



รายงานการวิจัย

การผลิตเบียร์จากข้าวไทย (Beer Production from Thai Rice)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โชคชัย วนภู

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2547-2549

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กุมภาพันธ์ 2553

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการศึกษาวิจัย ผ่านมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ภายใต้โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก ขอขอบคุณ Prof. Eberhard Geiger และบุคลากรใน Institute of Brewing Technology II, Technical University of Munich, Germany ที่ให้คำแนะนำและสนับสนุนงานวิจัยนี้เป็นอย่างดี

คณะผู้วิจัย
กุมภาพันธ์ 2553

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการผลิตเบียร์จากข้าวไทย โดยทำการศึกษาผลของอุณหภูมิ (20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส) และระยะเวลาการแช่เมล็ดข้าว (24, 48 และ 72 ชม.) ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟา และเบต้าแอมิเลสในข้าวที่ใช้ในการทดลอง ทั้ง 6 สายพันธุ์ แบ่งเป็นข้าวเจ้า 3 พันธุ์ คือ ข้าวหอมดอกมะลิ 105, ข้าวปทุมธานี 60 และ ข้าวเจ้าดำ และข้าวเหนียว 3 พันธุ์ คือ ข้าว กข.6 ข้าวเหนียวสันป่าตอง และข้าวเหนียวดำ จากการทดสอบพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และการแช่ข้าวในน้ำต่อเนื่องเป็นเวลานานกว่า 24 ชม. ส่งผลในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เบต้าแอมิเลส และชะลอกิจกรรมของอัลฟาแอมิเลส จึงทำการปรับวิธีการแช่เป็นแบบแช่น้ำระยะสั้นสลับกับการผึ่งลม โดยศึกษากับข้าวสองสายพันธุ์คือ ข้าวเจ้าดำ และข้าวเหนียวดำ โดยมีปัจจัยที่ทำการศึกษาคือ อุณหภูมิ ระดับความชื้นจากการแช่น้ำ และระยะเวลาการงอก ออกแบบการทดลองด้วยวิธีการตอบสนองบนพื้นผิว พบว่า สภาวะในการทำมอลท์ที่ให้คุณภาพมอลท์ที่มี cold water extract, extract yield, Kolbach index, ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ, apparent attenuation limit และเอนไซม์อัลฟาแอมิเลสสูงคือ เพาะข้าวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยแช่น้ำด้วยวิธีแช่สลับจนความชื้นเท่ากับ 44 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาการงอกรวมเป็นแปดวัน และอบแห้งที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากทำความสะอาดมอลท์พบว่าการสูญเสียน้ำหนักอยู่ที่ประมาณ 12%

มอลท์ข้าวถูกผลิตตามสภาวะดังกล่าวแล้วทำการศึกษาช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการทำ mashing และเปรียบเทียบวิธีการ mashing 4 แบบ พบว่า มอลท์ข้าวเจ้าดำเหมาะสำหรับการทำ mashing ที่เพิ่มอุณหภูมิ 52, 55 และ 57 องศาเซลเซียส เพื่อเน้นการผลิตน้ำตาลกลูโคส และมอลท์ข้าวเหนียวดำเหมาะกับการที่เพิ่มอุณหภูมิ 62 และ 64 องศาเซลเซียส เพื่อการผลิตน้ำตาลมอลโทส โดยพบว่าค่า pH ของ mashing-in และ divalent cation ที่เหมาะสมคือ pH 5.2 และ Ca^{2+} ปริมาณ 150 มิลลิกรัม/ลิตร นอกจากนี้การบดข้าวมอลท์ยังส่งผลต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระในเวิร์ทจากมอลท์ข้าวเจ้าดำและข้าวเหนียวดำ สำหรับมอลท์ข้าวเจ้าดำเหมาะกับการบดด้วยวิธี two roller mill โดยปรับระยะห่างของลูกกลิ้งอยู่ที่ ระยะ 0.5 มิลลิเมตร และมอลท์ข้าวเหนียวดำเหมาะกับการบดหยาบที่ระยะ 1.0 มม. จากนั้นทำการผลิตเวิร์ทด้วยสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว โดยใช้เครื่อง brew master mashing unit และให้ผล brewing yield ที่ $39 \pm 0.2\%$ สำหรับมอลท์ข้าวเจ้าดำ และ $38.4 \pm 2.8\%$ สำหรับมอลท์ข้าวเหนียวดำ จากการหมักเบียร์ด้วยยีสต์สองสายพันธุ์ คือ *Saccharomyces cerevisiae* 34/70 สำหรับการหมักแบบ bottom fermentation และ *S. cerevisiae* 60/120 สำหรับการหมักแบบ top fermentation พบว่ายีสต์สายพันธุ์ 60/120 ใช้กรดอะมิโนอิสระ (215 มิลลิกรัม/ลิตร จากเวิร์ทข้าวเจ้าดำ และ 168

มิลลิกรัม/ลิตร จากเวิร์ทข้าวเหนียวดำ) สูงกว่าสายพันธุ์ 34/70 (125 และ 109 มิลลิกรัม/ลิตรในเวิร์ท จากข้าวเจ้าดำและข้าวเหนียวดำ ตามลำดับ) และพบปริมาณ ester, higher alcohol, diacetyl และ 4-vinyl guaiacol ในเบียร์ประเภท ale สูงกว่าที่พบในเบียร์ประเภท lager จากผลการทำ sensory test พบว่า คะแนนความประทับใจโดยรวมต่อเบียร์ประเภท ale ที่ผลิตจากมอลท์ข้าวเจ้าดำ มีคะแนนอยู่ในระดับดีไม่ได้ แต่เบียร์ประเภท ale จากมอลท์ข้าวเหนียวดำจัดอยู่ในระดับดีได้ แต่ไม่ขอแก้ว ถัดไป ขณะที่เบียร์ประเภท lager จัดอยู่ในระดับคะแนนดีได้และต้องการแก้วถัดไป การศึกษานี้ทำให้ทราบว่ามอลท์จากข้าวดำมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเบียร์ที่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคได้

Abstract

The aim of this research was to investigate the optimal condition for brewing processes of rice beer. The malting conditions were investigated in terms of temperatures (20, 25 and 30°C) and steeping durations (24, 48 and 72 hrs.) on α - and β -amylase activities of six Thai rice cultivars, including three non waxy rice cultivars (Khaw Dok Mali 105 (KDML105), Pratum Thani 60 (PT60) and Khao Chao Dam (KCD)) and three waxy rice cultivars (San Pa Tong (SPT), Khokho 6 (RD6) and Khao Niew Dam (KND)). It was found that amylolytic activities of the rice malt were increased with temperature, better at 30°C than 25 °C and 20 °C; and those activities of the two enzymes were higher than 25 °C and 20 °C, respectively; whereas long steeping duration for more than 24 hours inhibited the activities of β -amylase and retarded α -amylase. Therefore, the steeping condition was modified to the short steeping-air-rest switching regime. The black non-waxy rice "KCD" and black waxy rice cultivars "KND" were selected to optimize the germination condition under the different temperatures, steeping degrees and durations of germination. Response surface methodology was used to design experiment as face centered composite design and to establish empirical models for each malt properties.

It was also found that both cultivars of rice had satisfied properties, high cold water extract (CWE), extract yield, Kolbach index, free alpha amino acid (FAN), apparent attenuation limit (AAL), and α - amylase activities by germinating at temperature 30°C, steeping by air-rest switching until the degree of steeping reached 44%, and germinating for 8 days and dried at 50°C for 24 hrs. The cleaned malt had malting losses approximately 12%. These malts were further used for mashing analysis. The 4 mashing regimes for rice malts were investigated for improving the wort quality. The results demonstrated that the temperature-programmed which focused on glucose production in a range of 52, 55 and 57°C was suitable to produce wort from KCD rice malt. The temperature-programmed which focused on maltose production at 62 and 64°C was selected for KND rice malt. The pH of mashing-in and divalent cations strongly influenced wort soluble nitrogen and FAN, and the optimal mashing-in pH for both rice malts was at 5.2 supplemented with Ca^{2+} 150 mg/L. The method of grinding using two roller mills influenced FAN content significantly; therefore, KCD was milled at a gap distance of 0.5 mm and KND at 1.0 mm. The selected mashing conditions were used to produce wort by using a brew master mashing unit and 39±0.2% of brewing yield was obtained by KCD malt and 38.4±2.8% by KND malt. Beers

were produced by using *Saccharomyces cerevisiae* 34/70 and *S. cerevisiae* 60/120 for bottom and top fermentation processes, respectively. The yeast strain 60/120 consumed FAN in wort (215 mg/L and 168 mg/L for KCD and KND wort, respectively) more than strain 34/70 (125 and 109 mg/L for KCD and KND wort, respectively). Consequently, volatile compounds such as ester, alcohol diacetyl and 4-vinyl guaiacol in ale beer were higher than in lager beer. The sensory evaluation of beers indicated that the overall impression of ale beer from KCD malt was undrinkable, ale beer from KND malt was drinkable but not preferable for the next glass, whereas the lager beers from both rice cultivars were judged as drinkable and preferable for the next glass. The results obtained from this research clearly demonstrated that black rice malt could be used as raw material for producing beers with an acceptable quality.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ข
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 องค์ประกอบสำคัญในการผลิตเบียร์	4
2.2 ขั้นตอนในการผลิตเบียร์	5
2.3 การหมัก	7
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	
3.1 การผลิตมอลต์จากข้าวไทย	8
3.2 การหาสถานะในการผลิตมอลต์ด้วยวิธีการตอบสนองบนพื้นผิว	10
3.3 การศึกษาการเพิ่มปริมาณ extract content and soluble nitrogen ใน wort ด้วยกระบวนการ mashing	13
3.4 การผลิตเบียร์จากมอลต์ข้าวเจ้าดำและมอลต์ข้าวเหนียวดำ	14

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการศึกษาวิจัย	
4.1 การผลิตมอลต์จากข้าวไทย	18
4.2 การหาสภาวะในการผลิตมอลต์ด้วยวิธีการตอบสนองบนพื้นผิว	25
4.3 ผลของ independent variables ที่มีต่อคุณลักษณะของมอลต์หรือ response variables	29
4.4 คุณภาพมอลต์อื่น ๆ ได้แก่ β -amylase, limit-dextrinase, α -glucosidase, และ malting losses	32
4.5 ผลของช่วงอุณหภูมิในการอบแห้งที่มีต่อคุณภาพของข้าวมอลต์	40
4.6 การศึกษาการเพิ่มปริมาณ extract content และ soluble nitrogen ใน wort ด้วยกระบวนการ mashing	42
4.7 การผลิตเบียร์จากมอลต์ข้าวเจ้าดำและมอลต์ข้าวเหนียวดำ	57
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	
5.1 การผลิตมอลต์จากข้าวไทย	68
5.2 การหาสภาวะในการผลิตมอลต์ด้วยวิธีการตอบสนองบนพื้นผิว	68
5.3 การศึกษาการเพิ่มปริมาณ extract content และ soluble nitrogen ใน wort ด้วยกระบวนการ mashing	68
5.4 การผลิตเบียร์จากมอลต์ข้าวเจ้าดำและมอลต์ข้าวเหนียวดำ	69
บรรณานุกรม	70
ประวัตินักวิจัย	75

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 โปรแกรมการแช่น้ำสลับกับการพักน้ำ	10
4.1 เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์กิจกรรมต่อหนึ่งหน่วยโปรตีนในข้าวมอลท์ที่พบ สูงสุดในตัวอย่างที่ผ่านการแช่น้ำ 24 ชั่วโมง และเพาะที่อุณหภูมิต่าง ๆ	23
4.2 ความยาวของยอดและรากจากข้าวงอก ในวันที่ 4-6	24
4.3 คุณสมบัติของข้าวเจ้าดำและข้าวเหนียวดำ	25
4.4 แสดงค่า coefficient ของ parameter ที่ประกอบอยู่ในแบบจำลองคณิตศาสตร์ และผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแบบจำลองของมอลท์ข้าวเจ้าดำ	27
4.5 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ของ parameter ที่ประกอบอยู่ในแบบจำลองคณิตศาสตร์ และผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแบบจำลองของมอลท์ข้าวเหนียวดำ	28
4.6 แสดงค่าที่คาดคะเนจากแบบจำลองเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดสอบจริง	29
4.7 เปรียบเทียบคุณภาพมอลท์ข้าวเจ้าดำและข้าวเหนียวดำกับมอลท์ที่ผลิตจากธัญพืช ต่าง ๆ	40
4.8 คุณภาพมอลท์ข้าวเหนียวดำและมอลท์ข้าวเจ้าดำที่ผ่านการทำแห้งในช่วงอุณหภูมิ ต่าง ๆ	41
4.9 แสดงผลของ mashing program ต่างๆต่อคุณภาพของ wort	48
4.10 ผลของ mashing-in pH ต่อคุณภาพ wort	49
4.11 คุณภาพทางเคมีและกายภาพของ wort ที่ได้จากการ mash ด้วยเครื่อง braumaister unit และคุณภาพของเบียร์ทั้งสองชนิดที่ได้จากมอลท์ข้าวเจ้าดำและ มอลท์ข้าวเหนียวดำ	63
4.12 แสดงกรดอะมิโนที่พบในตัวอย่าง wort, cast wort และ เบียร์	64

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า	
3.1	ไดอะแกรมจำลองการแผนการทดลองแบบ face-centered composite design	11
4.1	ปริมาณความชื้นในข้าวที่ผ่านการแช่น้ำเป็นระยะเวลาต่างๆ	19
4.2	เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ในข้าวมอลท์ที่เพาะที่ 30 องศาเซลเซียสและแช่น้ำเป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน	20
4.3	เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ β -amylase ต่อหนึ่งหน่วยโปรตีนในข้าวมอลท์เพาะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยผ่านการแช่น้ำ	21
4.4	ผลของระยะเวลาการแช่น้ำต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่งในข้าวมอลท์ที่เพาะ 6 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	22
4.5	แสดงผลของการทำ numerical optimization ที่ระบุสถานะที่เหมาะสมซึ่งให้ค่า desirability สูงสุด คือ สถานะการเพาะข้าวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เปรอร์เซ็นต์ความชื้นจากการแช่น้ำที่ 44% และเพาะข้าวในหังอกเป็นเวลา 8 วัน	33
4.6	แสดงภาพการตอบสนองแบบพื้นผิวของ CWE ที่ได้จากมอลท์ข้าวเจ้าดำ ซึ่งเป็นผลของ interaction term ของ ระยะเวลาการเพาะกับปริมาณความชื้นที่มีต่อข้าวที่เพาะที่ 30°C และมอลท์ข้าวเหนียวดำ ซึ่งเป็นผลจาก interaction term ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความชื้นจากการแช่น้ำและอุณหภูมิที่มีต่อ CWE ที่วัดจากตัวอย่างที่เพาะเป็นเวลา 8 วัน	34
4.7	แสดงภาพการตอบสนองแบบพื้นผิวของ extract content ที่ได้จากมอลท์ข้าวเจ้าดำ ซึ่งเป็น ผลของ interaction term ระหว่างระยะเวลาการเพาะกับอุณหภูมิที่มีผลต่อ extract content มอลท์ที่เพาะภายใต้ปริมาณความชื้น 44%, และมอลท์ข้าวเหนียวดำ ซึ่งเป็นผลจาก interaction term ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความชื้นจากการแช่น้ำและอุณหภูมิที่มีต่อ CWE ที่วัดจากตัวอย่างที่เพาะเป็นเวลา 8 วัน	35
4.8	แสดงภาพการตอบสนองแบบพื้นผิวของ Kolbach index ที่ได้จากมอลท์ข้าวเจ้าดำ ซึ่งเป็นผลของ interaction term ระหว่างระยะเวลาการเพาะกับอุณหภูมิที่มีผลต่อ Kolbach index จากมอลท์ที่เพาะภายใต้ปริมาณความชื้น 44%, และ FAN ซึ่งเป็นผลจาก interaction term ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความชื้นจากการแช่น้ำและอุณหภูมิที่มีต่อ FAN ที่วัดจากตัวอย่างที่เพาะเป็นเวลา 8 วัน	36

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.9 แสดงภาพการตอบสนองแบบพื้นผิวของ Kolbach index ที่ได้จากมอลท์ข้าวเหนียวดำ ซึ่งเป็นผลของ interaction term ระหว่างระยะเวลาการเพาะกับ อุณหภูมิ ที่มีผลต่อ Kolbach index จากมอลท์ที่เพาะภายใต้ปริมาณความชื้น 44%, และ FAN ซึ่งเป็นผลจาก interaction term ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความชื้น จากการแช่น้ำและอุณหภูมิที่มีต่อ FAN ที่วัดจากตัวอย่างที่เพาะเป็นเวลา 8 วัน	37
4.10 แสดงภาพการตอบสนองแบบพื้นผิวของ AAL ที่ได้จากมอลท์ข้าวเจ้าดำ ซึ่งเป็นผลของ interaction term ระหว่างปริมาณความชื้นจากการแช่น้ำกับ อุณหภูมิ ที่มีผลต่อ Kolbach index จากมอลท์ที่เพาะเป็นเวลา 8 วัน, และกราฟ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า CWE กับ AAL จากมอลท์ข้าวเจ้าดำ และมอลท์ ข้าวเหนียวดำ	38
4.11 แสดงภาพการตอบสนองแบบพื้นผิวของ α -amylase activity ในมอลท์ข้าวเจ้าดำและมอลท์ข้าวเหนียวดำ ที่ผ่านการเพาะ 8 วัน ซึ่งเป็นผลของ interaction term ระหว่างปริมาณความชื้นจากการแช่น้ำกับอุณหภูมิ	39
4.12 กราฟแสดงการเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิและเวลาในการ mash ที่มีต่อ ปริมาณ soluble nitrogen ใน wort ที่ได้จากการ mash	43
4.13 กราฟแท่งแสดงผลของอุณหภูมิและเวลาในการ mash ที่มีต่อปริมาณ FAN ใน wort ที่ได้จากมอลท์	44
4.14 กราฟแท่งแสดงผลของอุณหภูมิและเวลาในการ mash ต่อปริมาณ extract content ใน wort ที่ได้จากมอลท์	45
4.15 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสและมอลโทส ใน wort ที่ได้จากการ mash ที่อุณหภูมิ 40-70 องศาเซลเซียส	46
4.16 ผลของ divalent cation ต่อปริมาณ Soluble nitrogen ใน wort มอลท์ข้าวเจ้าดำ และมอลท์ข้าวเหนียวดำ	52
4.17 ผลของ divalent cation ต่อปริมาณ FAN ใน wort มอลท์ข้าวเจ้าดำ และมอลท์ ข้าวเหนียวดำ	53
4.18 ผลของ divalent cation ต่อปริมาณ Extract content ใน wort มอลท์ข้าวเจ้าดำ และมอลท์ข้าวเหนียวดำ	54

สารบัญญภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.19 ผลของ divalent cation ต่อปริมาณ Fermentability ใน wort มอลท์ข้าวเจ้าดำ และมอลท์ข้าวเหนียวดำ	55
4.20 กราฟแสดงผลการใช้ Ca^{2+} และ Zn^{2+} ร่วมกับการปรับ pH ของ mashing-in	56
4.21 แสดงปริมาณ extract (°P), suspended cell และ FAN ใน fermentation media จากมอลท์ข้าวเจ้าดำ	59
4.22 แสดงปริมาณ extract (°P), suspended cell และ FAN ใน fermentation media จากมอลท์ข้าวเหนียวดำ	60
4.23 ผลการทำ SDS-PAGE ของโปรตีนในมอลท์ข้าว, wort และ เบียร์: ตัวอย่างจาก ข้าวเจ้าดำ และข้าวเหนียวดำ	65
4.24 กราฟไบแมงมุมแสดงคะแนนการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของ ตัวอย่างเบียร์ทั้ง 4 ตัวอย่าง	67

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ข้าวเป็นอาหารหลักของชาวเอเชีย โดยเฉพาะประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการปลูกข้าวเป็นหลักที่สามารถบริโภคภายในประเทศได้เพียงพอ และส่งออกเป็นอันดับต้น ๆ ของโลกมาช้านาน เกษตรกรไทยประมาณ 3.6 ล้านครัวเรือน ประกอบอาชีพปลูกข้าวซึ่งคิดเป็นร้อยละ 66 ของเกษตรกรทั้งหมด 5.6 ล้านครัวเรือน ในพื้นที่ปลูกข้าว 56-58 ล้านไร่ ประเทศไทยสามารถผลิตข้าวได้ประมาณ 28-30 ล้านตันต่อปี (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, Online, 2552) ในจำนวนนี้ใช้บริโภคภายในประเทศเป็นประมาณ 10 ล้านตัน และใช้เพื่อการส่งออกประมาณ 6-7 ล้านตัน และในปี 2552 รัฐบาลคาดว่าจะสามารถส่งออกข้าวได้ 8.5 ล้านตัน (สำนักส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตร, 2552)มูลค่าการส่งออกข้าวคิดเป็นวงเงินประมาณ 80,000 –100,000 ล้านบาท

อย่างไรก็ตามราคาของข้าวต่อหน่วยที่ส่งออกพบว่ายังอยู่ในระดับต่ำ จากแผนยุทธศาสตร์ข้าวไทย 2550-2554 ซึ่งกระทรวงพาณิชย์กับกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ร่วมกันกำหนดขึ้นมานั้น มีการกล่าวถึงพันธกิจในการจัดระบบตลาดและพัฒนาผลิตภัณฑ์ว่าจะต้อง “ส่งเสริมการจัดระบบตลาดและพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อขยายตลาดการบริโภคข้าวและผลิตภัณฑ์ข้าวเพิ่มขึ้น รวมทั้งส่งเสริมให้มีการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์แปรรูปใหม่ๆ ที่สร้างมูลค่าเพิ่มในระดับสูง” ปัจจุบันผลิตภัณฑ์จากข้าวประกอบด้วย ข้าวหุงสำเร็จรูปบรรจุกระป๋อง, ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่, สารเพิ่มความคงตัว (food stabilizer), น้ำมันรำข้าว, สบู่, แป้ง (flour) รวมทั้งเครื่องดื่ม และผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้จากการปลูกข้าว เช่น ฟางข้าวนำมาใช้ผลิตน้ำตาล กระดาษ หรือกลบนำมาสกัดผงชิลิกา เป็นต้น นอกจากนี้การสร้างตลาดสำหรับผลิตภัณฑ์ข้าวนับเป็นปัจจัยสำคัญที่จะช่วยให้ช่วยแก้ปัญหาการกระจายสินค้าและสินค้าราคาตกต่ำเป็นไปอย่างยั่งยืน ตัวอย่างสินค้าที่กำลังประสบปัญหาคือ ผลิตภัณฑ์ข้าวกล้องงอกหรือข้าวกาบ้ำที่กำลังเป็นที่นิยมผลิตในกลุ่มเกษตรกร กำลังประสบปัญหาเรื่องการตลาด ทำให้สินค้าไม่ถึงมือผู้บริโภค ดังนั้น นอกจากการพัฒนาผลิตภัณฑ์ออกมาแล้วจำเป็นต้องวางแนวทางการตลาดและการกระจายผลิตภัณฑ์ให้ถึงมือผู้บริโภคด้วย อีกแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหา คือ การพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อป้อนสู่ภาคอุตสาหกรรมที่มีศักยภาพทางการตลาดที่ดีอยู่แล้ว นอกจากจะทำให้ภาคอุตสาหกรรมมีผลิตภัณฑ์ที่มีหลากหลายขึ้น หรืออาจมีคุณภาพสูงขึ้นแล้วภาคเกษตรกรเองยังไม่ต้องรับภาระในการแสวงหาตลาดอีกด้วย

ผลิตภัณฑ์แปรรูปข้าวในลักษณะที่เป็นเครื่องดื่มเพื่อป้อนสู่ภาคอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม เป็นอีกผลิตภัณฑ์หนึ่งที่มีความเป็นไปได้สูงที่จะเพิ่มมูลค่าให้แก่ข้าว ข้าวสามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มได้ ได้แก่ น้่านมข้าว สาโท เป็นต้น อย่างไรก็ตามในกลุ่มสุราแช่พื้นบ้านไทยนั้น

แม้จะเริ่มมีการผลิตเชิงการค้าอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน แต่กระบวนการผลิตยังไม่ได้ถึงมาตรฐาน ทำให้ผู้บริโภคยังไม่เกิดความมั่นใจในคุณภาพ จึงยังคงบริโภคสุราจากผู้ผลิตรายใหญ่และสุราจากต่างประเทศ ซึ่งแตกต่างกันไปจากประเทศอื่น ๆ เช่น ไต้หวัน จีน และญี่ปุ่น เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ในประเทศไทยมีมูลค่าตลาดสูงกว่า 100,000 ล้านบาท ในปี พ.ศ. 2546-2550 เบียร์มีมูลค่าตลาดเพิ่มขึ้นจาก 73,200 เป็น 106,000 ล้านบาท (Thailand Restaurant News, 2551) ดังนั้น จะเห็นได้ว่าธุรกิจนี้เป็นส่วนหนึ่งของการแปรรูปข้าว และเป็นแหล่งรายได้ที่สำคัญของภาครัฐในการจัดเก็บภาษี ดังนั้น เบียร์จึงเป็นอีกผลิตภัณฑ์หนึ่งที่น่าจะมีการพัฒนาให้เกิดมูลค่าเพิ่มของข้าวได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเบียร์จากข้าวไทย โดยจะมีผลต่อการลดการนำเข้าข้าวบาร์เลย์บางส่วน โดยมีรายละเอียดวัตถุประสงค์ย่อย ดังนี้

1. เพื่อทราบชนิดข้าวในประเทศที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในการผลิตเบียร์ให้ได้คุณภาพเป็นที่ยอมรับ
2. เพื่อทราบผลของสภาพในการทำ malting ของข้าวไทยต่อคุณภาพของเบียร์
3. เพื่อให้ได้ข้อมูลและแนวทางในการควบคุมและจัดสรรอาหารในข้าวไทย ในขั้นตอน mashing และ fermentation ที่มีผลต่อรสชาติของเบียร์
4. เพื่อปรับเปลี่ยนรสชาติใหม่ให้กับเบียร์เพื่อเพิ่มความหลากหลายและทางเลือกในการบริโภค
5. เพื่อศึกษาความเสถียรและอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถเพิ่มมูลค่าของข้าวไทย
2. สามารถลดการนำเข้าวัตถุดิบบางชนิดในการผลิตเบียร์
3. สามารถพัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสม (appropriate technology) ในการผลิตเบียร์จากข้าวไทย
4. สามารถเพิ่มความหลากหลายและทางเลือกใหม่ในการบริโภคเบียร์
5. สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีในเชิงพาณิชย์ได้

1.4 หน่วยงานที่น่าผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สถาบันการศึกษาวิจัยของภาครัฐ จะได้ประโยชน์ในเชิงของเทคโนโลยีที่สัมพันธ์กับคุณสมบัติทางชีวเคมีของข้าวไทยในการผลิตเบียร์
2. องค์กรเอกชน หรือชุมชนที่สนใจจะเป็นผู้ประกอบการรายย่อยในลักษณะ microbrewery

บทที่ 2

บททวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชตระกูลหญ้า (*Poaceae Gramineae*) ที่บริโภคกันมาช้านานเป็นเวลากว่า 5000 ปี (Bao และคณะ, 2001) ข้าวที่ปลูกมากที่สุดคิดเป็น 80% ของพื้นที่ทั่วโลกจัดเป็นสายพันธุ์ *Oryza sativa* L. indica และสายพันธุ์ที่ปลูกมากที่สุดในประเทศไทย, อินเดีย, ทางตอนใต้ของประเทศจีน และมาเลเซีย ในประเทศไทยมีตัวอย่างข้าวเก็บรักษาใน International Rice Research Institute (IRRI) มากกว่า 100,000 ตัวอย่าง และกว่า 24,000 ตัวอย่างข้าวที่เก็บในธนาคารข้าวแห่งชาติ จึงกล่าวได้ว่าประเทศไทยมีความหลากหลายของพันธุ์ข้าวสูง และมีข้าวประมาณ 84 สายพันธุ์ที่ปลูกหมุนเวียนในทุกฤดูการปลูกข้าว เมื่อพิจารณาถึงลักษณะเนื้อสัมผัสของข้าวสุก (cooked texture) จึงแบ่งข้าวออกเป็นสองกลุ่ม คือ ข้าวเหนียว (glutinous rice) และข้าวเจ้า (non-glutinous or waxy rice) ซึ่งสามารถแบ่งย่อยลงไปได้อีกตามปริมาณของเอมิโลสใน storage endosperm ดังนี้ กลุ่มเอมิโลสต่ำ (12-20%), เอมิโลสปานกลาง, (20-25%) และเอมิโลสสูง (>25%) (Bao และคณะ, 2001) และเนื่องจากข้าวจัดเป็นอาหารหลักของชาวโลกและจัดเป็นธัญพืชที่ปราศจากกลูเตน (gluten-free cereal) และเป็นธัญพืชที่มีคุณภาพโปรตีนสูง ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาข้อมูลพื้นฐานที่นำไปสู่การใช้ประโยชน์จากข้าวที่สามารถใช้ทดแทนธัญพืชที่ก่อให้เกิดการแพ้กลูเตน โปรตีนที่เรียกว่า celiac disease และเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์จากข้าว

กระบวนการผลิตมอลต์ (Malting process) เป็นขั้นตอนในการเตรียมวัตถุดิบสำคัญสำหรับกระบวนการผลิตเบียร์ ซึ่งประกอบด้วย การแช่น้ำ (steeping), การงอก (germination) และหยุดการงอกด้วยการอบแห้ง (kilning) เมล็ดบาร์เลย์ที่ผ่านกระบวนการดังกล่าวจะเรียกว่า มอลต์ (malt) จากนั้นนำไปทำความสะอาดด้วยการแยกยอดและรากออกจากเมล็ด ในการศึกษาการผลิตมอลต์จากธัญพืชต่างๆ จะเน้นที่การศึกษากระบวนการแช่น้ำและการงอกเป็นหลัก โดยปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของมอลต์จากธัญพืชต่างๆที่มีการศึกษากันอยู่ ได้แก่ ระยะเวลาการแช่น้ำ (steeping duration) (Eneje และคณะ, 2004; Iwuoha และคณะ, 1997), อุณหภูมิในการแช่น้ำ (Iwuoha และคณะ, 1997), วิธีการแช่น้ำหรือ steeping regime (Dewar และคณะ, 1997), อุณหภูมิในการงอก (Igyor และคณะ, 2001; Wijngaard และคณะ, 2005), ระยะเวลาในการงอก (Eneje และคณะ, 2004) เป็นต้น พบว่าธัญพืชแต่ละชนิดต้องการสภาวะในการงอกที่ต่างกันออกไป รวมถึงธัญพืชเดียวกันแต่คนละสายพันธุ์ต้องการสภาวะการงอกที่ต่างกันด้วย (Li และคณะ, 2006) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงศึกษาสภาวะในการผลิตข้าวมอลต์ คือ ระยะเวลาการแช่น้ำ (steeping duration) และอุณหภูมิโดยใช้ activity ของเอนไซม์ α -amylase และ β -amylase เป็นตัวชี้วัด สภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการผลิตข้าวมอลต์

เบียร์เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทหนึ่งที่ตั้งอยู่ในกลุ่มที่กล่าวไว้ข้างต้น ที่ในประเทศไทยยังไม่มีผู้ศึกษา หรือประยุกต์นำข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ มาใช้ในการผลิตอย่างแพร่หลาย หลักฐานเก่าแก่ที่สุดที่พบว่ามีการผลิตเบียร์ คือ สมัย 4,000 ปีก่อนคริสตกาลในแถบประเทศอียิปต์ และดินแดนเมโสโปเตเมีย จากนั้น เทคโนโลยีการผลิตเบียร์ได้ขยายตัวออกไปทางตะวันตกเข้าสู่ทวีปยุโรป และได้รับการพัฒนาขึ้นเป็นเครื่องดื่มที่สำคัญในยุโรปตั้งแต่โบราณเป็นต้นมา (Priest และคณะ, 2006) เบียร์จัดเป็นเมรัยที่หมักจากพืชประเภทแป้ง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นธัญพืช ได้แก่ ข้าวบาร์เลย์ และข้าวสาลีรวมไปถึงบางประเทศที่หมักจากหัวพืชบางชนิดในอาฟริกา

2.1 องค์ประกอบสำคัญในการผลิตเบียร์

1. เมล็ดธัญพืช

เมล็ดธัญพืชที่ใช้ในการผลิตเบียร์ส่วนใหญ่เป็นข้าวบาร์เลย์ เนื่องจากข้าวบาร์เลย์เป็นข้าวที่ทนอุณหภูมิต่ำได้ดีกว่าธัญพืชชนิดอื่นๆ ดังนั้น เบียร์จึงแพร่หลายในบริเวณประเทศที่มีฤดูร้อนสั้น ข้าวบาร์เลย์ที่ใช้ในการผลิตเบียร์แบ่งได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ ข้าวบาร์เลย์สองแถว (two-row barley) และข้าวบาร์เลย์หกแถว (six-row barley) ในข้าวบาร์เลย์สองแถวนั้นมีปริมาณโปรตีนและเอนไซม์ต่างๆที่ต่ำ คาร์โบไฮเดรตสูง และเปลือกเมล็ดบางกว่า และมีปริมาณสารกลุ่ม polyphenol เช่น tannin ต่ำกว่าข้าวบาร์เลย์หกแถว ซึ่งปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และ polyphenol ทั้งสามส่วนนี้ก็จะส่งผลต่อคุณภาพของเบียร์แต่ละชนิดที่ใช้ผลิต แตกต่างกันไปตามความนิยม

2. ดอกฮอป (Hop: *Humulus lupulus*)

ฮอป เป็นพืชชนิดหนึ่งที่นิยมใส่ลงไปเบียร์ ฮอปสามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มที่ให้ความขม (bitter hop) และกลุ่มที่ให้กลิ่นรส (aroma hop) ในดอกฮอปมีสารสำคัญที่มีผลต่อความขมและรส ได้แก่ สารกลุ่มเรซิน (resins) ซึ่งสามารถแบ่งสารเรซินออกได้เป็น 2 กลุ่มตามความสามารถในการละลาย กลุ่มแรกคือ hard resin ไม่มีผลต่อคุณภาพของเบียร์เท่าใดนัก ในขณะที่อีกกลุ่มคือ soft resin ซึ่งเป็นส่วนที่กลิ่น รส และความขม รวมไปถึงบทบาทในการเป็นสารป้องกันการเน่าเสีย (preservative) ใน soft resin มีสารสำคัญอีกสองชนิดคือ กรดแอลฟา (alpha acid) และ กรดบีตา (beta acid) 90% ของความขมเป็นผลมาจากสารกลุ่มแอลฟา ดังนั้น จะพบว่า bitter hop จะมีปริมาณกรดแอลฟาสูงกว่า aroma hop ในการผลิตเบียร์บางชนิดจะใส่ bitter hop ในช่วงแรกที่มีการต้ม ทำให้เรียกว่า kettle hopping หรือ bitter hopping และจะใส่ aroma hop ในขั้นตอนสุดท้ายของการต้ม ซึ่งบางครั้งเรียกขั้นตอนนี้ว่า late hopping

นอกจากนี้ ส่วนที่เป็นน้ำมันของฮอปก็เป็นอีกส่วนหนึ่งที่ส่งผลต่อกลิ่นของเบียร์โดยเฉพาะความรู้สึกลมกล่อม ปริมาณน้ำมันในดอกฮอปมีอยู่ในช่วง 0.5-3.0% โดยมีองค์ประกอบหลักไฮโดรคาร์บอนที่เป็น myrcene, humulene และ caryophyllene ใน aroma hop มีปริมาณ myrcene ต่ำ

แต่มี humulene สูง ส่วนฮอปที่มีปริมาณของ myrcene ที่สูงเกินไปจะไม่เหมาะสมที่จะนำมาทำเบียร์ เพราะจะก่อให้เกิดรสชาติที่ไม่พึงประสงค์

สารอีกกลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญในดอกฮอป คือ สารกลุ่ม polyphenol ซึ่งประกอบไปด้วย anthocyanogens, tannins และ catechins สารกลุ่มนี้ทำหน้าที่เป็นสาร antioxidant ซึ่งช่วยป้องกันปฏิกิริยา oxidation ในเบียร์ได้

3. น้ำ

จัดเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญของการผลิตเบียร์ โดยเป็นองค์ประกอบหลักกว่า 90% ของเบียร์ คุณภาพของน้ำจะส่งผลให้คุณภาพ และวัตถุประสงค์ของการเลือกผลิตชนิดของเบียร์แตกต่างกันออกไป ดังเช่น น้ำกระด้างที่มีปริมาณแคลเซียมและซัลเฟตสูง นิยมให้ผลิตเบียร์ประเภท pale หรือน้ำที่มีคาร์บอเนตสูงเหมาะสำหรับผลิตเบียร์ดำหรือ lager เป็นต้น ส่วนแร่ธาตุอื่นๆ ในน้ำที่มีผลต่อคุณภาพของเบียร์ ได้แก่ แคลเซียม อีออน จะทำปฏิกิริยากับสารกลุ่มฟอสเฟต ทำให้เกิดเป็นตะกอนและการปลดปล่อยไฮโดรเจน อีออน ทำให้ค่า pH ต่ำลง ส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์แอมิเลส บีต้า-แอมิเลส และกลุ่ม โปรติโอไลติกเอนไซม์ แมกนีเซียมอีออนมีผลต่อกระบวนการเมตาโบลิซึมของยีสต์ที่เข้มข้น โซเดียมอีออนมีผลต่อการส่งเสริมความหวานของเบียร์ เป็นต้น

4. ยีสต์

ยีสต์ที่ใช้ในการหมักเบียร์ แบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่ top-fermenting type ซึ่งเป็นยีสต์ในجنัส *Saccharomyces cerevisiae* (บางครั้งเรียก ale yeast) นิยมใช้ในการผลิตเบียร์ประเภท ales, stouts และเบียร์ที่ทำจากข้าวสาลี (wheat beers) อีกประเภทหนึ่ง คือ bottom-fermenting type เป็นยีสต์ในجنัส *S. uvarum* (ชื่อเดิม *S. calbergensis*) นิยมใช้ในการผลิตเบียร์ประเภท Pilsner, Bock, และ American malt liquors ยีสต์ในกลุ่ม top-fermenting มักใช้หมักที่อุณหภูมิ 10-25 องศาเซลเซียส ให้สารกลุ่มเอสเทอร์ ส่งผลให้มีกลิ่นหอมจำเพาะ ในขณะที่กลุ่ม bottom fermenting จะเจริญช้ากว่ากลุ่มแรก และนิยมใช้หมักที่อุณหภูมิ 7-15 องศาเซลเซียส (Goldammer, 2000)

2.2 ขั้นตอนในการผลิตเบียร์

หลักการผลิตเบียร์จากเมล็ดธัญพืช คือ การกระตุ้นให้เมล็ดธัญพืชเกิดการงอก ซึ่งในช่วงนี้แป้งที่สะสมในเมล็ดจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกลง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาการงอก เพื่อให้มีปริมาณน้ำตาลในเมล็ดที่เหมาะสมจำนวนหนึ่ง จากนั้นทำการหมักด้วยยีสต์ โดยที่ยีสต์จะใช้น้ำตาลในเมล็ดธัญพืช และเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในที่สุด ขั้นตอนหลักของการผลิตเบียร์ มีดังนี้

1. การทำมอลท์ (Malting process)

เริ่มโดยการนำเมล็ดข้าวบาร์เลย์ที่คัดเลือกแล้ว (ผ่านการคัดขนาด การกำจัดเศษดิน ทราบเป็นต้น) จากนั้นนำมาแช่น้ำ (steeping) เพื่อกระตุ้นให้เกิดกระบวนการเมตาโบลิซึมในเมล็ด ในช่วงนี้จะมี การเปลี่ยนน้ำที่แช่เป็นระยะ เพื่อรักษาความสะอาด เพิ่มการให้ออกซิเจนของเมล็ด และกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์ โดยทั่วไปจะใช้เวลาประมาณ 40 ชั่วโมง มีการเปลี่ยนน้ำ 3-4 ครั้ง กระบวนการแช่น้ำจะสมบูรณ์ต่อเมื่อสังเกตเห็นว่าเมล็ดมีการงอก และเมล็ดมีลักษณะพอง หรือบวมขึ้น 1/3-1 เท่าของขนาดเดิม ขั้นตอนต่อไปเป็นกระบวนการทำให้เมล็ดงอก (germination) โดยขั้นนี้มีการควบคุมอุณหภูมิ และความชื้นให้พอเหมาะ ซึ่งอาจทำใน drum หรือถ้อง หรือทำบนพื้น (floor malting) โดยให้มีความสูงของกองเมล็ด 10-20 เซนติเมตร ในขณะที่เมล็ดมีการงอก จะเกิดการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ เช่น การทำงานของกลุ่มไฮโดรไลติกเอนไซม์ เกิดการสังเคราะห์สารต่างๆ ขึ้นใหม่ ช่วงระยะเวลาของการงอกที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 3-5 วัน จากนั้นนำเมล็ดที่งอกนี้ทำให้แห้งด้วยลมร้อน ขั้นตอนนี้เรียกว่า kilning จุดประสงค์ของขั้นตอนนี้ คือ หยุดกระบวนการงอก เมตาโบลิซึม และทำให้มีลักษณะทางกายภาพของเมล็ดที่ค่อนข้างกรอบเพื่อสะดวกในการบดในขั้นตอนต่อไป ขั้นตอนที่ kilning สามารถเลือกใช้อุณหภูมิ และเวลาต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของเบียร์ที่ต้องการผลิต เช่น เบียร์กลุ่ม Pilsner และ Pale มักใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่าการผลิตเบียร์กลุ่ม Munich และ Vienna ช่วงของอุณหภูมิ และเวลาที่ใช้เฉลี่ยอยู่ที่ช่วง 80-130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดส่วนที่เป็นรากที่งอกออกมาทิ้งไป นำเมล็ดที่ต้องการทำความสะอาดอีกครั้ง ก่อนนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป เมล็ดธัญพืชที่ได้ในขั้นตอนนี้จึงเรียกว่า มอลท์ (malt) (Briggs, 1998)

2. การทำ Mashing (Mashing process)

ขั้นตอนนี้เป็นกระบวนการที่สกัดเอาน้ำตาล และสารอาหารต่างๆ จากข้าวมอลด์ที่บดแล้ว โดยการต้มที่อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสม โดยจะมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์สำคัญในข้าวมอลด์อยู่ 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเอนไซม์ phytase ซึ่งมีบทบาทต่อการควบคุม pH โดยเฉพาะในขั้นตอนหลักโดยอีสต์ กลุ่มเอนไซม์ proteolytic ได้แก่ protienase และ peptidase จะทำการย่อยสลายโมเลกุลของโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ (ก่อให้เกิดความไม่เสถียรของโฟมและกลิ่นไม่ดี) ให้มีขนาดเล็กลง และอยู่ในรูปของเพปไทด์ และกรดอะมิโน กลุ่มสุดท้ายได้แก่ α และ β -amylase เอนไซม์ α -amylase มีความสามารถในการลดปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่อีสต์ไม่สามารถนำไปใช้ได้อย่างรวดเร็ว จากนั้น β -amylase จะสลายส่วนที่เป็น dextrin น้ำตาลมอลโตส กลูโคส เป็นต้นโดยทั่วไปเอนไซม์ทั้งสองนี้สามารถเปลี่ยนแปลงในข้าวมอลด์ให้เป็นโมเลกุลของน้ำตาลที่อีสต์นำไปใช้ได้ในช่วง 60-80% อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้นิยมใช้ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิให้ถึง 100 องศาเซลเซียส แล้วจึงเค็มดอกหอพลงไปเป็นเวลา 1 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน สารละลายที่ได้จากขั้นตอนนี้เรียกว่า wort ปัจจัยที่ส่งผลต่อการคุณภาพของ wort ได้แก่ โปรแกรมการตั้งอุณหภูมิ (Kühbeck และ

คณะ, 2005; Wijngaard และคณะ, 2006), การใช้เอนไซม์ในการเพิ่ม extract yield (Goode และคณะ, 2003; Goode และคณะ, 2005), การปรับ pH ของ mashing-in (Bamforth, 2001) เป็นต้น

3. การหมัก (fermentation)

เป็นกระบวนการที่ใช้ยีสต์เปลี่ยนสารอาหารใน wort ที่เย็นแล้วให้กลายเป็นเอทานอล ซึ่งในขั้นตอนนี้จะมีการเติมสารอาหารที่จำเป็นให้กับยีสต์ด้วย ได้แก่ Zn^{2+} (Kunz, 2004) อุณหภูมิที่ใช้ในการหมักทั่วไปจะอยู่ที่ 8-15 องศาเซลเซียส สำหรับผลิตเบียร์ประเภท lagers และระหว่าง 15-20 องศาเซลเซียส สำหรับเบียร์ประเภท ales ขั้นตอนนี้ดังกล่าวทั่วไปเรียกว่า primary fermentation จากนั้น เป็นขั้นตอนที่ปรับแต่งรสชาติของเบียร์ หรือที่เรียกว่า secondary fermentation ซึ่งอาจมีการเติมน้ำตาลหรือสารปรุงแต่งอื่นๆ เพื่อให้เกิดกลิ่น รสพิเศษเพิ่มเติม โดยเบียร์บางชนิดอาจกรองยีสต์ออกในช่วงนี้ และดำเนินการหมักในถังพิเศษที่เป็นโลหะ ซึ่งสามารถอัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (carbonation) ลงไปในกรณีที่เป็น อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนนี้อยู่ระหว่าง 4-6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-30 วัน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การผลิตมอลท์จากข้าวไทย

3.1.1 พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่

1. ข้าวหอมมะลิ 105 (KDML105),
2. ข้าวปทุมธานี 60 (PT60),
3. ข้าวเจ้าดำ (WR),
4. ข้าวเหนียว กข6 (RD6),
5. ข้าวเหนียวสันป่าตอง (SPT),
6. ข้าวเหนียวดำ (KND)

3.1.2 การผลิตข้าวมอลท์

ปัจจัยที่มีผลต่อการงอกของข้าวถูกนำมาศึกษาในการทดลองนี้ ได้แก่ อุณหภูมิ (20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส), ระยะเวลาการแช่ข้าวในน้ำ (24, 48 และ 72 ชั่วโมง) โดยกำหนดระยะเวลาในการเพาะข้าวไว้ที่ 6 วัน โดยออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียล 3x3 ข้าวที่ผ่านการเพาะด้วยสถานะต่าง ๆ ถูกอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อลดความชื้นให้น้อยกว่า 10% และเป็นการหยุดการทำงานของเอนไซม์ในข้าวงอก ในขณะเดียวกันก็ทำลายความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ในข้าวงอกให้น้อยที่สุด จากนั้นเมล็ดข้าวงอกถูกแยกยอด และรากออกจากกันโดยร่อนผ่านตะแกรง ผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า ข้าวมอลท์

3.1.3 ปริมาณความชื้น

ข้าวที่ผ่านการแช่น้ำเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โดยตัวอย่างข้าวประมาณ 5 กรัมถูกสุ่มออกมา และวางบนกระดาษทิชชู 5 นาทีเพื่อซับความชื้นส่วนเกินที่บริเวณผิวออก จากนั้นชั่งน้ำหนัก และอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น และชั่งน้ำหนักหลังอบ คำนวณปริมาณความชื้นดังสมการข้างล่างนี้

$$\text{ปริมาณความชื้น} = \frac{(\text{น้ำหนักข้าวก่อนอบ} - \text{น้ำหนักข้าวหลังอบ})}{\text{น้ำหนักข้าวก่อนอบ}} \times 100$$

3.1.4 การสูญเสียน้ำหนักข้าวมอลต์

ข้าวงอกถูกสุ่มมา 10 เมล็ด จากแต่ละสภาวะการทดลอง เพื่อวัดความยาวของราก และยอด หลังจากแยกราก และยอดออกแล้ว ชั่งน้ำหนักข้าว 100 เมล็ด เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก (Malting losses) ดังสมการข้างล่าง และวิเคราะห์คุณภาพของข้าวมอลต์โดยวัดปริมาณเอนไซม์ α -amylase และ β -amylase

$$\text{Malting losses} = \frac{(\text{น้ำหนักข้าว 100 เมล็ดก่อนทำมอลต์} - \text{น้ำหนักข้าวมอลต์ 100 เมล็ด}) \times 100}{\text{น้ำหนักข้าว 100 เมล็ดก่อนทำมอลต์}}$$

3.1.5 วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ amylase

ทำการสกัดเอนไซม์ amylase จากข้าวมอลต์บดละเอียด (0.2 มิลลิเมตร disk mill) ปริมาณ 1 กรัม ด้วยการเติม 9 มิลลิลิตร ของ 50 mM Tris-HCl ที่มีส่วนผสมของ 3 mM CaCl_2 และ 4 mM NaOH ทำการผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเขย่าผสมทุก 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที 10 นาที และแยกเอาส่วนใสเก็บในตู้เย็นเพื่อทำการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ ด้วยวิธีวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งที่เกิดจากการย่อยน้ำแป้ง 1% (Nandi และคณะ, 1995) pipette สารสกัดเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร เติมลงใน 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลายน้ำแป้ง นำมาบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 0.5 มิลลิลิตร ของ 1% น้ำแป้งที่ละลายใน 50 mM acetate buffer ที่มี 0.003% CaCl_2 ผสมให้เข้ากัน และบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 1 มิลลิลิตร ของ 3,5-dinitrosalicylic acid สำหรับเอนไซม์ β -amylase ทำการสกัดด้วยวิธีเดียวกันกับเอนไซม์ α -amylase แต่การทดสอบปฏิกิริยาทำโดยบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส และใช้ซับสเตรทเป็น 1% น้ำแป้งละลายใน 50 mM citrate buffer pH 3.6 ที่มี 1 mM EDTA ปริมาณ reducing sugar ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ ถูกคำนวณเทียบกับสารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส แสดงเป็นปริมาณกิจกรรมต่อหนึ่งหน่วยโปรตีนโดยการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารสกัดเอนไซม์ด้วยวิธีของ Bradford (Bradford, 1976):

3.1.6 วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในข้าวและมอลต์

วิเคราะห์ด้วยวิธี Kjeldahl (Enari, 1975)

3.1.7 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารสกัดเอนไซม์จากข้าวด้วยวิธี Bradford (Bradford, 1976).

3.2 การหาสภาวะในการผลิตมอลต์ด้วยวิธีการคอบสนองบนพื้นผิว

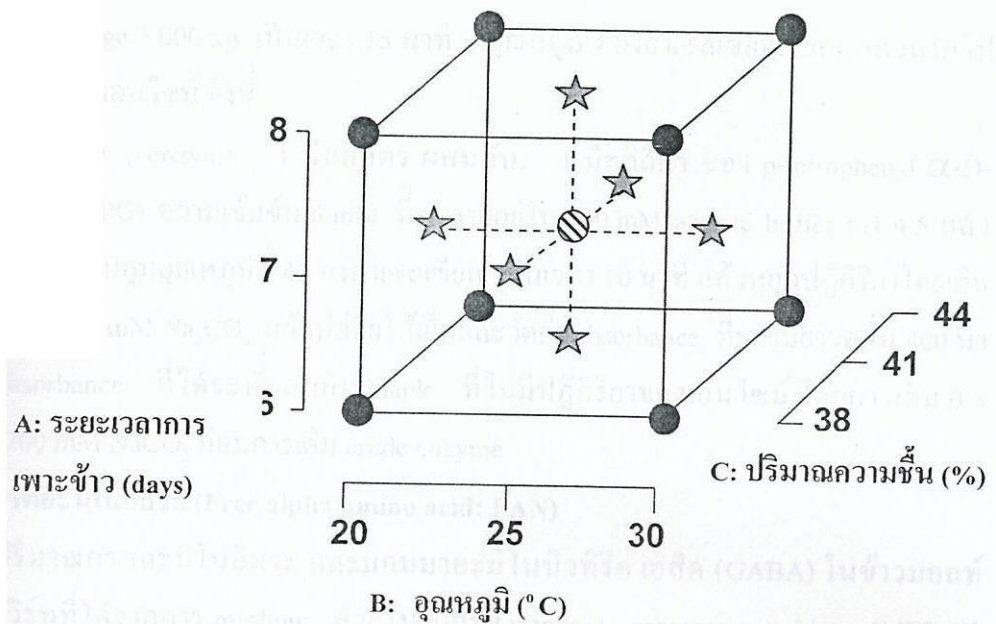
ใช้ข้าวเจ้าดำเก็บเกี่ยวปี 2548 ที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และข้าวเหนียวดำจากอำเภอพิมาย จังหวัดนครราชสีมา โดยมีขั้นตอนและวิธีการดังนี้

3.2.1 การออกแบบการทดลอง

ในการทดลองนี้ได้ปรับเปลี่ยนวิธีการแช่น้ำมาเป็นวิธีแช่น้ำช่วงสั้น สลับกับการพักน้ำ เป็นวิธีการให้ความชื้นกับข้าว และทำการเพาะข้าวภายใต้ค่า ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 95% แสดงในตารางที่ 3.1 การหาสภาวะในการผลิตมอลต์ข้าวเจ้าดำ และข้าวเหนียวดำมีตัวแปรที่ต้องทำการศึกษา 3 ตัวแปร ดังนี้ ปริมาณความชื้นในเมล็ดข้าว (steeping degree), จำนวนวันในการทำข้าวงอก (germination time) และอุณหภูมิ โดยทำการทดลองแบบ response surface methodology ออกแบบการทดลองแบบ face-centered composite design โดยกำหนดการแช่น้ำด้วยปริมาณความชื้นในข้าวงอกที่ 38, 41 และ 44% โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส จนครบระยะเวลา 6, 7 และ 8 วัน โดยกำหนดจำนวนตัวแปรที่ทำการทดสอบดังแสดงในรูปที่ 3.1 รวมทั้งสิ้น 24 การทดลองต่อข้าว 1 สายพันธุ์ มอลต์ที่ได้จะถูกเก็บตัวอย่างในวันที่ 6, 7 และ 8 และอบที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำมาวิเคราะห์คุณภาพของข้าวมอลต์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปลงใน โปรแกรมวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของตัวแปรด้วยวิธีทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม Design Expert (v.7.0.3) ความสัมพันธ์ของตัวแปรจะแสดงได้ในรูปสมการคณิตศาสตร์ และวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) และ regression coefficient ตามลำดับ จากนั้น นำแบบจำลองคณิตศาสตร์ที่ได้มาใช้ในการทำ numerical optimization เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะข้าวทั้งสองสายพันธุ์ แล้วทำการทดลองผลิตข้าวมอลต์ด้วยสภาวะที่เหมาะสมอีก 3 ซ้ำเพื่อยืนยันผลการหาสภาวะที่เหมาะสม

ตารางที่ 3.1 โปรแกรมการแช่น้ำสลับกับการพักน้ำ

วันที่	กิจกรรม
วันที่ 1	แช่น้ำ 5 ชั่วโมง พักน้ำ 4 ชั่วโมง แช่น้ำ 5 ชั่วโมง และ พักน้ำ 10 ชั่วโมง
วันที่ 2 และ วันต่อมา	แช่น้ำ 5 ชั่วโมง พักน้ำ 19 ชั่วโมง วนไปจนกระทั่งความชื้นในข้าวถึงจุดที่ต้องการ 38, 41 และ 44%
2 วันต่อมา	ให้ความชื้นข้าวด้วยวิธีสเปรย์น้ำ โดยปริมาณน้ำที่สเปรย์ขึ้นอยู่กับน้ำหนักที่ สูญเสียไปหลังจากข้าวมีความชื้นถึงจุดที่ต้องการ
วันที่ 6, 7, และ 8	เก็บตัวอย่างข้าว และอบที่ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เพื่อหยุดการทำงานของ เอนไซม์



- จุดแฟกทอเรียล (factorial point) = 8 จุด x 2 ซ้ำ = 16 การทดลอง
- ☆ จุดแอกเซียล (axial point) = 6 จุด x 1 ซ้ำ = 6 การทดลอง
- ⊙ จุดกึ่งกลาง (center point) = 1 จุด x 2 ซ้ำ = 2 การทดลอง

รูปที่ 3.1 ไดอะแกรมจำลองการแผนการทดลองแบบ face-centered composite design

3.2.2 วิเคราะห์คุณภาพมอลต์

มอลต์ที่ได้ถูกนำไปวิเคราะห์คุณภาพตามมาตรฐาน European Brewing Committee (EBC) (EBC, 1998) และ Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK) (Pfenninger, 1997) ดังนี้ moisture content (EBC 4.2), cold water extract (EBC 4.6.2), extract content (MEBAK 4.1.4.2.2), soluble nitrogen (MEBAK 4.1.4.5), Kolbach index (MEBAK 4.1.4.5.3), และ apparent attenuation limit (AAL) (MEBAK 4.1.4.10)

3.2.3 วิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ α -amylase, β -amylase, limit-dextrinase และ α -glucosidase

ตัวอย่างข้าว และข้าวมอลต์ 10 กรัม ถูกนำมาบดให้ละเอียด แล้วร่อนผ่านตะแกรง 0.5 มิลลิเมตร จากนั้นชั่งข้าวมอลต์บดน้ำหนัก 1 กรัม เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ α -amylase, β -amylase, limit-dextrinase ด้วยชุดวิเคราะห์ของบริษัท Megazyme (ประเทศไอร์แลนด์) สำหรับเอนไซม์ α -glucosidase ใช้วิธีตาม Iwata และคณะ, (2002) ดังนี้ ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการบด 1 กรัม ผสมกับ 10 mM acetate buffer (pH 5.0 ที่มี 5 mM dithiothreitol (DTT) และ 90 mM NaCl) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาแยกเอา crude enzyme ด้วยการกรอง

ผ่านลำไส้และ centrifuge 3,000 xg เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกเอาส่วนใสไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ดังนี้

นำ crude enzyme 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 1 มิลลิลิตร ของ p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNPG) ความเข้มข้น 6 mM ที่ละลายอยู่ใน 100 mM acetate buffer pH 4.5 แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.5 มิลลิลิตร ของ 200 mM Na_2CO_3 แล้วปล่อยให้เย็นและวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร ค่า absorbance ที่ได้จะหักลบกับ blank ที่ไม่มีปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยการเติม 0.5 มิลลิลิตรของ 200 mM Na_2CO_3 ก่อนการเติม crude enzyme

3.2.4 กรดอะมิโนอิสระ (Free alpha amino acid: FAN)

ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และแกมมาอะมิโนบิวทิริก เอซิด (GABA) ในข้าวมอลต์วิเคราะห์จากเวิร์กที่ได้จากการ mashing ด้วยโปรแกรม standard congress mashing (MEBAK 4.1.4.2.2) โดยเติม 0.02% sodium azide และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 xg เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเอาส่วนใสมาเติม internal standard คือ norvalin ให้มีความเข้มข้น 1.25 mM และวัดปริมาณกรดอะมิโนอิสระ ด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์ Spherisorb ODS II, 5 μm , 20 \times 4.6 cm ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส, mobile phase ที่ใช้ คือ eluent A ประกอบด้วย 5 มิลลิลิตร ของ tetrahydrofuran ละลายใน 10 ลิตร acetonitrile และ 485 มิลลิลิตร ของ phosphate buffer pH 7.2 และ eluent B ประกอบด้วย 250 มิลลิลิตร acetonitrile และ 250 มิลลิลิตร of phosphate buffer pH 7.2 สารละลายทั้งสองไหลในลักษณะ gradient concentration ด้วยความเร็ว 1 มิลลิลิตร/นาที ผ่าน fluorescent detector ที่มี excitation wavelength 355 nm และ emission wavelength 450 nm

3.2.5 ผลของช่วงอุณหภูมิในการอบแห้งต่อคุณภาพของข้าวมอลต์

หลังจากที่ได้สภาวะในการผลิตข้าวมอลต์ทั้งสองสายพันธุ์ คือ เปอร์เซ็นต์ความชื้น 44%, อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการอบ 8 วัน นำข้าวมอลต์ไปอบที่สภาวะดังนี้

- อุณหภูมิต่ำ คือ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- อุณหภูมิปานกลาง คือ 50 องศาเซลเซียส, 9 ชั่วโมง ตามด้วย 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง
- อุณหภูมิสูง คือ 60 องศาเซลเซียส, 2 ชั่วโมง ตามด้วย 70 องศาเซลเซียส, 1 ชั่วโมง และ 80 องศาเซลเซียส, 2 ชั่วโมง และ 85 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

จากนั้นนำข้าวมอลต์มาแยกรากและยอดเพื่อนำไปวิเคราะห์คุณภาพมอลต์ต่อไป

3.3 การศึกษาการเพิ่มปริมาณ extract content and soluble nitrogen ใน wort ด้วยกระบวนการ mashing

3.3.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ soluble nitrogen และ FAN ใน wort

ข้าวมอลต์ถูกบดด้วยเครื่องบดสำหรับห้องปฏิบัติการ (Bühler, Braunschweig, Germany) เพื่อให้มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยอยู่ที่ 0.2 มิลลิเมตร และทำการ mashing ในน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วน 1:8 เป็นเวลา 30 และ 60 นาที ที่อุณหภูมิ 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นลดอุณหภูมิของ wort ลงมาที่ 20 องศาเซลเซียส ปรับน้ำหนักทั้งหมดของ beaker เป็น 450 กรัม แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง (ribbon filter paper) และวิเคราะห์หาปริมาณ soluble nitrogen และ FAN ตามวิธีของ EBC (Enari, 1975)

3.3.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัด fermentable sugar

ทำการบดข้าวมอลต์ และทำ mashing จากนั้น wort ที่ได้จะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ extract content ตามวิธี EBC (Enari, 1975) และ fermentable sugar ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลฟรุคโทส, น้ำตาลมอลโทส, และน้ำตาล maltotriose และน้ำตาลซูโครส

3.3.3 เปรียบเทียบผลของ mashing วิธีต่างๆ

ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่ม soluble nitrogen, FAN, และ extract content ได้นำมาจัดทำโปรแกรมในการทำ mashing โดยทำการเปรียบเทียบการ mashing ทั้งหมด 4 วิธี ดังนี้

1) Temperature program ข้าวมอลต์ 50 กรัม ผสมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที, 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที, 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที, 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที, 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ 70 องศาเซลเซียส ให้เติมน้ำเพิ่ม 100 มิลลิลิตร และต้มต่อเป็นเวลา 60 นาที จากนั้น cool down ที่ 20 องศาเซลเซียส และปรับน้ำหนักสุดท้ายเป็น 450 กรัม จากนั้นทำการกรองเอา wort บันทึกเวลาที่ใช้ในการกรองมากกว่าหรือน้อยกว่า 60 นาที wort ที่ได้นำมาวิเคราะห์คุณภาพตามวิธี EBC

2) Decoction program แบ่งข้าวมอลต์ 50 กรัมออกเป็นสองส่วนเท่าๆกัน ส่วนที่ 1 ผสมน้ำกลั่น 125 มิลลิลิตร ต้มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที, 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้น ส่วนที่ 2 ผสมน้ำ 225 มิลลิลิตร ต้มที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้แป้งฟอร์มเจลอย่างสมบูรณ์ จากนั้นลดอุณหภูมิลงมาที่ 60 องศาเซลเซียส นำมาผสมกับส่วนที่ 1 แล้วให้ความร้อนที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาทีและ 70 องศาเซลเซียส 60 นาที แล้ว cool down ที่ 20 องศาเซลเซียส และปรับน้ำหนักสุดท้ายเป็น 450 กรัม บันทึกเวลาที่ใช้ในการกรอง wort ที่ได้และนำมาวิเคราะห์คุณภาพตามวิธี EBC

3) Temperature program ข้าวมอลต์ 50 กรัม ผสมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร ต้มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที, 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที, 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที, 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที, 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และ 70 องศาเซลเซียส ให้เติมน้ำเพิ่ม 100 มิลลิลิตร ต้มเป็นเวลา 20 นาที, 78 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และ cool down ที่ 20 องศาเซลเซียส และปรับน้ำหนักสุดท้ายเป็น 450 กรัม บันทึกเวลาที่ใช้ในการกรอง wort ที่ได้และนำมาวิเคราะห์คุณภาพตามวิธี EBC

4) Temperature program ข้าวมอลต์ 50 กรัม ผสมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร ต้มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที, 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที, 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที, 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และ 64 องศาเซลเซียส 20 นาที และ 70 องศาเซลเซียส ให้เติมน้ำเพิ่ม 100 มิลลิลิตร ต้มเป็นเวลา 20 นาที, 78 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และ cool down ที่ 20 องศาเซลเซียส และปรับน้ำหนักสุดท้ายเป็น 450 กรัม บันทึกเวลาที่ใช้ในการกรอง wort ที่ได้และนำมาวิเคราะห์คุณภาพตามวิธี EBC

3.3.4 ศึกษาค่า pH เริ่มต้นของการ mash (mashing-in pH)

ค่า pH ของ mashing-in เป็นตัวแปรหนึ่งที่น่ามาศึกษาผลของ pH เริ่มต้นในการ mash ที่มีต่อ soluble nitrogen, FAN, extract content, fermentability และ pH สุดท้ายของ wort ตามวิธีของ EBC

3.3.5 ศึกษาผลของ divalent cations: Ca^{2+} , Zn^{2+} and Mg^{2+} ion ที่มีผลต่อคุณภาพของ wort

สารกลุ่ม divalent cations ที่อยู่ในรูปของสารประกอบคลอไรด์ ได้แก่ CaCl_2 , ZnCl_2 และ MgCl_2 โดยเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นของ divalent cation ที่ 50, 100, 150 และ 200 ppm ตามลำดับ สารละลาย 250 มิลลิลิตร ทำการ mash กับ ข้าวมอลต์ 50 กรัม ด้วยโปรแกรม mashing ที่ ถูกเลือก และวิเคราะห์คุณภาพ wort

3.4 การผลิตเบียร์จากมอลต์ข้าวเจ้าดำและมอลต์ข้าวเหนียวดำ

3.4.1 วัสดุทดลอง

- 1) มอลต์ข้าวเจ้าดำและมอลต์ข้าวเหนียวดำ
- 2) ยีสต์ *S. cerevisiae* W34/70 และ *S. cerevisiae* W60/112 จาก Yeast Bank, Weihenstephan, Freising, Germany
- 3) aroma hops: Hallertauer Spalter 4.1 % alpha acid

3.4.2 วิธีการทดลอง

1) การผลิต wort ด้วยเครื่อง braumister mashing unit

การทดลองนี้ได้ทำการผลิต wort ด้วยเครื่อง braumister mashing unit ซึ่งมีขนาดการผลิตสูงสุดอยู่ที่ 25 ลิตร โดยนำมอลท์ข้าวเจ้าค้ำและข้าวเหนียวค้ำอย่างละ 4.5 กิโลกรัมมาบดด้วยเครื่องบดแบบ two roller mill (Kuenzweil, Kulmbach/Bayern) ซึ่งก่อนหน้าการทดลองนี้ ได้ทำการทดสอบผลของขนาด malt grit ที่บดด้วยเครื่องบด two roller mill ด้วยระยะห่างระหว่าง roller ต่างๆกัน พบว่า มอลท์ข้าวเจ้าค้ำให้ผลปริมาณ extract สูงสุด และคุณภาพ wort ที่ดีถ้าปรับระยะห่างระหว่าง roller เป็น 0.5 มิลลิเมตร และสำหรับมอลท์ข้าวเหนียวค้ำปรับเป็น 1.0 มิลลิเมตร

ข้าวมอลท์ทั้งสองสายพันธุ์ อย่างละ 4.5 กิโลกรัม ผสมน้ำด้วยอัตราส่วน 1:5 ดังนั้น จึงใช้น้ำกลั่น 22 ลิตร และเติม 150 ppm Ca^{2+} และปรับ pH ของ mashing-in เป็น 5.2 แล้วทำการ mashing ด้วยโปรแกรม 3 และ 4 สำหรับมอลท์ข้าวเจ้าค้ำ และมอลท์ข้าวเหนียวค้ำตามลำดับ เมื่อทำการ mashing จนเสร็จก็ทำการกรอง wort ผ่านตะแกรงเพื่อแยกกากข้าวมอลท์ (spent grain) เก็บตัวอย่าง wort 1 ลิตรเพื่อนำไปวิเคราะห์คุณภาพ และเก็บกากข้าวมอลท์ 500 กรัม เพื่อนำไปตรวจวัดหาปริมาณ extract ที่เหลืออยู่ จากนั้นทำการต้ม wort ที่ได้ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีแล้วเติม aroma hops (4.1 % alpha acid) โดยคำนวณปริมาณ hops pellets ให้ได้ปริมาณ bitterness ที่ 25 BU ดังสมการข้างล่างนี้

คำนวณหาปริมาณ hops ที่ต้องการ

$$\text{น้ำหนักร hops} = \left[\frac{\text{ปริมาณ cast wort (ลิตร)} \times (1) \times (C) \times \text{bitterness (IBU) ที่ต้องการ}}{(\% \text{ Utilization} / 100) \times (\% \text{ alpha acid in hops} / 100) \times (1000)} \right]$$

$$\text{ปริมาณ cast wort} = \left[\frac{\text{ปริมาณ wort ที่ได้} \times \text{degree plato}}{\text{Degree plato สุดท้ายที่ต้องการ (11.5°P)}} \right]$$

% Utilization = 24% เนื่องจากเติม hops pellets เวลา 30 นาทีสุดท้าย

C (corrective factor) = 0.96

2) การผลิตหัวเชื้อยีสต์เพื่อใช้สำหรับกระบวนการหมัก

เลี้ยง *S. cerevisiae* W60/120 และ W 34/70 ในอาหาร YM broth 100 มิลลิลิตร ขยำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วขยายเป็น 1000 มิลลิลิตร โดยใช้ pilsner wort ที่ผลิตจากมอลท์บาร์เลย์เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้อากาศโดยผ่านทาง aquatic bubble pump เป็นช่วงเวลา โดยตั้งเวลาให้ pump ทำงานเป็นเวลา 1 นาที ทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่เดียวกันบรรจุ magnetic bar ใน flask เพื่อให้เกิดการกระจายอากาศให้ทั่วถึงและเซลล์ยีสต์ไม่ตกตะกอนที่ก้น flask เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมงทำการนับเซลล์ยีสต์ได้กล้องจุลทรรศน์ด้วย heamacytometer และคำนวณปริมาตรของหัวเชื้อที่ต้องการ ตวงหัวเชื้อที่ต้องการใส่ในขวด centrifuge ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 5000xg เป็นเวลา 10 นาที ที่ 20 องศาเซลเซียส ยีสต์ที่ได้จะถูกละลายอีกครั้งด้วย wort จากข้าวมอลท์ชนิดเดียวกันกับที่ใช้สำหรับการผลิตเบียร์

3) การผลิตเบียร์แบบ top fermentation และ bottom fermentation

Cold wort 6 ลิตรที่ได้จากกระบวนการ mashing ถูกนำมาบรรจุลงใน sterilized keg ขนาด 10 ลิตร แล้วทำการเติมอากาศด้วย sterilized air เป็นเวลา 10 นาที (เพื่อให้มีออกซิเจนละลายประมาณ 8 มิลลิกรัม/ลิตร) จากนั้นนำไปปรับอุณหภูมิให้เท่ากับอุณหภูมิในการหมักโดยนำไปวางใน cold room 10 องศาเซลเซียส (bottom fermentation) และ 20 องศาเซลเซียส (top fermentation) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมยีสต์ที่ได้จากข้อ 3.1 ที่ความเข้มข้น 15×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร กระบวนการผลิตเบียร์จากมอลท์ข้าวเจ้าค้ำและมอลท์ข้าวเหนียวแบบ top fermentation ใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* W60/120 และ *S. cerevisiae* W34/70 สำหรับ bottom fermentation ในระหว่างกระบวนการหมักดำเนินอยู่นั้นได้ทำการเก็บตัวอย่าง wort 150 มิลลิลิตร ทุก ๆ 24 ชั่วโมงเพื่อติดตามจำนวนเซลล์ยีสต์, Degree Plato, และ FAN เมื่อกระบวนการหมักสิ้นสุด หมายถึง degree plato ไม่เปลี่ยนแปลงภายในเวลา 24 ชั่วโมง เบียร์ที่ได้จะถูกนำไปลดอุณหภูมิโดยลดจาก 10 องศาเซลเซียส เป็น 5 องศาเซลเซียส และ 20 องศาเซลเซียส เป็น 10 องศาเซลเซียส หมักต่อเป็นเวลา 2 วันเพื่อให้ยีสต์ตกตะกอนและ maturate เบียร์ที่ได้ จากนั้นเบียร์ทั้งสองชนิดจะถูกแยกเอาเฉพาะส่วนใส ซึ่งจากขั้นตอนนี้ยีสต์จะลดจำนวนลงต่ำกว่า 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำ keg ไปอัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับความดันที่ให้ปริมาณ CO_2 ที่ละลายได้อยู่ที่ 4.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และนำ keg ที่บรรจุเบียร์อัดก๊าซไปเก็บที่ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดทำการแยกเบียร์ออกจากยีสต์ที่ตกตะกอนอยู่ก้นถึง keg จากนั้นนำเบียร์ที่ได้ไปกรองผ่าน filter pad โดยใช้ filter aids ชนิดหยาบผสมน้ำ 500 มิลลิลิตร แล้วเคลือบลงบนผิวแผ่น filter pad ขณะเดียวกัน filter aids บางส่วนจะถูกผสมกับเบียร์เพื่อให้จับกับ haze protein แล้วกรองผ่านแรงดัน 1.5 bar ด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เบียร์ที่ได้จะถูกอัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อีกครั้งแล้วเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอบรรจุลงขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4) วิเคราะห์คุณภาพ wort และเบียร์

- ปริมาณน้ำตาลในหน่วยของ Degree Plato (°P) ตามวิธี MEBAK 2.10.6.2
- ปริมาณ soluble nitrogen และ protein fraction ตามวิธี MEBAK 2.9.3
- pH wort ตามวิธีของ MEBAK 2.2.14
- ปริมาณ 4-vinylguaicol ด้วยวิธี HPLC
- Foam stability by NIBEM ใน MEBAK
- diacetyl by GC ตามวิธีของ EBC

5) การทดสอบทางประสาทสัมผัส (Sensory Evaluation)

ตัวอย่างเบียร์บรรจุขวดที่เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จะถูกนำออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้อุณหภูมิของเบียร์ปรับขึ้นเป็น 8-10 องศาเซลเซียส แล้วจึงเสิร์ฟเบียร์ในแก้วเบียร์ขนาด 500 มิลลิลิตร การทดสอบชิมกระทำในห้องที่มีอากาศถ่ายเทสะดวก และไม่มีกลิ่นอื่น ๆ รบกวน นักชิมทั้ง 13 คนทำการชิมเบียร์ทีละแก้ว แล้วประเมินคุณสมบัติลงบนแบบสอบถามอย่างต่อเนื่องโดยต้องทำให้เสร็จภายในเวลา 30 นาที โดยในแบบฟอร์มจะแบ่งคุณสมบัติของเบียร์ออกเป็น 5 ลักษณะ ลักษณะที่ 1 ได้แก่ aroma (ซึ่งมาจากการดมกลิ่นเท่านั้น ได้แก่ malt, hops, ester และสารให้กลิ่นอื่น ๆ), ลักษณะที่ 2 appearance (จากการสังเกต color, head retention), ลักษณะที่ 3 flavor (ได้จากการชิมแล้วปล่อยให้กลิ่นนั้นระเหยขึ้น โพรงจมูก ได้แก่ กลิ่น malt, hops, fermentation characteristics, balance, after taste), ลักษณะที่ 4 mouth-feel (ได้จากความรู้สึกที่ลิ้นและกระพุ้งแก้ม สัมผัสเบียร์ body, astringency, carbonation) และ ลักษณะที่ 5 ความประทับใจโดยรวมเป็นความเห็นโดยรวมที่มีต่อผลิตภัณฑ์ โดยคุณลักษณะ aroma, appearance, flavor และ mouth-feel มีการจัดระดับคะแนน เป็น 0 ถึง 5 ซึ่ง 0 หมายถึง ไม่ชอบมากๆ (dislike extremely), 1 หมายถึง ไม่ชอบ (dislike), 2 หมายถึง เฉย ๆ (normal), 3 หมายถึง ชอบ (like), 4 หมายถึง ชอบมาก (like very much), 5 หมายถึง ชอบที่มากที่สุด (like extremely) และสำหรับ overall impression นั้นระดับคะแนน 0 หมายถึง ดื่มไม่ได้ (undrinkable), 1 หมายถึง ดื่มได้แต่ไม่ขอแก้วถัดไป (drinkable without asking for another), 2 หมายถึง ดื่มได้และขอแก้วที่สอง (drinkable and prefer one more), 3 หมายถึง ดี (good), 4 หมายถึง ดีมาก (very good) และ 5 หมายถึง ยอดเยี่ยม (excellent)

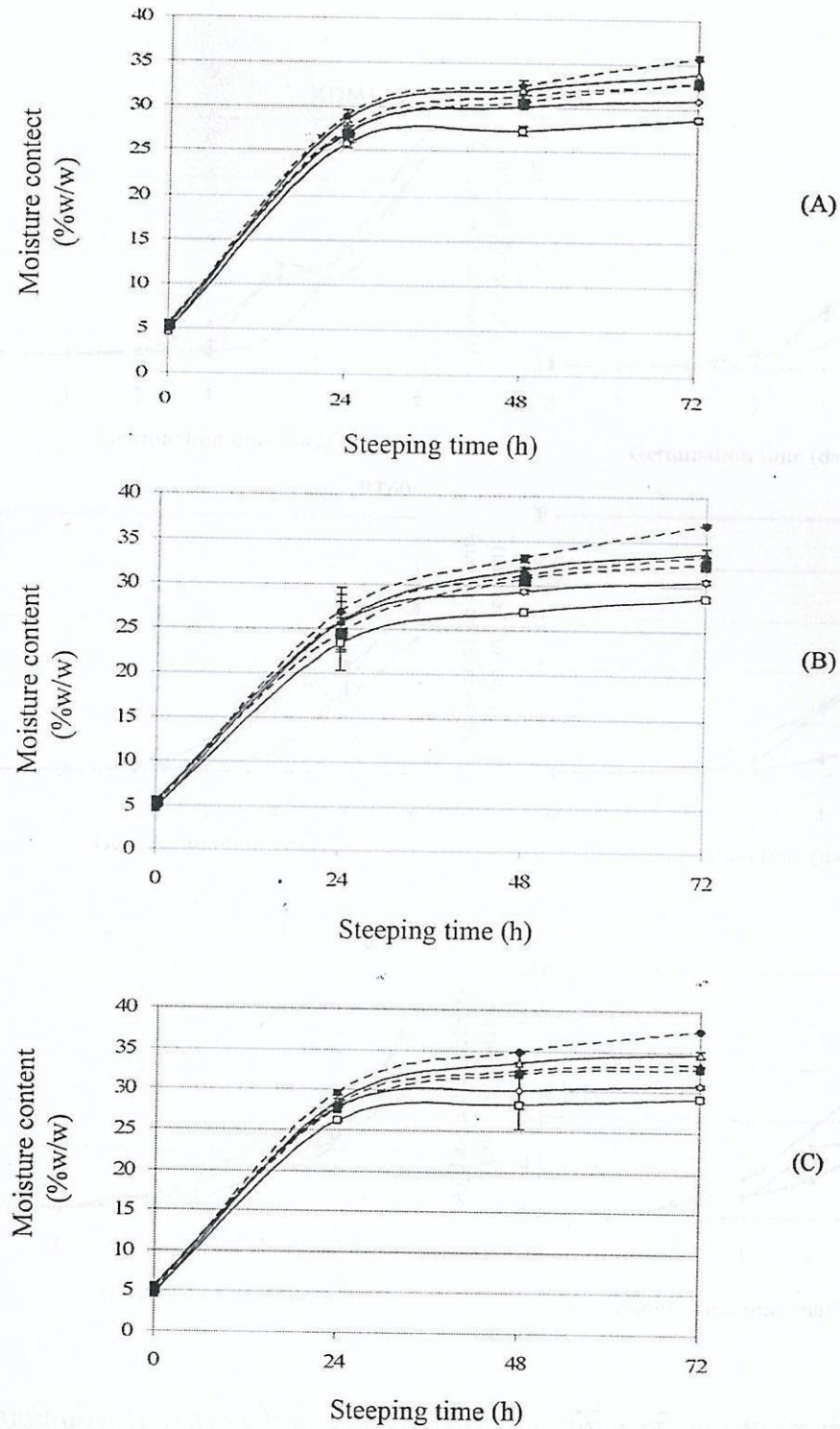
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

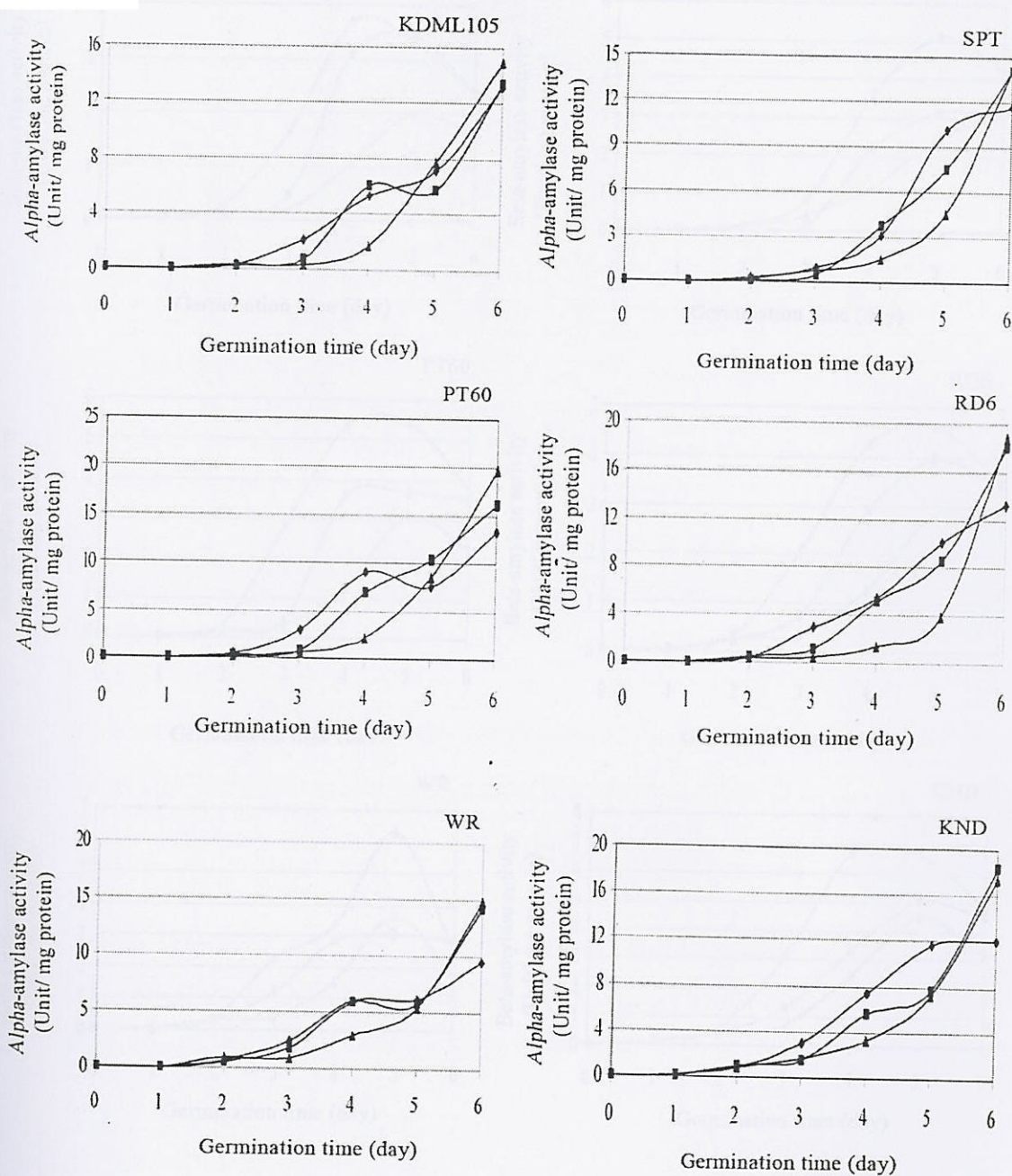
4.1 การผลิตมอลท์จากข้าวไทย

การผลิตมอลท์จากข้าวไทยทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ 105, ข้าวเจ้าดำ, ข้าวปทุมธานี 60, ข้าว กข 6 และข้าวเหนียวดำ โดยทำการทดลองศึกษาผลของระยะเวลาการแช่น้ำดังนี้ แช่น้ำเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และอุณหภูมิในการผลิตข้าวมอลท์ที่ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส แล้วปล่อยให้แห้งจนครบเวลา 6 วัน (รวมระยะเวลาแช่น้ำ) ที่ห้องควบคุมอุณหภูมิ และความชื้นที่ $95\% \pm 5$ โดยภายในห้องมีเครื่องฟั่นไอน้ำทำงานทุก 2 ชั่วโมง และข้าวที่ทำการเพาะจะนำกลับมาแช่น้ำทุก 12 ชั่วโมง ครั้งละ 5 นาที ในการศึกษครั้งนี้ ใช้ปริมาณเอนไซม์ α -amylase และ β -amylase เป็นตัวบ่งชี้สถานะที่เหมาะสมในการเพาะข้าว

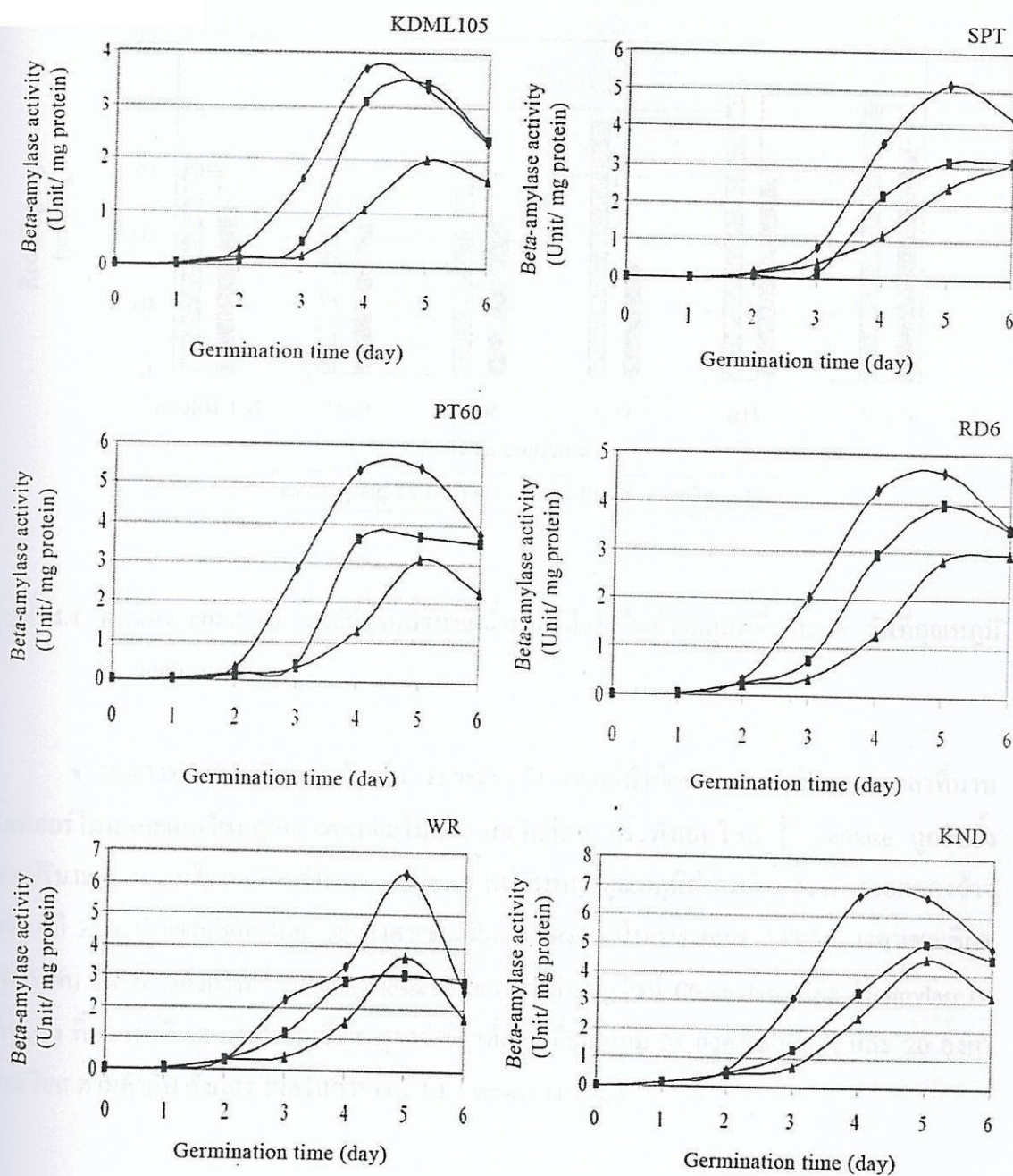
การสร้างเอนไซม์อัลฟาเอมิเลสในข้าวงอกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะข้าว (จากรูปที่ 4.1) ในขณะที่เอนไซม์ β -amylase มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นในระยะเวลา 3-4 วันแรกในการเพาะ หลังจากนั้นเอนไซม์มีแนวโน้มลดลงในวันที่ 5-6 (รูปที่ 4.2) จากรูปที่ 1 ผลของระยะเวลาการแช่น้ำต่อการผลิตเอนไซม์ α -amylase มีแนวโน้มดังนี้ การเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ α -amylase ในตัวอย่างข้าวที่อยู่ในระหว่างแช่น้ำและข้าวที่สะเด็ดน้ำแล้ว พบว่าข้าวที่อยู่ระหว่างแช่น้ำมีระดับต่ำกว่าระดับเอนไซม์ในข้าวที่สะเด็ดน้ำและอยู่ระหว่างปล่อยให้แห้งในวันเวลาเดียวกัน และเมื่อพิจารณา α -amylase ในข้าวงอก ณ วันที่ 6 พบว่าปริมาณเอนไซม์ α -amylase ในตัวอย่างข้าวที่แช่น้ำ 24 ชั่วโมง มีกิจกรรมสูงขึ้นอย่างรวดเร็วเกือบเทียบเท่ากับตัวอย่างข้าวที่ผ่านการแช่น้ำ 48 และ 72 ชั่วโมง จากผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในข้าวงอก 6 วัน โดยเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างที่ผ่านการแช่น้ำต่าง ๆ พบว่า ตัวอย่างข้าวที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ ตัวอย่างข้าวที่แช่น้ำน้อยที่สุด คือ 24 ชั่วโมง ตามด้วย 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลของปริมาณเอนไซม์ β -amylase ในรูปที่ 4.3 ซึ่งระยะเวลาการแช่น้ำส่งผลต่อปริมาณเอนไซม์ β -amylase โดยตัวอย่างข้าวที่มีการแช่น้ำนานมีปริมาณเอนไซม์ต่ำกว่าตัวอย่างข้าวที่มีระยะเวลาแช่น้ำที่สั้นกว่า ($72 \text{ ชั่วโมง} < 48 \text{ ชั่วโมง} < 24 \text{ ชั่วโมง}$) ซึ่งปริมาณ reducing sugar ในข้าวมอลท์บ่งบอกถึงการย่อยแป้งในเมล็ดข้าวในระหว่างงอก (รูปที่ 4.4) ซึ่งคาดว่าหากเอนไซม์ α -amylase และ β -amylase สูงแสดงว่ามีการย่อยแป้งในเมล็ดข้าวได้มากกว่าข้าวที่มีเอนไซม์ในระดับต่ำกว่า



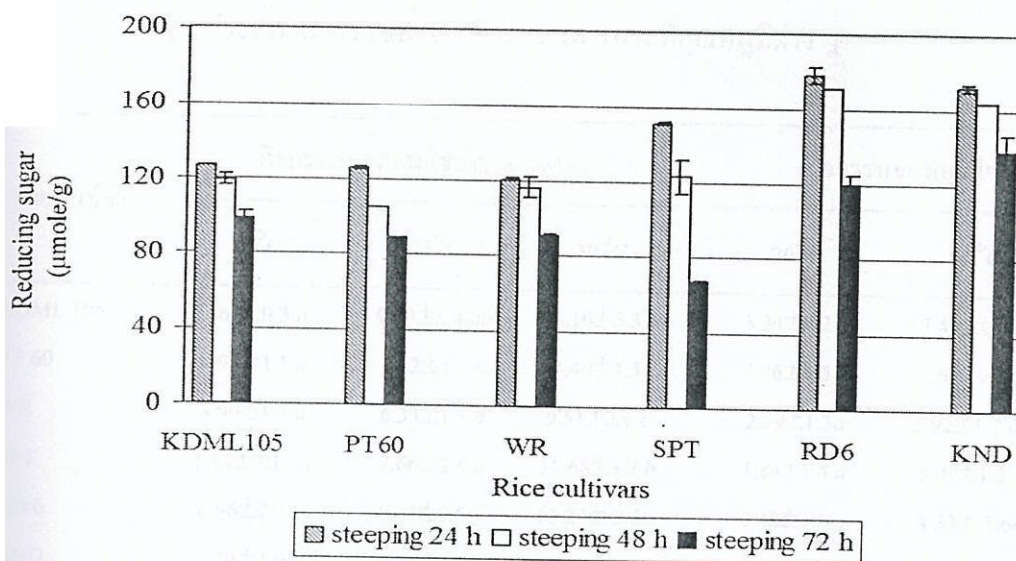
รูปที่ 4.1 ปริมาณความชื้นในข้าวที่ผ่านการแช่น้ำเป็นระยะเวลาต่างๆ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (A), 25 องศาเซลเซียส (B) และ 30 องศาเซลเซียส(C), \diamond ; KDML105, \square ; PT60, Δ ; WR, \blacksquare ; SPT, \blacktriangle ; RD6, \blacklozenge ; KND.



รูปที่ 4.2 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ในข้าวมอลที่ที่เพาะที่ 30 องศาเซลเซียสและ
 ใช้น้ำเป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน ดังนี้ : ◆ ; 24 ชั่วโมง, ■ ; 48 ชั่วโมง, ▲ ; 72 ชั่วโมง



รูปที่ 4.3 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ β -amylase ต่อหนึ่งหน่วยโปรตีนในข้าวมอลต์เพาะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยผ่านการแช่น้ำเป็นระยะเวลา ◆ ; 24 ชั่วโมง, ■ ; 48 ชั่วโมง, ▲ ; 72 ชั่วโมง



รูปที่ 4.4 ผลของระยะเวลาการแช่น้ำต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่งในข้าวมอลท์ที่เพาะ 6 วันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น ระยะเวลาในการแช่น้ำที่เหมาะสมจึงเป็นระยะเวลาที่นานพอที่ฮอร์โมนและเอนไซม์ถูกกระตุ้นและไม่นานจนเกินไปจนกระทั่งเอนไซม์ β -amylase ถูกยับยั้งโดยปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่าอุณหภูมิส่งผลต่ออัตราการงอกของข้าวอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส มีอัตราเร็วในการงอกสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยผลของการเกิด malting losses และการผลิตเอนไซม์ α -amylase และ β -amylase ในข้าวงอก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สูงกว่าข้าวที่เพาะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 4.1 และตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์กิจกรรมต่อหนึ่งหน่วยโปรตีนในข้าวมอลต์ที่พบสูงสุดในตัวอย่างที่ผ่านการแช่น้ำ 24 ชั่วโมง และเพาะที่อุณหภูมิต่างๆ

สายพันธุ์ข้าว	กิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase			กิจกรรมของเอนไซม์ β -amylase		
	20°C	25°C	30°C	20°C	25°C	30°C
KDML 105	3.67±0.3 a	9.63±5.4 ab	13.10±5.3 b	3.34±0.2 a	3.48±0.6 a	3.71±0.1 b
PT 60	4.92±1.1 a	8.22±1.1 b	13.40±4.3 b	2.96±1.5 a	3.6±1.4 ab	5.45±2.3 a
WR	3.90±1.4 a	6.33±1.3 a	9.51±2.6 b	2.29±1.3a	2.92±1.2 ab	6.32±5.6 b
SPT	2.15±0.13 a	7.66±2.6 a	11.68±3.2 b	1.84±1.4 a	3.97±1.3 a	5.16±1.6b
RD 6	6.96±2.2 a	8.43±0.5 b	13.27± 2.2 c	3.48±1.5 a	4.33± 1.6a	4.63±2.1 b
KND	5.14±1.9 a	7.09±0.1 a	11.99±3.4 b	6.81±0.3 a	4.38±0.1 b	6.71±1.2 b

ตัวเลขในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ \pm ค่าความแปรปรวน
ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมภ์บ่งบอกค่าความแตกต่างที่ค่า $p \leq 0.05$

ตารางที่ 4.2 ความยาวของยอดและรากจากข้าวออกในวันี่ 4-6

คุณสมบัติ	20°C			25°C			30°C		
	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.
(วัน)	ระยะเวลาการแช่น้ำ								
Shoot length (mm)	4.4±0.7 b	2.6±0.1 a	3.8±0.5 b	7.9±0.9 a	8.1±0.5 a	5.5±0.5 a	14.3±0.1 a	14.0±2.1 a	10.8±5.1 a
	4.6±1.0 a	4.7±2.3 a	4.8±0.5 a	15.2±1.0 b	12.3±0.4 a	8.7±3.0 a	22.5±1.3 a	19.5±0.9 a	15.3±0.4 a
	4.8±1.0 a	7.9±1.3 a	5.0±1.4 a	23.5±3.0 a	18.8±0.1 a	14.6±0.5 a	33.3±1.4 a	28.6±2.3 a	24±2.3 a
Root length (mm)	11.3±2.6 c	9.6±1.9 b	6.5±1.8 a	49.8±4.9 b	20.7±8.8 ab	7.5±3.2 a	53.3±6.9 c	39.3±4.8 b	16.6±2.3 a
	17.9±4.1 a	16.6±4.3 a	14.9±3.3 a	49.8±8.3 b	42.0±5.4 ab	29.3±4.5 a	68.8±8.9 b	63.6±7.7 b	49.9±5.1 a
	23.3±4.2 a	23.4±3.4 a	18.4±3.3 a	65.8±10.4 a	49.3±5.7 a	51.6±5.5 a	73.6±10.6 a	65.4±4.8 a	69.9±6.1 a
Malting losses (%)	2.7±1.4 b	2.7±0.6 b	1.7±1.1 a	7.5±1.1 a	6.7±1.9 a	2.7±1.1 a	9.7±3.2 a	9.0±1.6 a	3.6±1.7 a
	6.3±2.9 a	7.2±4.9 a	4.3±3.4 a	15.6±2.2 b	12.2±2.1 ab	8.05±1.7 a	20.9±5.0 a	16.6±3.5 a	13.2±2.3 a
	9.5±3.8 b	9.5±3.1 b	6.4±1.6 a	32.5±3.8 b	23.0±2.6 ab	19.3±2.8 a	39.4±5.2 b	28.4±4.4 ab	22.7±3.4 a

4.2 การหาสถานะในการผลิตมอลต์ด้วยวิธีการตอบสนองบนพื้นผิว

4.2.1 คุณสมบัติของข้าวเจ้าดำและข้าวเหนียวดำ

จากผลการทดสอบคุณสมบัติของวัตถุดิบที่ใช้พบว่าข้าวทั้งสองชนิดมีเปอร์เซ็นต์การงอกอยู่ในเกณฑ์ที่ดี คือสูงกว่า 95% และจัดเป็นข้าวกลุ่มที่มี gelatinization temperature ปานกลาง คือ 70-74 °C (Capanzana และ Buckle, 1997) ผลการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ α -amylase ในข้าวเปลือกพบว่ามีปริมาณต่ำมาก และสำหรับเอนไซม์ β -amylase ในข้าวเจ้าดำนั้นมีปริมาณต่ำกว่าในข้าวเหนียวดำมาก โดยในข้าวเหนียวดำพบแอกติวิตี้สูงถึง 102±3 (unit/g) และนอกจากนี้ยังพบปริมาณเอนไซม์ limit-dextrinase สูงกว่าที่มีการรายงานในมอลต์จากข้าวบาร์เลย์ ซึ่งพบอยู่ในช่วง 500 U/kg ในขณะที่ในข้าวเจ้าดำพบสูงถึง 3,917±46 U/kg และ 3,391±31 สำหรับข้าวเหนียวดำ

ตารางที่ 4.3 คุณสมบัติของข้าวเจ้าดำและข้าวเหนียวดำ

คุณสมบัติ	ข้าวเจ้าดำ	ข้าวเหนียวดำ
Moisture content (%)	12.1±0.5	11.6±0.2
Germinative capacity (%)	95±3	97±2
Gelatinization temperature (°C)	71.4±0.2	73.3±0.3
α -amylase (Celaphal unit/g)	2±1	1±0.5
β -amylase (Betamyl unit/g)	11±0.5	102±3
Limit-dextrinase (U/kg)	3,917±46	3,397±31
α -glucosidase (U/kg)	82±5	72±1

4.2.2 Model fitting and evaluation

จากแผนการทดลองแบบ face-centered composite design ที่ประกอบด้วย 24 การทดลองต่อข้าวหนึ่งสายพันธุ์ ตัวอย่างข้าวมอลต์ที่ได้ถูกนำมาวิเคราะห์คุณภาพจากนั้นข้อมูลดังกล่าวถูกป้อนลงโปรแกรม Design-Expert v. 7.0.3 ทำการวิเคราะห์และจำลองสมการรีเกรสชันและวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) ของตัวแปรแต่ละตัวในแบบจำลองดังกล่าว ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.2 และ 4.3 ซึ่ง terms ที่ประกอบในแบบจำลองล้วนเป็น terms ที่มีความสำคัญต่อแบบจำลอง ที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$ ยกเว้นในกรณีแบบจำลองของ extract content ที่สกัดได้จากมอลต์ข้าวเหนียวดำ มี terms ระยะเวลาการเพาะข้าว (β_1), ปริมาณความชื้น (β_3) และ interaction term ระหว่างอุณหภูมิและปริมาณความชื้น (β_{23}) ที่ไม่ส่งผลต่อปริมาณ extract content อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทำให้แบบจำลองคณิตศาสตร์มีค่า coefficient of determination $R^2 = 0.3766$ ซึ่งโดยทั่วไป ค่า R^2 นั้นบ่งบอกถึงคุณภาพของแบบจำลองที่ได้ และนอกจากนี้ยังมี predicted R^2 และ adjusted R^2 ที่จะต้องพิจารณา

ร่วมด้วย โดยค่าทั้งสองจะต้องมีค่าที่แตกต่างกันไม่เกิน 0.20 แต่ถ้าเกิน 0.20 บอกให้ทราบว่าแบบจำลองนั้นไม่เหมาะสมกับข้อมูลที่ได้จากการทดลองหรือข้อมูลอาจมีความแปรปรวนสูง (Ahmad และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบผ่านทางค่า coefficient of variation (CV) ที่เป็นค่า standard deviation ที่แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าผิดพลาดของค่าที่ได้จากการพยากรณ์ต่อค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง และค่า CV ควรมีค่าไม่เกิน 10% และจากการทดลองทุกแบบจำลองคณิตศาสตร์มีค่า CV อยู่ในเกณฑ์ ดังนั้นแบบจำลองที่แสดงในตารางที่ 4.4 และ 4.5 นั้นมีความเหมาะสมที่จะใช้ในการพยากรณ์ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.99% ยกเว้นแบบจำลองของ extract content ที่ได้จากมอลท์ข้าวเหนียวดำการนำไปใช้ต้องทำด้วยความระมัดระวัง และเนื่องจากค่า R^2 ของแบบจำลองมีค่าต่ำ ในการทดลองนี้จึงไม่นำมาใช้ในการพยากรณ์ และไม่ใช่เพื่อการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตมอลท์ข้าวเหนียวดำ

เนื่องจาก response variables ซึ่งหมายถึง คุณลักษณะของมอลท์ในด้านต่างๆ ที่ทำการทดสอบในการทดลองนี้มีทั้งหมด 6 คุณลักษณะจึงใช้วิธีการ numerical optimization เพื่อหาสภาวะในการผลิตข้าวมอลท์ ทำได้ดังต่อไปนี้ extract content, cold water extract (CWE) เป็นคุณลักษณะที่มีอันดับความสำคัญสูงสุด (ระดับ 5) เนื่องจากเป็นปัจจัยที่บ่งบอกว่าข้าวมอลท์มีการเปลี่ยนแปลงมากน้อยแค่ไหนในระหว่างกระบวนการงอก ถัดมาคือ Kolbach index และเอนไซม์ α -amylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลง storage protein และ storage starch จัดมีความสำคัญที่ระดับ 4 FAN เป็นผลิตผลจากการทำงานของเอนไซม์ proteinase และ peptidase และ AAL เป็นค่าที่บ่งบอกถึงปริมาณ fermentable sugar ที่ละลายในเวิร์ทที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ได้ จัดเป็นผลิตผลสุดท้ายของการทำงานของเอนไซม์กลุ่ม amylase จึงให้ระดับความสำคัญไว้ที่ระดับ 3 และค่าของคุณลักษณะ (response value) ที่ต้องการนั้นถูกตั้งไว้ที่ค่าสูงสุด (maximum) ที่สามารถผลิตได้ภายใต้การทดลองนี้ ซึ่งเป็นเป้าหมายในการผลิตมอลท์ข้าวที่มีคุณภาพเหมาะสมสำหรับการผลิตเบียร์ จากนั้นโปรแกรมได้ระบุสภาวะที่เป็นทางเลือกในการผลิตมอลท์ โดยสภาวะที่มีความน่าจะเป็นสูงสุด ถูกเลือกเพื่อใช้ในการผลิตข้าวมอลท์ ซึ่งสภาวะดังกล่าวคือ การเพาะข้าวที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส ด้วยเปอร์เซ็นต์ความชื้นจากการแช่น้ำอยู่ที่ 44% และเพาะข้าวเป็นระยะเวลา 8 วัน จากนั้นทำการผลิตมอลท์จากข้าวทั้งสองสายพันธุ์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนั้น 3 ชั่วโมงยืนยันผลว่าแบบจำลองที่ได้สามารถนำมาใช้งานได้จริงและสามารถใช้ในการทำ optimization ได้ผลจริง ดังแสดงในตารางที่ 4.6 ซึ่งพบว่าแบบจำลองทั้งหมดสามารถนำมาใช้เพื่อการคาดคะเนได้ผลดีจริง ยกเว้นแบบจำลองของ extract content จากมอลท์ข้าวเหนียวดำที่ไม่ได้นำมาใช้ในการ optimization

ตารางที่ 4.4 แสดงค่า coefficient ของ parameter ที่ประกอบอยู่ในแบบจำลองคณิตศาสตร์และผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแบบจำลองของมอลต์ข้าวเจ้าดำ

Factor	CWE % (w/w)	Extract % (w/w)	FAN (mg/100g)	Kolbach Index (%)	α - amylase (Unit/g)	AAL (%)
β_0	8.44	62.18	73.46	16.40	51.90	82.17
Linear						
β_1	0.26	0.47	9.24	0.84	2.96	3.72
β_2	1.66	1.14	18.77	3.40	20.18	14.61
β_3	0.47		14.93	1.88	4.66	2.11
Interaction						
β_{12}	-0.28	-0.79	-3.76	-0.73		-3.25
β_{13}	0.17			0.41		1.63
β_{23}	0.22		4.71	0.83	3.07	
Quadratic						
β_{11}						
β_{22}	-1.10	-1.49		-1.11	-15.13	-11.67
β_{33}						
p -value for model	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
p -value for lack of fit	0.1578	0.0804	0.3281	0.1627	0.7979	0.0013
R^2	0.9859	0.9128	0.9277	0.9868	0.9810	0.9866
Adj. R^2	0.9797	0.8945	0.9076	0.9798	0.9687	0.9819
Pred. R^2	0.9739	0.8596	0.8848	0.9652	0.9506	0.9713
C.V.%	3.11	0.80	10.0	3.50	7.94	2.72

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ของ parameter ที่ประกอบอยู่ในแบบจำลองคณิตศาสตร์และผล
การวิเคราะห์ความแปรปรวนของแบบจำลองของมอลท์ข้าวเหนียวดำ

Factor	CWE % (w/w)	Extract %(w/w)	FAN (mg/100g)	Kolbach Index (%)	α -amylase (Unit/g)	AAL (%)
β_0	9.70	58.68	84.92	20.15	76.17	49.82
Linear						
β_1	0.41	0.13	4.92	0.96	2.28	3.45
β_2	1.68	0.55	15.89	2.62	14.11	16.31
β_3	0.56	-0.067	8.05	1.78	3.28	7.58
Interaction						
β_{12}	-0.26	0.26	-3.66	-0.62	-2.62	
β_{13}		-0.73		0.44	1.75	2.99
β_{23}	0.26	-0.069	+2.95	0.55		3.44
Quadratic						
β_{11}			-12.44			
β_{22}	-1.99			-1.69	-11.72	-9.85
β_{33}						
<i>p</i> -value for model	<0.0001	0.1787	<0.0001	<0.001	<0.001	<0.001
<i>p</i> -value for lack of fit	<0.0001	0.9360	0.7681	0.1613	0.4685	0.7278
R^2	0.9621	0.3766	0.9624	0.9669	0.9767	0.9586
Adj. R^2	0.9455	0.1566	0.9491	0.9524	0.9684	0.9440
Pred. R^2	0.9084	-0.4755	0.9225	0.9299	0.9465	0.9197
C.V.%	4.79	2.10	5.35	3.67	3.79	9.8

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าที่คาดคะเนจากแบบจำลองเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดสอบจริง

Malt qualities	KCD		KND	
	Predicted values	Experimental values	Predicted values	Experimental values
CWE (% w/w)	9.83 [9.24/10.43] ¹	9.88±0.05	11.29 [10.23/12.23]	11.37±0.05
Extract (% w/w)	61.5 [60.4/62.7]	62.0±0.21	nd	59.3±0.42
FAN (mg/100g malt)	117 [100/135]	104±3	100 [90/110]	98.3±6.5
Kolbach index (%)	21 [20/23]	20±1	21 [22/27]	23±1
α-amylase activity (U/g)	72 [63/81]	75±2	73 [64/70]	83±5
AAL (%)	89.3 [84.4/94.2]	85.5±0.7	82.2 [77.9/85.6]	85.5±0.7

¹ [95% P. I. low / 95% P. I. high]. Nd = not determined

4.3 ผลของ independent variables ที่มีต่อคุณลักษณะของมอลท์หรือ response variables

4.3.1 ผลของ independent variables ที่มีต่อ CWE และ extract content ในข้าวมอลท์

ค่า CWE เป็นค่าที่บอกถึงปริมาณ soluble substances ที่ได้จากกระบวนการทำ malting ซึ่งคิดเทียบกับน้ำหนักของข้าวมอลท์ 50 กรัมที่ใช้ในการสกัด ซึ่งค่า CWE สูงสุดที่ได้คือ 9.8% และ 11.4% ในมอลท์ข้าวเจ้าดำและมอลท์ข้าวเหนียวดำตามลำดับ สำหรับมอลท์คุณภาพดีจากข้าวบาร์เลย์ ค่า CWE ที่ได้คือ ประมาณ 22% ขึ้นไป (Guglielminetti และคณะ, 1995) และเมื่อนำมอลท์ข้าวมาผ่านกระบวนการ mashing ตามวิธีมาตรฐาน congress mashing พบว่า ค่า extract ที่ได้อยู่ในช่วงระหว่าง 58.6-62.8 % (w/w) สำหรับมอลท์ข้าวเจ้าดำ และสำหรับมอลท์ข้าวเหนียวดำอยู่ในช่วง 55.3-61.4 % (w/w) ซึ่งต่ำกว่าค่ามาตรฐานของมอลท์จากบาร์เลย์ที่ดี คือ 80% ขึ้นไป แต่เนื่องจากน้ำหนักของข้าวมอลท์เป็นน้ำหนักที่รวมน้ำหนักของเปลือกซึ่งในมอลท์จากข้าว มีน้ำหนักเปลือกถึง 30% ของน้ำหนักทั้งหมด ดังนั้นปริมาณ extract สูงสุดที่ได้จึงคิดเป็น 70% ของน้ำหนักมอลท์ทั้งหมดและในจำนวนนี้ยังรวมถึงน้ำหนักของส่วน embryo ที่ประกอบด้วยบางส่วนของราก และยอดที่ไม่สามารถละลายได้ และสำหรับมอลท์บาร์เลย์มีส่วนของ starchy endosperm ประมาณ 82% (Briggs, 1998) ซึ่งสูงกว่าข้าว จึงเป็นปกติที่ปริมาณ extract และ CWE ที่ได้ต่ำกว่ามาตรฐานมอลท์บาร์เลย์

ปัจจัยในการผลิตมอลต์ทั้งสามได้ถูกทดสอบพบว่าอุณหภูมิ เฟอร์เซ็นต์ความชื้นจากการแช่น้ำ และระยะเวลาการเพาะข้าว มีผลต่อปริมาณ extract และ CWE ในมอลต์ข้าวเจ้าดำอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ค่าสัมประสิทธิ์ที่มีค่าบวกบ่งบอกถึงปริมาณ CWE จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มค่าของปัจจัยทั้งสามอย่างใดอย่างหนึ่ง รูปที่ 4.5 A แสดงความสัมพันธ์ของสองตัวแปร คือระยะเวลาการเพาะข้าวและปริมาณความชื้นจากการแช่น้ำที่ส่งเสริมการเพิ่ม CWE ในส่วนของค่าสัมประสิทธิ์ที่ติดลบของ interaction term ระหว่างระยะเวลาการเพาะข้าวกับอุณหภูมิและ quadratic term ของอุณหภูมิ (β_{12} และ β_{22}) ซึ่งบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ของสองตัวแปรที่หากให้ระยะเวลาการเพาะข้าวคงที่แล้วเพิ่มอุณหภูมิจนถึงค่าหนึ่งจะส่งผลให้ค่า CWE ลดลง และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็นสองเท่า ค่า CWE ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งพบใน CWE ของมอลต์ข้าวเหนียวดำดังแสดงในรูปที่ 4.5 B

นอกจากนี้ อุณหภูมิยังเป็นปัจจัยสำคัญดังรูปที่ 4.7 แสดง interaction effect ระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลาในการเพาะข้าวที่มีต่อปริมาณ extract content ในมอลต์ข้าวเจ้าดำและข้าวเหนียวดำที่มีปริมาณความชื้นจากการแช่น้ำ 44% ซึ่งพบว่าเมื่อเพาะข้าวที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-8 วัน ผลของปริมาณความชื้นจากการแช่น้ำมีนัยสำคัญต่อการเพิ่มปริมาณ extract content ในมอลต์จากข้าวเจ้าดำแบบ exponential ในรูปที่ 4.6A คาดว่าเป็นผลมาจากการที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ในช่วงเวลาดังกล่าวยังคงสูงขึ้น ในรูปที่ 4.6B แสดงผลในเชิงลบของอุณหภูมิ และระยะเวลาในการงอกต่อปริมาณ extract content ในข้าวเหนียวดำ พบว่าปริมาณ extract content ลดลงเล็กน้อยในช่วงระยะเวลาการงอก 6-8 วัน

4.3.2 ผลของ independent variables ที่มีต่อปริมาณ Kolbach index และ FAN ในข้าว

มอลต์

ในการทดลองนี้ได้ทำการวัดปริมาณไนโตรเจนในข้าวมอลต์ และใน wort แล้วแสดงผลเป็นอัตราส่วนของไนโตรเจนในข้าวมอลต์ และใน wort ซึ่งบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรตีนเอสในข้าวมอลต์ที่ทำงานในช่วงผลิตมอลต์ และช่วงของการผลิต wort (หรือ mashing) เรียก อัตราส่วนดังกล่าวนี้ว่า “Kolbach index” ผลการทดลองพบว่าค่า Kolbach index ในมอลต์ข้าวเจ้าดำอยู่ระหว่าง 9.5-21.7% สำหรับข้าวเหนียวดำอยู่ระหว่าง 13.5-23.2% ปัจจัยทางด้านอุณหภูมิ ปริมาณความชื้น และระยะเวลาในการงอกมีผลต่อค่า Kolbach index รูปที่ 4.8A และ 4.9A แสดงผลของปัจจัยในการผลิตมอลต์ที่มีต่อค่า Kolbach index ในข้าวเจ้าดำ และข้าวเหนียวดำตามลำดับ โดยข้าวเจ้าดำมีค่า Kolbach index ลดลงเล็กน้อย หลังทำการงอก 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และปริมาณความชื้น 41% ในขณะที่มอลต์ข้าวเหนียวดำที่งอกภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกันยังคงพบว่า Kolbach index เพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 8 นอกจากนี้ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการงอกและความชื้นยังส่งผลต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระ หรือ FAN เช่นกัน (รูปที่ 4.8B และ 4.9B) โดยพบว่าปริมาณ FAN เพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มความชื้นในระหว่างกระบวนการผลิต

มอลท์ ซึ่งเป็นผลผลิตของการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอสทั้งในระหว่างที่ข้าวออก และระหว่าง mashing เอนไซม์โปรตีนเอสเป็นเอนไซม์กลุ่ม hydrolysis enzyme ที่ต้องใช้น้ำในการย่อยสลาย โมเลกุลของโปรตีน ดังนั้นจึงพบว่าปริมาณ FAN และ Kolbach index เพิ่มขึ้นตามปริมาณความชื้นที่ให้แก่ข้าวออก และสูงสุดที่ปริมาณความชื้น 44% ปริมาณ FAN มีผลต่อกระบวนการหมักและกลิ่นของเบียร์ ซึ่งปริมาณ FAN ในมอลท์ที่ผ่าน congress mashing ต้องสูงกว่า 140 มก./ลิตร จึงจะเพียงพอต่อความต้องการของยีสต์เพื่อเพิ่มจำนวน และดำเนินกระบวนการหมักได้เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามปริมาณ FAN ในข้าวมอลท์จากทั้งสองสายพันธุ์อยู่ในช่วงที่ต่ำกว่ามาตรฐานของข้าวบาร์เลย์ ดังนั้นตัวแปรนี้บ่งบอกให้ทราบว่าข้าวมอลท์ที่ต้องการโปรแกรม mashing ที่นานกว่า congress mashing หรืออาจต้องมีการปรับกระบวนการ mashing ให้เหมาะสมต่อไป

4.3.3 ผลของ independent variables ที่มีต่อค่า Apparent attenuation limit (AAL) หรือความสามารถในการหมักในข้าวมอลท์

การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดใน wort ที่ได้จากการทำ congress mashing โดยการวัดเปอร์เซ็นต์ extract ที่หายไปหลังจากเติมยีสต์ลงไปให้หมักพอแล้วเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เรียกค่าที่ได้ว่า Apparent attenuation limit หรือ fermentability จากผลการทดลองพบว่าค่า AAL ในมอลท์ข้าวเจ้าค่าอยู่ระหว่าง 48.4-89.3% และมอลท์ข้าวเหนียวค่าอยู่ระหว่าง 43.8-83.0% ซึ่งค่า AAL เพิ่มขึ้นตามการเพิ่มอุณหภูมิ ระยะเวลาการงอก และปริมาณความชื้น ดังแสดงผลในตารางที่ 4.5 และ 4.6 และเนื่องจากพบปริมาณ FAN และ extract content สูงสุดในข้าวทั้งสองพันธุ์ที่งอกเป็นเวลา 8 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และปริมาณความชื้น 44% ดังนั้นจึงพบค่า AAL สูงสุดในข้าวมอลท์ที่ผลิตภายใต้สภาวะดังกล่าว นอกจากนี้ค่า AAL ยังสัมพันธ์กับ degree of modification หรือ ค่า CWE ดังแสดงในรูปที่ 4.10

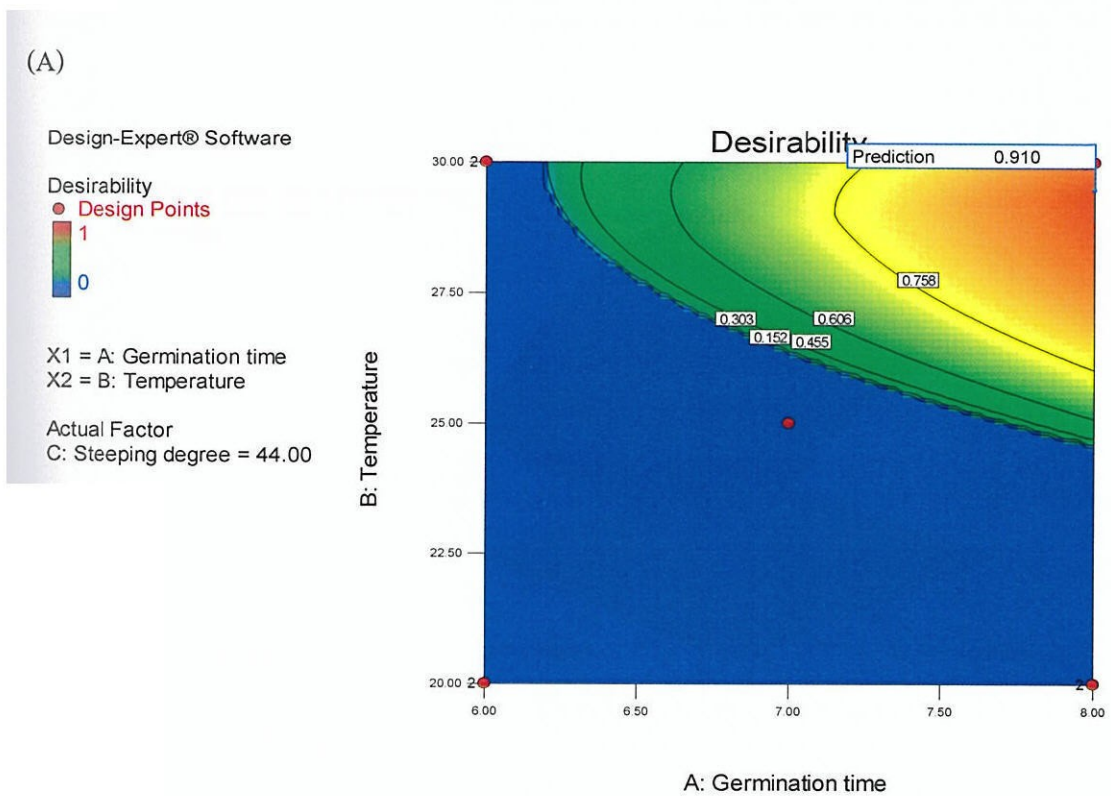
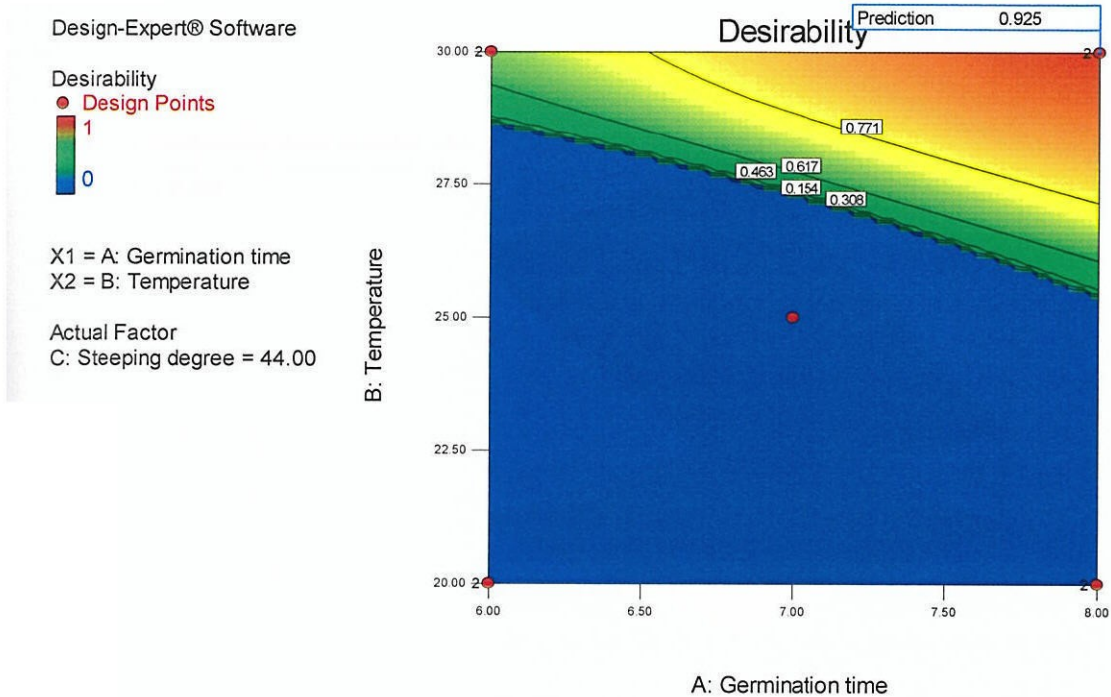
4.3.4 ผลของ independent variables ที่มีต่อปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase

กลุ่มเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง เป็น oligosaccharide, dextrin, trisaccharide, disaccharide และ monosaccharide เรียกว่า เป็นกลุ่มของ amylolytic enzymes เอนไซม์หลักที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโมเลกุลแป้งแบบสุ่มภายในสายของ polysaccharide ให้เล็กลงจนได้ amylase หรือ amylopectin สายสั้น คือ เอนไซม์ α -amylase (Guglielminetti และคณะ, 1995) จากการเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ α -amylase ในข้าวเปลือกกับข้าวมอลท์ พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้จะถูกสร้างระหว่างกระบวนการงอกในขณะที่ยังพบเพียงเล็กน้อยในข้าวเปลือก จากผลการทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณเอนไซม์พบว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการงอก อุณหภูมิและปริมาณความชื้นส่งผลในการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ α -amylase ในข้าวมอลท์ ดังแสดงในรูปที่ 4.11A และรูปที่ 4.11B น้ำ หรือความชื้นมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase เช่นเดียวกับผลที่มีต่อเอนไซม์ proteases ในขณะที่ให้ความชื้นข้าวออกที่ 38% พบว่า ปริมาณเอนไซม์ในข้าวเหนียวค่างอกครั้งที่ตั้งแต่วันที่ 6-8 แต่เมื่อ

เพิ่มความชื้นเป็น 41% และ 44% พบปริมาณเอนไซม์สูงขึ้น ตามลำดับ ดังนั้นจึงพบว่าปริมาณของเอนไซม์ α -amylase สูงสุด เมื่อผลิตมอลท์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณความชื้น 44 % และระยะเวลา 8 วัน ในมอลท์ข้าวเจ้าค่าพบปริมาณ α -amylase สูงสุด คือ 75 ยูนิต/กรัมมอลท์ และ ในมอลท์ข้าวเหนียวค่า 83 ยูนิต/กรัมมอลท์ ในกรณีของข้าวบาร์เลย์พบว่าการรายงานปริมาณเอนไซม์ α -amylase สูงสุดในวันที่ 2 และคงที่ไปจนถึงวันที่ 4 (Wijngaard และ Ulmer, 2006) อย่างไรก็ตาม ใน buckwheat ซึ่งเป็นธัญพืชชนิดหนึ่งที่มีความสนใจในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเบียร์มากขึ้น มีรายงานว่าพบกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase สูงสุดในวันที่ 6 (63 ยูนิต/กรัมมอลท์) (Okungbowa และคณะ, 2002) ซึ่งคล้ายกับผลการทดลองนี้ที่พบปริมาณของเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการออก และสูงสุดในช่วงท้ายการออก

4.4 คุณภาพมอลท์อื่น ๆ ได้แก่ β -amylase, limit-dextrinase, α -glucosidase, และ malting losses

β -amylase เป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติย่อยสาย dextrin ที่ปลายด้าน non-reducing end และผลิตภัณฑ์จากการย่อยคือ น้ำตาลมอลโทส (Nakamura และคณะ, 1989; Okungbowa และคณะ, 2002) ในข้าวเปลือกทั้งสองสายพันธุ์พบกิจกรรมเอนไซม์ β -amylase ในปริมาณที่ต่างกัน โดยพบว่าข้าวเปลือกพันธุ์ข้าวเจ้าค่าพบกิจกรรมของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองใน buckwheat (Okungbowa และคณะ, 2002) และในข้าวบางสายพันธุ์ (Guglielminetti และคณะ, 1995) ในขณะที่ข้าวเหนียวค่าพบกิจกรรมของเอนไซม์ β -amylase สูงกว่าข้าวเจ้าค่า ซึ่งปริมาณที่พบใกล้เคียงกับรายงานกิจกรรมของเอนไซม์ที่พบในข้าวบาร์เลย์ และข้าวฟ่างก่อนผ่านกระบวนการออก และกิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มสูงขึ้นระหว่างที่ข้าวออก ซึ่งจากการรายงานของข้าวบาร์เลย์พบกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดหลังจากออกได้ 2 วันจากนั้นจะลดลงอีกครั้งในช่วงท้ายของการออกจนมีค่าใกล้เคียงกับตอนเริ่มต้น (Lewis และ Young, 1995) นอกจากนี้ ยังพบว่าข้าวมอลท์ทั้งสองสายพันธุ์มีกิจกรรมเอนไซม์ limit-dextrinase and α -glucosidase สูงกว่าในข้าวเปลือก (ตารางที่ 4.7) ซึ่งจากการรายงานผลการทดลองในข้าวบาร์เลย์ ระบุว่าป็นกิจกรรมของเอนไซม์ α -glucosidase ที่อยู่ในรูป free form, latent form และ bound form (Lewis and Young, 1995) จากผลการตรวจสอบค่า malting losses ที่ได้จากการควบคุมความชื้นในเมล็ดข้าวออกโดยการแช่น้ำสลับกับการสะเด็ดน้ำ (20 % malting losses หลังการเพาะ 6 วัน) พบว่า มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับการควบคุมความชื้นด้วยระยะเวลาการแช่น้ำแบบต่อเนื่อง (12 % malting losses หลังการเพาะ 8 วัน) ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากการที่รากและยอดของข้าวถูกชะลอการเจริญในระหว่างแช่น้ำ และปริมาณ malting losses คังกล่าวยังอยู่ในเกณฑ์เดียวกันกับบาร์เลย์ ดังนั้นสถานะการผลิตมอลท์ด้วยวิธีการควบคุมความชื้นโดยการแช่น้ำสลับกับการสะเด็ดน้ำจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการผลิตข้าวมอลท์



(B)

รูปที่ 4.5 แสดงผลของการทำ numerical optimization ที่ระบุสภาวะที่เหมาะสมซึ่งให้ค่า desirability สูงสุด คือ สภาวะการเพาะข้าวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์ความชื้นจากการแช่น้ำที่ 44% และเพาะข้าวให้งอกเป็นเวลา 8 วัน

Design-Expert® Software

CWE

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

9.81865

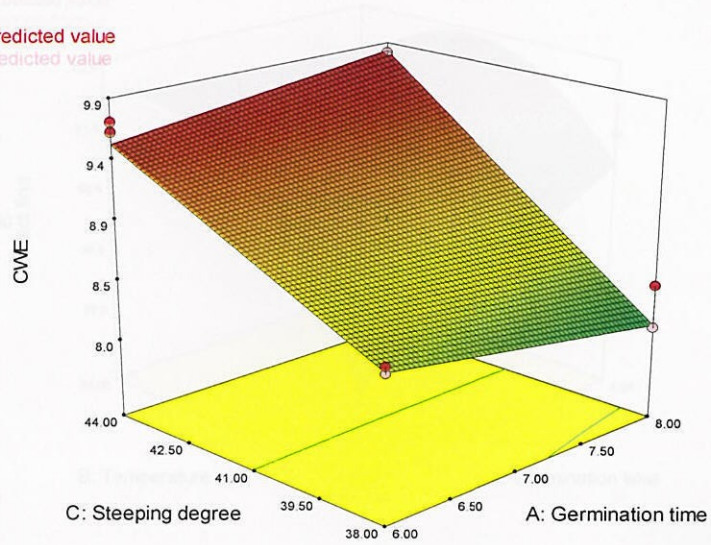
5.02591

X1 = A: Germination time

X2 = C: Steeping degree

Actual Factor

B: Temperature = 30.00



(A)

Design-Expert® Software

CWE

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

9.81865

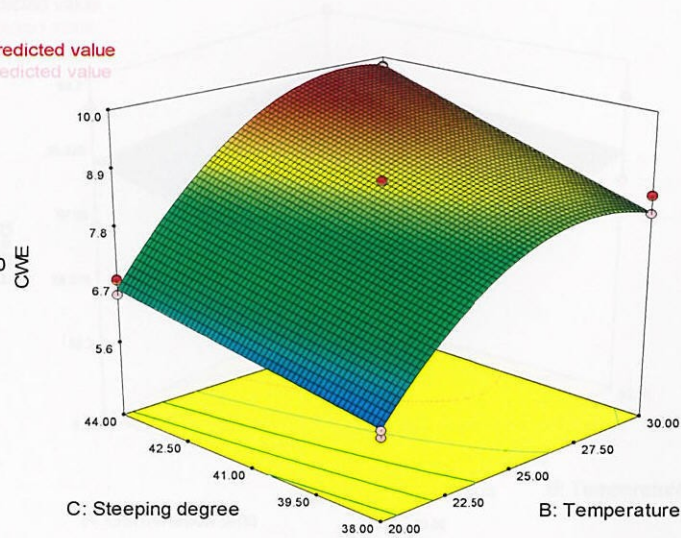
5.02591

X1 = B: Temperature

X2 = C: Steeping degree

Actual Factor

A: Germination time = 8.00



(B)

รูปที่ 4.6 แสดงภาพการตอบสนองแบบพื้นผิวของ CWE ที่ได้จากมอลต์ข้าวเจ้าดำ (A) ซึ่งเป็นผลของ interaction term ของ ระยะเวลาการเพาะกับปริมาณความชื้นที่มีต่อข้าวที่เพาะที่ 30°C และมอลต์ข้าวเหนียวดำ (B) ซึ่งเป็นผลจาก interaction term ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความชื้นจากการแช่น้ำและอุณหภูมิที่มีต่อ CWE ที่วัดจากตัวอย่างที่เพาะเป็นเวลา 8 วัน

Design-Expert® Software

Extract fine

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

62.8

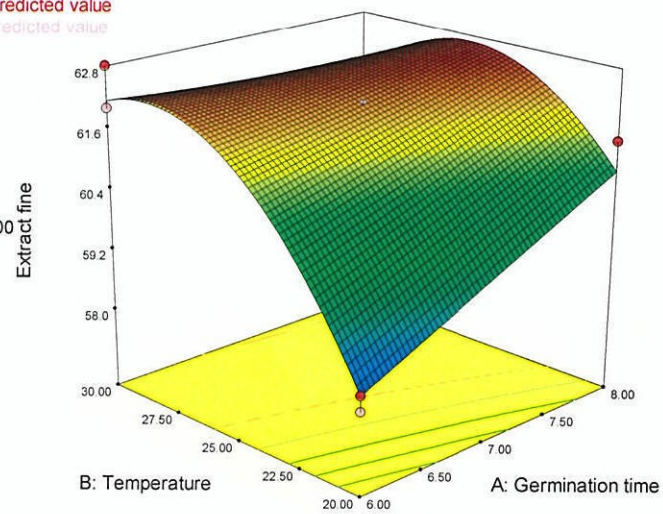
57.6

X1 = A: Germination time

X2 = B: Temperature

Actual Factor

C: Steeping degree = 44.00



(A)

Design-Expert® Software

Extract

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

61.4

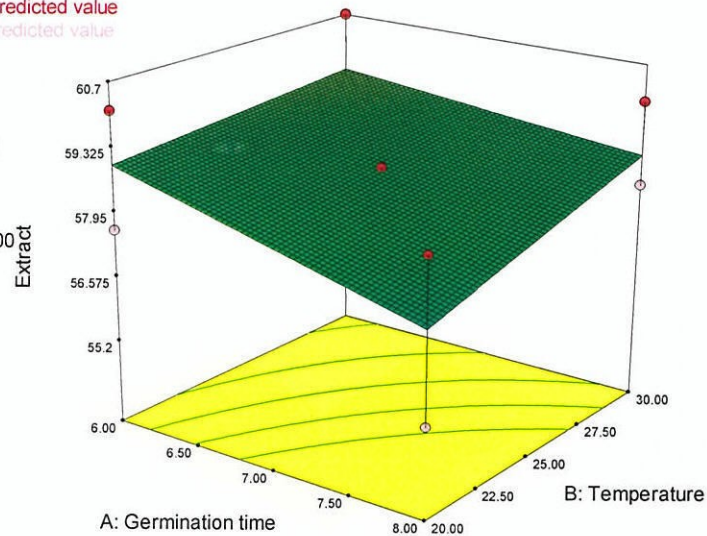
55.3

X1 = A: Germination time

X2 = B: Temperature

Actual Factor

C: Steeping degree = 44.00



(B)

รูปที่ 4.7 แสดงภาพการตอบสนองแบบพื้นผิวของ extract content ที่ได้จากมอลต์ข้าวเจ้าดำ ซึ่งเป็นผลของ interaction term ระหว่างระยะเวลาการเพาะกับอุณหภูมิ ที่มีผลต่อ extract content มอลต์ที่เพาะภายใต้ปริมาณความชื้น 44% (A), และมอลต์ข้าวเหนียวดำ (B) ซึ่งเป็นผลจาก interaction term ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความชื้นจากการแช่น้ำและอุณหภูมิที่มีต่อ CWE ที่วัดจากตัวอย่างที่เพาะเป็นเวลา 8 วัน

Design-Expert® Software

Kolbach index

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

21.7

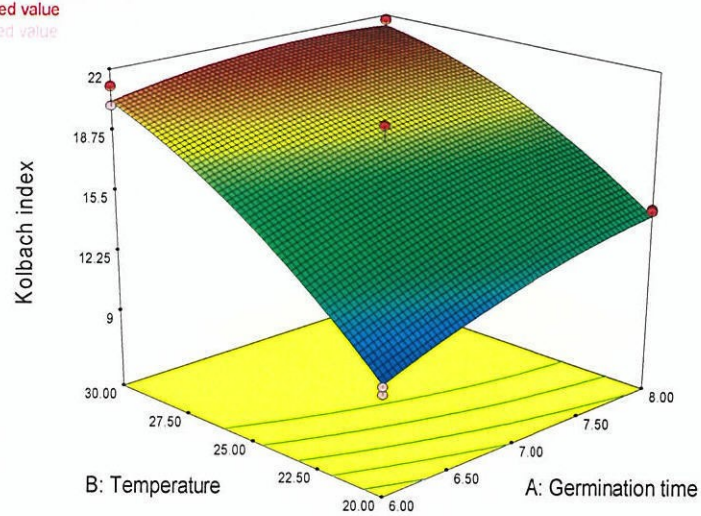
9.5

X1 = A: Germination time

X2 = B: Temperature

Actual Factor

C: Steeping degree = 44.00



(A)

Design-Expert® Software

FAN

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

124.22

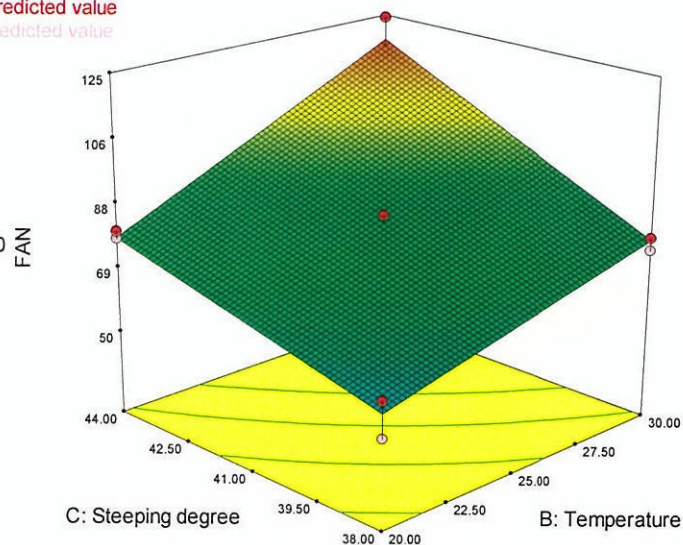
32.29

X1 = B: Temperature

X2 = C: Steeping degree

Actual Factor

A: Germination time = 8.00



(B)

รูปที่ 4.8 แสดงภาพการตอบสนองแบบพื้นผิวของ Kolbach index ที่ได้จากมอลท์ข้าวเจ้าดำ ซึ่งเป็นผลของ interaction term ระหว่างระยะเวลาการเพาะกับอุณหภูมิ ที่มีผลต่อ Kolbach index จากมอลท์ที่เพาะภายใต้ปริมาณความชื้น 44% (A), และ FAN (B) ซึ่งเป็นผลจาก interaction term ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความชื้นจากการแช่น้ำและอุณหภูมิที่มีต่อ FAN ที่วัดจากตัวอย่างที่เพาะเป็นเวลา 8 วัน

Design-Expert® Software

Kolbach index

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

24.7

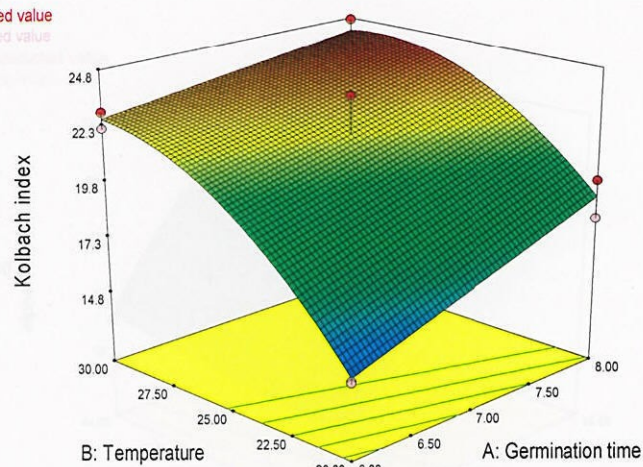
13.5

X1 = A: Germination time

X2 = B: Temperature

Actual Factor

C: Steeping degree = 44.00



(A)

Design-Expert® Software

FAN

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

100.17

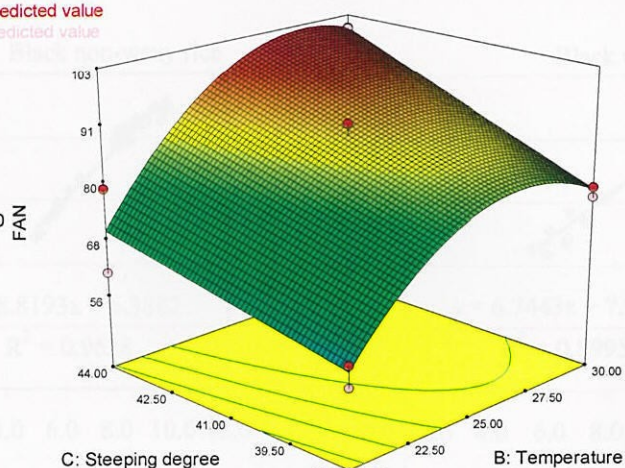
43.72

X1 = B: Temperature

X2 = C: Steeping degree

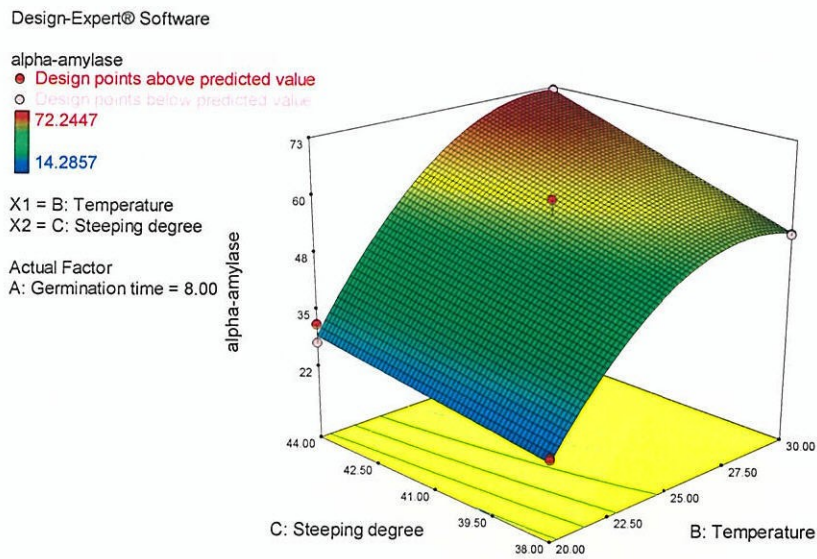
Actual Factor

A: Germination time = 8.00

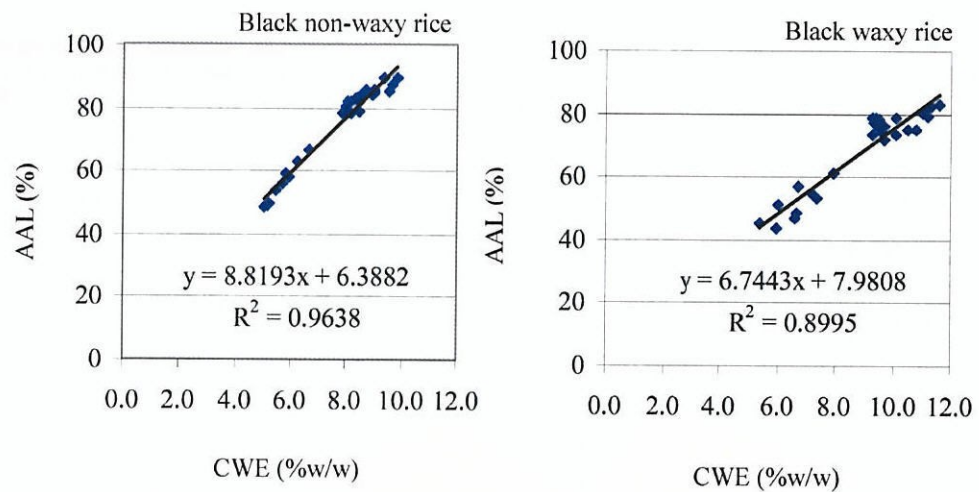


(B)

รูปที่ 4.9 แสดงภาพการตอบสนองแบบพื้นผิวของ Kolbach index ที่ได้จากมอลท์ข้าวเหนียวดำ ซึ่งเป็นผลของ interaction term ระหว่างระยะเวลาการเพาะกับอุณหภูมิ ที่มีผลต่อ Kolbach index จากมอลท์ที่เพาะภายใต้ปริมาณความชื้น 44% (A), และ FAN (B) ซึ่งเป็นผลจาก interaction term ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความชื้นจากการแช่น้ำและอุณหภูมิที่มีต่อ FAN ที่วัดจากตัวอย่างที่เพาะเป็นเวลา 8 วัน



(A)



(B)

รูปที่ 4.10 แสดงภาพการตอบสนองแบบพื้นผิวของ AAL ที่ได้จากมอลต์ข้าวเจ้าดำ ซึ่งเป็นผลของ interaction term ระหว่างปริมาณความชื้นจากการแช่น้ำกับอุณหภูมิ ที่มีผลต่อ Kolbach index จากมอลต์ที่เพาะเป็นเวลา 8 วัน (A), และ (B) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า CWE กับ AAL จากมอลต์ข้าวเจ้าดำ (ซ้าย) และมอลต์ข้าวเหนียวดำ (ขวา)

Design-Expert® Software

alpha-amylase

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

72.2447

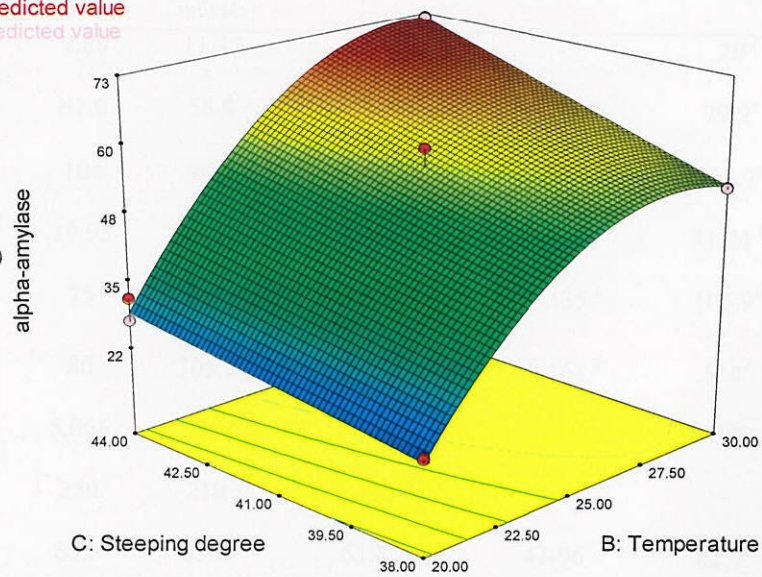
14.2857

X1 = B: Temperature

X2 = C: Steeping degree

Actual Factor

A: Germination time = 8.00



Design-Expert® Software

alpha-amylase

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

78.535

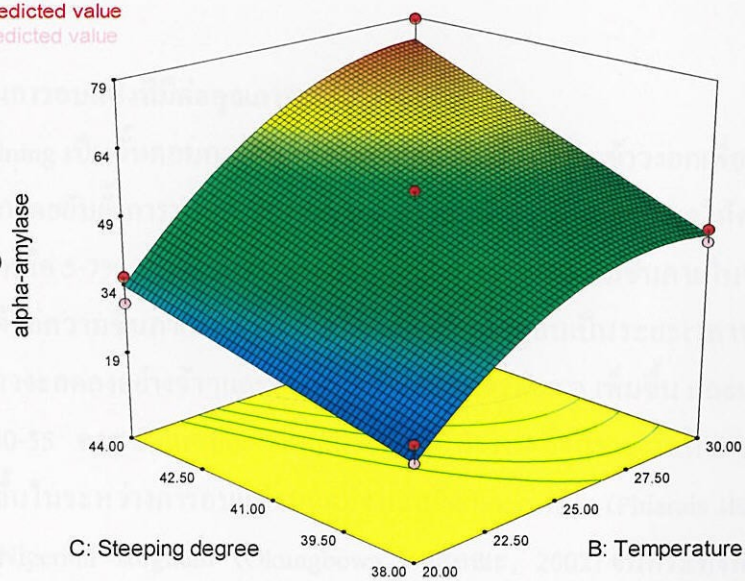
15.3389

X1 = B: Temperature

X2 = C: Steeping degree

Actual Factor

A: Germination time = 8.00



ภาพที่ 4.11 แสดงภาพการตอบสนองแบบพื้นผิวของ α -amylase activity ในมอลต์ข้าวเจ้าดำ (A) และมอลต์ข้าวเหนียวดำ(B) ที่ผ่านการเพาะวันซึ่งเป็นผลของ interaction term ระหว่างปริมาณความชื้นจากการแช่น้ำกับอุณหภูมิ

ตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบคุณภาพมอลท์ข้าวเจ้าค้ำและข้าวเหนียวค้ำกับมอลท์ที่ผลิตจากธัญพืชต่าง ๆ

Parameters	มอลท์ข้าวเจ้าค้ำ	มอลท์ข้าวเหนียวค้ำ	buckwheat	sorghum ^d	Barley
CWE %(w/w)	9.88	11.37	-	-	20
Extract %(w/w)	62.0	58.8	69.2 ^c	65-83.7	79.9 ^a
FAN (mg/100g)	104	99.9	107 ^c	100	106.7 ^a
Kolbach index (%)	19.95	22.95	23.91 ^b	15.3-41	31.24 ^b
α -amylase (U/g)	75	83.7	19.9 ^c	39-135 ^c	105.9 ^a
β -amylase (U/g)	80	105.3	24.7 ^c	80-168 ^c	514 ^a
Limit-dextrinase (U/kg)	5,066	5,212	-	-	~500
α -glucosidase (U/kg)	250	210	-	-	-
AAL (%)	85.5	85.5	61.8 ^c	43-96	82.7 ^a
Malting losses (%)	12.61	12.43	-	-	12-14

^a Wijngaard and Ulmer, (2005), ^b Wijngaard, et al, 2005, ^c Phiarais et al., (2005), ^d Briggs, 1998, p731, ^e Agu and Palmer, (1998).

4.5 ผลของช่วงอุณหภูมิในการอบแห้งที่มีต่อคุณภาพของข้าวมอลท์

การอบแห้ง หรือ kilning เป็นขั้นตอนการอบแห้ง และลดความชื้นภายในข้าวงอกเพื่อเป็นการยับยั้งการเจริญของข้าวงอกโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางส่วน การทำแห้งส่งผลให้ความชื้นภายในเมล็ดข้าวมอลท์ลดลงเหลือ 5-7% จากความชื้นของข้าวงอกที่ 40% โดยความชื้นภายในข้าวคั่ว ๆ ลดจนกระทั่งลมร้อนได้ไล่ความชื้นภายในข้าวแล้วเป่าออกไปนอกคู่อบเป็นระยะเวลาหนึ่ง ซึ่งในช่วงนี้ความชื้นภายในข้าวจะลดลงอย่างช้าๆและอุณหภูมิข้าวมอลท์จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น และเอนไซม์ที่ทำงานในช่วงอุณหภูมิ 40-55 องศาเซลเซียส จะถูกกระตุ้นให้ทำงาน ซึ่งมีรายงานกิจกรรมของ soluble β -amylase ที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการอบแห้งมอลท์จากเมล็ด buckwheat (Phiarais และคณะ, 2005) และในมอลท์จาก Nigerian sorghum (Okungbowa และคณะ, 2002) จนกระทั่งความชื้นสัมพัทธ์ภายในคู่อบลดลง ทำให้อัตราการทำแห้งสูงขึ้น และค่าความต่างของอุณหภูมิที่เข้าและออกจากคู่อบจะค่อยๆลดลงตามระยะเวลาจนกระทั่งความชื้นของมอลท์คงที่ที่ประมาณ 5%

ในขณะที่เอนไซม์บางชนิดถูกกระตุ้นนั้น มีเอนไซม์บางชนิดที่จัดเป็น heat sensitive enzyme ถูกทำลายให้เสียสภาพได้ Uvere และคณะ (2000) พบว่าเอนไซม์ α -amylase ในข้าวฟ่างลดลง 18-25% และ β -amylase ลดลง 4-90% ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ การอบแห้งแบบค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิจาก 55 องศาเซลเซียส เป็น 65 องศาเซลเซียส ให้ผลปริมาณน้ำตาลที่สกัดได้สูงกว่าในการอบแห้งที่อุณหภูมิ

65 องศาเซลเซียส โดยตรงอุณหภูมิเดียว ซึ่งเป็นผลมาจากการอบที่อุณหภูมิสูงทันที และเป็นเวลานานส่งผลให้เอนไซม์เสียสภาพมากกว่าการค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิ ผลการทดลองพบว่า ช่วงอุณหภูมิการอบไม่มีผลต่อการทำงานของ α -amylase, β -amylase และ limit dextrinase ในข้าวมอลที่ข้าวเจ้าดำ แต่กลับส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ในมอลที่ข้าวเหนียวดำ และส่งผลให้ค่า AAL ที่ได้มีความแตกต่างกัน และอุณหภูมิยังส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์กลุ่ม proteinase โดยอุณหภูมิสูงให้ผลปริมาณ soluble nitrogen ต่ำสุด รองลงมาคือ ช่วงอุณหภูมิปานกลาง และอุณหภูมิต่ำ ตามลำดับ ในขณะที่คุณภาพด้านอื่นๆ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นเพื่อเป็นการรักษากิจกรรมของเอนไซม์ในข้าวซึ่งมีไม่สูงนักเมื่อเทียบกับบาร์เลย์ ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการอบแห้งจึงเลือกที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.8 คุณภาพมอลที่ข้าวเหนียวดำและมอลที่ข้าวเจ้าดำที่ผ่านการทำแห้งในช่วงอุณหภูมิต่าง ๆ

คุณภาพมอลที่	มอลที่ข้าวเจ้าดำ			มอลที่ข้าวเหนียวดำ		
	อุณหภูมิ ต่ำ	อุณหภูมิ ปานกลาง	อุณหภูมิ สูง	อุณหภูมิ ต่ำ	อุณหภูมิ ปานกลาง	อุณหภูมิ สูง
Moisture (%)	7.2 c	5.1 a	5.45 b	6.8 c	4.75 a	5.2 b
Extract % (w/w)	62.9 ab	62.8 b	62.9 a	57.8 a	58.95 a	57.5 a
Protein (%)	8.9 a	9.05 a	9.05 a	7.8 a	7.4 a	7.35 a
Soluble N (gN/100g)	0.319 c	0.307 b	0.288 a	0.316 c	0.297 b	0.295 a
FAN(mg/100g)	87.7 b	85.1 a	86.25 a	96.6 a	91.8 a	91.15 a
Kolbach Index	22.4 b	21.25 a	19.8 a	26.3 c	24.95 b	25 a
AAL (%)	85 a	85.55 a	84.6 b	81 a	81.5 a	83 a
pH	6.0 a b	6.02 a	6.01 b	5.98 a	5.98 a	6.00 a
α -amylase (U/g)	46 a	45 a	49 a	57 b	51 a	57 b
β -amylase (U/g)	37 a	34 a	41 a	51 a	53 a	50 a
Limit-dextrinase (U/kg)	4,835 a	4,873 a	4,595 a	4,608 b	4,619 b	4,221 a
α -glucosidase (U/kg)	257 a	255 a	240 a	187 a	186 a	165 a

ค่าเฉลี่ยจากการผลิตมอลทั้งสองกลุ่มตัวอย่าง

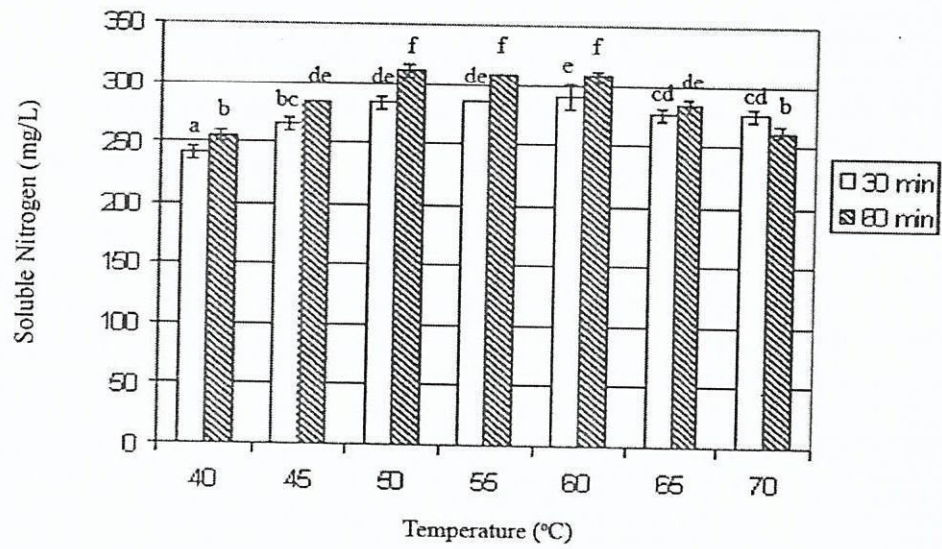
4.6 การศึกษาการเพิ่มปริมาณ extract content และ soluble nitrogen ใน wort ด้วยกระบวนการ mashing

4.6.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ soluble nitrogen และ FAN ใน wort

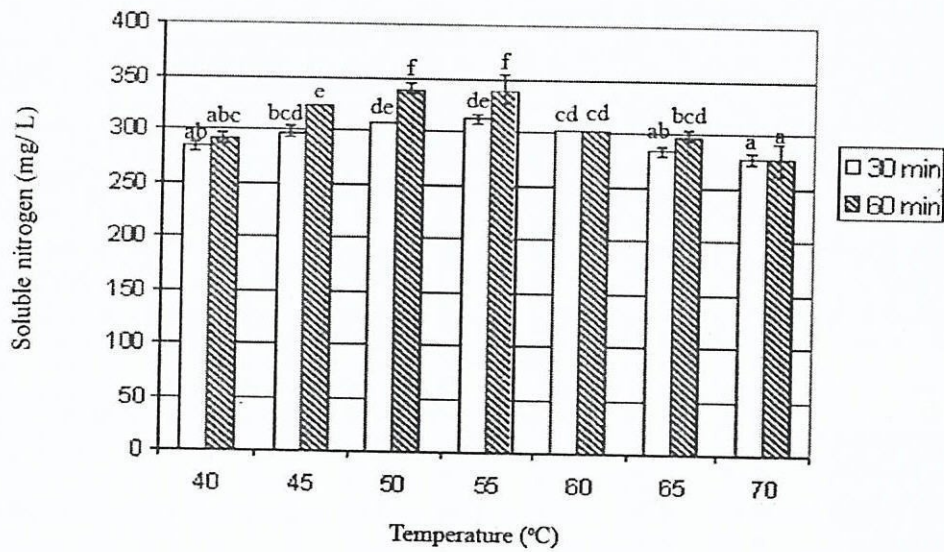
ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ soluble nitrogen และ FAN พบว่า ปริมาณ soluble nitrogen และ FAN ใน wort จากมอลต์ข้าวเจ้าดำสูงมากที่สุดในช่วงอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.12-4.13) แต่เมื่ออุณหภูมิสูงเกิน 60 องศาเซลเซียส ปริมาณ soluble nitrogen ใน wort ลดลง คาดว่าเกิดจากเอนไซม์ proteinase เสื่อมสภาพ (denatured) สำหรับมอลต์ข้าวเหนียวดำ พบว่า ปริมาณ soluble nitrogen และ FAN สูงสุดที่อุณหภูมิ 45-60 องศาเซลเซียส ซึ่งจัดอยู่ในช่วงอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับข้าวเจ้าดำ ซึ่งมีการรายงานอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ proteinase อยู่ในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส ที่ pH 4.6-5 (Kühbeck และคณะ, 2005; Wijngaard และ Arendt, 2006) ในขณะที่เอนไซม์ peptidase มีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 45-50 องศาเซลเซียส ที่ pH ต่ำกว่า 5.3 (Noonan, 1996) นอกจากนี้ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์กลุ่ม proteinase สามารถทนความร้อนในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 60 นาที

4.6.2 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ extract content และผลต่อชนิดของปริมาณน้ำตาลกลูโคสและมอลโทสใน wort

ในการย่อยแป้งให้ได้น้ำตาลนั้น เรียกว่า saccharification เป็นช่วงที่ amylolytic enzyme ทำงานเพื่อย่อยโมเลกุลแป้ง หรือ dextrin ให้อยู่ในรูปของน้ำตาล และสาย dextrin สั้น ๆ ในขณะที่กระบวนการทำให้โมเลกุลของแป้งทั้งหมดอยู่ในรูปของสารละลาย เรียกว่า liquefaction ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ amylase และมักเกิดที่อุณหภูมิสูงกว่า saccharification ผลการทดลองพบว่าปริมาณ extract content เพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิการ mashing สำหรับ มอลต์ข้าวเจ้าดำ ปริมาณ extract content สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (61.05%w/w) และ 75 องศาเซลเซียส (61.49%w/w) สำหรับ มอลต์ข้าวเหนียวดำ อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 70-78 องศาเซลเซียส ให้ผลปริมาณ extract content ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p > 0.5$ (รูปที่ 4.14) รวมถึงเวลาในการ mashing 30 นาที และ 60 นาที ให้ผลของปริมาณ extract ที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การ liquefaction คือ 70 องศาเซลเซียส, 30 นาที สำหรับมอลต์บาร์เลย์พบว่า อุณหภูมิช่วงที่เหมาะสมแก่การเกิด saccharification และ liquefaction คือช่วงอุณหภูมิ 65-71 องศาเซลเซียส (Noonan, 1996) จากความหมายของ extract content ซึ่งประมาณ 80% ของปริมาณ extract หมายถึง น้ำตาล และส่วนที่เหลือคือ soluble nitrogen, dextrin, vitamin และ mineral เป็นต้น จึงนำ wort ที่ได้จากการ mash เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิต่างๆมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคสและมอลโทสดังแสดงในรูปที่ 4.15

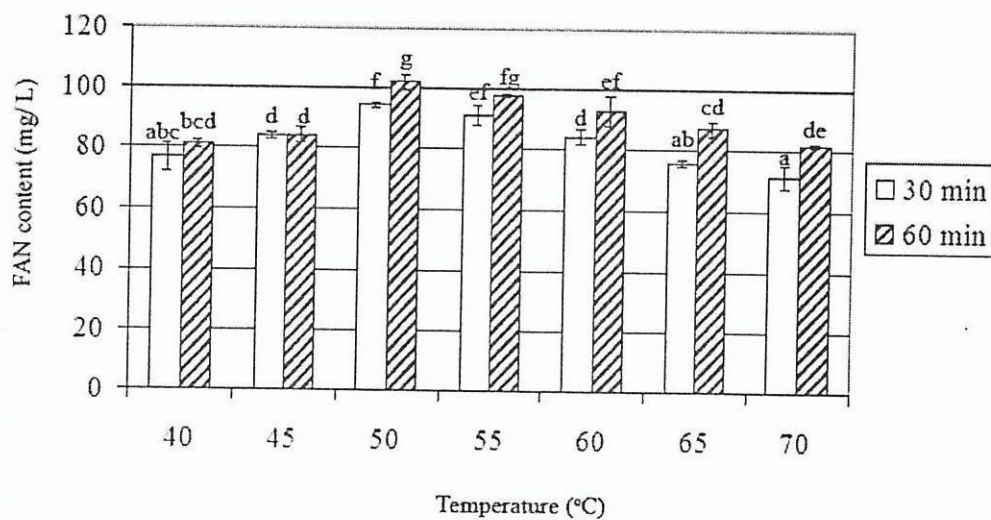


(A)

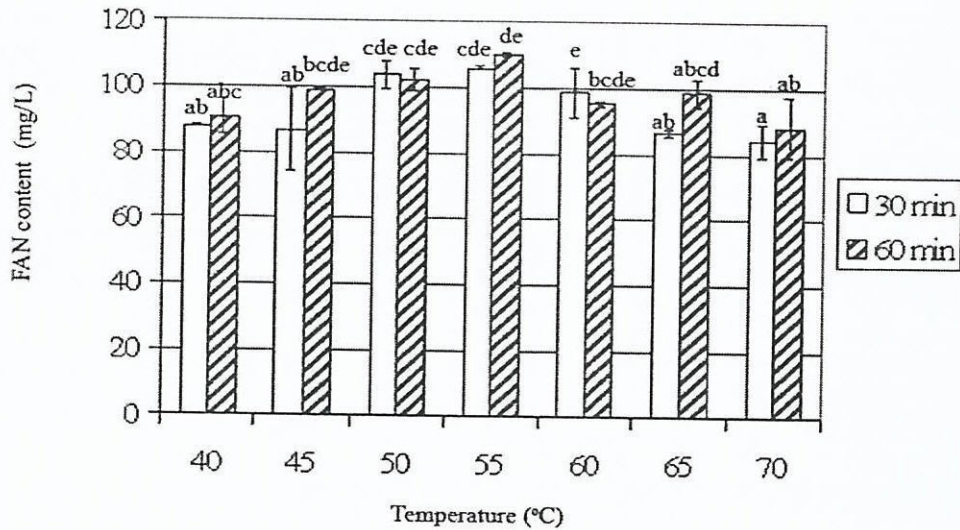


(B)

รูปที่ 4.12 กราฟแสดงการเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิและเวลาในการ mash ที่มีต่อปริมาณ soluble nitrogen ใน wort ที่ได้จากการ mash มอลท์ข้าวเจ้าดำ (A) และมอลท์ข้าวเหนียวดำ (B)

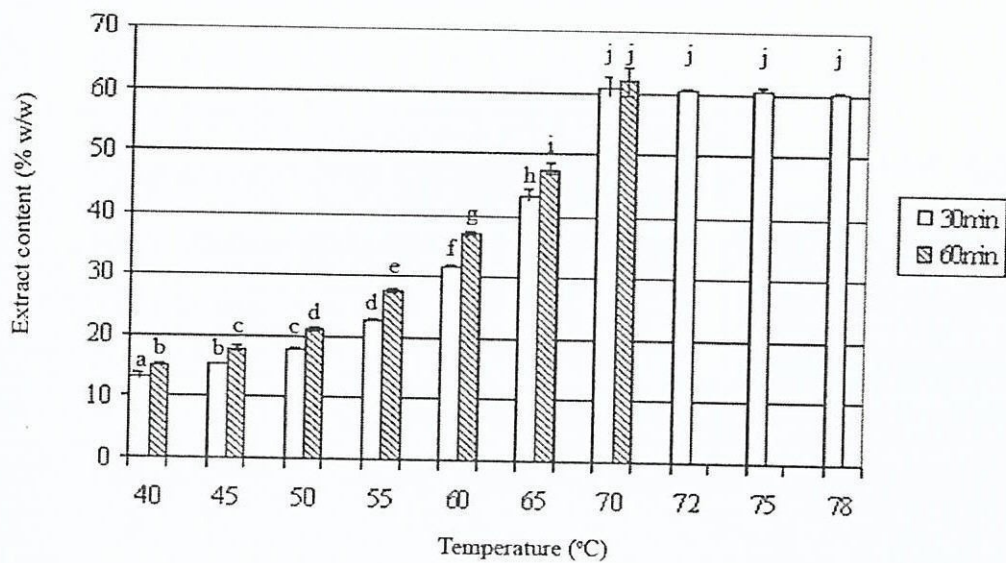


(A)

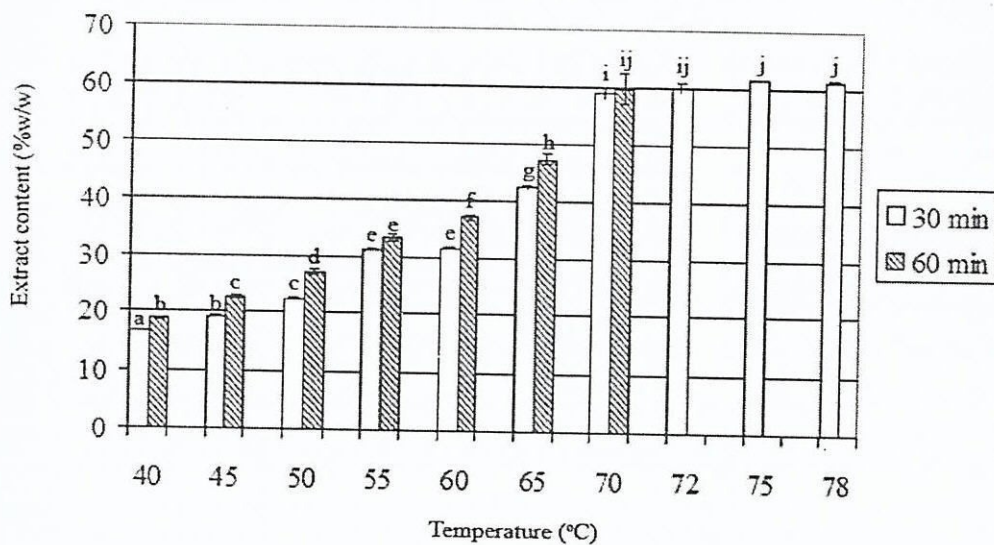


(B)

รูปที่ 4.13 กราฟแท่งแสดงผลของอุณหภูมิและเวลาในการ mash ที่มีต่อปริมาณ FAN ใน wort ที่ได้จากมอลท์ข้าวเจ้าดำ (A) มอลท์ข้าวเหนียวดำ (B)

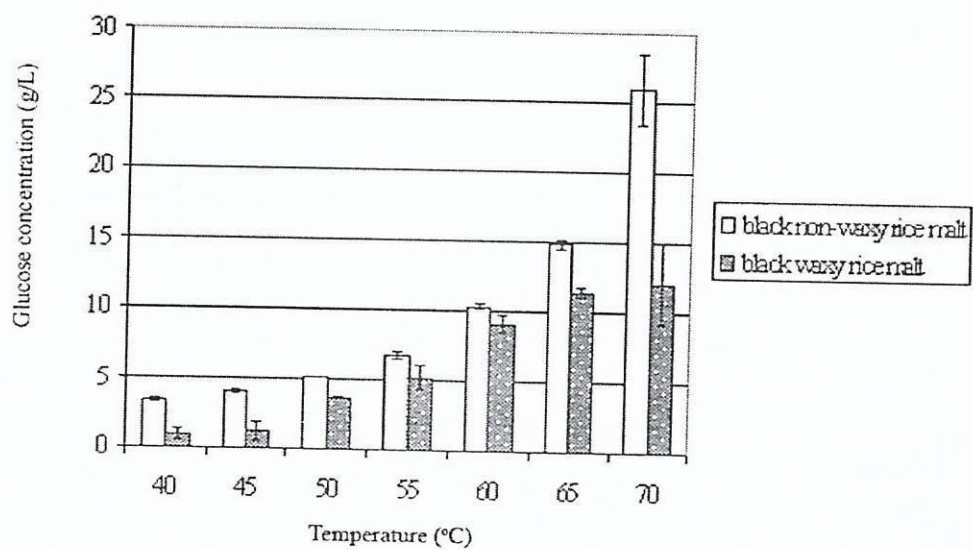


(A)

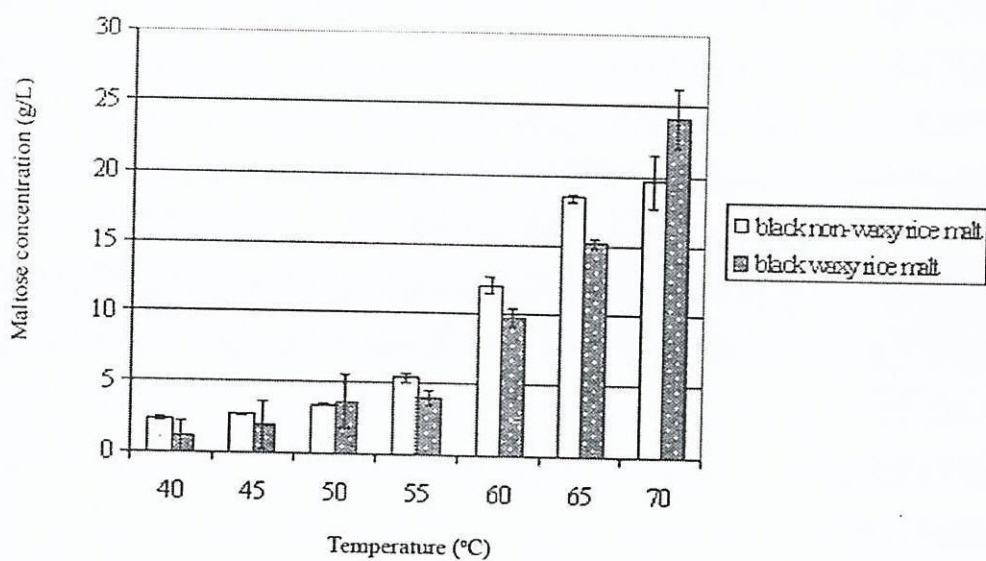


(B)

รูปที่ 4.14 กราฟแท่งแสดงผลของอุณหภูมิและเวลาในการ mash ต่อปริมาณ extract content ใน wort ที่ได้จากมอลท์ข้าวเจ้าดำ (A) และมอลท์ข้าวเหนียวดำ (B)



(A)



(B)

รูปที่ 4.15 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคส (A) และมอลโทส (B) ใน wort ที่ได้จากการ mash ที่อุณหภูมิ 40-70 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองพบว่า wort จากมอลท์ข้าวเจ้าทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงกว่าปริมาณมอลโทสในทุก ๆ อุณหภูมิการ mash และน้ำตาลกลูโคสสูงสุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (25.98 กรัมต่อลิตร) ในขณะที่ wort จากมอลท์ข้าวเหนียวทำให้ปริมาณน้ำตาลมอลโทสสูงสุด 24.08 กรัมต่อลิตร ที่ 70 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยการรวมค่าปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมอลโทส พบว่า ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณน้ำตาลสูงสุดและสัมพันธ์กับอุณหภูมิของการเพิ่ม extract content

จากผลการทดลองดังกล่าว คาดว่าเป็นผลมาจากการที่มอลท์ข้าวเจ้ามีปริมาณเอนไซม์ α -glucosidase อยู่สูงกว่ามอลท์ข้าวเหนียวค่า ดังตารางที่ 4.8 ซึ่งมีรายงานว่าเอนไซม์ α -glucosidase ในข้าวสามารถย่อยโมเลกุลของแป้งได้ที่ปลายด้านที่เป็น non-reducing end ผลที่ได้จากการย่อยคือ น้ำตาลกลูโคสกับโมเลกุลของแป้งที่เล็กลงหรือสาย dextrin (Iwata และคณะ, 2003) และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase คือ 40-55 องศาเซลเซียส ซึ่งในมอลท์บาร์เลย์ และใน Pearl millet พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส, Triticale อยู่ที่ 54-56 องศาเซลเซียส และ Finger millet อยู่ที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ช่วงอุณหภูมิดังกล่าวยังเป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ Limit dextrinase ซึ่งจะย่อยเฉพาะตำแหน่ง 1,6- α -D glycosidic linkage ใน α -และ β -limit dextrin เท่านั้น สำหรับเอนไซม์ β -amylase ซึ่งพบในมอลท์ข้าวเหนียวค่าสูงกว่ามอลท์ข้าวเจ้าค่า และในมอลท์บาร์เลย์พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 60-65 องศาเซลเซียสแต่ในกรณีของมอลท์ข้าวเหนียวค่า ปริมาณน้ำตาลมอลโทสสูงสุดพบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจหมายถึงเอนไซม์ β -amylase ในมอลท์ข้าวเหนียวค่าทนความร้อนได้ถึง 70 องศาเซลเซียส

4.6.3 ทดสอบผลของโปรแกรม mashing แบบต่างๆ ต่อคุณภาพ wort

โปรแกรม mashing ข้าวมอลท์ทั้ง 4 แบบ ได้ถูกทดสอบกับข้าวมอลท์ทั้งสองชนิด โดยโปรแกรมที่ 1 นั้นออกแบบโดยอิงผลการทดลองที่ 4.4.4 ส่วนโปรแกรมที่ 2 ออกแบบให้เป็นโดยดัดแปลงจากวิธีแบบ decoction ซึ่ง mash มอลท์ส่วนที่ 1 ถูกต้มให้แป้งเปลี่ยนเป็นเจลก่อนนำมาผสมกับ mash ส่วนที่ 2 ส่วนโปรแกรมที่ 3 และ 4 เป็นการเพิ่มความถี่ของช่วงอุณหภูมิของการ mashing จากโปรแกรมที่ 1 โดยโปรแกรมที่ 3 จะกระจายอุณหภูมิช่วง 50-60 องศาเซลเซียส อันเนื่องมาจากผลการทดสอบคุณภาพมอลท์ พบว่าข้าวมอลท์มีกิจกรรมของเอนไซม์ limit dextrinase อยู่สูงมาก ซึ่งเอนไซม์มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 55 องศาเซลเซียส และ โปรแกรมที่ 4 เน้นไปที่การทำงานของเอนไซม์ β -amylase ที่พบว่ามีความถี่สูงในช่วงอุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ผลของคุณภาพ wort ที่ได้ แสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 แสดงผลของ mashing program ต่างๆต่อคุณภาพของ wort

Rice malt varieties	Mashing program	Extract content (%w/w)	Soluble nitrogen (mg/100gmalt)	FAN (mg/100g malt)	Fermentability (%)	pH
Black	1	61.56 ^{ab}	355 ^b	109 ^b	86.3 ^c	6.01 ^{ab}
Normal	2	60.50 ^a	320 ^a	89 ^a	78.6 ^a	6.03 ^b
Rice	3	63.48 ^b	355 ^b	109 ^b	84.1 ^b	6.01 ^{ab}
	4	62.98 ^{ab}	349 ^b	101 ^b	85.2 ^c	6.0 ^a
Black waxy rice	1	53.37 ^a	327 ^a	112 ^c	79.1 ^c	5.95 ^a
	2	58.65 ^b	310 ^b	91 ^a	72.5 ^b	6.02 ^a
	3	63.68 ^c	336 ^c	113 ^c	70.2 ^a	6.0 ^{ab}
	4	63.53 ^c	329 ^b	103 ^b	71.6 ^b	5.93 ^a

จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณ extract content ที่ได้ต่อน้ำหนักแห้งของมอลต์ข้าวเจ้าดำมีปริมาณใกล้เคียงกัน แต่ mashing program 3 ให้ปริมาณ extract content สูงสุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก mashing program 2 ที่เป็นการดัดแปลงจากวิธี decoction mashing เนื่องจากมอลต์ครึ่งหนึ่งได้ผ่านการต้มก่อนจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากส่วนที่ 2 ซึ่งมี activity ของ proteinase และ amylase ที่ยังไม่ถูกทำลายจนหมด ซึ่งวิธีนี้พบว่าสามารถให้ extract ที่สูงใกล้เคียงกับ mashing program 1 และ 2 แต่ให้ปริมาณ soluble nitrogen และ FAN ต่อน้ำหนักข้าวมอลต์ดำที่สุด ซึ่งเป็นผลมาเกิดจากการที่โปรตีนของมอลต์ในส่วนที่ต้มแล้วสูญเสียสภาพ ทำให้เอนไซม์ในส่วนที่ 2 ไม่สามารถทำงานได้ หรืออีกเหตุผลหนึ่งก็คือ กิจกรรมของเอนไซม์ในข้าวมอลต์ส่วนที่ 2 มีไม่มากเมื่อเทียบกับการ mashing แบบ temperature program ที่ข้าวมอลต์ทั้งหมดรวมอยู่ในบีกเกอร์เดียวกันและถูก mash พร้อม ๆ กัน ส่วนมอลต์ข้าวเหนียวดำให้ผลคล้ายกันกับมอลต์ข้าวเจ้าดำ mashing program 3 และ 4 ให้ผลของ extract content ที่สูงพอ ๆ กัน เนื่องจากมีการใช้อุณหภูมิที่สูงกว่า 70 องศาเซลเซียส ซึ่งทำให้โมเลกุลของแป้งในข้าวเหนียวดำที่มี gelatinization temperature สูงกว่า 70 องศาเซลเซียส มีปริมาณ extract content สูงขึ้นมากถึง 10% เมื่อเทียบกับ mashing program 1 ที่ใช้อุณหภูมิสูงสุดคือ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และเมื่อเปรียบเทียบผลของ fermentability ของ wort จาก mashing program 3 (71.6%) และ mashing program 4 (70.2%) พบว่า extract จาก 45.48 กรัม (63.53x0.716) และ 44.70 กรัม (63.68x0.702) ของ extract ถูกใช้ในการ fermentation ซึ่งบ่งบอกถึงปริมาณ fermentable sugar ที่ได้จาก program 4 สูงกว่า program 3 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ 4.4.4 ซึ่งพบว่ามอลต์ข้าวเหนียวดำให้ปริมาณน้ำตาลสูงในช่วงอุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส และ

ถึงแม้ว่าปริมาณ soluble nitrogen และ FAN ที่ได้ค่อน้ำหนักแห้งของมอลต์ของ program 3 สูงกว่า program 4 ในทางการค้าปริมาณ extract และ fermentability บ่งบอกถึง yield ของแอลกอฮอล์ที่ได้จากกระบวนการผลิต ดังนั้น mashing program 3 จึงถูกเลือกเพื่อใช้กับ มอลต์ข้าวเจ้าดำ และ mashing program 4 สำหรับมอลต์ข้าวเหนียวดำ

4.6.4 ทดสอบผลของ mashing-in pH ต่อคุณภาพ wort

pH ของ mashing-in คือ ค่า pH เริ่มต้นหลังจากที่ทำการผสมมอลต์กับน้ำที่ใช้ในการ mash ซึ่งมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ amylase และ proteinase ในการเพิ่ม yield ของ extract content และ soluble nitrogen ใน wort ดังแสดงผลในตารางที่ 4.10 โดย pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของ α -amylase คือ 5.5 (Greenwood และ MacGregor, 1965), β -amylase คือ pH 5.2 (Narziss และ Rusitka, 1977), limit dextrinase คือ pH 5.5 (Manners และ Yellowless, 1971), endopeptidase-metal คือ pH 5.5, 6.9, 8.5 และ carboxypeptidase คือ pH 4.8, 5.2 และ 5.6 (Enari และ Sopenan, 1986) จากผลการทดลองพบว่าค่า extract content เพิ่มขึ้นเมื่อลด pH ลงจนถึง pH 4.7 ค่า extract content ลดลงมาเป็น 51.6%(w/w)

ตารางที่ 4.10 ผลของ mashing-in pH ต่อคุณภาพ wort

ชนิดข้าวมอลต์	Mashing-in pH	Extract content (%w/w)	Soluble nitrogen (mg/100gmalt)	FAN (mg/100g malt)	Fermentability (%)	pH final
มอลต์ข้าวเจ้าดำ	Control (6.01)	63.5 ^b	355 ^a	109 ^a	84.1 ^a	6.01 ^c
	5.8	64.1 ^b	386 ^b	112 ^a	85.8 ^b	5.84 ^d
	5.6	64.3 ^b	440 ^c	138 ^b	88.4 ^c	5.73 ^c
	5.2	65.6 ^c	555 ^d	171 ^c	88.4 ^c	5.32 ^b
	4.7	51.6 ^a	584 ^c	321 ^d	84.2 ^a	4.78 ^a
มอลต์ข้าวเหนียวดำ	Control (5.93)	63.5 ^a	329 ^a	103 ^a	71.6 ^a	5.93 ^c
	5.74	64.5 ^a	349 ^b	109 ^a	73.1 ^b	5.79 ^d
	5.6	64.6 ^a	380 ^c	128 ^b	77.3 ^c	5.66 ^c
	5.2	65.0 ^a	419 ^d	144 ^c	80.8 ^d	5.31 ^b
	4.7	66.0 ^b	517 ^c	322 ^d	83.0 ^c	4.80 ^a

สำหรับมอลท์ข้าวเจ้าค้ำ แต่พบว่าสำหรับมอลท์ข้าวเหนียวค้ำ ค่า extract content ยังคงเพิ่มเป็น 66%(w/w) ซึ่งสอดคล้องกับผลของค่า fermentability สำหรับค่า soluble nitrogen และ FAN เพิ่มขึ้นสวนกับค่า pH ที่ลดลง โดยเฉพาะที่ค่า pH ต่ำกว่า 5 ซึ่งในการทดลองนี้คือ pH 4.7 พบว่าค่า FAN เพิ่มขึ้นสูงและมีปริมาณสูงกว่า 50% ของ total soluble nitrogen ใน wort ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาต่อผลิตภัณฑ์สุดท้ายเนื่องจากปริมาณ soluble nitrogen ที่จัดเป็น โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลปานกลางถึงใหญ่ที่มีผลต่อการเกิด foam และความเสถียร ดังนั้น pH ของ mashing-in ที่เหมาะสมต่อการ mash ข้าวมอลท์ทั้งสองสายพันธุ์ คือ pH 5.2

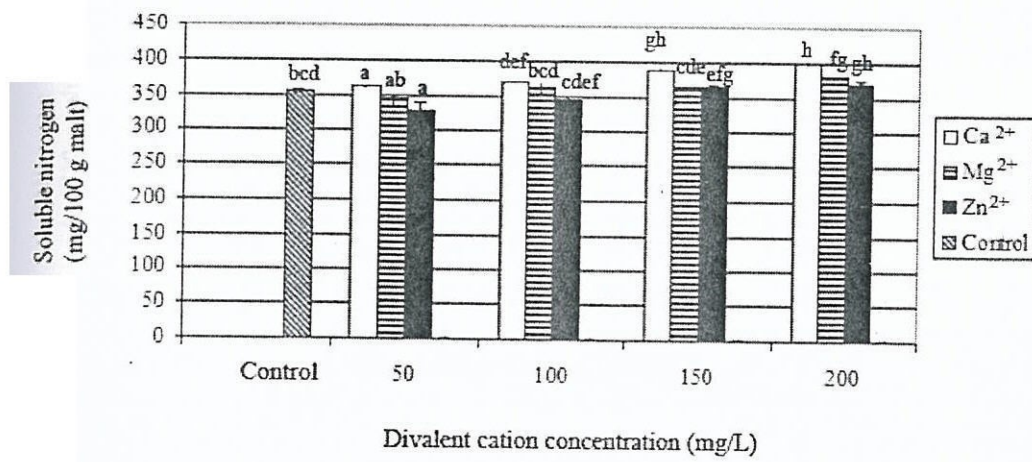
4.6.5 ผลของ divalent cations ต่อ soluble nitrogen, FAN, extract content และ

fermentability

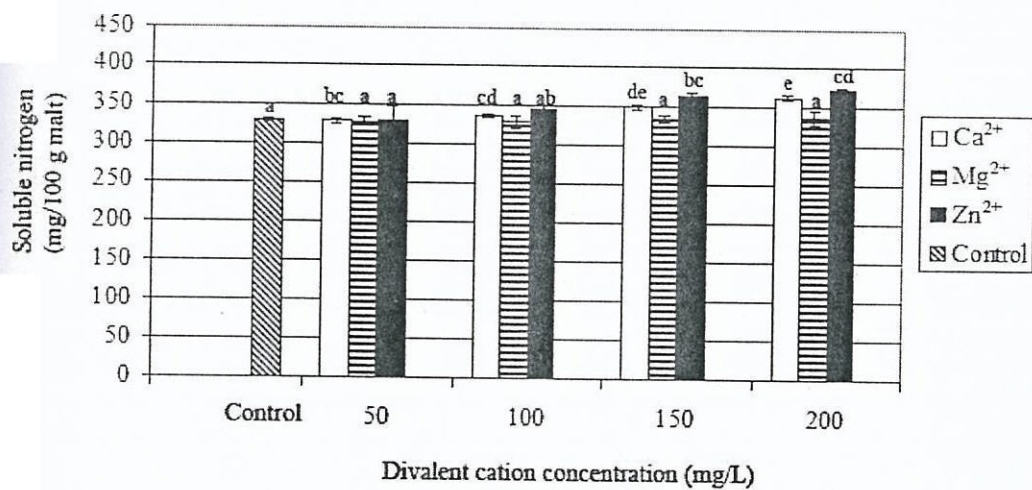
การเติม divalent cation ในน้ำที่ใช้ในการ mashing นั้นมีความสำคัญต่อค่า pH ของน้ำที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ และนอกจากนี้ divalent cation ยังมีบทบาทในการเป็น cofactor สำหรับเอนไซม์ในข้าวมอลท์อีกด้วย ได้แก่ เอนไซม์ α -amylase และ protease เป็นต้น ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า Ca^{2+} , Mg^{2+} และ Zn^{2+} มีผลต่อปริมาณ soluble nitrogen ใน wort ซึ่งเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ divalent cations ดังกล่าว และ Ca^{2+} ให้ผลการเพิ่ม soluble nitrogen ใน wort จากมอลท์ข้าวเจ้าค้ำได้ดีที่สุด และสำหรับมอลท์ข้าวเหนียวค้ำ Ca^{2+} และ Zn^{2+} สามารถเพิ่มปริมาณ soluble nitrogen ได้ดี แต่ผลการวิเคราะห์ทางสถิติระบุว่า Zn^{2+} 200 มก.ต่อลิตร ให้ผลไม่แตกต่างจาก Ca^{2+} 150 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับผลของ Mg^{2+} ต่อปริมาณ soluble nitrogen ใน wort ที่ผลิตจากมอลท์ข้าวเจ้าค้ำ พบว่า Mg^{2+} ที่ความเข้มข้น 200 มก.ต่อลิตรเท่านั้นที่สามารถเพิ่ม soluble nitrogen ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่ในมอลท์ข้าวเหนียวค้ำนั้นไม่พบว่า Mg^{2+} มีผลอย่างมีนัยสำคัญในการเพิ่ม soluble nitrogen (รูปที่ 4.16-4.17) ถึงแม้ว่าจะมีการรายงานว่า Mg^{2+} กระตุ้นการทำงานของ protease ในถั่ว

ผลของ divalent cation ต่อค่า extract content แสดงในรูปที่ 4.18 พบว่า ค่า extract content มีค่าใกล้เคียงกันมาก โดยพบว่า divalent cations ไม่ส่งผลในการเพิ่มขึ้นของ extract content ใน wort จากมอลท์ข้าวทั้งสองสายพันธุ์ แต่ส่งผลต่อค่า fermentability โดยเฉพาะ Ca^{2+} และ Zn^{2+} ให้ผลในการเพิ่มค่า fermentability ของ wort จากมอลท์ข้าวเจ้าค้ำได้สูงสุด 90% ที่ค่าความเข้มข้นของ Ca^{2+} 100-200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ wort จากมอลท์ข้าวเหนียวค้ำมีค่า fermentability สูงสุด 79% ที่ค่าความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วน Mg^{2+} ไม่ส่งผลในการเพิ่ม fermentability และ extract อย่างมีนัยสำคัญ

จากผลของ divalent cation ต่อคุณสมบัติของ wort ที่ได้จากข้าวมอลต์สองสายพันธุ์สรุปได้ว่า Ca^{2+} และ Zn^{2+} ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของ soluble nitrogen, FAN และ fermentability อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.19) โดยพบว่า Ca^{2+} และ Zn^{2+} ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลในการเพิ่ม soluble nitrogen , FAN และ fermentability ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสภาวะที่ความเข้มข้น 200 mg/L ดังนั้นจึงแนะนำให้ใช้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ส่งผลต่อการปรับปรุงคุณภาพ wort อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด คือ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และเนื่องจาก pH ที่แตกต่างกันของสารละลาย Ca^{2+} และ Zn^{2+} ที่ระดับความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่า pH 5.73 และ 6.08 ตามลำดับ อาจส่งผลต่อคุณภาพของ wort มากกว่าที่จะเป็นผลของ cation โดยตรง จึงทำการทดสอบผลของ divalent cation ทั้งสองที่ความเข้มข้นดังกล่าวอีกครั้ง โดย ปรับ pH ของ mashing-in ให้เท่ากันคือ 5.2

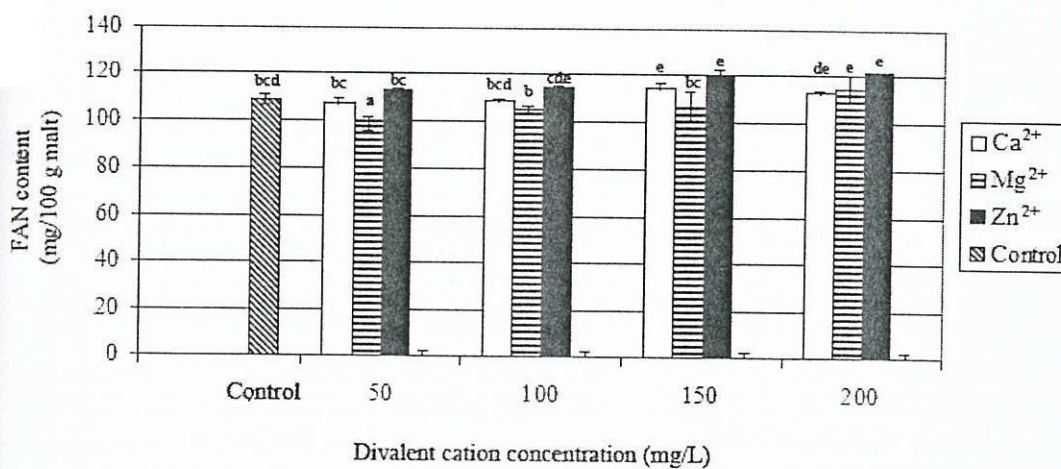


(A)

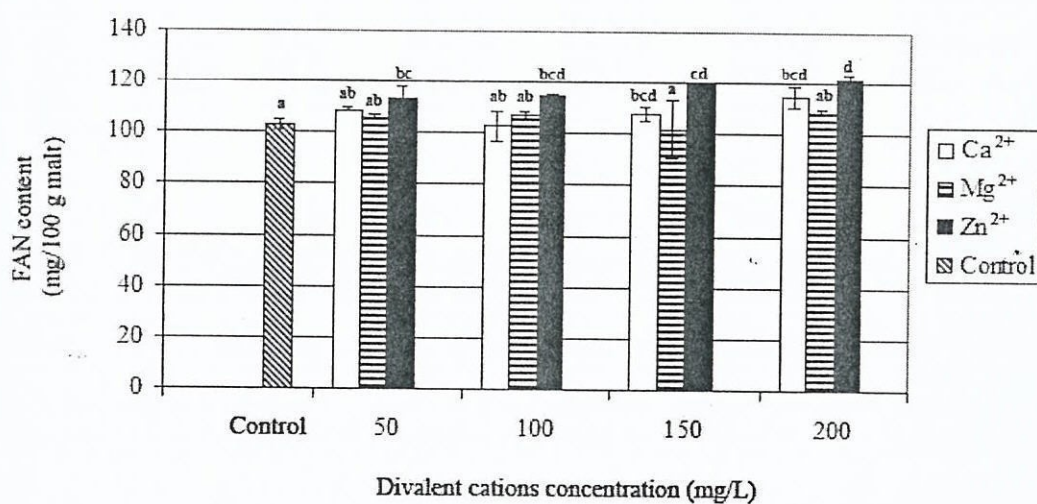


(B)

รูปที่ 4.16 ผลของ divalent cation ต่อปริมาณ Soluble nitrogen ใน wort จาก (A) มอลที่ข้าวเจ้าดำ (B) มอลที่ข้าวเหนียวดำ

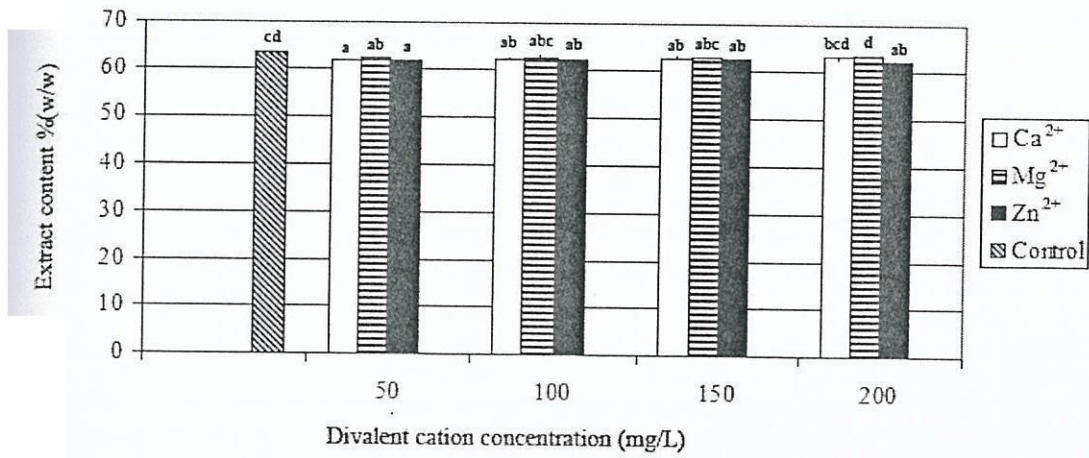


(A)

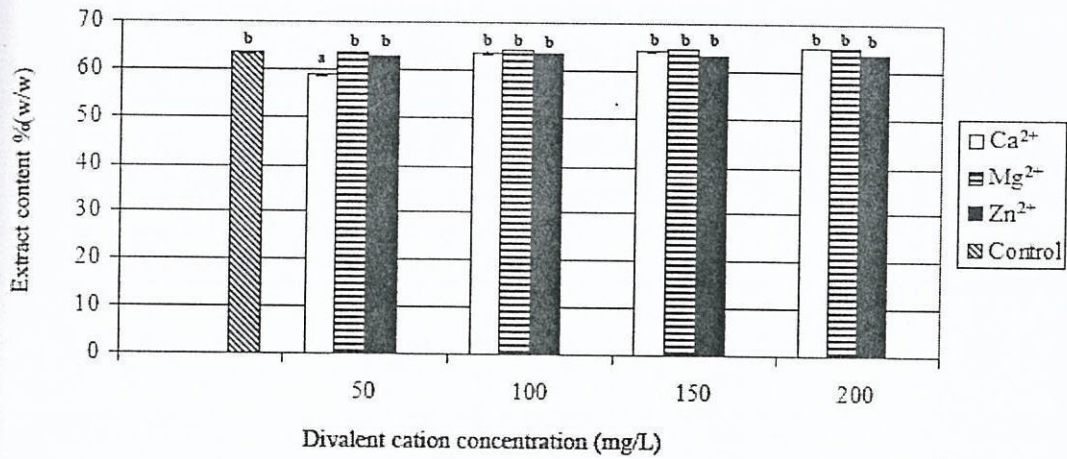


(B)

รูปที่ 4.17 ผลของ divalent cation ต่อปริมาณ FAN ใน wort จาก (A) มอลต์ข้าวเจ้าดำ (B) มอลต์ข้าวเหนียวดำ

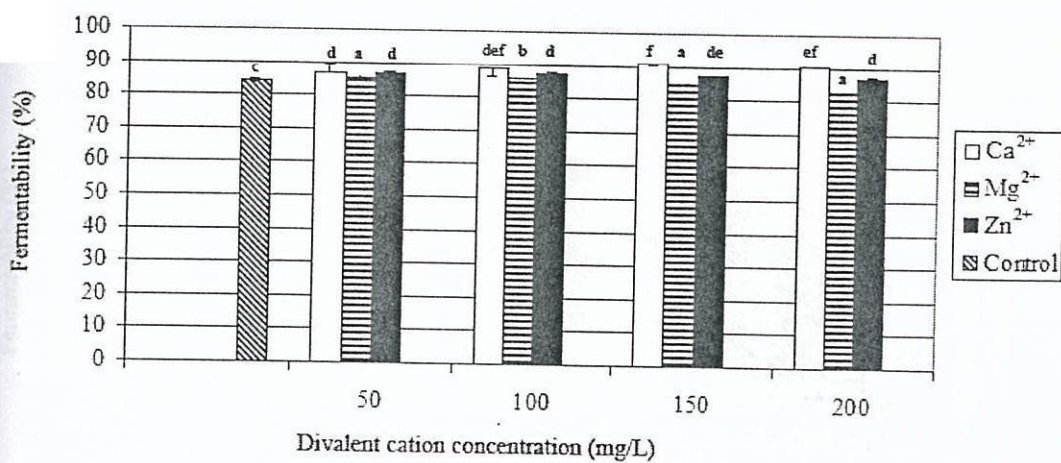


(A)

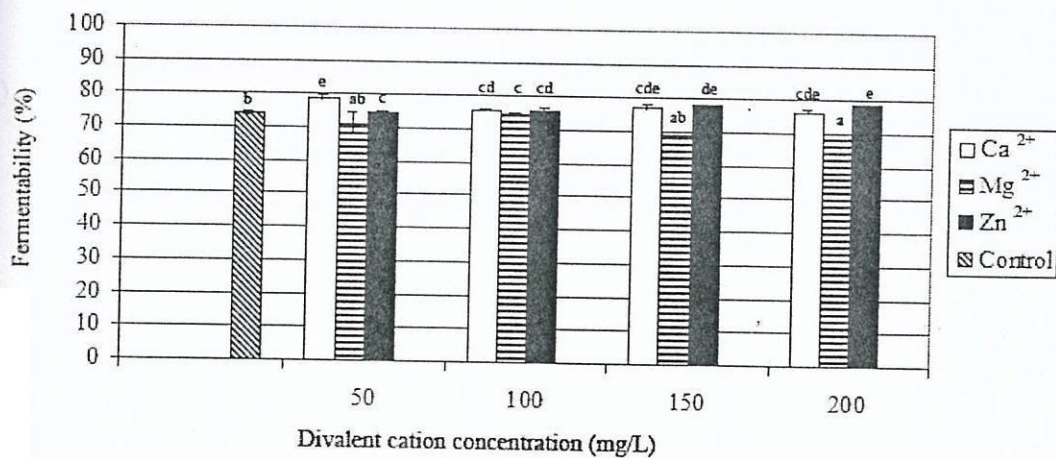


(B)

รูปที่ 4.18 ผลของ divalent cation ต่อปริมาณ Extract content ใน wort จาก (A) มอลที่ข้าวเจ้าดำ (B) มอลที่ข้าวเหนียวดำ

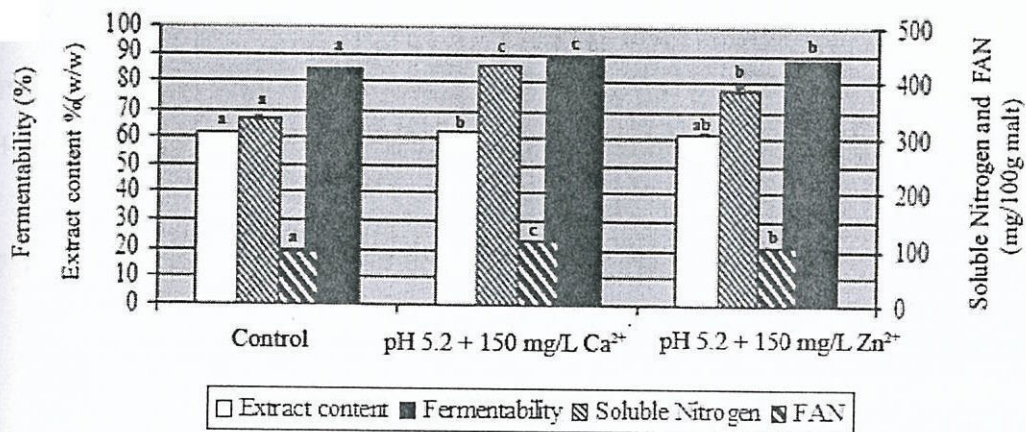


(A)

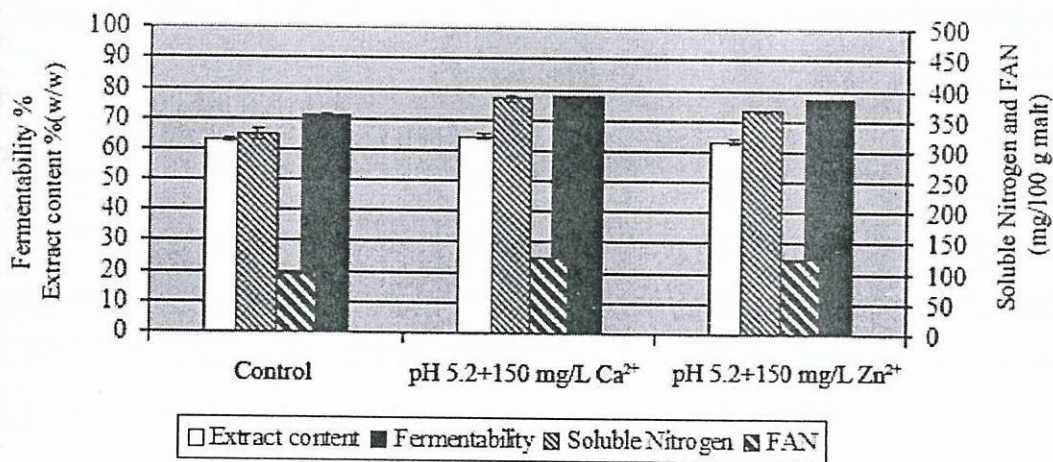


(B)

รูปที่ 4.19 ผลของ divalent cation ต่อปริมาณ Fermentability ใน wort จาก (A) มอลท์ข้าวเจ้าดำ (B) มอลท์ข้าวเหนียวดำ



(A)



(B)

รูปที่ 4.20 กราฟแสดงผลการใช้ Ca²⁺ และ Zn²⁺ ร่วมกับการปรับ pH ของ mashing-in; (A) มอลต์ข้าวเจ้าดำ (B) มอลต์ข้าวเหนียวดำ

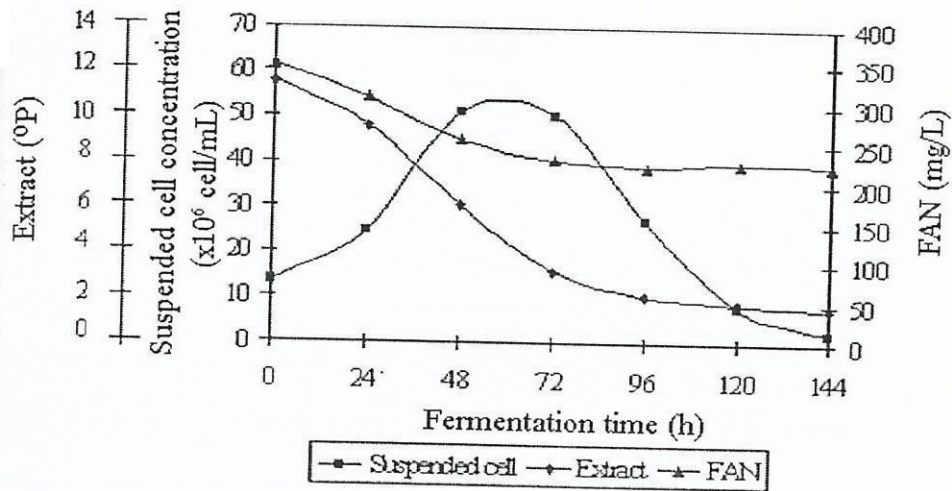
ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ Ca^{2+} และ Zn^{2+} ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ pH 5.2 (รูปที่ 4.20) พบว่า การใช้ Ca^{2+} หรือ Zn^{2+} พร้อมกับปรับ pH ให้ผลในการเพิ่ม extract content, fermentability, soluble nitrogen และ FAN ใน wort ที่ได้จากมอลท์ข้าวเจ้าค่าอย่างมีนัยสำคัญ โดย Ca^{2+} ให้ผลที่ดีกว่า Zn^{2+} แต่สำหรับ wort ที่ได้จากมอลท์ข้าวเหนียวค่าพบว่า การใช้ Ca^{2+} หรือ Zn^{2+} ร่วมกับการปรับ pH ให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.5$) ดังนั้น Ca^{2+} 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และ pH mashing-in ที่ 5.2 จึงใช้เป็นสภาวะในการผลิต wort เพื่อใช้ในการผลิตเบียร์ต่อไป

4.7 การผลิตเบียร์จากมอลท์ข้าวเจ้าค่าและมอลท์ข้าวเหนียวค่า

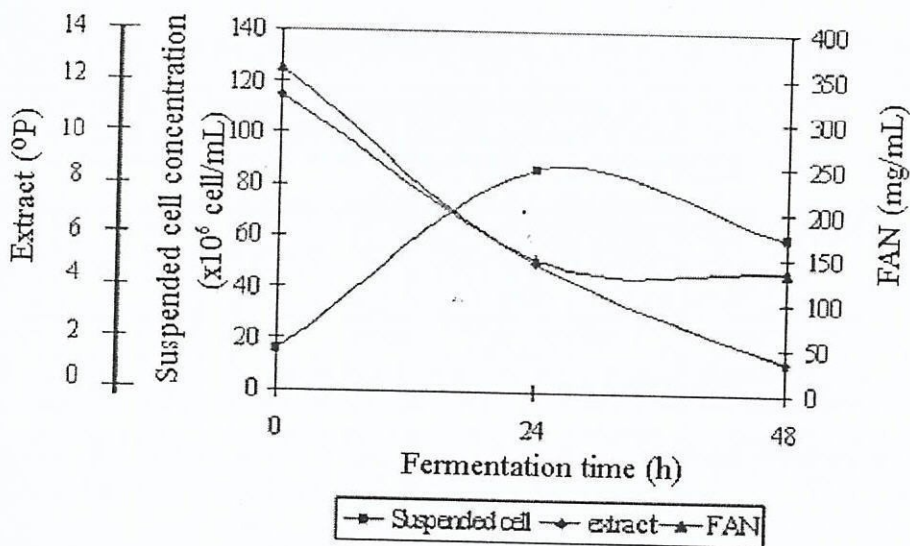
4.7.1 กระบวนการหมักเบียร์

กระบวนการหมักเบียร์แบบ top fermentation ใช้ระยะเวลาในการหมักสั้นกว่าแบบ bottom fermentation เนื่องจากการหมักที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ที่สูงกว่าแบบ bottom fermentation ซึ่งหมักที่ 10 องศาเซลเซียส จากรูปที่ 3.1 โคอะแกรมจำลองการแผนการทดลองแบบ face-centered composite design จะเห็นได้ว่าการหมักแบบ top fermentation สิ้นสุดในระยะเวลา 48 ชั่วโมงในขณะที่การหมักแบบ bottom fermentation กระบวนการหมักสิ้นสุดที่เวลา 144 ชั่วโมงสำหรับเบียร์จากมอลท์ข้าวเจ้าค่า จำนวน suspended cell concentration ในกระบวนการหมักแบบ bottom fermentation จะเพิ่มขึ้นในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการหมัก แล้วลดลงจนต่ำกว่า 15×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรเมื่อกระบวนการหมักสิ้นสุด ซึ่งเกิดจากการที่เซลล์ยีสต์ตกลงสู่ก้นถังซึ่งเป็นธรรมชาติของ bottom fermenting yeast ส่วน top fermenting yeast นั้นเซลล์ยีสต์เพิ่มสูงสุดในเวลา 24 ชั่วโมงแล้วลดลงเล็กน้อย แต่ธรรมชาติของยีสต์ชนิดนี้จะมี budding แบบต่อเนื่องเป็นสายหรือเป็นกลุ่มก้อนแล้วมักจะมีการยึดติดกันระหว่างเซลล์ยีสต์ ทำให้เกิดเป็นลักษณะกลุ่มก้อน (flock) และรอยตัวอยู่กับฟองกาซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ผิวของ wort ซึ่งการตรวจสอบปริมาณ suspended cell นี้เป็นการตรวจสอบความเป็นไปของกระบวนการหมักว่ามีความผิดปกติหรือไม่ แต่ไม่สามารถบอกได้ถึงปริมาณเซลล์ทั้งหมดได้ และผลการทดลองนี้ก็บอกได้ว่า กระบวนการหมักเกิดขึ้นอย่างเป็นปกติ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยหนึ่งที่ต้องติดตาม คือ ปริมาณ FAN เนื่องจาก FAN มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของยีสต์ และส่งผลต่อ flavor ของเบียร์ ซึ่งพบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* W34/70 ในกระบวนการหมักแบบ bottom fermentation ใช้ FAN น้อยกว่า *S. cerevisiae* W60/112 แม้ว่าจะมีระยะเวลาการหมักที่นานกว่า top fermentation ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการหมักที่อุณหภูมิที่สูงกว่าของ top fermentation ทำให้ metabolism ของยีสต์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว และต้องการกรดอะมิโนเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการสร้าง metabolic enzymes และเพื่อรักษาสภาพเซลล์ ซึ่งในกรณีเบียร์จากมอลท์ข้าวเจ้าค่านั้น top fermenting yeast ใช้ FAN 225 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 125 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับ bottom fermenting yeast

ในกรณีการผลิตเบียร์จากมอลต์ข้าวเหนียวคั้นนั้น ให้ผลที่คล้ายกับมอลต์ข้าวเจ้าคั่ว แต่ระยะเวลาการหมักของ bottom fermentation ใช้เวลา 168 ชั่วโมง และพบว่าค่า extract content ที่เหลืออยู่ที่ประมาณ 3 °P และคงที่ตลอดการทดลอง นอกจากนี้ตลอดระยะเวลาการ mature เบียร์ที่ 10 องศาเซลเซียส และ 5 องศาเซลเซียส ค่า degree Plato ไม่ลดลง ในขณะที่ปริมาณ suspended cell ในถังหมักมีปริมาณที่ปกติโดยมี maximum suspended cell concentration อยู่ที่ประมาณ 60×10^6 เซลล์ต่อมล. ทั้ง top และ bottom fermentation และจำนวนเซลล์ที่ตายตลอดการทดลองต่ำกว่า 10% ของ suspended cell ทั้งหมด ปริมาณ FAN ที่ใช้ไปของ top fermentation คือ 220 มิลลิกรัมต่อลิตร และ bottom fermentation คือ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร

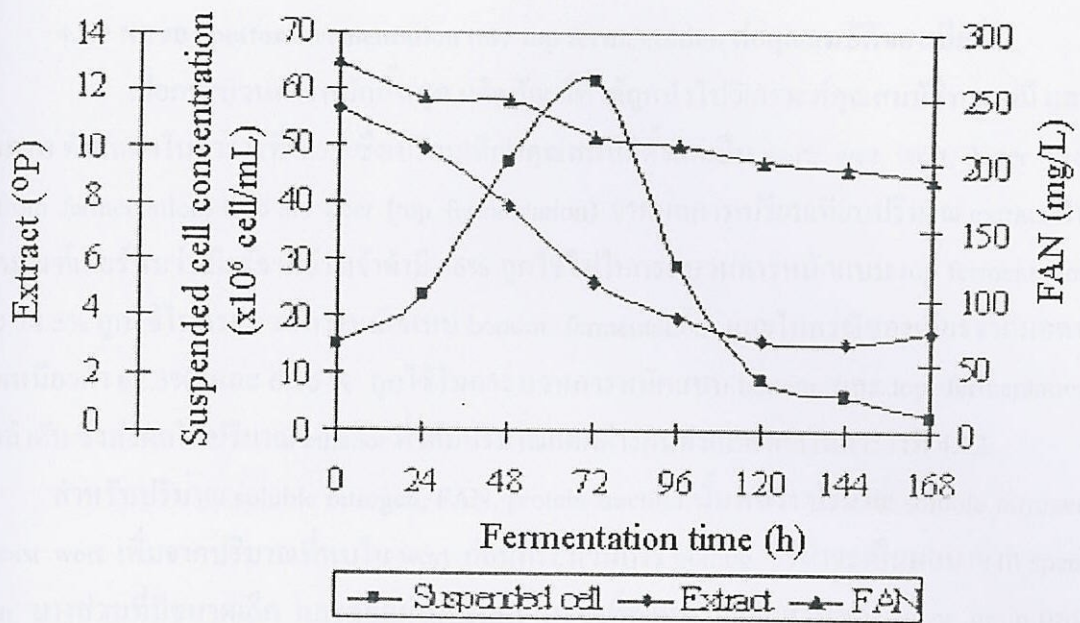


(A)

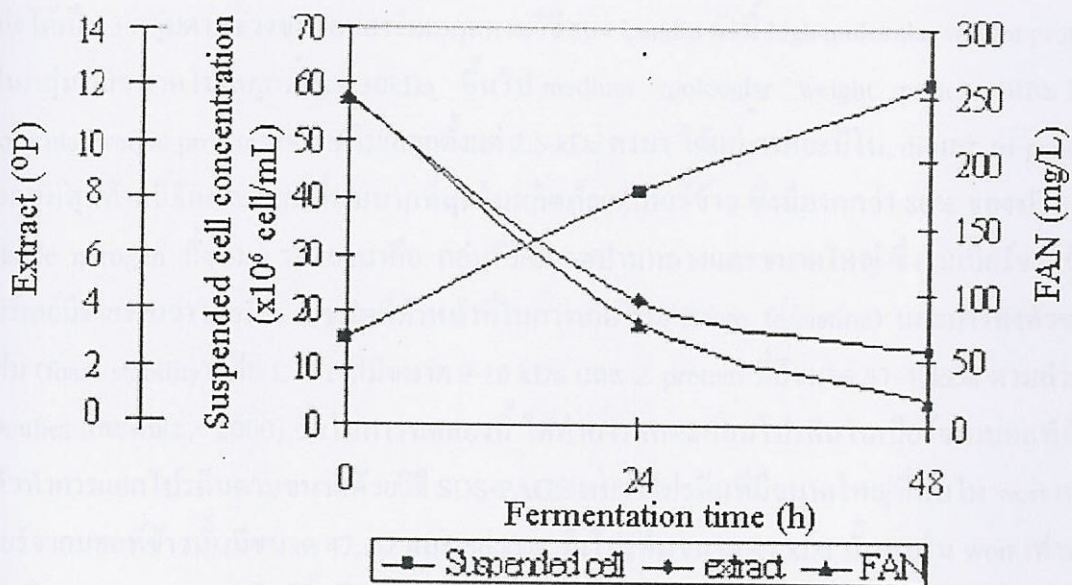


(B)

รูปที่ 4.21 แสดงปริมาณ extract (°P), suspended cell และ FAN ใน fermentation media จากมอดที่
ข้าวเจ้าดำ ภาพ (A) คือ bottom fermentation และภาพ (B) คือ top fermentation



(A)



(B)

รูปที่ 4.22 แสดงปริมาณ extract (°P), suspended cell และ FAN ใน fermentation media จากมอลต์ข้าวเหนียวดำ ภาพ (A) คือ bottom fermentation และภาพ (B) คือ top fermentation

4.7.2 ผลของ bottom fermentation และ top fermentation ต่อคุณสมบัติของเบียร์

เมื่อกระบวนการหมักสิ้นสุด ผลิตภัณฑ์ที่ได้ถูกนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี และกายภาพ ดังแสดงในตารางที่ 4.12 ซึ่งเปรียบเทียบคุณสมบัติตั้งแต่เป็น wort, cast wort, lager beer (bottom fermentation) และ ale beer (top fermentation) จากผลการเปรียบเทียบปริมาณ extract ในผลิตภัณฑ์เบียร์พบว่าเบียร์จากข้าวเจ้าคามี 86% ถูกใช้ไปในกระบวนการหมักแบบ top fermentation และ 74.5% ถูกใช้ในกระบวนการหมักแบบ bottom fermentation และในกรณีของเบียร์จากมอลท์ข้าวเหนียวคามี 62.3% และ 63.6 % ถูกใช้ในกระบวนการหมักแบบ bottom และ top fermentation ตามลำดับ ซึ่งส่งผลให้ปริมาณ ethanol ที่ได้มีปริมาณแตกต่างกันดังแสดงผลในตารางที่ 4.12

สำหรับปริมาณ soluble nitrogen, FAN, protein fraction นั้นพบว่า ปริมาณ soluble nitrogen ใน cast wort เพิ่มขึ้นจากปริมาณที่พบใน wort ก่อนกระบวนการ boiling ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจาก spent grain บางส่วนที่มีขนาดเล็ก และลอดผ่านตะแกรงกรองที่ทำหน้าที่แยกส่วนของ spent grain ออกจาก wort นั้นเอง หลังจากกระบวนการหมักสิ้นสุดลง soluble nitrogen ประมาณ 500-700 มก.ต่อลิตร ถูกใช้ไปในกระบวนการหมัก และสูญเสียไปกับการตกตะกอนและการกรอง ซึ่งในจำนวน soluble nitrogen ที่เหลือในผลิตภัณฑ์สุดท้าย ได้แก่ กรดอะมิโน เพปไทด์ และ โปรตีนที่มีขนาดใหญ่ สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มตามช่วงขนาดของโมเลกุลตามวิธีของ Lundin ดังนี้ high molecular weight protein เป็นกลุ่มที่มีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 30kDa ขึ้นไป medium molecular weight protein และ low molecular weight protein มีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 2.6 kDa ลงมา ได้แก่ กรดอะมิโน, di- และ tri-peptide ซึ่งกลุ่มสุดท้ายนี้จัดเป็นกลุ่มที่พบมากที่สุด ในผลิตภัณฑ์เบียร์ข้าว ซึ่งมีมากกว่า 80% ของปริมาณ soluble nitrogen ทั้งหมด รองลงมาคือ กลุ่มที่มีขนาดปานกลางและขนาดใหญ่ ซึ่งในเบียร์จากข้าวบาร์เลย์มีรายงานว่าโปรตีน 2 ชนิดที่ทำหน้าที่ในการเกิดโฟม (foam formation) และการคงตัวของโฟม (foam stability) คือ LTP1 ที่มีขนาด 9-10 kDa และ Z protein ที่มีขนาด 37-40kDa ตามลำดับ (Douliez และคณะ, 2000) ซึ่งในการทดลองนี้ ได้ทำการตกตะกอน โปรตีนในเบียร์จากมอลท์ข้าว แล้วทำการแยกโปรตีนตามขนาดด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ที่พบใน wort และเบียร์จากมอลท์ข้าว นั้นมีขนาด 47, 52 และ 56 kDa ซึ่งโปรตีนขนาด 47 kDa นั้นพบใน wort เท่านั้น ส่วนใน cast wort และเบียร์นั้นไม่พบโปรตีนชนิดนี้ ซึ่งอาจเป็นโปรตีนที่ไม่ทนความร้อน และเกิดการตกตะกอนหลังจากขั้นตอน wort boiling นอกจากนี้ในตัวอย่าง wort, cast wort และเบียร์ข้าวทั้งสองชนิดนั้นพบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 11 kDa บนแผ่นเจลซึ่งมีความเข้มข้นสูงสุด (รูปที่ 4.23) โปรตีน LTP1 ในข้าวที่มีการรายงานว่ามีความยาว 11.6 kDa (García-Garrido และคณะ, 1998) ซึ่งน่าจะเป็นโปรตีนสำคัญในการเกิดโฟมในเบียร์จากมอลท์ข้าว และจากผลของ foam stability ที่วัดโดยวิธี NIBEM พบว่าเบียร์ที่ผลิตจากมอลท์ข้าวเจ้าคามีค่า foam stability อยู่ในเกณฑ์ที่ดี ในขณะที่

เบียร์จากมอลท์ข้าวเหนียวค่านั้นพบว่ามีความค่า foam stability ต่ำกว่าซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ ที่พบในเบียร์นั้นมีค่าค่ามากถึง 0.2 และ 0.3% สำหรับ lager และ ale เบียร์ตามลำดับ

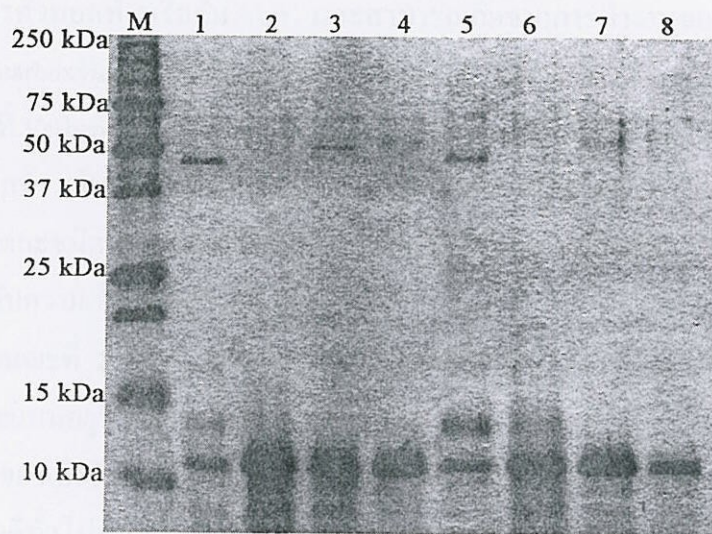
จากผลการวิเคราะห์ทางเคมี ซึ่งเป็นการวัดปริมาณ aldehyde, higher alcohol, acetate ester, และ diacetyl ซึ่งพบว่าสารในกลุ่มดังกล่าวพบว่ามีปริมาณมากใน ale beer ซึ่งเป็นผลมาจากการหมักแบบ top fermentation ซึ่งทำให้อุณหภูมิสูงกว่า อย่างไรก็ตามปริมาณดังกล่าวไม่เกินระดับมาตรฐานเบียร์ แต่ปริมาณ diacetyl ใน ale beer ที่ผลิตจากมอลท์ข้าวเจ้าค่านั้นที่มีปริมาณสูงถึง 0.88 มก.ต่อลิตร diacetyl เกิดจาก metabolism ของยีสต์ซึ่งสร้าง precursor คือ acetohydroxy acid ในระหว่างการสังเคราะห์กรดอะมิโน ปริมาณ diacetyl ขึ้นอยู่กับ pH, อุณหภูมิ และปริมาณ oxygen ที่ยีสต์นำไปใช้ (Kunze, 2004) และมีค่า flavor threshold ที่ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในกรณีที่มีการตรวจพบสูงกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เบียร์ที่ได้ควรจะมีการบ่ม (maturation) นานขึ้นเพื่อให้ยีสต์ทำงานและลด diacetyl ด้วยเอนไซม์ในระบบ metabolism ของยีสต์ ตารางที่ 4.13 แสดงชนิดของกรดอะมิโนที่ตรวจพบใน wort, cast wort, lager และ ale beer ซึ่งจำแนกตามกลุ่มของกรดอะมิโนที่จัดตามลำดับการนำไปใช้โดยยีสต์ *S. cerevisiae* กลุ่ม A จัดเป็นกรดอะมิโนที่มีการนำไปใช้ก่อนเป็นอันดับแรก กลุ่ม B เป็นลำดับต่อมาซึ่งจะถูกใช้เมื่อ A ถูกใช้จนใกล้จะหมด และสุดท้ายที่ถูกนำไปใช้คือ กลุ่ม C ส่วนกลุ่ม D เป็นกรดอะมิโนที่จะไม่ถูกใช้ในกระบวนการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน ซึ่งหมายถึง proline เพียงชนิดเดียว ในจำนวนนี้พบว่า ser หรือ serine นั้นถูกนำไปใช้จนมีปริมาณเหลือในเบียร์อยู่น้อยมาก serine เป็น กรดอะมิโนที่มีบทบาทในกระบวนการสร้าง pyrine, pyrimidine และ เป็น precursor ของ glycine และ cysteine นอกจากนี้ยังพบว่า met หรือ methyonine เป็นอีกหนึ่งกรดอะมิโนที่มีการนำไปใช้จนเกือบหมด เมื่อเปรียบเทียบกับที่พบใน wort และ cast wort ซึ่ง methyonine มีบทบาทสำคัญในการช่วยลดการเกิด visinol diketone (VDK) ได้แก่ diacetyl และ 2, 3 Pentadion ซึ่งมีรายงานว่า VDK จะถูกสร้างมากใน wort ที่มี lysine สูง (Lekkas และคณะ, 2005) และเพราะข้าวเป็นแหล่ง lysine ที่สำคัญ ในการหมักแบบ top fermentation ของมอลท์ข้าวเจ้าค่านั้นมีการใช้ lysine สูงถึง 18 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.11 คุณภาพทางเคมีและกายภาพของ wort ที่ได้จากการ mash ด้วยเครื่อง braumaister unit และคุณภาพของเบียร์ทั้งสองชนิดที่ได้จากมอลท์ข้าวเจ้าดำและมอลท์ข้าวเหนียวดำ

คุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพ	มอลท์ข้าวเจ้าดำ				มอลท์ข้าวเหนียวดำ			
	wort		เบียร์		wort		เบียร์	
	wort	Cast	Lager	Ale	wort	Cast	Lager	Ale
	wort	wort			wort	wort		
Extract (^o P)	10.3	11.5	2.93	1.58	9.4	11.5	4.33	4.19
Ethanol (%v/v)	0	0	5.0	5.17	0	0	4.46	4.36
FAN (มก.ต่อลิตร)	277	260	173	100	292	272	183	86
Protein Fraction								
Fraction A (%)	2.9	1.8	4	0.6	2.9	3.1	0.2	0.3
Fraction B (%)	18.1	16.9	16.5	19.1	18.1	13.1	18.4	17.8
Fraction C (%)	79	81.3	79.5	80.3	79	83.8	81.4	81.9
Soluble nitrogen (มก.ต่อลิตร)	1,071	1,341	847	637	736	979	464	354
Foam stability	-	-	367	340	-	-	273	165
pH	5.42	5.28	4.47	4.28	5.43	5.21	4.25	3.78
Acetaldehyde (มก.ต่อลิตร)	-	-	6.6	9.6	-	-	9.2	9.3
Ethylacetate (มก.ต่อลิตร)	-	-	27.2	55.7	-	-	24.15	39.75
i-Amylacetate (มก.ต่อลิตร)	-	-	3.3	7.3	-	-	9.1	6.05
Amylalcohol (มก.ต่อลิตร)	-	-	76.3	93	-	-	59.75	107.65
n-propanol (มก.ต่อลิตร)	-	-	14.7	35.8	-	-	8.8	31.75
i-Butanol (มก.ต่อลิตร)	-	-	17.6	58.3	-	-	16.1	63.65
Diacetyl (total) (มก.ต่อลิตร)	-	-	0.48	0.88	-	-	0.33	0.45
4-vinyl guaicol	<0.1	0.5	0.4	7.4	0.1	0.2	0.7	4.85

ตารางที่ 4.12 แสดงกรดอะมิโนที่พบในตัวอย่าง wort, cast wort และ เบียร์

กลุ่ม	กรดอะมิโน (มก./ลิตร)	มอลท์ข้าวเจ้าดำ				มอลท์ข้าวเหนียวดำ			
		Wort		Beer		Wort		Beer	
		wort	cast wort	lager	ale	wort	cast wort	lager	ale
A	Asp	14.5	12.0	7.4	1.2	15.1	12.7	10.7	3.8
A	Glu	10.7	9.9	5.7	0.9	11.3	10.6	8.3	4.7
A	Asn	29.6	23.2	3.8	1.8	30.2	22.3	5.7	0.8
A	Ser	14.9	12.3	2.0	0.7	15.4	13.1	2.6	0.4
A	Gln	6.5	7.3	3.8	3.3	7.1	13.2	4.0	3.0
A	Thr	9.0	6.0	7.4	6.8	9.4	7.9	8.7	4.6
A	Arg	20.8	18.7	14.3	8.7	16.9	18.2	18.6	5.9
A	Lys	22.3	19.2	7.8	1.2	23.4	22.3	9.8	4.2
B	His	6.7	5.9	3.7	3.5	6.4	16.4	4.4	2.5
B	Val	19.6	18.0	15.2	9.8	20.4	17.3	15.2	6.2
B	Met	6.3	6.1	0.4	0.5	6.8	6.2	2.8	0.6
B	Ile	10.2	9.8	7.8	1.7	10.6	9.0	5.8	2.1
B	Lue	25.5	23.1	13.4	3.2	26.7	22.8	10.2	2.1
C	Gly	7.0	4.4	5.4	5.2	6.7	4.9	6.8	3.5
C	Ala	22.7	18.0	10.5	7.4	23.1	22.3	18.3	8.9
C	Tyr	21.4	17.8	12.7	14.4	22.3	19.5	18.6	10.9
C	Trp	7.3	7.3	5.3	4.6	7.8	7.0	6.1	4.0
C	Phe	17.6	16.7	13.5	6.5	18.6	15.8	12.2	5.3
Total		272.4	235.7	140.2	81.3	278.4	261.3	168.7	73.6



รูปที่ 4.23 ผลการทำ SDS-PAGE ของโปรตีนในมอลท์ข้าว, wort และ เบียร์: M; molecular marker, lane 1-4 ตัวอย่างจากข้าวเจ้าดำ lane 1; wort, lane 2; cast wort, lane 3; lager beer, lane 4; ale beer, lane 5-8 ตัวอย่างจากข้าวเหนียวดำ lane 5; wort, lane 6; KND cast wort, lane 7; KND lager beer, lane 8; ale beer.

4.7.3 ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ผลการทดสอบชิมโดยผู้ประเมิน 7 คน ซึ่งทำการทดสอบชิมเบียร์ทั้ง 4 ตัวอย่าง แสดงในรูปที่ 4.24 ซึ่งเป็นการให้ระดับคะแนนความชอบจากคะแนน 0 ถึง 5 โดยจำแนกคุณสมบัติของเบียร์ออกเป็น 5 ลักษณะที่ต้องการประเมินเพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาคุณสมบัติของเบียร์ คือ

ลักษณะที่ 1 คือ aroma หมายถึง กลิ่นของเบียร์ที่สัมผัสได้โดยการดมกลิ่นเท่านั้น พบว่าคะแนนเฉลี่ยอยู่ที่ระดับ 2 ลงมา และตัวอย่างที่มีคะแนนเฉลี่ยสูงสุด คือ lager beer จากข้าวเจ้าดำ รองลงมาคือ ale beer จากข้าวเหนียวดำ, lager เบียร์ข้าวเหนียวดำ และ ale beer จากข้าวเจ้าดำ (รูปที่ 4.24) ซึ่งเมื่อนำผลไปเปรียบเทียบกับคุณสมบัติทางเคมีของเบียร์ในตารางที่ 4.12 ซึ่ง ale beer จากข้าวเจ้าดำมีปริมาณ diacetyl สูง ที่ให้กลิ่นของ butterscotch นอกจากนี้ยังพบว่ายังมีปริมาณ 4-vinyl guaicol สูงที่สุด (7.4 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นคล้ายกานพลู (clove) หรือ กลิ่นของ phenolics หรือ เครื่องเทศ ซึ่งสารนี้ให้กลิ่นเฉพาะใน smoky beer และ wheat beer ตัวอย่างเช่น Belgian white beer, German wheizen beer, blond specialty beer, dark specialty beer ซึ่ง มีรายงานว่าพบสาร 4-vinyl guaicol ในเบียร์ดังกล่าวข้างต้นจากห้องตลาดอยู่ในช่วง 0.053-3.76 มิลลิกรัมต่อลิตร (Vanbeneden และคณะ, 2008a) ซึ่ง 4-vinyl guaicol เป็นสารที่เกิดได้จากปฏิกิริยา

decarboxylation ของ ferulic acid (4-hydroxy-3methoxycinnamic acid) ซึ่งปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นได้ด้วยความร้อนจากการคั่วมอลท์ หรือคั่ว wort และสามารถเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ ที่มีชื่อว่า phenolic acid decarboxylation (PAD) ที่พบได้ในยีสต์กลุ่ม top fermenting yeast เป็นส่วนใหญ่ จะเห็นได้ว่าปริมาณที่ Verbeneden และคณะ (2008b) รายงานในเบียร์ดังกล่าวนั้นมีปริมาณต่ำกว่าที่พบใน ale beer จากข้าวเจ้าคั่วและข้าวเหนียวคั่ว ซึ่ง threshold ที่ผู้ชิมสามารถระบุกลิ่นของ 4-vinyl guaiacol ในเบียร์แต่ละชนิดนั้นจะแตกต่างกันเนื่องจาก metric ของ beer หรือองค์ประกอบอื่น ๆ ของเบียร์ส่งผลต่อระดับความเข้มข้นที่ผู้ชิมตรวจพบได้

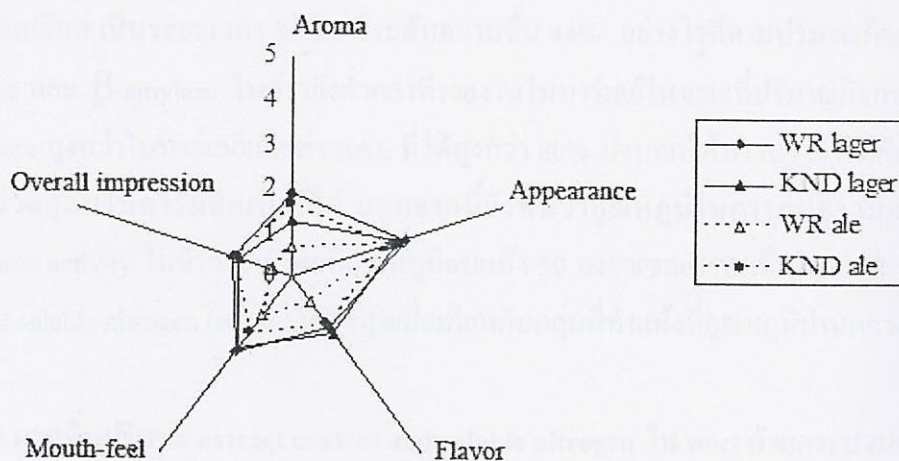
ลักษณะที่ 2 คือ appearance ได้แก่ สี ความใส และ head retention หรือปริมาณฟองที่ผิวเบียร์ มีระดับคะแนนอยู่ที่ 2.3-2.7 โดย lager beer และ ale beer จากข้าวเจ้าคั่วมีระดับคะแนนสูงสุด สองอันดับแรก สีของเบียร์จากข้าวคั่วมีสีเป็นสีน้ำตาลเข้ม ที่มีระดับสีอยู่ที่ 12-16.5 EBC unit ซึ่งเข้มกว่าสีของเบียร์ปกติทั่วไปที่มีสีอัมพันจะมีค่าประมาณ 6.5 EBC ปริมาณฟองที่ผิวของเบียร์ข้าวถูกประเมินโดยการแกว่งแก้วโดยผู้ชิมแล้วสังเกตปริมาณฟองที่เกิด และการคงตัวของฟอง ซึ่งในที่นี้ก็ถูกประเมินโดยรวมเป็นคะแนน appearance และเมื่อเทียบกับผลคะแนน appearance กับการทดสอบ foam stability พบว่าสอดคล้องกัน โดย lager และ ale beer จากมอลท์ข้าวเจ้าคั่วมีค่า foam stability ที่ดีกว่าเบียร์จากมอลท์ข้าวเหนียวคั่ว แต่อย่างไรก็ตาม คะแนนที่ผู้ชิมให้นั่นถือว่าทุกตัวอย่างมีคะแนน appearance ใกล้เคียงกัน แม้ว่าค่า foam stability ที่วัดได้จากตัวอย่างเบียร์จากมอลท์ข้าวสองชนิดจะต่างกันมาก นั่นหมายความว่า ไม่เพียงแต่ปริมาณฟองเท่านั้นที่มีผลต่อคะแนนแต่ลักษณะของฟองที่ปรากฏก็อาจมีผลต่อความชอบ ซึ่งเบียร์จากข้าวคั่วมีฟองที่มีขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับฟองในเบียร์จากข้าวบาร์เลย์ที่มีขนาดเล็กละเอียดกว่า

ลักษณะที่ 3 คือ flavor ซึ่งมีระดับคะแนนเฉลี่ยอยู่ที่ 0.7-1.6 หมายความว่าผู้ชิมส่วนใหญ่มีความเห็นว่าเป็นไม่ชอบ flavor ของเบียร์จากมอลท์ข้าวคั่วทั้งสองชนิด โดย ale beer จากมอลท์ข้าวเจ้าคั่วมีระดับคะแนนต่ำสุด และ ale beer จากข้าวเหนียวคั่วได้คะแนนต่ำรองลงมา ซึ่งคาดว่าอาจมาจากกลิ่นของ 4-vinyl guaiacol ซึ่งพบว่าปริมาณสูงในตัวอย่างดังกล่าว

ลักษณะที่ 4 คือ mouth-feel มีระดับคะแนนเฉลี่ยอยู่ที่ 1.1-2.1 และตัวอย่างเบียร์ที่ได้รับคะแนนเฉลี่ยสูงสุด คือ lager beer จากมอลท์ข้าวเจ้าคั่ว (คะแนนเฉลี่ย 2.1) รองลงมาคือ lager beer จากมอลท์ข้าวเหนียวคั่ว (คะแนนเฉลี่ย 2.0) ซึ่ง mouth-feel หมายถึง body, astringency, carbonation และสัมผัสอื่นที่ผู้ชิมสัมผัสได้จากกลิ่นและกระพุ้งแก้ม ระดับคะแนนนี้ถือได้ว่าผู้ชิมส่วนใหญ่ให้คะแนนอยู่ในระดับปกติหรือเลข ๆ ต่อ lager beer และไม่ชอบสำหรับ ale beer

ลักษณะที่ 5 คือ overall impression ซึ่งเป็นคะแนนโดยรวมเพื่อประเมินความประทับใจที่มีต่อตัวอย่างเบียร์ พบว่าระดับคะแนนเฉลี่ยอยู่ที่ 1.4, 1.3, 1.2 และ 0.5 สำหรับ lager beer จากมอลท์ข้าวเจ้าคั่ว, ale beer จากมอลท์ข้าวเหนียวคั่ว, lager beer จากมอลท์ข้าวเหนียวคั่ว, และ

สุดท้ายคือ ale beer จากมอลท์ข้าวเจ้าดำ ดังนั้นคะแนนความประทับใจโดยรวมที่มีต่อเบียร์จากมอลท์ข้าวเจ้าดำและข้าวเหนียวดำคือ ค่อนข้างดีและอาจจะขอแก้วที่ 2 ส่วนเบียร์ที่ได้รับการประเมินว่าดื่มไม่ได้คือ ale beer จากมอลท์ข้าวเจ้าดำ ซึ่งน่าจะมาจากคะแนนความชอบเฉลี่ยของลักษณะ flavor และ aroma มีค่าต่ำที่สุด ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า การควบคุมคุณภาพของเบียร์ต้องเริ่มตั้งแต่การเตรียมวัตถุดิบ ซึ่งในขั้นตอนนี้ไม่ได้มีการศึกษาถึงสารกลุ่ม phenolic compound ที่เป็นสารตั้งต้นในการเกิด phenolic decarboxylation และ 4-vinyl guaiacol มาตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมมอลท์ แต่อย่างไรก็ตามในขั้นตอนของการเตรียม wort พบว่ามีสารดังกล่าวเกิดขึ้น และพบมากใน wort ที่มาจากมอลท์ข้าวเจ้าดำที่มีการให้ความร้อนในช่วงอุณหภูมิ 45-57 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาสั้นซึ่งมีการทดสอบพบว่า การให้ความร้อนในช่วง mashing มีผลต่อปริมาณ ferulic acid ที่ละลายได้และพบว่าค่าดังกล่าวสูงขึ้นตามอุณหภูมิและสูงสุดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ arabinoxylan degrading enzymes (Vanbeneden และคณะ, 2008b) และนอกจากนี้ยังเกิดขึ้นได้ในขั้นตอนของการทำเบียร์ที่ใช้ top fermenting yeast ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่มีปฏิกิริยาของเอนไซม์ PAD ดังนั้นการเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมกับวัตถุดิบจึงเป็นเรื่องที่ต้องให้ความสำคัญไม่น้อยไปกว่าการเลือกใช้กระบวนการที่เหมาะสม



รูปที่ 4.24 กราฟโอบางมุมแสดงคะแนนการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของตัวอย่างเบียร์ทั้ง 4 ตัวอย่าง

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

5.1 การผลิตมอลต์จากข้าวไทย

จากผลการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ α -amylase และ β -amylase ในระยะเวลา 6 วัน พบว่าข้าวอกสร้างเอนไซม์ alpha-amylase เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการงอก จนถึง 6 วัน ในขณะที่ β -amylase จะพบว่ามีสร้างในช่วง 1-4 วันแรกของการงอก แล้วลดลงหลังจากระยะเวลาดังกล่าว นอกจากนี้พบว่าระยะเวลาการแช่น้ำส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase และ β -amylase ข้าวมอลต์ที่แช่น้ำติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ส่งผลในการยับยั้งทั้งปริมาณเอนไซม์และกิจกรรมของเอนไซม์ β -amylase และยับยั้งการสร้างเอนไซม์ α -amylase ในช่วงที่ทำการแช่น้ำ นอกจากนี้ อุณหภูมิส่งผลต่อการงอกโดยพบว่าข้าวจะมีการสร้างเอนไซม์สูงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับอุณหภูมิ 25 และ 20 จะพบปริมาณเอนไซม์ลดลงตามลำดับ

5.2 การหาสถานะในการผลิตมอลต์ด้วยวิธีการตอบสนองบนพื้นผิว

สถานะที่เหมาะสมในการผลิตข้าวมอลต์ทั้งสองสายพันธุ์ คือ ทำการเพาะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 วัน ที่ระดับความชื้น 44% อย่างไรก็ตามปริมาณกิจกรรมของ α -amylase และ β -amylase ในข้าวยังต่ำกว่าที่รายงานในบาร์เลย์ ในขณะที่ปริมาณกิจกรรมของ limit-dextrinase สูงกว่าในบาร์เลย์และค่า AAL ที่ได้สูงกว่า 80% บ่งบอกให้ทราบว่าข้าวมีศักยภาพในการใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเบียร์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าอุณหภูมิในการอบข้าวมอลต์ส่งผลต่อ proteinase activity ในข้าวอก โดยที่อุณหภูมิต่ำ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ผลปริมาณ soluble nitrogen และ FAN สูงสุดเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ทำแห้งที่อุณหภูมิปานกลางและสูง

5.3 การเพิ่มปริมาณ extract content and soluble nitrogen ใน wort ด้วยกระบวนการ mashing

จากการทดลองในการหาสถานะในการผลิต wort จากมอลต์ข้าวทั้งสองสายพันธุ์ สามารถสรุปได้ว่า ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสกัด soluble nitrogen และ FAN คือ 50-60 องศาเซลเซียส, 70 องศาเซลเซียส เหมาะสำหรับการสกัด fermentable sugar และ dextrin และ 78 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำให้แป้งละลายอย่างสมบูรณ์และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ สำหรับวิธีการ mashing ที่เหมาะสมกับมอลต์ข้าว คือ infusion mashing แบบ wide temperature program คือการค่อยๆเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดเป็นช่วง ๆ เพื่อรักษาสภาพของเอนไซม์และไม่ทำลาย substrate ของเอนไซม์อีกด้วย นอกจากนี้การปรับ pH ของ mashing-in และการใช้ divalent cation สามารถช่วย

ทำให้เอนไซม์เกิดความเสถียรและทำงานอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดย pH ที่เหมาะสม คือ 5.2 และใช้ร่วมกับ Ca^{2+} ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ได้ wort ที่มีคุณภาพและมีสารอาหารที่เพียงพอต่อกระบวนการหมักเบียร์ต่อไป

5.4 การผลิตเบียร์จากมอลท์ข้าวเจ้าดำและมอลท์ข้าวเหนียวดำ

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า คุณภาพของ wort ส่งผลต่อกระบวนการหมักและคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้าย ดังนั้น wort ที่มีน้ำตาลกลูโคสสูงกระบวนการหมักจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจึงใช้เวลาสั้นกว่าการหมักเบียร์ทั่วไปที่ใช้บาร์เลย์ ในขณะที่ความต้องการ FAN ของยีสต์ในระหว่างกระบวนการ fermentation ต่ำกว่า 220 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เป็นระดับต่ำสุดที่ยีสต์ต้องการใช้ในการหมัก wort จากบาร์เลย์ คุณสมบัติของเบียร์จากข้าวดำมีสีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นของควินหรือ 4-vinyl guaiacol ที่เป็นลักษณะเฉพาะของ wheat beer และ smoky beer ซึ่งจะโดดเด่นใน ale beer ซึ่งส่งผลให้คะแนน sensory evaluation ในหัวข้อ flavor ได้คะแนนต่ำมาก จะอย่างไรก็ตามคะแนนความประทับใจโดยรวมถือว่า จัดเป็นเบียร์ที่ดื่มได้ โดยเฉพาะ lager beer จะมีคะแนนการยอมรับที่ดีกว่า ale beer ดังนั้น ยีสต์สายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการหมักเบียร์จากข้าวดำควรเป็นกลุ่ม bottom fermenting yeast หรือ top fermenting yeast บางสายพันธุ์ที่ไม่มี PAD activity เท่านั้น

บรรณานุกรม

- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2552. ยุทธศาสตร์ข้าวไทย 2550-2554 [ออนไลน์].ได้จาก: <http://www.dit.go.th/contentdetail.asp?typeid=16&catid=104&ID=1539>
- สำนักส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตร กรมการค้าภายใน. 2552. รายงานภาวะสินค้าข้าว ประจำเดือน กรกฎาคม 2552 [ออนไลน์].ได้จาก: <http://www.dit.go.th/contentdetail.asp?typeid=16&catid=103&ID=1222>
- Agu, R. C. and Palmer, G. H. (1998). A reassessment of sorghum for lager-beer brewing. *Biores. Tech.* 66: 253-261.
- Ahmad, A.L., Wong, S.S., Teng, T.T., and Zuhairi, A. (2007). Optimization of coagulation-flocculation process for pulp and paper mill effluent by response surface methodological analysis. *J. Hazard Mater.* 145: 162-168.
- Bamforth, C.W. (2001). pH in brewing: An overview. *MBAA T. Q.* 38(1): 1-8.
- Bao, J. and Bergman, C. J. (2001). The functionality of rice starch. In Eliasson (Ed.) *Starch in food: structure, function and applications* (pp. 250-294). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Box, G. and Fowkes, N. (1951). The experimental attainment of optimum conditions. *J. Sta. Soc.:Series B* 13:145.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(7): 248-254.
- Briggs, D. E. (1998). *Malt and Malting*. London: Blackie Academic & Professional.
- Brown, K. A. and Hammond, M. R. J. (2003). Flavor control in small-scale beer fermentations. *Trans Inst. Chem. Eng.* 81: 40-49.
- Capanzana, V.M. and Buckle, A.K. (1997). Optimization of germination condition by response surface methodology of a high amylose rice (*Oryza sativa*) cultivar. *Lebensm- Wissen u- Technol.* 30: 155-163.
- Chaturveldi, A. and Sarojini, G. (1996). Effect of seed treatment on lipolytic deterioration of pearl millet flour during storage. *J. Food Sci. Technol.* 33: 81-82.
- Cheison, C. S., Wang, Z., and Xu, S.-Y. (2007). Use of response surface methodology to optimize the hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor. *J. Food. Eng.* 80: 1134-1145.

- Dewar, J., Taylor, J. R. N., and Berjak, P. (1997). Determination of improved steeping conditions for sorghum malting. *J. Cereal Sci.* 26(1): 129-136.
- Douliez, J.-P., Michon, T., Elmorjani, K., and Marion, D. (2000). Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. *J. Cereal Sci.* 20: 1-20.
- EBC, Analytica-EBC (Ed.). (1998). *Analytica-EBC, European Brewer Convention*. Nuernberg: Getaenke-Fachverlage.
- EBC. (1998). *Analytica-EBC, European Brewery Convention*. Nuernberg: Getaenke-Fachverlage.
- Enari T. M. and Sopanen, T. (1986). Mobilization of endospermal reserves during the germination of barley. *J. Inst. Brew.* 92, 25-31
- Enari, T. M. (1975). *Analytica-EBC (3rd ed.)*. Zurich: Schweizer Brauerei-Rundschau.
- Eneje, L. O., et al. (2004). Effect of steeping and germination time on malting performance of Nigerian white and yellow maize varieties. *Proc. Biochem.* 39(8): 1013-1016.
- García-Garrido, M.J., Menossi, M., Puigdomènech, P., Martínez-Izquierdo, A.J., and Delsena, M. (1998). Characterization of a gene encoding an abscisic acid-inducible type-2 lipid transfer protein from rice. *FEBS Letters* 428: 193-199.
- Goldammer, T. (2000). *The Brewer's Handbook*. New York: KVP Publisher.
- Goode, D.L., Halbert, C., and Arendt, E.K. (2003). Optimisation of mashing conditions when mashing with unmalted sorghum and commercial enzymes. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 61: 69-78.
- Goode, D.L., Wijngaard, H.H., and Arendt, E.K. (2005). Mashing with unmalted barley-impact of malted barley and commercial enzyme (*Bacillus* spp.) additions. *MBAA. T. Q.* 42(3): 184-198.
- Greenwood, C. T. and Mac Gregor, A.W. (1965). The isolation of alpha-amylase from barley and malted barley, and a study of the properties and action patterns of the enzymes. *J. Inst. Brewing* 71: 405-417.
- Guglielminetti, L., Yamaguchi, J., Perata, P., and Alpi, A. (1995). Amylolytic activities in cereal seeds under aerobic and anaerobic conditions. *Plant Physiol.* 109(3): 1069-1076.
- Igyor, A. M., Ogbonna, A. C., and Palmer, H. G. (2001). Effect of malting temperature and mashing methods on sorghum wort composition and beer flavour. *Proc. Biochem.* 36: 1039-1044.

- Iwata, H., Isogai, A., Utsunomiya, H., Itani, T., and Nishio, N. (2003). Relationship between the accumulation of starch and alpha-glucosidase in rice endosperm. *Nippon Nougakagaku Kaishi*. 77:1,130-1,136.
- Iwata, H., Suzuki, T., Takahashi, K., and Aramaki, I. (2002). Critical importance of α -glucosidase contained in rice kernel for alcohol fermentation of rice polish. *J. Biosci. Bioeng.* 93: 296-302.
- Iwuoha, C. I. and Aina, J. O. (1997). Effects of steeping condition and germination time on the β -amylase activity, phenolics content and malting loss of Nigerian local red short Kaura sorghum malts. *Food Chem.* 58(4): 289-295.
- Juliano, O.B. (1985). Production and utilization of rice. In O. B. Juliano (Ed.) *Rice: chemistry and technology* (p. 29). St. Paul, Minnesota: The American Association of Cereal Chemists, Inc.
- Kühbeck F., T. Dickel, M. Krottenthaler, W. Back, M. Mitzscherling, A. Delgado and T. Becker. (2005). Effects of mashing parameters on mash b-glucan, FAN and soluble extract levels. *J. Inst. Brew.* 111(3): 316-327.
- Kunze, W. (2004). *Technology brewing and malting* (3rd international edition ed.). Berlin: VBL .
- Lekkas, C., Stewart, G.G., Hill, A.E., Taidi, B., and Hodgson, J. (2005). The importance of free amino nitrogen in wort and beer, quoted in 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. *J.Inst. Brew.* 113(1): 3-8.
- Lewis, J.M. and Young, W.T. (1995). *Brewing*. London: Chapman & Hall.
- Li, Y., McCaig, R., and Egi, A. (2006). Malting characteristics of three Canadian hulless barley cultivars, CDC Freedom, CDC McGwire, and CDC Grainer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 64(2): 111-117.
- Liyana-P., C. and Sharhidi, F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chem.* 93:47-56.
- Manner, D.J. and Yellowless, D. (1971). Studies on carbohydrate metabolizing enzymes. XXVI. The limit dextrinase from germinated barley. *Starch* 23: 228-234.
- Meyor, R. H. and Montgomery, D.C. (2002). *Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments*. New York: John Wiley & Son, Inc.
- Nakamura, Y., Yuki, K., Park, S.Y., and Ohya, T. (1989). Carbohydrate metabolism in the developing endosperm of rice grains. *Plant Cell Physio.* 30: 833- 839.

- Nandi, S., Das, G., and Sen-Mandi, S. (1995). β -Amylase activity as an index for germination potential in rice. *Ann. Bot.* 75(5): 463-467.
- Narziss, L. & Rusitka, P. (1977). Variation of enzymic activities during drying and curing of malt. *Brauwiss.* 30:1-12
- Nath, A., Chattopadhyay, K. P., and Majumdar, C. G. (2007). High temperature short time air puffed re-to-eat (RTE) potato snacks: process parameter optimization. *J. Food Eng.* 80: 770-780.
- Noonan, J.G. (1996). *New Brewing Lager beer*. Colorado: Brewers Publications.
- Okungbowa, J., Obeta, N.A.J., and Ezeogu, I.L. (2002). Sorghum β -amylase production: relationship with grain cultivar, steep regime, steep liquor composition and kilning temperature. *J. Inst. Brew.* 3: 362-370.
- Pfenninger, H. (Ed.). (1997). *Brautechnische Analysenmethoden, Band I*. Freising-Weihenstephan: Selbstverlag der MEBAK.
- Phiarais, B.P.N., Wijngaard, H.H., and Arendt, E.K. (2005). The impact of kilning on enzymatic activity of buckwheat malt. *J. Inst. Brew.* 111: 290-298.
- Priest, F. G. and Stewart G. G. (2006). *Handbook of brewing*. London: CRC Taylor & Francis.
- Quoted in Nakai H. et al., (2006). Plant α -glucosidase: Molecular analysis of rice α -glucosidase and degradation mechanism of starch granules in germination stage. *J. Appl. Glycosci.* 53:137-142.
- Thailand Restaurant News. 2551. สิงหาคม 4 ทายาทผู้บัลลังก์ ชัยชนะครั้งแรกในรอบ 10 ปี [ออนไลน์]. ได้จาก: www.thailandrestaurantnews.com/
- Uvere, O.P., Andenuga, D.O., and Mordi, C. (2000). The effect of germination and kilning on the cyanogenic potential, amylase and alcohol levels of sorghum malts used for burukutu production. *J. Sci. Food Agric.* 80: 352-358.
- Usansa U., N. Sompong, C. Wanapu, N. Boonkerd, and N. Teaumroong. (2009). The Influences of Steeping Duration and Temperature on the α - and β -Amylase Activities of Six Thai Rice Malt Cultivars (*Oryza sativa* L. Indica). *J. Inst. Brew.* 140-147, 2009.
- Vanbeneden N., Gils, F., Delvaux, F., and F., D.R. (2008a). Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. *Food Chem.* 107: 221-230.

- Vanbeneden N., Roey, V.T., Delvaux, F., and F., D.R. (2008b). Release of phenolic flavour precursors during wort production: Influence of process parameters and grist composition on ferulic acid release during brewing. *Food Chem.* 111: 83-91.
- Wijngaard, H. H., Uhmer, H. M., Neumann, M., and Arendt, E. K. (2005). The effect of steeping time on the final malt quality of buckwheat. *J. Inst. Brew.* 111(3): 275-281.
- Wijngaard, H. H., Ulmer, H. M., Neumann, M., and Arendt, E. K. (2005). The effect of steeping time on the final malt quality of buckwheat. *J. Inst. Brew.* 111: 275-281.
- Wijngaard, H.H. and Arendt, K.E. (2006). Optimization of a mashing program for 100% malted buckwheat. *J. Inst. Brew.* 112(1): 57-65.
- Wijngaard, H.H. and Ulmer, H.M. (2005). The effect of germination temperature on malt quality of buckwheat. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 63: 31-36.
- Wijngaard, H.H. and Ulmer, M.H. (2006). The effect of germination time on the final malt quality of buckwheat. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 64: 214-221.
- Wutthiyano, C. (2000). Thai natives rice. Bangkok: Department of Agriculture.

ประวัตินักวิจัย

Associate Professor Dr. Neung Teaumroong

NAME : Associate Professor Dr. Neung Teaumroong
ADDRESS : School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology
Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima,
THAILAND 3000

EDUCATION

1987 B.Sc. Microbiology, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
1989 M.Sc. Industrial Microbiology, Chulalongkorn University, Thailand
1990 Dipl. Microbiology and Biotechnology, University of Tokyo, Japan
1993 Dr.rer.nat Microbiology and Molecular Biology, University of Innsbruck,
Austria

RESEARCH OF INTERESTS

: Molecular Microbial Ecology
: Molecular Biology of N₂-fixation and am

PEER-REVIEWED PUBLICATION

- Teaumroong, N., and S. Pichayangura. (1989). Detection of Polysaccharides from some Mushrooms. J. of Microbial Utilization of Renewable Resources. Vol.6, P.126-128.
- Chung, S.-Y., Yokoyama, K., Gomo, M., Teaumroong, N., Ishii, M., Igarashi, Y., and Kodama, T. (1994). Purification and some properties of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Pseudomonas hydrogenothermophila* strain TH-1. J. Ferment. Bioeng., 78, 469-47.
- Teaumroong, N., Y. Murooka and N. Boonkerd. (1995) Acid Tolerance and Antibiotic Resistance of Some Strains of *Bradyrhizobium* applied in Thailand. Suranaree J. Sci. Technol Vol.2, P. 75-80.
- Teaumroong N. and N. Boonkerd (1996). Iron Element, Siderophores and Microbes. Suranaree J. Sci. Technol. 3:95-100.
- Teaumroong, N. and N. Boonkerd. (1996). Symbiotic Relationship Between Rhizobia and Legumes in Molecular Genetic Aspect. Suranaree J. Sci. Technol. 3:15-20
- Teaumroong, N., N. Boonkerd and K. Haselwandter (1996) Effect of the iron sources on the siderophore produced from *Bacillus polymyxa*. Suranaree J. Sci. Technol. 3:133-137
- Teaumroong, N., C. Schuarzer, B. Auer and K. Haselwandter. 1997. A non-radioactive DNA probe for detecting dicyandiamide - degrading soil bacteria. Biology and Fertility of Soils. 25, 159 - 161.

- Teaumroong, N., K. Teamtisong, M. Manassila and N. Boonkerd.(1998). Preliminary Study of The Competition and Persistence of Applied *Bradyrhizobia* Strains Using Reporter Gene in Soil. Suranaree J. Sci. Technol 5:18-23.
- Teaumroong, N. and N. Boonkerd (1998). Detection of *Bradyrhizobium* spp. and *B. japonicum* in Thailand by Primer-Based Technology and Direct DNA Extraction. Plants and Soil. 204:127-134.
- Chumkhunthod P., S. Rodtong, N. Teaumroong and N. Boonkerd (2001). Bioconversion of Cassava Roots to High Protein Product for Animal Feed. Thai J. Biotechnol., September 2001, p.17-25.
- Teaumroong N., W. Sattayapisut, T. Teekachunhatean and N. Boonkerd (2002). Using Agricultural Wastes for *Tricholoma crassum* (Berk.) Production. H. Insam, N. Riddech, S. Klammer (Eds.) Microbiology of composting., p.231-236.
- Pongsilp N., N. Teaumroong, A. Nuntagij, N. Boonkerd and M. J. Sadowsky. (2002). Genetic Structure of Indigenous Non-nodulating and Nodulating Populations of *Bradyrhizobium* in Soils from Thailand. Symbiosis, 33:39-58
- Teaumroong N., S. Innok, S. Chunleuchanon and N. Boonkerd. (2002). Diversity of Nitrogen-fixing cyanobacteria under various ecosystems of Thailand: I Morphology, physiology and genetic diversity. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 18:673-682.
- Chunleuchanon S. A. Sooksawang, N. Teaumroong and N. Boonkerd. (2003). Diversity of Nitrogen-fixing cyanobacteria under various ecosystems of Thailand: II Population dynamics as affected by environmental factors. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 19: 167-173.
- Payakapong W., P. Tittabutr, N. Teaumroong and N. Boonkerd. (2004) Soybean cultivars affect nodulation competition of *Bradyrhizobium japonicum* strains. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 20: 311-315
- Minamizawa K., K. Nishioka, T. Miyaki, B. Ye, T. Miyamoto, M. You, A. Saito, M. Saito, W. L. Barraquio, N. Teaumroong, T. Sein and T. Sato. (2004) Anaerobic Nitrogen-Fixing Consortia Consisting of Clostridia Isolated from Gramineous Plants. Applied and Environmental Microbiology, 70:3096-3102.
- Tittabutr P., W. Payakapong, N. Teaumroong and N. Boonkerd (2005) Cassava as a cheap source of carbon for rhizobial inoculant production using amylase-producing fungus and glycerol-producing yeast. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 21:823-829.
- Innok, S., Matsumura, M., Boonkerd, N., and N. Teaumroong (2005) Detection of *Microcystis* in Lake Sediment using Molecular Genetic Techniques. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 21,1559-1568.

Sooksa-nguan, T. J.E. Thies, P. Gypmantasiri, N. Boonkerd, and N. Teaumroong (2009). Effect of rice cultivation systems on nitrogen cycling and nitrifying bacterial community structure. *Applied Soil Ecology*. Doi:10.1016/j.apsoil.2009.06.013

Leelahawong, C., A. Nantagij, N. Teaumroong, N. Boonkerd, and N. Pongsilp. (2010) Characterization of root-nodule bacteria isolated from a medicinal legume *Indigofera tinctoria*. *Annals of Microbiology*. (accepted)

INVITED BOOK CHAPTER

Neung Teaumroong and Nantakorn Boonkerd (2006). Rhizobial Production Technology. In: *Microbial Biotechnology in Agriculture and Aquaculture*. Vol. 2 (eds.) R.C. Ray, Science Publishers, USA, pp. 77-110.

N. Teaumroong, C. Wanapu, Y. Chankum, W. Ajharn, S. Sang-Arthit, N. Teamthaisong, and N. Boonkerd. (2010) Production and Application of Bioorganic Fertilizer for Organic Farming Systems in Thailand : A Case Study. In *Microbes at Work*, H.Insam et al.,(Editors), Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI10.1007/978-3-642-04043-6-15.

PROCEEDING AND ANNUAL REPORT

Teaumroong, N., N. Boonkerd and Y. Murooka. (1995) Application of primer based technology to fingerprint the genomes of *Bradyrhizobium* spp. Used in Thailand :In Proceeding of the 10th International Congress on Nitrogen fixation, St. Petersburg, Russia May 28-June 3, p. 741.

Boonkerd N., N. Teaumroong, P. Wadisirisuk, S. Kotepong and A. Nantagij. 1996. Rhizobial strain improvement and on-farm management for high N₂ fixation in Thailand; Isolation of forage legume rhizobia. *Annual Report of IC Biotech*. 19:839-844.

Teaumroong N, K. Teamthaisong, P. Wadisirisuk, S. Kotepong, A. Nantagij. and N. Boonkerd. 1997. Rhizobial strain improvement and on-farm management for high N₂ fixation in forage legumes; Screening of high effective rhizobial strains. *Annual Report of IC Biotech*. 20:955-962.

Teaumroong, N. and N. Boonkerd. (1998). Using reporter gene system to monitor applied *Bradyrhizobium* in Thailand. In Proceeding of the 11th International Congress on Nitrogen fixation, Institute Pasteur, Paris, France, July 2-25, 1997. p. 660

Boonkerd, N., N. Teaumroong and G. Hardarson (1998). Effect of inoculation methods on nodulation, N₂ fixation and yield of soybeans under field condition. In Proceeding of the 11th International Congress on Nitrogen fixation, Institute Pasteur, Paris, France, July 2-25, 1997. p. 631

Boonkerd, N., N. Teaumroong and G. Hardarson (1998). Nitrogen Fixation (¹⁵N Dilution) in Soybean as Affected by Inoculation Methods : In Asian Network on Microbial Researches. Gadjah Mada University (GMU), The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN) Science and Technology Agency, Japan. P. 165-171.

- Rodtong, S., N. Teaumroong and P. Chooklay (1998). A preliminary study on the diversity of macrofungi in Nong-Rawiang plant genetic forest: In proceeding of the Asia-Pacific Mycological Conference on "Biodiversity and Biotechnology" 6-9 July 1999, Hua-Hin, Thailand. P.281-284.
- Teaumroong N., K. Teamtaisong, P. Wadisirisuk, S. Kotepong, A. Nantagij, and N. Boonkerd. (1999). Strain selection and characterization of rhizobia isolated from forage legumes grown in Thailand. Annual Report of IC Biotech.
- Teaumroong N., K. Teamtaisong, A. Nantagij, P. Wadisirisuk, S. Kotepong, and N. Boonkerd. (2000). Diversification of some forage legumes rhizobia isolated in Thailand. In:Proceeding of the 12th International congress on nitrogen fixation [F.O. Pedrosa et al. (eds.)], Foz do Iguacu, Parana, Brazil. September 12-17, 1999.Kluwer Academic Publishers. p.196
- Teaumroong, N., M. Manassila, N. Boonkerd. and S. Rodtong. (2000). ITS-RFLP analyses of Edible mushrooms in genera *Russula* and *Boletus* collected from North Easter part of Thailand. Abstracts of the Asian Mycological Congress 2000, 9-13 July 2000, Hong Kong Sar, China: 115.
- Teaumroong N., K. Teaumroong, T. Sooksa-nguan and N. Boonkerd. (2001). The Diazotrophic endophytic Bacteria in Thai Rice. The Fifth ESAFA International Conference on Rice Environments and Rice Products, 27-31 May 2001. Krabi, Thailand. p. 147-160
- Kotepong S., A. Nuntagij, S. Jitaksorn, N. Teaumroong and N. Boonkerd (2001) Application of Tree Legume Rhizobia for Reforestratiion Programme in Thailand. In Proceeding of the 13th International Congress on Nitrogen Fixation, Ontario, Canada (2-7 July 2001), p. 512.
- Rodtong, S. Burom, C., Teaumroong, N., and Boonkerd N. (2003) Bioconversion of cassava starch to nutrient sources for slow-growing Rhizobium cultivation. Abstracts of the Bio Thailand 2003 on Technology for life, 17-20 July 2003, Pattaya, Chonburi, Thailand, p. 258.
- Teamtisong, K., Okazaki, S., Minamisawa, K., Teaumroong, N., Saeki, K., Kaneko, T., and Tabata, S. (2003). Rhizobial determinants for nodulation and nitrogen fixation with bred soybean. Nippon Doji Hiryo Gakkai Koen Yoshishu (Abstracts of the Meeting, Japanese Society of Soil Science and Plant Nutrition), 49:58.
- Nuntagij, A. Kotepong, S., Jitaksorn, S., Chengaksorn, C., Teaumroong, N., Boonkerd, N., and Abe, M. (2003). Selection and management of rhizobia for tree legumes in reforestation. *Biotechnol Sustain Util Biol Resour Trop*. 16:193-197.
- Tittabutr, P., Payakapong, W., Teaumroong, N., and Boonkerd, N. (2003). Development of rhizobial inoculant production and formulation : dilution technique and solid state fermentation. *Biotechnol Sustain Util Bio Resour Trop*. 16:105-112.

- Manassila M., A. Nantagij, S. Kotepong, N. Boonkerd and N. Teaumroong (2004). Characterization and Monitoring Selected Rhizobial Strains Isolated from Tree Legumes in Thailand. Proceeding in the 6th European Nitrogen Fixation Conference (24th -27th July), Tolouse, France.
- Teaumroong, N., Sooksa-nguan, T., Thies, E.J., and Boonkerd N. (2004). Comparison of Bacterial Activities Involved in Nitrogen Cycling Between Conventional Rice Cultivation and the System of Rice Intensification (SRI). Proceeding in the 14th International Congress on Nitrogen Fixation (Oct. 27- Nov. 1), Beijing, China.
- Payakapong, W., Titabutr, P., Teaumroong, N. Borthakur, D., and Boonkerd, N. (2004). Isolation of Genes for Salt Tolerant form *Sinorhizobium* LT11. Proceeding in the 14th International Congress on Nitrogen Fixation (Oct. 27- Nov. 1), Beijing, China.
- Namanusart, W., N. Teaumroong, S. Rodthong, O. Nopamornbodi and N. Boonkerd. (2004). Genetic of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Infected *Acacia mangium* WillD. The IV Asia-Pacific Mycological Congress and the IX International Marine and Freshwater Mycology Symposium (14-19 Nov. 2004). P. 127
- Innok, S., Chunleuchanon, S., N. Boonkerd and N. Teaumroong. (2006). Application of Akinete Forming N₂-fixing Cyanobacteria for Rice Cultivation. Proceeding in 11th International Symbiosium on Microbial Ecology (ISME) (August 20-25, 2006) Vienna, Austria.
- Prakamhang J., K. Minamisawa, K. Teamtaisong, N. Boonkerd and N. Teaumroong. Oral presentation : Microbiai communities of enophytic diazotrop bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa*). 11th International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes. September 3-4, 2008. Gent, Belgium
- Tanthanuch, W., Mohammed, S., Matthisen, R., Titrabutr, P., Yamabhai, M., Taemthaisong, K., Jensen, Ole N., Teaumroong, N., and Boonkerd, N. (2009). Proteomic analysis of a *S. meliloti* strain BL3 membrane proteins by mass spectrometry and investigation of salt stress response. The 19th Annual Meeting of Japanese Society of Plant Microbe Interactions. 8-10 September, 2009. Agata-no-Mori Auditorium in Matsumoto, Japan.

INSTRUCTIONAL EXPERTISE

- ◆ Applied Microbiology
- ◆ Man and Environment
- ◆ Environmental Microbiology
- ◆ Agricultural Biotechnology
- ◆ Biosafety
- ◆ Food Microbiology
- ◆ Plant and Microbe Interaction
- ◆ Molecular Biology and Recombinant DNA Technology

PROFESSIONAL SOCIETIES AND COMMITTEE

- : Thai Society of Biotechnology
- : Thai Inventor Association

- : Central Biosafety Committee (CBC)
- : Subcommittee of Central Biosafety Committee (CBC) in Microbiology
- : Technical Biosafety Committee

ORAL PAPER PRESENTATION

- NRCT; NUS; DOST-JSPS. Joint Seminar on Biotechnology. December 22-24 1988, Chiang Mai University. (**Oral presentation:** in "Detection of Polysaccharides From Some Edible Mushrooms.")
- The 3rd FAO/IAEA Research co-ordination meeting on "Enhancing Soil Fertility and Crop Production by Better Management of *Rhizobium*". (**Oral presentation** in "Using Molecular Biology to Detect Rhizobia in Agro-Ecosystem"). University de Geneve, Geneva, Switzerland. August 15-19, 1994.
- Biotechnology Research and Applications for Sustainable Development (BRASD). Central Plaza Hotel, Bangkok, Thailand. August 7-10, 1996. (**Oral presentation :** in "Using Molecular Biology Techniques to Fingerprint the Genomes and Study Behavior of *Bradyrhizobium* in Agro-Ecosystem.")
- Research co-ordination meeting on "Enhancing Soil Fertility and Crop Production by Better Management of Rhizobium" (FAO/IAEA). 2-6 Sep. 1996, UN, Vienna, Austria (**Oral presentation :** "The Detection System to Monitor Applied *Bradyrhizobium* in Soil")
- Project of JSPS-NRCT "Seminear on Cooperative research of biotechnology between Thailand and Japan". Nov. 27, 1996. (**Oral presentation :** in "Application of Reporter Gene System to Detect Rhizobial Behavior.")
- JSPS-NRCT/DOST/LIPI/VCC "Sustainable Development of Biotechnology in Tropics". 3-4 November 1998, Manila, Philipines. (**Oral presentation :** in "Characterization of *Desmanthus virgatus* Rhizobial Strains Isolated from Thai Soil.")
- 10th Annual Meeting of TSB and NCGEB "Biotechnology for A Self-Sufficient Economy". 25-27 November 1998, Bangkok, Thailand. (**Oral Presentation :** in "The Prospectus of School of Biotechnology, SUT, Towards N₂-fixing Microbes Research in Thailand.")
- 8th International Symposium on Nitrogen fixation with Non Legumes. 3-7 December 2000, The University of Sydney, NSW, Australia. (**Oral presentation :** in "Diversity of nitrogen fixing cyanobacteria under ecosystems of Thailand.")
- The Fifth ESAFS International Conference on Rice Environments and Rice Products 27-31 May 2001, Krabi, Thailand. (**Oral presentation :** in "The Diazotrophic Endophytic Bacteria In Thai Rice.")

- The 14th International Congress on Nitrogen Fixation. Oct. 27- Nov. 1 2004., Beijing, China
(**Oral presentation** : in “Isolation of Genes for Salt Tolerance from *Sinorhizobium* LT11”)
- **INTERNATIONAL INVITED SPEAKER** : “Biofertilizer Technology” at Gansu Agricultural University, China (2-3 Nov. 2004)
- JSPS-NRCT/DOST/LIPI/VCC Joint Seminar “Sustainable Development of Biotechnology in Tropics”. 3-4 December 2004, Bali, Indonesia. (**Oral presentation** : in “10th Year Biofertilizer Research at Suranaree University of Technology : from Gene to Farmers”)
- 12th International Conference of the African association for Biological Nitrogen Fixation. Jan. 21-26. 2007, Cape Town, South Africa (**Oral presentation** : in “The alternative sigma factor RpoH2 is required for salt tolerance in *Sinorhizobium* sp. strain BL3”)
- 11th International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes. September 3-4, 2008, Gent, Belgium (**Oral presentation** : in “Microbial communities of enophytic diazotroph bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa*)”)

LICENS

- “Cyanobacterial Akinete Induction as Biofertilizer” Neung Teaumroong, et al., 2005 No. 105617
- Patent “Bioorganic Production Pilot Plant” Neung Teaumroong, et al., 2008
- Patent “Screw set for turning Bioorganic Fertilizer” Neung Teaumroong, et al., 2008
- Patent “Motor system for screwing Bioorganic Fertilizer” Neung Teaumroong, et al., 2008
- 11 Trade secrets (Neung Teaumroong, et al., 2008)

FELLOWSHIPS

- “The Royal Golden Jubilee program” (2000-2005)
- “UNESCO” : Post Graduate Programme (1989-1990) in Microbiology and Biotechnology. University of Tokyo.
- “MONBUSHO” : Research in “Molecular Genetic of Acid Tolerance *Rhizobium*”. Hiroshima University, Hiroshima, Japan. (October 24-December 23, 1994.)
- “AUSTRIA GOVERNMENT” : Research in “Investigation of Siderophores from Bacteria”. University of Innsbruck, Austria. (May 1-June 30 1995)
- “JSPS” : Research in “Construction of Cholesterol Oxidase Gene for Using as *Rhizobium* Reporter Gene”. Osaka University, Japan (12 Jan-25 Feb 1998)
- “MONBUSHO” : Research in “Construction of Green Fluorescent Protein Gene for Detecting *Rhizobium*” Osaka University, Japan.(December 7, 1998 - January 21, 1999)
- “JSPS” : Research in “Homologous recombination of GFP in *Rhizobium*” Osaka University, Japan (March 13, 2000- March 31, 2000)

- “JSPS” : Research in “Effect of Rhizobitoxine Forwards Legume Nodulation”. Tohoku University, Japan (November 7,- December 21, 2002)
- ISNAR and W.K. Kellogg Foundation, Training in “Monitoring, Evaluation and Impact Assessment of R&D Investments in Agriculture” (9-20 June 2003), Pretoria, Republic of South Africa.
- InWEnt (2003-2004) Training programme
 - : Bioorganic Fertilizer Production from Agro-Industrial Wastes and Entrepreneurship Development for Rural Women Leadership Southeast Asia
 - : Technical training on Biofertilizer Inoculant Production