บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

จากการนำผลิตภัณฑ์ถั่วชีวภาพซึ่งได้จากการดำเนินโครงการผลิตไอโซฟลาโวน (ไดซีนและเจนีสทีน) จากถั่วชีวภาพ ระยะที่ 1 มาศึกษาการสกัดไอโซฟลาโวนจากถั่วชีวภาพ ศึกษาการผลิตไอโซฟลาโวนแบบผงจากถั่วชีวภาพ และศึกษาความคงตัวของไอโซฟลาโวนแบบผง ได้ผลการศึกษาดังนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาการสกัดไอโซฟลาโวนจากถั่วชีวภาพ

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาตัวทำละลายในการสกัดถั่วชีวภาพ

จากการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดไอโซฟลาโวนจากถั่วชีวภาพในลักษณะสารสกัดหยาบ (Crude extracted) ด้วยสารละลาย 5 ชนิด คือ น้ำ เอทานอล (ความเข้มข้นร้อยละ 95) เมทานอล อะซิโตน และอะซิโตไนไตรล์ เมื่อนำสารสกัดไปวิเคราะห์หาปริมาณไอโซ ฟลาโวน พบว่า การสกัดด้วยสารละลายอะซิโตนให้ปริมาณไอโซฟลาโวนรวมชนิด Glucosides และ Aglycones มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เท่ากับ 0.56 และ 18.46 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสดของถั่วเหลืองหมัก ตามลำดับ รองลงมาคือ การสกัดด้วยสารละลายอะซีโตไนไตรท์ เมทานอล และเอทานอล ตามลำดับ ส่วนการสกัดด้วยน้ำจะได้ปริมาณไอโซฟลาโวนทั้ง 2 ชนิด น้อยที่สุด (ตารางที่ 4.1) ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาของ Patricia (2002) ที่ทำการศึกษาผลของตัวทำละลายต่อการสกัดไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลือง พบว่าการใช้อะซิโตไนไตรล์ในการสกัดสารสกัดไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองนั้นจะให้ปริมาณไอโซฟลาโวนมากกว่าการใช้อะซิโตน เมทานอล และเอทานอลในการสกัด แต่เนื่องจากสารละลายอะซิโตน อะซิโตไนไตรล์ และเมทานอล เป็นสารละลายที่มีความเป็นพิษต่อร่างกาย โดยปริมาณอะซิโตนในเลือดที่ทำให้เป็นพิษคือ 200 - 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของเลือด และถ้าได้รับอะซีโตนในปริมาณ 550 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของเลือด จะทำให้เสียชีวิต ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงเลือกสารละลาย เอทานอล (ความเข้มข้นร้อยละ 95) ซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายมนุษย์เป็นตัวทำละลายในการสกัด โดยมีรายงานการศึกษาการใช้เอทานอลในการสกัดสารสกัดไอโซฟลาโวนของ Sang-Moon *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาการสกัดไอโซฟลาโวนจากจมูกถั่ว โดยใช้ เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ที่ปริมาณ ร้อยละ 80 ของปริมาณถั่วทั้งหมด พบว่าไอโซฟลาโวนที่ได้จะมีมากที่สุดเมื่อทำการสกัดที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และยังมีการศึกษาของ ผ่องศรี และคณะ (2544) ได้ทำการสกัดไอโซฟลาโวนจากกากถั่วเหลืองด้วยเอทานอล พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดไอโซฟลาโวนมากที่สุดคือ ใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 64 ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส นาน

110 นาที ซึ่งจะให้ปริมาณไอโซฟลาโวนรวม 62.23 มิลลิกรัม ต่อลิตร โดยยังพบว่า ปริมาณสารมีพิษเช่นโลหะหนักและอัลฟาทอกซินบี 1 อยู่ในเกณฑ์ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาลักษณะของสารสกัดหยาบที่ได้จากสารละลายทั้ง 5 ชนิด พบว่าสารสกัดมีกลิ่นเหม็นมาก ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อตั้งต้นที่ใช้มีการสร้างเอนไซม์โปรติเอสออกมาย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองให้โมเลกุลที่มีขนาดเล็กลงจนกระทั่งได้เป็นกรดอะมิโน จากนั้นแบคทีเรียจะใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจนและแหล่งพลังงานโดยปฏิกิริยา Deamination จะมีการปลดปล่อยแอมโมเนียออกมา (Macko and Estep, 1984) ซึ่งพบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ของเมล็ดถั่วเหลืองอยู่ในส่วนของเนื้อถั่วเหลืองมากที่สุด

ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะทำการศึกษาแหล่งของไอโซฟลาโวนชนิด Glucosides จากส่วนต่างๆของถั่วเหลืองพันธุ์ เชียงใหม่1 ได้แก่ เปลือกถั่วเหลือง เนื้อถั่วเหลือง และจมูกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่1 เพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นสำหรับผลิตไอโซฟลาโวนชนิด Aglycones

ตารางที่ 4.1 ปริมาณไอโซฟลาโวนในสารสกัดหยาบจากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสดของถั่วเหลืองหมัก)

Extracted solution	Glucosides' family (mg/100g wet weight of fermented soybean)				Aglycones' family (mg/100g wet weight of fermented soybean)			
	Daidzin	Genistin	Glycitin	Total Glucosides	Daidzein	Genistein	Glycitein	Total Aglycones
Water	ND	ND	0.39 ± 0.01^{e}	0.39 ± 0.01^{e}	0.04 ± 0.01^{d}	0.21 ± 0.03^{d}	0.27 ± 0.34^{b}	0.53 ± 0.25^{b}
Ethanol	ND	ND	0.42 ± 0.01^{d}	0.42 ± 0.01^{d}	7.85 ± 0.11^{c}	4.89 ± 0.09^{c}	0.81 ± 0.01^{a}	13.54 ± 0.20^{c}
Methanol	ND	ND	0.50 ± 0.01^{b}	0.50 ± 0.01^{b}	8.79 ± 0.24^{b}	5.45 ± 0.15^{b}	0.94 ± 0.01^{a}	15.17 ± 0.38^{b}
Acetone	ND	ND	0.56 ± 0.01^{a}	0.56 ± 0.01^{a}	10.66 ± 0.03^{a}	6.72 ± 0.03^{a}	1.08 ± 0.01^{a}	18.46 ± 0.06^{a}
Acetonitrile	ND	ND	0.44 ± 0.01^{c}	0.44 ± 0.01^{b}	8.85 ± 0.23^{b}	5.52 ± 0.15^{b}	0.86 ± 0.03^{a}	15.22 ± 0.41^{b}

หมายเหตุ: ND (not detected) หมายถึง วิเคราะห์ไม่พบ

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับข้อมูลในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่า ค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

การทดลองที่ 1.2 ศึกษาปริมาณไอโซฟลาโวนในส่วนต่างๆของจมูกถั่วเหลือง

จากการทดลองที่ 1.1 พบว่า สารสกัดหยาบที่ได้มีกลิ่นเหม็นเนื่องจากเชื้อ *Bacillus* spp. สร้างเอนไซม์โปรติเอสออกมาย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองและปลดปล่อยแอมโมเนียออกมา ดังนั้นในการทดลองนี้ทำการศึกษาปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด Glucosides ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของไอโซฟลาโวนชนิด Aglycones จากส่วนต่างๆ ของเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่1 คือ เปลือกถั่ว

เหลือง เนื้อถั่วเหลือง และจมูกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่1 โดยนำส่วนต่างๆ มาวิเคราะห์หาไอโซฟลาโวนตามวิธีของ Murphy *et al.* (2002) ได้ผลการทดลองดัง (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณไอโซฟลาโวนในส่วนต่างๆ ของถั่วเหลืองพันธุ์ เชียงใหม่ 1

Soybean	**Glucosides' family (mg/100g dry weight)**				**Aglycones' family (mg/100g dry weight)**			
	Daidzin	**Genistin**	**Glycitin**	**Total Glucosides**	**Daidzein**	**Genistein**	**Glycitein**	**Total Aglycones**
Germ	403.73±3.11[a]	71.02±1.43[a]	ND	474.75±4.54[a]	19.72±0.53[a]	3.32±0.07[a]	ND	23.04±0.59[a]
Cotyledon	9.03±0.44[b]	21.54±0.11[b]	ND	30.57±0.56[b]	1.35±1.02[b]	2.39±0.32[a]	1.25±0.39[a]	4.99±1.10[b]
Hull	7.92±0.03[c]	3.45±0.01[c]	ND	11.37±0.03[c]	0.46±0.50[b]	0.67±0.01[b]	0.45±0.06[b]	1.57±0.55[b]

หมายเหตุ: ND (not detected) หมายถึง วิเคราะห์ไม่พบ
ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับข้อมูลในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่า ค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากการศึกษาปริมาณไอโซฟลาโวนในส่วนต่างๆของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 1 พบว่า ปริมาณของไอโซฟลาโวนชนิด Glucosides ในจมูกถั่วเหลืองมีมากกว่าทั้งในส่วนของเนื้อและเปลือกถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยในจมูกถั่วเหลืองมีไอโซฟลาโวนรวมชนิด Glucosides เท่ากับ 474.75 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง เช่นดียวกับไอโซฟลาโวนรวมชนิด Aglycones พบว่าในจมูกถั่วเหลืองมีมากกว่าทั้งในส่วนของเนื้อและเปลือกถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยในจมูกถั่วเหลืองมีไอโซฟลาโวนรวมชนิด Aglycones เท่ากับ 23.04 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ดังนั้นจึงเลือกจมูกถั่วเหลืองเป็นแหล่งของไอโซฟลาโวนรวมชนิด Glucosides ในการทดลองต่อไป ซึ่งจะทำการศึกษาปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด Glucosides ในจมูกถั่วเหลืองพันธุ์ต่างๆ

การทดลองที่ 1.3 ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณไอโซฟลาโวนจากจมูกถั่วเหลืองพันธุ์ต่างๆ

จากการทดลองที่ 1.2 พบว่า จมูกถั่วเหลืองมีปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด Glucosides มากที่สุด สำหรับการทดลองนี้จะทำการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณไอโซฟลาโวน จากจมูกถั่วเหลืองที่มีการปลูกอย่างแพร่หลาย 3 พันธุ์ คือ พันธุ์ตาแดง พันธุ์เชียงใหม่1 และพันธุ์เชียงใหม่60 โดยศึกษาปริมาณไอโซฟลาโวนตามวิธีของ Murphy *et al.* (2002) ซึ่งได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ปริมาณไอโซฟลาโวนในจมูกถั่วเหลืองพันธุ์ต่างๆ

Varities of soygerm	Glucosides' family (mg/100g dry weight of soygerm)				Aglycones' family (mg/100g dry weight of soygerm)			
	Daidzin	Genistin	Glycitin	Total Glucosides	Daidzein	Genistein	Glycitein	Total Aglycones
Tadang	570.98±13.76[a]	155.23±2.26[a]	356.68±10.01[a]	1,082.89±26.03[a]	104.60±3.08[a]	29.52±0.72[a]	26.96±0.97[a]	161.08±4.76[a]
Chiangmai60	334.04±4.38[c]	75.76±0.38[b]	188.12±2.02[b]	597.93±6.78[b]	26.24±0.63[b]	6.96±0.31[b]	7.85±1.25[b]	41.05±2.20[b]
Chiangmai1	404.90±1.66[b]	71.59±0.80[b]	ND	476.48±2.45[c]	19.90±0.26[c]	3.51±0.28[c]	2.48±3.50[b]	25.89±4.04[c]

หมายเหตุ: ND (not detected) หมายถึง วิเคราะห์ไม่พบ

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับข้อมูลในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่า ค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.3 พบว่า ปริมาณไอโซฟลาโวนรวมทั้งชนิด Glucosides และ Aglyconesในจมูกถั่วเหลืองพันธุ์ตาแดงมีปริมาณมากกว่าในพันธุ์เชียงใหม่ 60 และ พันธุ์เชียงใหม่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีไอโซฟลาโวนรวมชนิด Glucosides และ Aglycones 1,082.89 และ 161.08 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้น จึงเลือกจมูกถั่วเหลืองพันธุ์ตาแดงเป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักเพื่อผลิตไอโซฟลาโวนในการทดลองต่อไปโดย Arthur et al. (1983) กล่าวว่า ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ในถั่วเหลืองแปรผันตามสายพันธุ์จาก 116 ถึง 309 มิลลิกรัมต่อลิตร และแปรเปลี่ยนตามพื้นที่การเพาะปลูกจาก 46 ถึง 195 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นกับภูมิอากาศในแต่ละปี

การทดลองที่ 1.4 การศึกษาปริมาณไอโซฟลาโวนจากสารสกัดหยาบ

จากการทดลองที่ 1.3 พบว่า จมูกถั่วเหลืองพันธุ์ตาแดงมีปริมาณไอโซฟลาโวนรวมชนิด Glucosides และ Aglycones มากที่สุด สำหรับการทดลองนี้จะใช้จมูกถั่วเหลืองพันธุ์ตาแดงเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการหมักดังภาพที่ 4.1 จากนั้นนำจมูกถั่วชีวภาพที่ได้มาทำการสกัดไอโซฟลาโวนโดยใช้สารละลายเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 แล้วนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.4

จมูกถั่วเหลืองพันธุ์ตาแดง นึ่งด้วยไอน้ำนาน 3 ชั่วโมง

↓

ใส่ถุงร้อนทันทีและรอจนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง

↓

นำเชื้อ *Bacillus subtilis* CR01, *Bacillus subtilis* NATTOA02, *Bacillus coagulans* PR03 และ *Bacillus megaterium* PY03 ชนิดละร้อยละ 9 ของจมูกถั่วเหลืองต้มสุก

↓

เติมอากาศและปิดจุกสำลี

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 120 ชั่วโมง

↓

จมูกถั่วชีวภาพ (จมูกถั่วเหลืองหมัก)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ภาพที่ 4.1 กระบวนการหมักจมูกถั่วชีวภาพหรือจมูกถั่วเหลืองหมัก

ตารางที่ 4.4 ปริมาณไอโซฟลาโวนในสารสกัดหยาบจากจมูกถั่วชีวภาพ (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสดของสารสกัดหยาบ)

Glucosides' family (mg/100g wet weight of crude extract)				Aglycones' family (mg/100g wet weight of crude extract)			
Daidzin	Genistin	Glycitin	Total Glucosides	Daidzein	Genistein	Glycitein	Total Aglycones
4.69±1.47	0.35±0.69	10.00±0.87	15.03±2.99	358.23±3.73	94.05±0.93	233.01±2.02	685.29±4.18

ตารางที่ 4.4 พบว่า ปริมาณไอโซฟลาโวนรวมชนิด Glucosides และ Aglycones ที่สกัดได้มีค่าเท่ากับ 15.03 และ 685.29 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสดของสารสกัดหยาบ ซึ่งไอโซฟลาโวนรวมชนิด Aglycones ที่สกัดได้เป็นชนิดที่สนใจในการศึกษาครั้งนี้ และเมื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณในหน่วยต่อน้ำหนักของจมูกถั่วเหลืองหมักเพื่อหาร้อยละผลผลิตของปริมาณไอโซฟลาโวนรวมชนิด Aglycones ในสารสกัดหยาบเทียบกับจมูกถั่วเหลืองหมัก พบว่า จมูกถั่วเหลืองหมักและสารสกัดหยาบมีปริมาณไอโซฟลาโวนรวมชนิด Aglycones เท่ากับ 233.58 และ 170.34 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม จมูกถั่วเหลืองหมัก ดังนั้นปริมาณไอโซฟลาโวนรวมชนิด Aglycones ที่สกัดได้จากจมูกถั่วเหลืองหมักโดยใช้สารละลายเอทานอล คิดเป็นร้อยละ 72.93 (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 ปริมาณร้อยละผลผลิตของการสกัดจมูกถั่วเหลืองหมักด้วยเอทานอล (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสดของจมูกถั่วเหลืองหมัก)

Sample type	Aglycones' family (mg/100g wet weight of fermented soygerm)			
	Daidzein	Genistein	Glycitein	Total Aglycones
Fermented soygerm	151.89	38.17	43.52	233.58
Crude extract	106.69	27.34	21.81	170.34
Yield (%)	**70.24**	**71.63**	**50.11**	**72.93**

จากการทดลองที่ 1 สามารถสรุปได้ว่า วัตถุดิบที่เหมาะสมในการหมักเพื่อใช้ผลิตไอโซฟลาโวน คือ จมูกถั่วเหลืองพันธุ์ตาแดง สารละลายที่เหมาะสมในการสกัดไอโซฟลาโวนจากจมูกถั่วเหลืองหมัก คือ สารละลายเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยร้อยละของไอโซฟลาโวนชนิด Aglycones ในสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดจมูกถั่วเหลืองหมัก เท่ากับ ร้อยละ 72.93 และมีกระบวนการผลิตสารสกัดที่เหมาะสมดังภาพที่ 4.2

จมูกถั่วเหลืองหมัก 20 กรัม ผสมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

↓ ปั่นผสมด้วยเครื่อง Homogenizer เวลา 5 นาที

เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

↓

ปั่นแยกตะกอนด้วย Centrifuge 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

↓

สารสกัดหยาบในสารละลายเอทานอล (สารละลายสีเหลืองใส)

ภาพที่ 4.2 วิธีการสกัดไอโซฟลาโวนจากจมูกถั่วเหลืองด้วยเอทานอล

การทดลองที่ 2 การศึกษาการผลิตไอโซฟลาโวนแบบผง

ในการทดลองนี้จะทำการศึกษาการผลิตไอโซฟลาโวนแบบผงจากจมูกถั่วชีวภาพ โดยใช้สารสกัดหยาบที่ผลิตได้จากการทดลองที่ 1 มาแยกตัวทำละลายออกจากสารสกัด ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้คือ สารละลายเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 ซึ่งเป็นสารระเหยง่ายมีความดันไอสูง ดังนั้นการแยกสารละลายเอทานอลออกจากสารสกัดหยาบจะใช้วิธีการระเหยภายใต้สุญญากาศ

(Evaporation) ที่ความดัน 175 มิลลิบาร์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Buchi-R2, Switzerland) จะได้สารสกัดไอโซฟลาโวน จากนั้นนำสารสกัดที่แยกสารละลายเอทานอลออกแล้วมาผลิตไอโซฟลาโวนแบบผงและนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไอโซฟลาโวน ตามกระบวนการดังภาพที่ 3.4

จากการทดลองผลิตไอโซฟลาโวนแบบผง โดยเปรียบเทียบวิธีการทำแห้ง 3 วิธี คือ การอบแห้งด้วยลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dry) ที่อุณหภูมิขาเข้า 100 องศาเซลเซียส อุณหภูมิขาออก 60 องศาเซลเซียส และการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ความดัน $133x10^{-3}$ มิลลิบาร์ พบว่า วิธีการอบแห้งด้วยลมร้อนและการทำแห้งแบบพ่นฝอยไม่สามารถผลิตไอโซฟลาโวนชนิดผงได้ โดยการอบแห้งด้วยลมร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวอย่าง ไอโซฟลาโวนที่ได้ยังมีความชื้น มีสีน้ำตาลและมีกลิ่นเหม็นเนื่องจากใช้ระยะเวลาการอบนาน ส่วนการทำแห้งแบบพ่นฝอย ตัวอย่างไอโซฟลาโวนที่ได้มีสีน้ำตาลเข้ม มีการสูญเสียตัวอย่างเนื่องจากการอุดตันของหัวพ่น ดังนั้นสำหรับการทดลองนี้จึงเลือกวิธีการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งมาใช้ในการผลิตไอโซฟลาโวนแบบผง จากนั้นจึงนำไอโซฟลาโวนแบบผงมาวิเคราะห์หาปริมาณไอโซ ฟลาโวน ได้ผลดังตารางที่ 4.6 และมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด Aglycones ระหว่างกระบวนการผลิต ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.6 ปริมาณไอโซฟลาโวนในไอโซฟลาโวนแบบผงที่ผลิตโดยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งของไอโซฟลาโวนแบบผง)

Glucosides' family (mg/100g wet weight of isoflavone powder)				Aglycones' family (mg/100g wet weight of isoflavone powder)			
Daidzin	Genistin	Glycitin	Total Glucosides	Daidzein	Genistein	Glycitein	Total Aglycones
26.03±0.04	8.61±12.37	20.93±0.32	55.56±12.46	2371.32±77.76	486.96±22.30	556.52±36.27	3,414.80±136.32

ตารางที่ 4.6 พบว่า ในไอโซฟลาโวนแบบผง 100 กรัม จะมีไอโซฟลาโวนรวมชนิด Aglycones 3,414.80 มิลลิกรัม แต่พบไอโซฟลาโวนรวมชนิด Glucosides เพียง 55.56 มิลลิกรัม ซึ่งมีปริมาณที่น้อยมาก ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้กระบวนการหมักจมูกถั่วเหลืองผลิตเอนไซม์ β-glucosidase ย่อยสลายพันธะของไอโซฟลาโวนชนิด Glucosides ทำให้โครงสร้างเป็นไอโซฟลาโวนชนิด Aglycones ซึ่งจะมีผลทำให้ไอโซฟลาโวนสามารถถูกดูดซึมผ่านระบบทางเดินอาหารได้อย่างรวดเร็วมากกว่าชนิด Glucosides (Setchell, 2000)

ตารางที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด Aglycones ในจมูกถั่วเหลืองหมัก สารสกัดหยาบ และไอโซฟลาโวนแบบผงที่ผลิตโดยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

Sample type	Initial weight (g)	Aglycones' family			
		Daidzein	Genistein	Glycitein	Total Aglycones
Fermented soygerm (mg/100 g wet weight of fermented soygerm)	100	78.93	16.21	18.52	113.66
Isoflavones extract (mg/100 g wet weight of isoflavones extract)	60	131.55	27.01	30.87	189.43
Isoflavone powder (mg/100 g dry weight of isoflavone powder)	5.55	2,371.32	486.96	556.52	3,414.80

ตารางที่ 4.7 พบว่า น้ำหนักเริ่มต้นจากจมูกถั่วเหลืองหมัก 100 กรัม เมื่อนำมาสกัดด้วยสารละลายเอทานอลและทำการระเหยสารละลายเอทานอลออกจะได้ปริมาณสารสกัดไอโซฟลาโวน 60 กรัม จากนั้นเมื่อนำสารสกัดมาผลิตไอโซฟลาโวนแบบผงจะได้ปริมาณไอโซฟลาโวนแบบผง 5.55 กรัม หรือคิดเป็นร้อยละ 5.55 ของจมูกถั่วเหลืองหมัก โดยไอโซฟลาโวนแบบผงประกอบด้วยไอโซฟลาโวนชนิด Aglycones ได้แก่ Daidzein, Genistein, Glycitein และ Aglycones รวมเท่ากับ 2,371.32, 486.96, 556.52 และ 3,414.80 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสดของจมูกถั่วเหลืองหมัก ตามลำดับ และสามารถสรุปวิธีการผลิตไอโซฟลาโวนแบบผงได้ดังภาพที่ 4.3

สารสกัดไอโซฟลาโวน (Isoflavones extract) ผสมโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1 อัตราส่วน 1:3

↓ ปั่นผสมด้วยเครื่อง Homogenizer เวลา 5 นาที

ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry)

ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ความดัน 133x10^{-3} มิลลิบาร์

↓

ไอโซฟลาโวนแบบผง

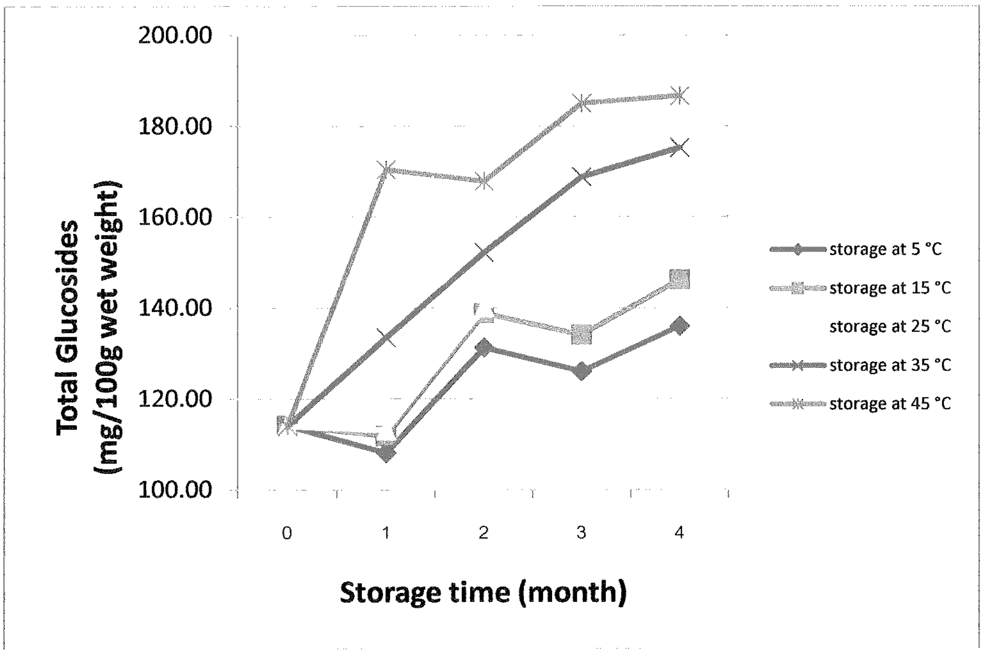
ภาพที่ 4.3 การผลิตไอโซฟลาโวนแบบผงโดยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

การทดลองที่ 3 การศึกษาความคงตัวของไอโซฟลาโวนแบบผง

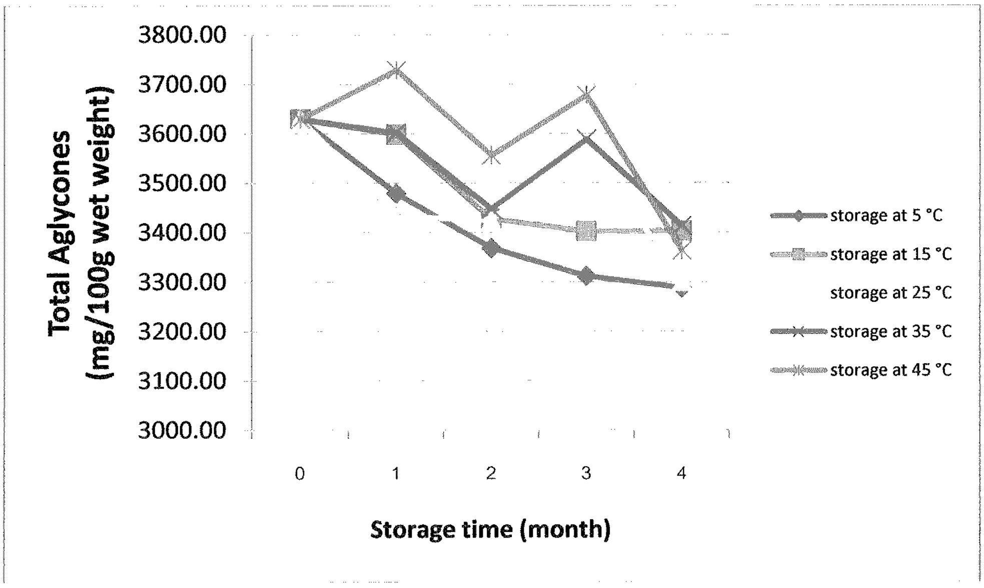
จากการศึกษาความคงตัวของไอโซฟลาโวนแบบผง โดยทำการผลิตไอโซฟลาโวนแบบผง ตามวิธีการผลิตดังภาพที่ 4.1, 4.2 และ 4.3 จากนั้นนำไอโซฟลาโวนแบบผงที่ผลิตได้มาบรรจุในถุงอะลูมิเนียมฟลอยด์ ขนาดบรรจุ 2.5 กรัม นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5, 15, 25, 35 และ 45 เป็นเวลา 4 เดือน และทำการสุ่มตัวอย่างเดือนที่ 0, 1, 2, 3 และ 4 มาวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด Glucosides และ Aglycones ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาได้ผลดังตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.4-4.5 ตามลำดับ โดยพบว่า เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นแนวโน้มของปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด Glucoside จะเพิ่มขึ้นตามไปด้วยในทุกอุณหภูมิแต่ที่อุณหภูมิ 35 และ 45 องศาเซลเซียสมีอัตราการเพิ่มที่มากกว่าในอุณหภูมิอื่นๆ ทั้งนี้อาจเนื่องจากความร้อนในการเก็บรักษามีผลทำให้ปริมาณ β-glucoside ของไอโซฟลาโวนรวมเพิ่มขึ้น (Wang and Murphy, 1996) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Marcia (2005) ที่ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อคุณสมบัติของไอโซฟลาโวนใน soy protein isolate พบว่าที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสนาน 1 ปี ในการเก็บรักษา soy protein isolate มีผลทำให้ปริมาณ β-glucoside และ Acetylglucoside เพิ่มสูงขึ้น แต่ในทางกลับกันปริมาณ malonylglucoside กลับลดลง โดย Coward et al. 1998 กล่าวว่า ความร้อนจะไม่สามารถทำให้ปริมาณไอโซฟลาโวนเพิ่มหรือลดได้ แต่ความร้อนจะสามมารถเปลี่ยนคุณสมบัติของไอโซฟลาโวนได้ และความร้อนปริมาณที่น้อยมากก็สามารถเปลี่ยนรูปของไอโซฟลาโวนจาก malonylglucoside ให้กลายเป็น β-glucoside (Murphy, 1996) ซึ่งจากเหตุผลข้างต้นนี้อาจส่งผลให้การทดลองนี้มีปริมาณ Glucoside ที่วิเคราะห์ได้เพิ่มขึ้นเมื่อมีอุณหภูมิ และเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.8 ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด Glucosides และ Aglycones ที่เปลี่ยนแปลงของระหว่างการเก็บรักษาในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 5, 15, 25, 35 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งของไอโซฟลาโวนแบบผง)

Varities of soygerm		Glucosides' family (mg/100g dry weight of isoflavones powder)				Aglycones' family (mg/100g dry weight of isoflavones powder)			
Temperature (Celsius)	Time (Month)	Daidzin	Genistin	Glycitin	Total Glucosides	Daidzein	Genistein	Glycitein	Total Aglycones
5	0	70.25	13.11	30.77	114.13	2432.04	661.13	536.61	3,629.78
	1	41.00	0.00	67.14	108.15	2320.18	610.30	548.92	3,460.65
	2	49.02	12.42	69.90	131.33	2221.36	611.21	536.30	3,368.87
	3	47.67	11.08	67.32	126.08	2336.72	524.31	451.11	3,670.54
	4	57.25	11.66	67.11	136.02	2254.04	524.36	557.13	3,662.11
15	0	70.25	13.11	30.77	114.13	2432.04	661.13	536.61	3,629.78
	1	41.60	0.00	70.28	111.88	2388.72	623.03	586.67	3,536.58
	2	52.28	13.59	73.01	138.89	2266.02	623.91	538.19	3,428.12
	3	51.01	13.71	69.40	134.12	2392.58	476.53	470.26	3,500.02
	4	61.60	12.73	71.96	146.29	2341.87	538.60	598.38	3,519.70
25	0	70.25	13.11	30.77	114.13	2432.04	661.13	536.61	3,629.78
	1	42.42	0.00	70.76	113.17	2300.18	592.10	540.55	3,442.04
	2	52.01	14.59	73.62	140.22	2290.24	616.04	519.30	3,425.58
	3	54.62	16.04	77.52	148.18	2502.88	550.08	509.97	3,488.24
	4	63.23	14.85	72.72	150.80	2319.21	526.18	536.76	3,464.07
35	0	70.25	13.11	30.77	114.13	2432.04	661.13	536.61	3,629.78
	1	48.71	7.65	77.17	133.53	2393.76	619.99	588.06	3,596.50
	2	57.35	18.39	76.51	152.25	2323.88	609.50	514.60	3,447.98
	3	62.22	22.15	84.49	168.85	2484.06	557.18	547.96	3,451.95
	4	73.78	21.59	79.87	175.24	2393.46	527.51	591.23	3,476.15
45	0	70.25	13.11	30.77	114.13	2432.04	661.13	536.61	3,629.78
	1	57.23	25.04	88.20	170.48	2532.04	641.59	632.60	3,825.40
	2	65.71	24.79	77.44	167.94	2403.50	611.59	541.37	3,556.45
	3	68.95	29.19	86.92	185.05	2596.92	539.27	541.54	3,498.81
	4	80.27	27.44	78.96	186.67	2410.42	508.13	588.32	3,449.96



ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด Glucosides ระหว่างการเก็บรักษาในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 5, 15, 25, 35 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน

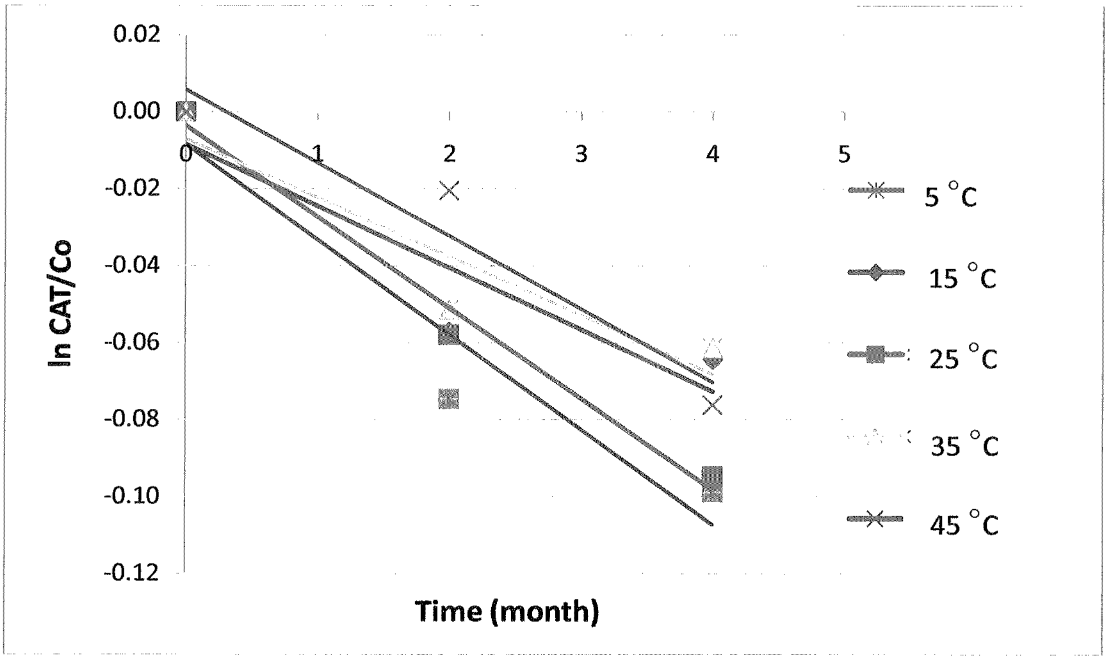


ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด Aglycones ระหว่างการเก็บรักษาในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 5, 15, 25, 35 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน

ตารางที่ 4.9 ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด Aglycones ในไอโซฟลาโวนแบบผงที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 5, 15, 25, 35 และ 45 องศาเซลเซียส (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งของไอโซฟลาโวนแบบผง)

Temperature	**Time (Month)**				
(°C)	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**
5	3,629.78	3,460.65	3,368.87	3,670.54	3,662.11
15	3,629.78	3,536.58	3,428.12	3,500.02	3,519.70
25	3,629.78	3,442.04	3,425.58	3,488.24	3,464.07
35	3,629.78	3,596.50	3,447.98	3,451.95	3,476.15
45	3,629.78	3,825.40	3,556.45	3,498.81	3,449.96

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.9 เมื่อนำผลการทดลองสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไอโซฟลาโวนกับเวลาเพื่อหาอันดับของปฏิกิริยา พบว่า อัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด Aglycones ในไอโซฟลาโวนแบบผงเป็นปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง (n=1) คือ มีการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของสารตั้งต้นกับเวลาเป็นแบบ Logarithmic ดังภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่าง ln C_{At}/Co กับเวลา t

จากภาพที่ 4.6 จะเห็นว่า อัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด Aglycones ในไอโซฟลาโวนแบบผงเป็นปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง (n=1) ดังนั้นจึงสามารถหาอัตราเร็วของปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวนรวมชนิด Aglycones รวมของผลิตภัณฑ์ หรือค่า k ได้จากสมการของ Arrhenius ดังนี้

$$\ln (C_{At} / C_{A0}) = -kt$$

เมื่อ C_{At} = ปริมาณไอโซฟลาโวนที่เวลา t

C_{A0} = ปริมาณไอโซฟลาโวนเริ่มต้น

t = ระยะเวลา

k = อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิใดๆ

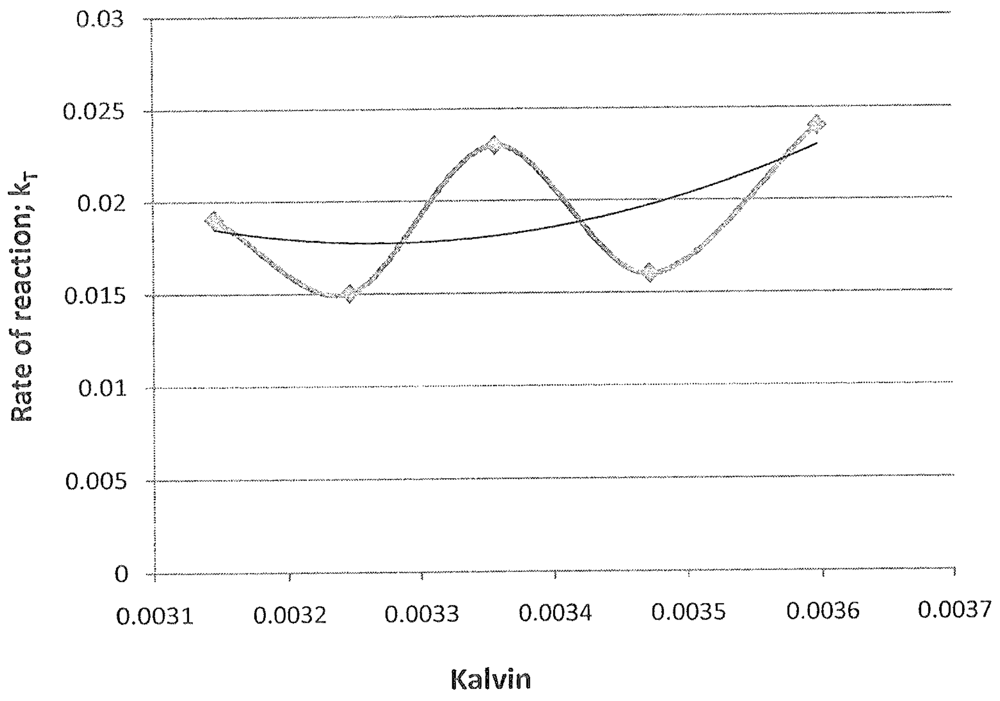
จากสมการของปฏิกิริยาอันดับหนึ่งข้างต้น ค่าความชันของกราฟแสดงถึงอัตราเร็วของปฏิกิริยา หรือค่า k โดยเครื่องหมายลบ (-) แสดงถึงทิศทางของปฏิกิริยาที่ลดลง สำหรับสมการของปฏิกิริยาอันดับหนึ่งของการเก็บรักษาแต่ละอุณหภูมิเป็นดังนี้

ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส	Y= -0.024x-0.008	R^2=0.920
ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส	Y= -0.016x-0.008	R^2=0.832
ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	Y= -0.023x-0.003	R^2=0.983
ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	Y= -0.015x-0.006	R^2=0.867
ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	Y= -0.019x-0.005	R^2=0.933

ดังนั้นสามารถสรุป อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างๆ (k_T) ได้ดังตารางที่ 4.10 และนำค่า k ที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า k กับอุณหภูมิ$^{-1}$ ในหน่วยองศาเคลวินได้ดังภาพที่ 4.7

ตารางที่ 4.10 อัตราเร็วของปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด Aglycones ที่อุณหภูมิต่างๆ

Storage temperature		Rate of reaction (k_T)
Degree Celsius	**Kelvin**	
5	278	0.024
15	288	0.016
25	298	0.023
35	308	0.015
45	318	0.019



ภาพที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วของปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด Aglycones ที่อุณหภูมิต่างๆ

จากภาพที่ 4.7 แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วปฏิกิริยา และการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวนรวมชนิด Aglycones ที่อุณหภูมิต่างๆ และมีสมการถดถอย ดังนี้

$$k = 48,922(T)^2 - 319.8(T) + 0.540$$

เมื่อ k = อัตราเร็วของปฏิกิริยา

T = อุณหภูมิในหน่วยองศาเคลวิน

สมการที่ได้จะถูกใช้คาดคะเนอัตราเร็วของปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวน โดยแทนค่าอุณหภูมิที่ต้องการทราบอายุการเก็บรักษา จากนั้นนำค่า k ที่คำนวณได้แทนค่าลงในสมการของ Arrhenius ดังนี้

$$\text{Ln}\,(C_{At} / C_{A0}) = -kt$$

โดยดัชนีบ่งชี้การเสื่อมคุณภาพจะกำหนดปริมาณไอโซฟลาโวนรวมชนิด Aglycones ที่ยอมรับได้ คือ เหลือร้อยละ 70 จากปริมาณเริ่มต้น ดังนั้นจากตาราง 4.9 ไอโซฟลาโวนแบบผงมีปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด Aglycones เริ่มต้น (C_{A0}) เท่ากับ 3,629.78 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง และมี Reject point (C_{At}) ที่ร้อยละ 70 เท่ากับ 2,540.85 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง

ผลการศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ พบว่า การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไอโซฟลาโวนแบบผงจะมีอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ ดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 อายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์สารสกัดไอโซฟลาโวนแบบผงที่อุณหภูมิต่างๆ

Storage temperature (celsius)	k	Storage time (Month)
5	0.023	15.74
15	0.019	18.38
25	0.018	20.10
35	0.017	20.51
45	0.018	19.68

จากตารางที่ 4.11 พบว่า ไอโซฟลาโวนแบบผงที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสมีอายุการเก็บรักษาที่น้อยที่สุด คือ 15.74 เดือน และตามด้วยอุณหภูมิการเก็บรักษาที่ 15 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยอุณหภูมิที่สามารถเก็บรักษาไอโซฟลาโวนแบบผงได้ดีที่สุดคือ ที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเก็บได้นาน 20 เดือนกับ 3 วัน และ 20 เดือนกับ 15 วัน ตามลำดับ สอดคล้องกับ Hau and Chang (2002) ศึกษาการเปลี่ยนรูปของไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองที่มีผลมาจากการเก็บรักษา พบว่าสภาวะการเก็บรักษาที่ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 84 และอุณหภูมิ 30องศาเซลเซียสมีผลทำให้ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด Aglycones มีค่ามากกว่า Glucosides แต่ปริมาณ Glucoside ยังมีปริมาณที่เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 12 เป็นร้อยละ 31 ภายในระยะเวลาในการเก็บรักษา 18 เดือน ทั้งนี้กระบวนการเปลี่ยนรูปของไอโซฟลาโวนจาก Glucosidess กลายเป็น Aglycones นั้นต้องอาศัยเอนไซม์ในการทำปฏิกริยา คือ β-glucosidase ซึ่ง Pandjaitan et al. (2000) กล่าวว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษา แป้งถั่วเหลืองเพื่อไม่ให้ β-glucosidase เสียสภาพ คือต้องเก็บไว้ในอุณหภูมิค่อนข้างสูง ประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส