



รายงานการวิจัย

การผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนจากถั่วชีวภาพ ระยะที่ 3:
การออกแบบระบบถังหมักชีวภาพเพื่อผลิตไอโซฟลาโวนโดยเทคโนโลยี
เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

**Isoflavones Aglycones Production from Biobean, 3rd phase:
The Bioreactor Design for Isoflavones Production by Using Starter
Culture Technology**

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. ไพโรจน์ วรรณจารี

ดร.ศักดา พริงลำภู

นาย เรวัตร์ พงษ์พิสุทธินันท์

นางโพธิ์ศรี ลีลาภักดิ์

นายสุภกิจ ไชยพุด

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2556

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคโนจากจมูกถั่วเหลืองหมัก ออกแบบระบบถังหมักชีวภาพที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคโน ตลอดจนศึกษาการสกัดและการผลิตไอโซฟลาโวนบริสุทธิ์ที่ผลิตจากระบบถังหมักชีวภาพที่ออกแบบได้

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคโนจากจมูกถั่วเหลืองหมักพบว่า ลักษณะของจมูกถั่วเหลืองก่อนหมัก ปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ปริมาณอากาศในการหมัก และอุณหภูมิในการหมัก มีผลต่อปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคโนในจมูกถั่วเหลืองหมักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยจมูกถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการบดมีความเหมาะสมใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคโนได้มากกว่าการใช้จมูกถั่วเหลืองที่ผ่านการบด สำหรับการศึกษาปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ที่เหมาะสม พบว่า ปริมาณเชื้อที่ร้อยละ 15 จะให้ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคโนมากที่สุดเท่ากับ 1,498.52 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง สำหรับปริมาณอากาศที่เหมาะสมในการหมัก พบว่า ปริมาณอากาศที่ 6 ลิตรต่อนาที โดยให้ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคโนสูงสุดที่ 1,172.83 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง และการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมัก พบว่า ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคโนรวมมากที่สุดเท่ากับ 1,521.39 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง

การออกแบบระบบถังหมักชีวภาพเพื่อผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคโน ประกอบด้วย บั้มอากาศ เครื่องวัดปริมาณอากาศ แผ่นกรองอากาศขนาด 0.2 ไมโครเมตร ท่ออากาศ เครื่องหมุนด้วยความเร็วรอบต่ำ และถังหมักชีวภาพแบบแนวนอนผลิตจากเหล็กปลอดสนิม ปริมาตรถัง 46 ลิตร ปริมาตรผลิต 15 ลิตร สามารถผลิตโดยใช้จมูกถั่วเหลืองตั้งต้นประมาณ 7 กิโลกรัม สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคโนของเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ในระบบถังหมักชีวภาพ พบว่า มีอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อจุลินทรีย์ (μ) ในระหว่างการหมักเท่ากับ 0.095 ต่อชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสระหว่างการหมักสูงสุดเท่ากับ 2.7 มิลลิยูนิตต่อกรัม และมีอัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคโน ($q_{\text{total aglycones}}$) เท่ากับ 12.07 mg \cdot hr⁻¹ ต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง โดยระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตไอโซฟลาโวนด้วยระบบถังหมักชีวภาพ เท่ากับ 96 ชั่วโมง

การศึกษากการสกัดและการผลิตไอโซฟลาโวนบริสุทธิ์ที่ผลิตจากระบบถังหมักชีวภาพพบว่า ความเข้มข้นของเอทานอลในกระบวนการสกัดที่เหมาะสม คือ ร้อยละ 80 ซึ่งได้ปริมาณ

ก

ไอโซฟลาโวนเท่ากับ 394.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารสกัดเอทานอล และเรซินที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตไอโซฟลาโวนบริสุทธิ์ คือ Amberlite XAD-4 โดยมีร้อยละของผลผลิตและร้อยละความบริสุทธิ์เท่ากับ 53.66 และ 31.00 ตามลำดับ

ABSTRACT

The objectives of this research were to investigate the factors which had effect on isoflavone aglycone produced from fermented soy germ, to design the optimal bioreactor for isoflavone aglycone production including to determine the extraction and purification of isoflavone aglycone produced from the bioreactor.

Regarding the factors which had effect on isoflavone aglycone production from fermented soy germ, the results showed that the appearance of soy germ before fermentation, the amount of *Bacillus coagulans* PR03, the air quantity in fermentation and temperature during fermentation affected on the quantities of isoflavone aglycone significantly ($p \leq 0.05$). The non crushed soy germ was suitable in using as raw material in fermentation due to bacteria could produce more isoflavone aglycone than crushed soy germ. For the optimization of *Bacillus coagulans* PR03, it was found that 15% of *Bacillus coagulans* PR03 produced the most amount of isoflavone aglycone (1,498.52 mg/100 g dry weight). Regarding the optimization of aeration quantity in fermentation, the results showed that using the air quantity of 6 liter per minutes could produce the highest level of isoflavone aglycone (1,172.83 mg/100g dry weight). While the temperature during fermentation of 35°C could produce the highest level of total isoflavone aglycone (1,521.39 mg/ 100g dry weight).

The designed bioreactor consisted of the following parts: an air pump, air flow meter, a 0.2 µm air filter, air pipe, a slow speed rotor including a 46 liters horizontal bioreactor tank made of stainless steel with 15 liters working volume which had capacity of 7 kgs soy germ. The efficiency of isoflavone aglycone by *Bacillus coagulans* PR03 in such bioreactor was determined. It was founded that the growth rate of bacteria during fermentation was 0.095 per hour. The highest β-glucosidase activity was 2.7mU/g. The changing rate of isoflavone aglycone ($q_{\text{totalaglycones}}$) was 12.07 mg·ml·hr⁻¹·CFU⁻¹/100g dry weight, whereas the optimal time for isoflavone production was 96 hours.

The extraction and purification of isoflavone produced by using such bioreactor were also determined. It was found that the optimal ethanol extraction concentration was 80% with the extraction yield of 394.30 mg isoflavone / ml ethanol. The optimal resin for isoflavone purification was Amberlite XAD-4 with the yield and purification percentages of 53.66% and 31.00%, respectively.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
บทที่ 2 การทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย วัตถุประสงค์ และอุปกรณ์	15
วัตถุประสงค์และอุปกรณ์	15
วิธีการทดลอง	18
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	26
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	54
บรรณานุกรม	55
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก. การวิเคราะห์	61
ภาคผนวก ข. ภาพประกอบที่เกี่ยวข้อง	68

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
2.1	องค์ประกอบของถั่วเหลือง	3
2.2	ปริมาณของไอโซฟลาโวนในอาหารตามธรรมชาติ	5
2.3	เชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ที่ตรวจพบในถั่วเหลืองหมักที่บ้านของไทย	11
4.1	ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนในจมูกถั่วเหลืองหมัก	26
4.2	ร้อยละการเปลี่ยนแปลงของไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน	27
4.3	ผลของปริมาณเชื้อ <i>Bacillus coagulans</i> PR03 ที่ได้รับต่อการผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนในจมูกถั่วเหลืองหมัก	28
4.4	ปริมาณค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากการได้รับปริมาณเชื้อ <i>Bacillus coagulans</i> PR03 ที่แตกต่างกัน	28
4.5	ปริมาณเชื้อ <i>Bacillus coagulans</i> PR03 ในจมูกถั่วเหลืองหมักที่นับได้ในการได้รับปริมาณเชื้อ <i>Bacillus coagulans</i> PR03 ที่ต่างกัน	29
4.6	ผลของปริมาณอากาศต่อการผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนในจมูกถั่วเหลืองหมัก	30
4.7	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในจมูกถั่วเหลืองหมักที่ได้รับปริมาณอากาศแตกต่างกัน	31
4.8	ปริมาณเชื้อ <i>Bacillus coagulans</i> PR03 ในจมูกถั่วเหลืองหมักที่นับได้ในการได้รับปริมาณเชื้อ <i>Bacillus coagulans</i> PR03 ที่ต่างกัน	31
4.9	ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนจากจมูกถั่วเหลืองหมักที่ระดับอุณหภูมิในการหมักต่างๆ	32
4.10	ปริมาณเชื้อ <i>Bacillus coagulans</i> PR03 ในจมูกถั่วชีวภาพที่ช่วงเวลาต่างๆ	37
4.11	ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนในจมูกถั่วเหลืองหมัก ณ เวลาต่างๆ	41
4.12	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในแต่ละช่วงเวลา	47
4.13	ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนจากการสกัดด้วยเอทานอล	48

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.14 ร้อยละความบริสุทธิ์ของสารสกัดไอโซฟลาโวนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เรซินชนิด Diaion HP-20	49
4.15 ร้อยละความบริสุทธิ์ของสารสกัดไอโซฟลาโวนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เรซินชนิด Amberlite XAD-4	50
4.16 ร้อยละความบริสุทธิ์ของสารสกัดไอโซฟลาโวนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เรซินชนิด Amberlite XAD-7HP	51
4.17 ร้อยละความบริสุทธิ์ของสารสกัดไอโซฟลาโวนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เรซินชนิด Amberlite XAD-16HP	52
4.18 ค่าร้อยละปริมาณผลผลิตที่ได้และค่าร้อยละความบริสุทธิ์ของไอโซฟลาโวนในเรซินแต่ละชนิด	53
ก-1 ความเข้มข้นของ <i>p</i> -Nitrophenol ที่มีต่อค่าการดูดกลืนแสง ณ ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร	66

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	จมูกถั่วพันธุ์ สจ.2	6
2.2	โครงสร้างโมเลกุลของไอโซฟลาโวน	7
3.1	วิธีการหมักจมูกถั่วเหลืองโดยการแปรผันลักษณะของจมูกถั่วเหลืองก่อนหมัก	19
3.2	วิธีการหมักจมูกถั่วเหลืองหมักโดยการแปรผันปริมาณเชื้อ <i>Bacillus coagulans</i> PR03	19
3.3	วิธีการหมักจมูกถั่วเหลืองหมักโดยการแปรผันปริมาณอากาศในการหมัก	20
3.4	วิธีการหมักจมูกถั่วเหลืองหมักโดยการแปรผันอุณหภูมิในการหมัก	21
3.5	ขั้นตอนการสกัดไอโซฟลาโวน	22
3.6	ขั้นตอนการเตรียมเรซิน	23
3.7	ขั้นตอนการกำจัดไขมันและการผลิตสารสกัดไอโซฟลาโวนเข้มข้น	23
3.8	การทำให้สารสกัดไอโซฟลาโวนบริสุทธิ์	24
4.1	การหมักจมูกถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.2 ในสภาวะที่เหมาะสม	33
4.2	ถังหมักจมูกถั่วชีวภาพ รุ่น WIRIYA model : S46L	35
4.3	ระบบถังหมักชีวภาพ รุ่น WIRIYA model : S46L	36
4.4	ปริมาณเชื้อ <i>Bacillus coagulans</i> PR03 จากจมูกถั่วชีวภาพ ที่ช่วงเวลาต่างๆ	37
4.5	ปริมาณไดซิทินของจมูกถั่วเหลืองหมัก ณ ช่วงเวลาต่างๆ	42
4.6	ปริมาณเจนิสทินของจมูกถั่วเหลืองหมัก ณ ช่วงเวลาต่างๆ	43
4.7	ปริมาณไกลซิทินของจมูกถั่วเหลืองหมัก ณ ช่วงเวลาต่างๆ	44
4.8	ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคโนรวมจำเพาะของจมูกถั่วเหลืองหมัก ณ ช่วงเวลาต่างๆ	45
4.9	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสของจมูกถั่วเหลืองหมักในแต่ละช่วงเวลา	46
ก-1	โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ ไอโซฟลาโวน	63
ก-2	กราฟมาตรฐานของ <i>p</i> -Nitrophenol	67
ข-1	แสดงลักษณะของจมูกถั่วชีวภาพหลังจากหมักที่อุณหภูมิต่างๆ	69
ข-2	เตรียมสารสกัดเข้มข้นผสมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 และน้ำที่ผ่านกระบวนการกำจัดประจุไอออน (Deionize water) อัตราส่วน 1 : 2 : 4 w/v/v	69
ข-3	แสดงเรซินที่บรรจุสารสกัดไอโซฟลาโวน	70
ข-4	แสดงการแยกสารละลายไอโซฟลาโวนในแต่ละ fraction จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณไอโซฟลาโวน	71