S. (1985) Cloning of repetitive DNA from *Plasmodium falciparum* and its use in strain and species identification. Mahidol University Annual Research Abstracts, 12, 250.

- Intapruk, C.** (1985) in Manual for national laboratory workshop "DNA cloning techniques" (in Thai) to be published by the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, the Ministry of Science and Technology, 172-188.
- Wilairat, P., Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Tungpradabkul, S., Sertsrivanich, R., Panyim, S., Yuthavong, Y. (1985) Recombinant DNA techniques as potential diagnostic means. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 21, 299-305.
- Sriroongrueng, W. and **Intapruk, C.** (1989) The prenatal diagnosis of thalassemias (in Thai). *Songkla Med J.* 6, 428-435.
- Intapruk, C.**, Higashimura, N., Yamamoto, K., Okada, N., Shinmyo, A. and Takano M (1991) Nucleotide sequences of two genomic DNAs encoding peroxidase of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 98: 237-241.
- Intapruk, C.**, Yamamoto, K., Fujiyama, K., Shinmyo, A. and Takano, M. (1993) Cloning of cDNAs encoding two peroxidases of *Arabidopsis thaliana*. *J Ferment Bioeng* 75: 166-172.
- Shinmyo, A., Fujiyama, K., Kawaoka, A. and **Intapruk, C.** (1993) Structure and expression of peroxidase isozyme genes in horseradish and *Arabidopsis*. In: KG Welinder, SK Rasmussen, C Penel and H Greppin, eds, *Plant Peroxidases Biochemistry and Physiology*. Univ Geneva, Switzerland, pp 222-228.
- Intapruk, C.**, Yamamoto, K., Sekine, M., Shinmyo, A. and Takano, M. (1994) Regulatory sequences involved in the peroxidase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* 13: 123-129.
- Intapruk, C.**, Takano, M. and Shinmyo, A. (1994) Nucleotide sequence of a new cDNA for peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 104: 285-286.
- Wanapu, C.** and Shinmyo, A. (1996) *cis*-Regulatory of the peroxidase gene in *Arabidopsis thaliana* involved in root specific expression and responsiveness to high-salt stress. *Ann New York Acad Sci.* 782 (12): 107-114.
- Rodtong, S.; **Wanapu, C.** and Ishizaki, A. (2000) Starch-utilizing bacteria for L-lactic acid production. The 12<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. 52.
- Kanchanatawee, S., **Wanapu, C.** and Ketudat-Cairns, M. (2000) Biotechnology postgraduate program in Thailand. *Thai J. Biotechnol.* 2, 55-62.
- Sripo, T., Phongdara, A., **Wanapu, C.** and Caplan, A.B. (2002) Screening and characterization of aldehyde dehydrogenase gene from *Halomonas salina* strain AS11. *J. Biotech.* 95, 171-179.

- Kuapunyakoon, T. and **Wanapu, C.** (2003) Effects of diammonium phosphate (DAP) supplementation on growth rate and ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae* K1-V1116 in tamarind wine. Suranaree J. Sci. Technol. 10: 147-151.
- Sripunya, P., **Wanapu, C.** and Boonkerd, N. (2005) Effect of  $\beta$ -glucosidase enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* on aroma production during mango (Chok-anan) wine fermentation. Thai J. Biotechnol. 6: 50-56.
- Usansa, U., Sompong, N., **Wanapu, C.**, Boonkerd, N. and Teaumroong, N. (2009) The influences of steeping duration and temperature on the  $\alpha$ - and  $\beta$ - amylase activities of six Thai rice malt cultivars (*Oryza sativa* L. indica). J. Inst. Brew. 105 (2) 140-147.
- Teaumroong, N., **Wanapu, C.**, Chankum, Y., Arjharn, W., Sang-Arthit, S., Teaimthaisong, K. and Boonkerd, N. (2010) Production and application of bioorganic fertilizers for organic farming systems in Thailand: A case study. In: Insam, H. , Franke-Whittle, I. and Goberna, M. (eds). Microbs at work: from wastes to resources. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 294-296.
- Usansa, U., Burberg, F., Geiger, E., Back, W., **Wanapu, C.**, Arendt, E.K., Kreis, S., Boonkerd, N., Teaumroong, N. and Zarnkow, M. (2011) Optimization of malting for two black rice varieties, black non-waxy rice and black waxy rice (*Oryza sativa* L. Indica). J. Inst. Brew. 117(1), 39–46.
- Vechklang, K., Boonanuntanasarn S. Ponchunchoovong, S., Pirarat N. and **Wanapu, C.** (2011) The potential for rice wine residual as an alternative protein source in a practical diet for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at the juvenile stage. Aqua. Nut., 17(6), 685-694.
- Li L., **Wanapu, C.**, Huang, X., Huang, T., Li, Q., Peng, Y. and Huang, G. (2011) Comparison of AFLP and SSR for Genetic Diversity Analysis of *Brassica napus* Hybrids. J Agri. Sc. 3(3), 101-110.
- Boonterm, C., **Wanapu, C.**, Silapapun, A. and Boonkerd, N. (2011) Effects of nitrogen, potassium fertilized, and clusters per vine on anthocyanins content in cabernet sauvignon wine. Suranaree J. Sci. Technol. 18(1), 41-54.
- Li, L., Huang, X., **Wanapu, C.**, Li, Q., Huang, G. and Huang, T. (2011) Genetic diversity analysis of 25 rapeseed varieties from Guizhou rapeseed regional test by SSR marker. Guizhou Agri. Sc. 11, 1-4 (in Chinese).

- Wanapu, C.,** Sripunya, P. and Boonkerd, N. (2012) Selection of yeast strains  $\beta$ -glucosidase for improving wine aroma. *J. Agri. Sc. Technol. B*, 2, 691-702.
- Kongkaew, A., Usansa, U. and **Wanapu, C.** (2012) Beer production from rice mait based in pilot-scale: volatile compounds and sensorial properties analysis. *The Journal of King Mongkut's University of Technology*. 3(1), 86-94.
- Kongkaew, A., Usansa, U. and **Wanapu, C.** (2012) Optimisation of wort production from rice malt using enzymes and barley malt. *Af. J. Biotech.* 11(42), 9941-9949.
- Vechklang, K., Lim, C., Boonanuntasarn, S., Welker, T., Ponchunchuwong, S., Klesius, P.H. and **Wanapu, C.** (2012) Growth performance and resistance to *Streptococcus iniae* of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets supplemented with GroBiotic-A and Brewtech dried brewers yeast. *J App. Aqua.* 24, 183-198.

**Patents:** 5 Thai patents and 3 Trade Secrets.

**Current Research Works:**

1. The Bioprocess Control of Microbial Alginates for Industrial Production.
2. Composition of Biopolymer and Filmogenics.
3. Improvement of Bioethanol Production by Using Thermotolerant Yeasts and Bioconversion.
4. Thai Rice Beer Production.