

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัตถุดิบและอุปกรณ์

1. วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต

- ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 1 (Chiangmai 1)
- ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 (Chiangmai 60)
- ถั่วเหลืองพันธุ์ตาแดง (Tadang)
- จมูกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 1
- จมูกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60
- จมูกถั่วเหลืองพันธุ์ตาแดง

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตถั่วเหลืองหมัก

- เครื่องชั่งไฟฟ้าศนิยม 2 ตำแหน่ง (Semi-accurate balance, Mettler-Toledo: Model BB120 Switzerland)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator, Heraeus: Model D-6450 Hanau, Germany)
- หม้อนึ่งความดัน (Autoclave, HIRAYAMA: Model HA300 MN, Japan)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert Model UNB400, USA)
- ผ้าขาวบาง
- ตำลึง

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพ

- เครื่องปั่น (Blender, National: MX-T700 GN, Taiwan)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าศนิยม 2 ตำแหน่ง (Semi-accurate balance, Mettler-Toledo: Model BB120, Switzerland)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Microcentrifuge, Wise spin, Australia)
- กระดาษกรอง เบอร์ 1 (Whatman, USA)
- ช้อนตักสาร (Spatula)
- 125 ml Erlenmeyer flask

- Shaker (UMAC, UM-S606, Thailand)
- Homogenizer (Kinematica AG Littau-Luzern, Switzerland)
- Evaporator (B.U.C.H.I รุ่น R2)
- HPLC column, Inersil C18 size 250x4.6 mm., 5.0 μ M
- Disposable syringe, size 3 ml
- Disposable Nylon membrane 0.45 μ m Disc, Ligand Co.Ltd, Thailand
- Disposable glove
- Volumetric Flask, Size 5, 10 and 50 ml
- LC vial with septa cap, Size 2 ml, Restek, Thailand
- Mobile Phase Filtering Set
- Nylon membrane 0.45 μ m, for mobile phase preparation, Millipore
- Nylon membrane 0.20 μ m, for mobile phase preparation, Millipore
- Aqueous membrane 0.45 μ m, for mobile phase preparation, Millipore
- Pasture pipette
- Automatic pipette 10, 20, 100, 200 μ l (Gilson, France)
- Loop
- Test tube
- Petri dish
- Centrifuge tube
- Vials 2 ml clear 9 mm thread w/Grad marking spot
- Disposable syringe 3 ml, NIPRO
- Freeze dryer (ยี่ห้อ LABCONCO, USA)

4. สารเคมี

- Acetonitrile, HPLC grade (JT Bakers, USA)
- Daidzein (Sigma, USA)
- Genistein (Sigma, USA)
- Flavones (Fluka, USA)
- Acetic acid, Analytical grade (JT Baker, USA)
- Hydrochloric acid, Analytical grade (JT Baker, USA)

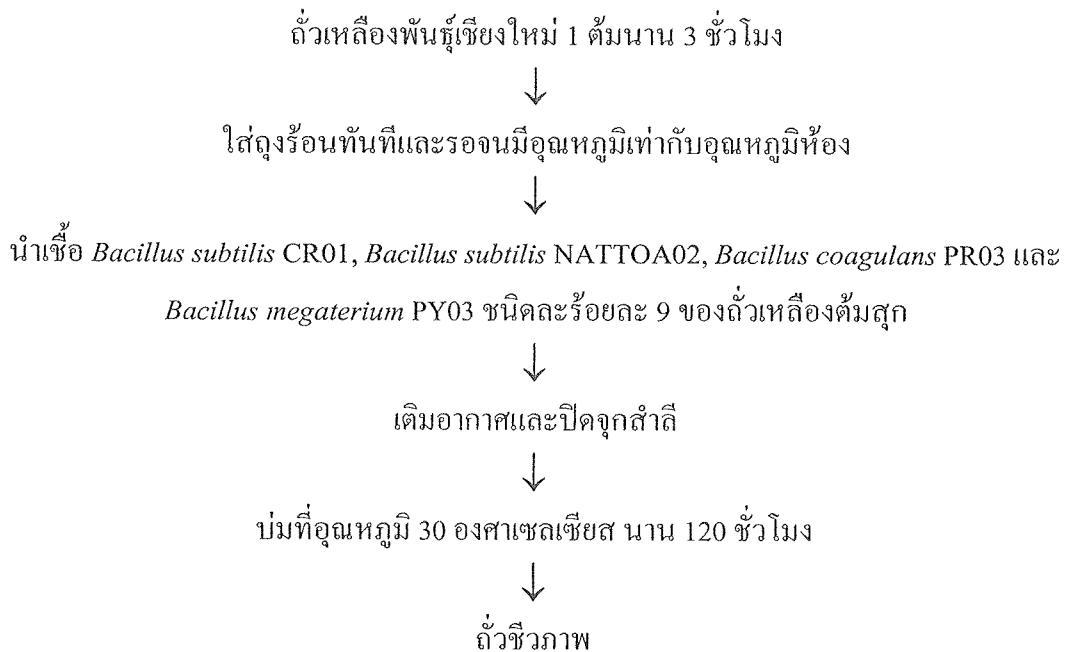
- Ethanol 95 %(Scharlau Chemie SA, Spain)
- Crystal violet (Merck, Germany)
- Iodine (Merck, Germany)
- Safranin (Merck, Germany)
- Nutrient agar (Difco, USA)
- Nutrient broth (Difco, USA)
- Bacto Agar (Difco, USA)
- Soluble Starch (Merck, Germany)
- Bacto Peptone (Difco, USA)
- Potassium Monohydrogen Phosphate (Merck, Germany)
- Potassium Dihydrogen Phosphate (Merck, Germany)
- Sodium Chloride (Merck, Germany)
- Glacial acetic acid (Merck, Germany)
- Sodium acetate (Merck, Germany)
- Methanol, HPLC grade (JT Bakers, USA)
- *p*-Nitrophenyl- β -D-pyranoside (Sigma, USA)
- Sodium carbonate (Merck, Germany)
- *p*-Nitrophenol (Merck, Germany)
- Acetone, AR grade (Merck, Germany)
- Ethanol 95% (Food grade, USA)
- Sodium alginate (Food grade, USA)

5. เครื่องประมวลผลทางสถิติ

- โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 15.0
- โปรแกรมสำเร็จรูป Design Expert version 7.1.0

วิธีการทดลอง

จากการดำเนินโครงการผลิตไอโซฟลาโวน (ไดซินและเจนีสตีน) จากถั่วชีวภาพ ระยะที่ 1 ทำให้ทราบกระบวนการหมักถั่วชีวภาพเพื่อผลิตไอโซฟลาโวนที่เหมาะสม พบว่า เชื้อบริสุทธิ์ที่เหมาะสม คือ *Bacillus subtilis* CR01, *Bacillus subtilis* NATTOA02, *Bacillus coagulans* PR03 และ *Bacillus megaterium* PY03 ใช้ระยะเวลาเตรียมหัวเชื้อ 18 ชั่วโมง โดยใช้ปริมาณของหัวเชื้อเริ่มต้นแต่ละชนิดในสัดส่วน ร้อยละ 9 ของน้ำหนักถั่วเหลือง ตามลำดับ หรือคิดเป็นร้อยละ 36 ของน้ำหนักถั่วเหลืองทั้งหมด สำหรับวัตถุดิบใช้ถั่วเหลืองพันธุ์ เชียงใหม่ 1 เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการหมัก ใช้สภาวะบ่มแบบแข็งและเติมอากาศเข้าไปในระบบ (1 ลิตร/นาที่) และใช้ระยะเวลาหมัก 120 ชั่วโมง จะได้ผลิตภัณฑ์ถั่วชีวภาพ โดยมีกระบวนการผลิตดังภาพที่ 3.1

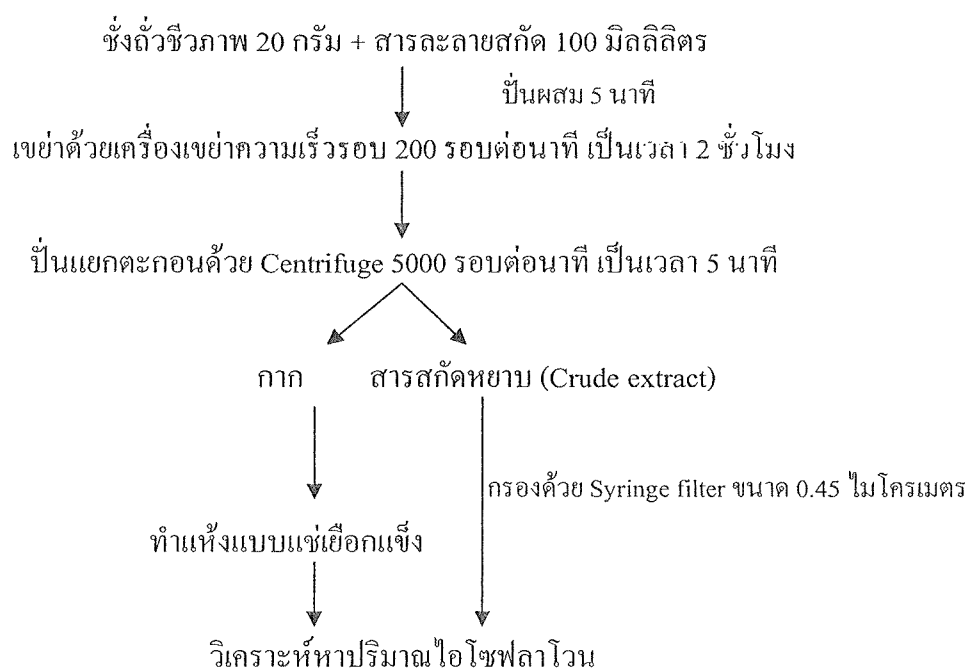


ภาพที่ 3.1 กระบวนการหมักถั่วชีวภาพที่เหมาะสม

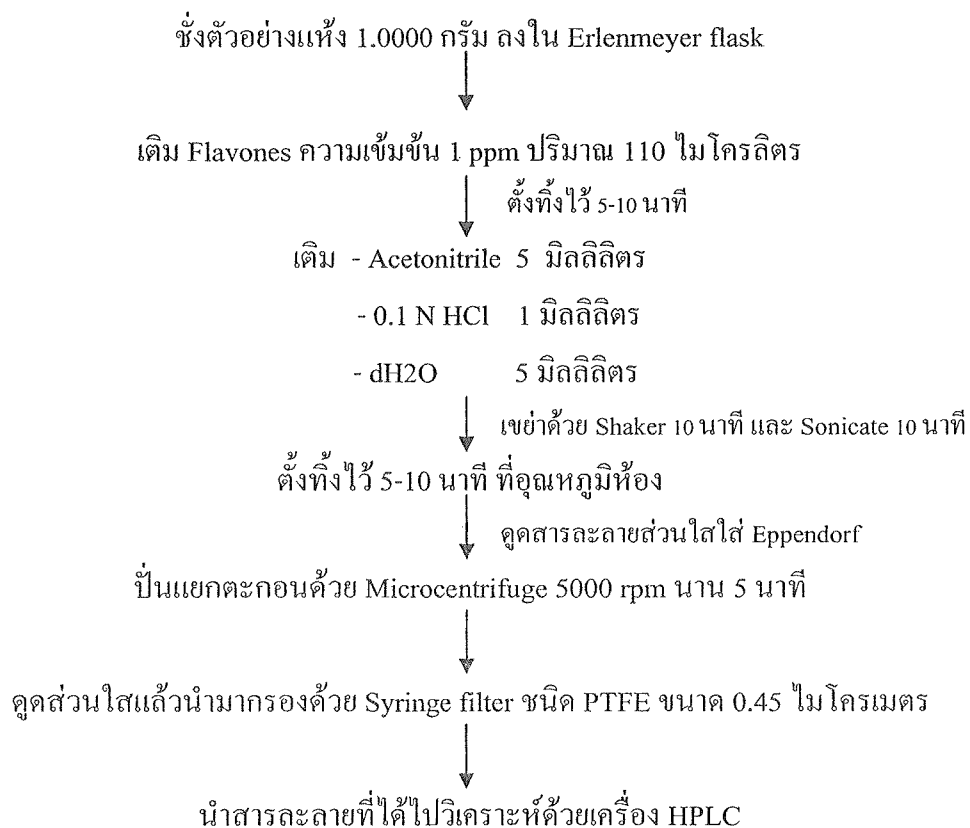
สำหรับการดำเนินการวิจัยในโครงการระยะที่ 2 นี้ จะนำถั่วชีวภาพที่ผลิตได้มาทำการศึกษาการสกัดไอโซฟลาโวนจากถั่วชีวภาพ ศึกษาการผลิตไอโซฟลาโวน แบบผงจากถั่วชีวภาพ และศึกษาความคงตัวของไอโซฟลาโวนแบบผงที่ผลิตได้ เพื่อทำนายอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ โดยมีวิธีการทดลองในการทดลองต่างๆ ดังนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาการสกัดไอโซฟลาโวนจากถั่วชีวภาพ

การทดลองนี้จะศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดไอโซฟลาโวนจากถั่วชีวภาพในลักษณะสารสกัดหยาบ (Crude extract) ได้แก่ น้ำ เอทานอล (ความเข้มข้นร้อยละ 95) เมทานอล อะซิโตน และอะซิโตนไตรัส ใช้วิธีการสกัดตามวิธีดังภาพที่ 3.2 วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) (ไพโรจน์, 2547) จากนั้นสุ่มตัวอย่างวิเคราะห์หาปริมาณไอโซฟลาโวนด้วยเครื่องโครมาโตกราฟแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatograph; HPLC) ตามวิธีของ Murphy *et al.* (2002) ดังภาพที่ 3.3



ภาพที่ 3.2 วิธีการสกัดสารสกัดหยาบ (Crude extract) จากตัวทำละลายชนิดต่างๆ



ภาพที่ 3.3 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณไอโซฟลาโวนตามวิธีของ Murphy *et al.* (2002)

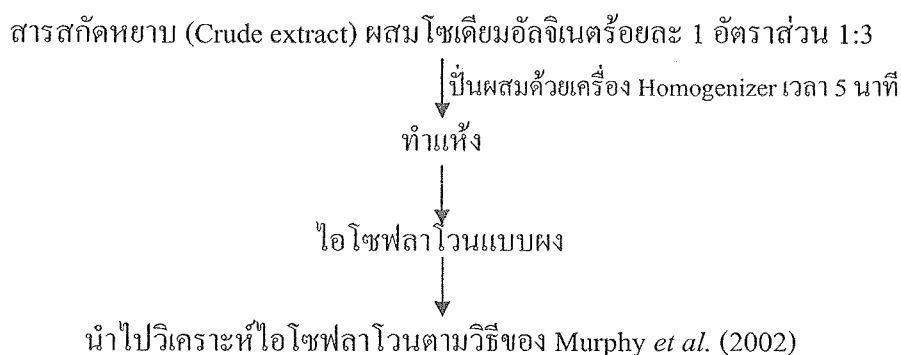
จากการทดลองนี้จะทำให้ทราบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการผลิตสารสกัดหยาบที่ได้ปริมาณของไอโซฟลาโวนมากที่สุด

การทดลองที่ 2 การศึกษาการผลิตไอโซฟลาโวนแบบผง

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตไอโซฟลาโวนแบบผงจากถั่วชีวภาพ โดยใช้กระบวนการผลิตสารสกัดหยาบที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 และนำสารสกัดไอโซฟลาโวนที่ได้มาแยกตัวทำละลายออกจากสารสกัด โดยในกรณีที่สารสกัดหยาบได้จากการใช้น้ำในการสกัดจะศึกษาวิธีการลดความชื้นที่เหมาะสม ส่วนกรณีที่ใช้กรดและตัวทำละลายในการสกัดจะศึกษาวิธีการแยกตัวทำละลายออกจากสารสกัดที่เหมาะสม

จากนั้นจะศึกษาการผลิตไอโซฟลาโวนแบบผง ซึ่งสารสกัดหยาบที่กำจัดตัวทำละลายออกแล้วจะถูกเพิ่มสัดส่วนของแข็งก่อนการทำแห้งตามวิธีของ Kao และ Chen (2007) โดยเติมโซเดียมอัลจิเนต ร้อยละ 1 ลงในสารสกัดและปั่นผสมด้วยเครื่องผสมความเร็วสูง (Homogenizer)

เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตัวอย่างจะถูกนำไปทำเป็นผงโดยเปรียบเทียบการทำแห้ง 3 วิธี คือ การอบแห้งด้วยลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส การทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dry) ที่อุณหภูมิขาเข้า 100 องศาเซลเซียส อุณหภูมิขาออก 60 องศาเซลเซียส และการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ความดัน 133×10^{-3} มิลลิบาร์ สุ่มตัวอย่างวิเคราะห์หาปริมาณไอโซฟลาโวนเหมือนการทดลองที่ 1 (ภาพที่ 3.4) จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อศึกษาความมีนัยสำคัญของผลการทดลองโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ



ภาพที่ 3.4 การผลิตไอโซฟลาโวนแบบผง

จากการทดลองนี้จะทำให้ทราบวิธีแยกสารละลายสกัดออกจากสารสกัดหยาบและทราบวิธีการผลิตไอโซฟลาโวนแบบผง ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ไอโซฟลาโวนจากถั่วชีวภาพแบบผงเพื่อใช้ในการศึกษาความคงตัวของไอโซฟลาโวนและทำนายอายุการเก็บรักษาในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 3 การศึกษาความคงตัวของไอโซฟลาโวนแบบผง

จากการทดลองศึกษาการผลิตไอโซฟลาโวนแบบผงจากถั่วชีวภาพในการทดลองที่ 2 จะมีการนำไปใช้ในการผลิตไอโซฟลาโวนแบบผง เพื่อใช้ในการศึกษาความคงตัวของไอโซฟลาโวน โดยทำการศึกษาในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 5, 15, 25, 35 และ 45 องศาเซลเซียสตามลำดับ

การทดลองนี้จะวิเคราะห์หาปริมาณไอโซฟลาโวนเหมือนการทดลองที่ 1 ในเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 เดือน จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อศึกษาความมีนัยสำคัญของผลการทดลองโดยใช้โปรแกรมทางสถิติเพื่อศึกษาความคงตัวและการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวน ระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งจะช่วยให้สามารถทำนายอายุการเก็บรักษาตลอดจนสภาวะการเก็บที่เหมาะสมได้