บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัตถุดิบและอุปกรณ์

1. วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต

- จมูกถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.2 (ตาแดง)
- เชื้อ *Bacillus coagulans* PR03

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตถั่วเหลืองหมัก

- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 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
- สำลี
- ถังหมัก (Fermenter)
- ปั๊มลม (ให้อากาศ)
- เครื่องวัดปริมาณอากาศ (Flow meter)
- Syringe filter, 0.2µm diameter 50 mm

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพ

- เครื่องปั่น (Blender, National: MX-T700 GN, Taiwan)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Semi-accurate balance, Mettler-Toledo: Model BB120, Switzerland)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Microcentrifuge, Wise spin, Australia)
- เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Hettich : universal 320R, Germany)
- กระดาษกรอง เบอร์ 1 (Whatman, USA)
- ช้อนตักสาร (Spatula)
- 125 ml Erlenmeyer flask
- Shaker (UMAC, UM-S606, Thailand)

- Spectrophotometer (Shimadzu : UV-1800, Japan)
- Homogenizer (Kinematica AG Littau-Luzern, Switzerland)
- Evaporator (B.U.C.H.I รุ่น R2)
- HPLC column, Inersil C18 size 250x4.6 mm., 5.0 uM
- Disposable syringe, size 3 ml
- Disposable Nylon membrane 0.45 um 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 um, for mobile phase preparation, Millipore
- Nylon membrane 0.20 um, for mobile phase preparation, Millipore
- Aqueous membrane 0.45 um, for mobile phase preparation, Millipore
- Pasture pipette
- Automatic pipette 10, 20, 100, 200 ul (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 (LABCONCO, USA)
- Glass column

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)
- **N**utrient agar (Difco, USA)
- **N**utrient 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-glucopyranoside (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)
- diaion HP20 (Supelco, USA)
- Amberlite XAD-4 (Supelco, USA)
- Amberlite XAD-7HP (Sigma, USA)
- Amberlite XAD-16HP (Sigma, USA)

5. เครื่องประมวลผลทางสถิติ

- โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 15.0

วิธีการทดลอง

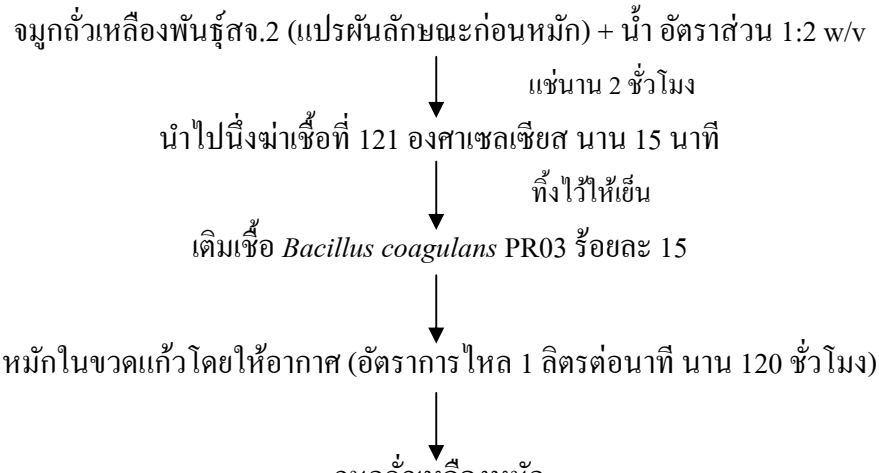
ในการดำเนินโครงการผลิตไอโซฟลาโวน (ไดซิอินและเจนิสทิอิน) จากถั่วชีวภาพ ระยะ ที่ 2 ทำให้ทราบว่าส่วนของถั่วเหลืองที่เหมาะสมในการหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์เพื่อผลิตไอโซฟลาโวน คือ จมูกถั่วเหลืองพันธุ์สจ.2 เนื่องจากปริมาณไอโซฟลาโวนส่วนใหญ่อยู่ในจมูกถั่วเหลือง และการหมักจมูกถั่วเหลืองไม่มีกลิ่นแอมโมเนียเหมือนกับการหมักถั่วทั้งเมล็ดเพราะในจมูกถั่วเหลืองมีส่วนของโปรตีนอยู่น้อย ซึ่งโปรตีนเป็นสาเหตุของการเกิดกลิ่นแอมโมเนียเนื่องจากการหมัก นอกจากนี้ยังทำให้ทราบว่าเอทานอลมีความเหมาะสมต่อกระบวนการสกัดไอโซฟลาโวน

สำหรับการดำเนินการวิจัยในโครงการระยะที่ 3 นี้จะทำการศึกษาต่อยอดในการออกแบบระบบถังหมักและกระบวนการหมักที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจมูกถั่วเหลืองหมักชีวภาพเพื่อใช้ผลิตสารสกัดไอโซฟลาโวนจากเชื้อบริสุทธิ์

การทดลองที่ 1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนจากจมูกถั่วเหลืองหมัก

การทดลองที่ 1.1 ผลของการเตรียมบดและไม่บดจมูกถั่วเหลืองก่อนหมักต่อปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน

ศึกษาลักษณะของจมูกถั่วเหลืองพันธุ์สจ.2 ที่เหมาะสมโดยจะผันแปร ลักษณะของจมูกถั่วเหลืองพันธุ์สจ.2 คือ จมูกถั่วเหลืองพันธุ์สจ.2 บด (ความละเอียด 30 mesh) และจมูกถั่วเหลืองพันธุ์สจ.2ไม่บด ดังภาพที่ 3.1 ก่อนการหมัก ซึ่งหมักโดยขวดแก้ว ขนาด 500 มิลลิลิตร แบบให้อากาศที่มีอัตราการไหล 1 ลิตรต่อนาที และใช้เชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ปริมาณร้อยละ 15 ในการหมัก วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) (ไพโรจน์, 2547) จากนั้นสุ่มตัวอย่างวิเคราะห์หาปริมาณไอโซฟลาโวนด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatograph; HPLC) ตามวิธีของ Murphy *et al.* (2002) (ภาคผนวก ก.)

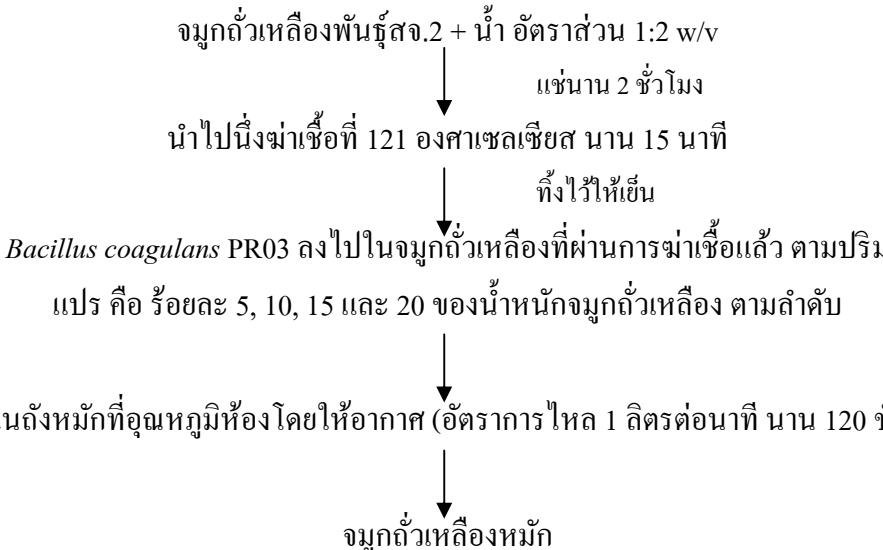


ภาพที่ 3.1 วิธีการหมักจมูกถั่วเหลืองโดยการแปรผันลักษณะของจมูกถั่วเหลืองก่อนหมัก

นำจมูกถั่วเหลืองหมักที่ได้ไปทำแห้งโดยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไอโซฟลาโวน จากนั้นนำลักษณะของจมูกถั่วเหลืองพันธุ์สจ.2 ที่เหมาะสมไปใช้ในการหมักเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียต่อคุณภาพของจมูกถั่วเหลืองหมัก

ศึกษาปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ที่เหมาะสมต่อการหมักโดยใช้ถังหมัก โดยผันแปรปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 เป็น 4 ระดับ คือ ร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 ของปริมาณจมูกถั่วเหลือง ตามลำดับ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) (ไพโรจน์, 2547) ตามภาพที่ 3.2

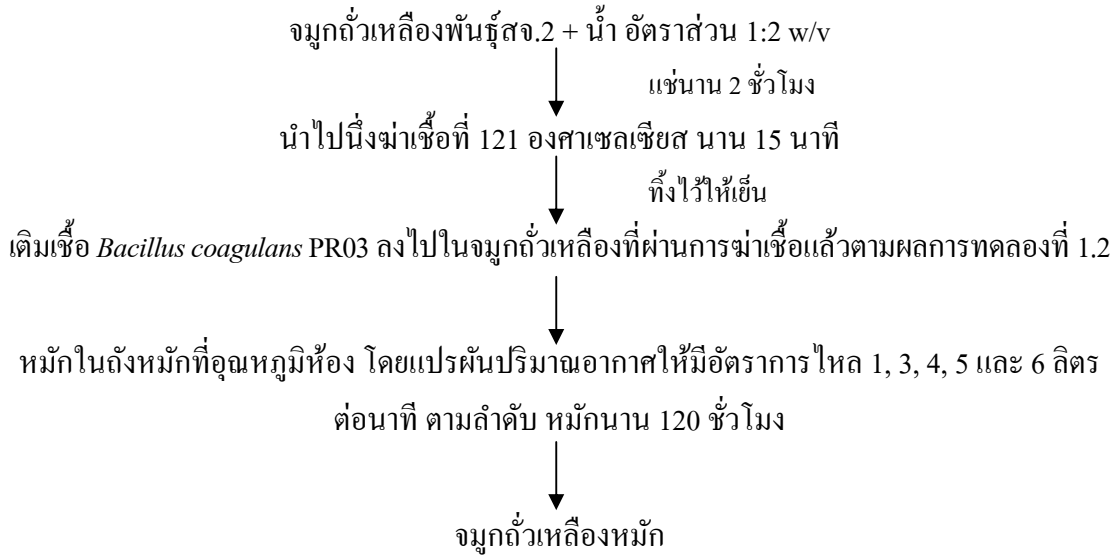


ภาพที่ 3.2 วิธีการหมักจมูกถั่วเหลืองหมักโดยการแปรผันปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03

สุ่มตัวอย่างวิเคราะห์ หาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase และนำจมูกถั่วเหลืองหมักที่ได้ไปทำแห้งโดยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) แล้วจึงวิเคราะห์หาปริมาณไอโซฟลาโวน

การทดลองที่ 1.3 การศึกษาปริมาณอากาศในระบบการหมักต่อคุณภาพของจมูกถั่วเหลืองพันธุ์สจ.2 หมัก

ศึกษาปริมาณอากาศในการหมักโดยใช้ถังหมักที่เหมาะสมต่อการหมักจมูกถั่วเหลืองพันธุ์สจ.2 โดยผันแปรปริมาณอากาศในการหมัก 5 ระดับ คือ 1, 3, 4, 5 และ 6 ลิตรต่อนาที ตามลำดับ วางแผนการทดลอง แบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) (ไพโรจน์, 2547)

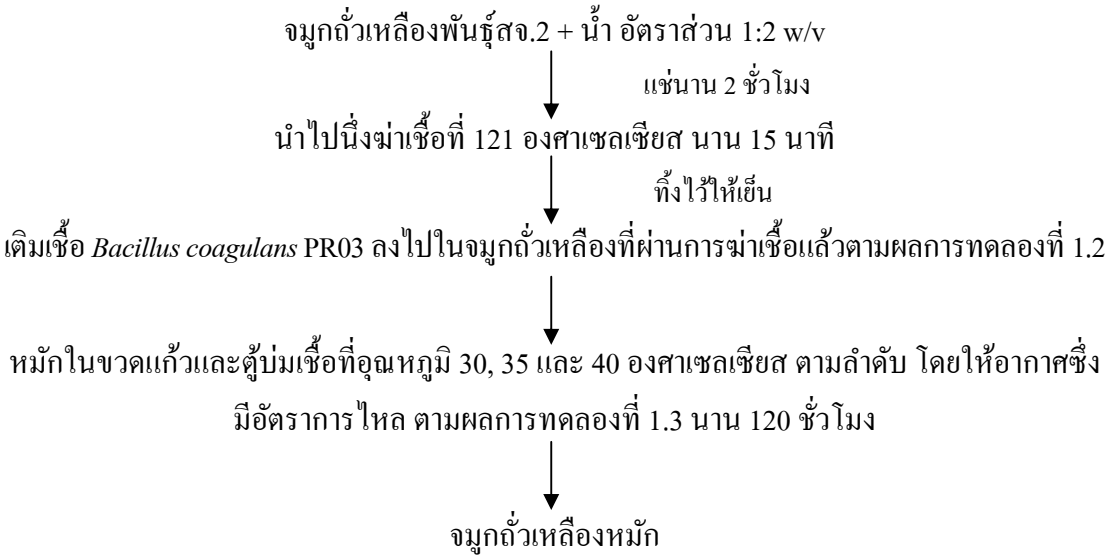


ภาพที่ 3.3 วิธีการหมักจมูกถั่วเหลืองหมักโดยการแปรผันปริมาณอากาศในการหมัก

จากนั้นสุ่มตัวอย่างวิเคราะห์ หาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase และ นำจมูกถั่วเหลืองหมักที่ได้ไปทำแห้งโดยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) แล้วจึงวิเคราะห์หาปริมาณไอโซฟลาโวน

การทดลองที่ 1.4 การศึกษาอุณหภูมิในระบบการหมักต่อคุณภาพของจมูกถั่วเหลืองพันธุ์สจ.2 หมัก

ศึกษาอุณหภูมิในการหมักที่เหมาะสมต่อการหมักจมูกถั่วเหลืองพันธุ์สจ.2 โดยผันแปรอุณหภูมิในการหมัก 3 ระดับ คือ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งหมักโดยขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร แบบให้อากาศที่มีอัตราการไหล 1 ลิตรต่อนาที ตามภาพที่ 3.4 โดยวางแผนการทดลอง แบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) (ไพโรจน์, 2547)



ภาพที่ 3.4 วิธีการหมักจมูกถั่วเหลืองหมักโดยการแปรผันอุณหภูมิในการหมัก

จากนั้นสุ่มตัวอย่าง จมูกถั่วเหลืองหมักที่ได้ไปทำแห้งโดยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) แล้วจึงวิเคราะห์หาปริมาณไอโซฟลาโวน

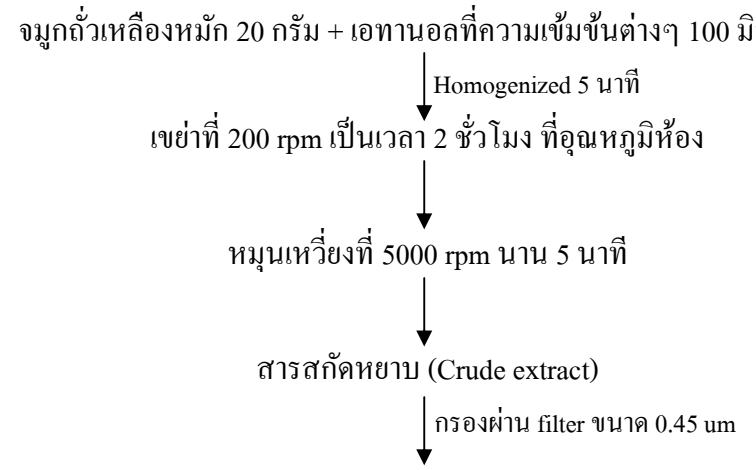
การทดลองที่ 2 การออกแบบระบบถังหมักชีวภาพที่เหมาะสมสำหรับผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกล โคนจากจมูกถั่วเหลืองหมัก

จากการทดลองที่ 1 ทำให้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการหมักจมูกถั่วเหลืองเพื่อจะผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน ในการทดลองนี้จะนำสภาวะต่างๆที่เหมาะสม มาใช้ในการออกแบบระบบถังหมักชีวภาพ (Bioreactor) และทดสอบประสิทธิภาพของระบบถังหมักชีวภาพที่ออกแบบได้ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์หาปริมาณไอโซฟลาโวนด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ตามวิธีของ Murphy *et al.* (2002) และวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase โดยดัดแปลงวิธีของ Choi *et al.* (2002) จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้วิเคราะห์หาค่าจลศาสตร์การหมัก (Kinetic) ของเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตไอโซฟลาโวน($q_{Isoflavone}$) โดยเฉพาะการผลิตไดซิอิน ($q_{Diadzein}$) เจนิสทิอิน ($q_{Genistein}$) และไกลซิทิอิน ($q_{Glycitein}$) ซึ่งจะสามารถทำนายระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวจมูกถั่วเหลืองหมักที่ผลิตด้วยระบบถังหมักชีวภาพที่ออกแบบได้

การทดลองที่ 3 การศึกษาการสกัดไอโซฟลาโวนและการผลิตไอโซฟลาโวนบริสุทธิ์ที่ผลิตจากระบบถังหมักชีวภาพ

การทดลองที่ 3.1 การศึกษาระดับความเข้มข้นของเอทานอลต่อปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนที่สกัดได้ในสารสกัดหยาบ

ศึกษาการสกัดไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองหมักที่ผลิตด้วยระบบถังหมักชีวภาพที่ออกแบบได้จากการทดลองที่ 2 ทำการศึกษาในลักษณะสารสกัดหยาบ (Crude extracted) โดยใช้ตัวทำละลายสกัด คือ เอทานอล (ได้จากการดำเนินงานในระยะที่ 2 ปีงบประมาณ 2554) วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) (ไพโรจน์, 2547) ศึกษาความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสม โดยผันแปรความเข้มของเอทานอล ร้อยละ 40, 60, 80 และ 95 ตามลำดับ ตามภาพที่ 3.5 เพื่อหาประสิทธิภาพของการสกัด จากนั้นสุ่มตัวอย่างวิเคราะห์หาปริมาณไอโซฟลาโวนด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ตามวิธีของ Murphy *et al.* (2002) และนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อศึกษาความมีนัยสำคัญของผลการทดลองโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ



ภาพที่ 3.5 ขั้นตอนการสกัดไอโซฟลาโวน

การทดลองที่ 3.2 ศึกษาการผลิตไอโซฟลาโวนให้บริสุทธิ์

ในการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตสารสกัดไอโซฟลาโวนบริสุทธิ์จากจมูกถั่วเหลืองหมักโดยใช้เรซินชนิดต่างๆ ได้แก่ Diaion HP20, Amberlite XAD-4, Amberlite XAD-7HP และ Amberlite XAD-16HP ซึ่งดัดแปลงวิธีการทำให้ไอโซฟลาโวนบริสุทธิ์จาก Wu and Lai (2007) โดยมีวิธีการทดลองดังนี้

วิธีการเตรียมเรซินเพื่อที่จะผลิตไอโซฟลาโวนบริสุทธิ์

นำเรซินชนิดต่างๆได้แก่ diaion HP20, Amberlite XAD-4, Amberlite XAD-7HP และ Amberlite XAD-16HP ชนิดละ 50 กรัม แช่ในเมทานอลนาน 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัดสารที่ไม่บริสุทธิ์

↓

จากนั้นนำเรซินแต่ละชนิดที่ผ่านการแช่เมทานอลแล้วมาบรรจุลงในคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.8 เซนติเมตร

↓

กำจัดเมทานอลด้วยน้ำปราศจากอิออน ปริมาณ 1000 มิลลิลิตร

↓

คอลัมน์ที่ได้พร้อมใช้งาน

ภาพที่ 3.6 ขั้นตอนการเตรียมเรซิน

ขั้นตอนการกำจัดไขมันและผลิตสารสกัดไอโซฟลาโวนเข้มข้น

จมูกถั่วเหลืองหมักบดละเอียดอบแห้งที่ 70 องศาเซลเซียสผสมกับเฮกเซน อัตราส่วน 1:4 w/v

↓ กรองเอาเฮกเซนออกด้วย suction pump

นำจมูกถั่วเหลืองหมักที่ผ่านการกำจัดไขมันไปอบเพื่อกำจัดเฮกเซนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

↓

นำจมูกถั่วที่ผ่านการกำจัดไขมันผสมกับเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 อัตราส่วน 1:5 w/v

↓

นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 2 ชั่วโมง

↓ กรองเอาส่วนสารละลายสีเหลืองใส

นำสารละลายสีเหลืองใสไปทำการแยกเอทานอลออกด้วยเครื่อง Evaporation ที่ความดัน 175 มิลลิบาร์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

↓

สารสกัดไอโซฟลาโวนเข้มข้น

ภาพที่ 3.7 ขั้นตอนการกำจัดไขมันและการผลิตสารสกัดไอโซฟลาโวนเข้มข้น

วิธีการทำสารสกัดไอโซฟลาโวนให้บริสุทธิ์

นำสารสกัดไอโซฟลาโวนเข้มข้นผสมกับเอทานอลร้อยละ 80 และ น้ำที่ผ่านการกำจัดประจุ อัตราส่วน 1 : 2 : 4 w/v/v

↓

นำสารละลายไอโซฟลาโวนข้างต้นผ่านคอลัมน์แก้วที่บรรจุเรซินแต่ละชนิดโดยมีอัตราการไหลของสารละลายเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายที่ผ่านเรซินเป็น fraction 1

↓

นำ deionize water ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ผ่านคอลัมน์แก้วเพื่อกำจัดสารที่ละลายได้ในน้ำเนื่องจากไอโซฟลาโวนจะถูกดูดซับไว้กับเรซินและละลายน้ำได้น้อยมากโดยมีอัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ผ่านเรซินในขั้นตอนนี้เป็น fraction 2

↓

นำเอทานอลร้อยละ 20 ผ่านคอลัมน์แก้วโดยมีอัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรเก็บสารละลายที่ได้เป็น fraction 3

↓

นำเอทานอลร้อยละ 40 ผ่านคอลัมน์แก้วโดยมีอัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรเก็บสารละลายที่ได้เป็น fraction 4

↓

นำเอทานอลร้อยละ 60 ผ่านคอลัมน์แก้วโดยมีอัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรเก็บสารละลายที่ได้เป็น fraction 5

↓

นำเอทานอลร้อยละ 80 ผ่านคอลัมน์แก้วโดยมีอัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรเก็บสารละลายที่ได้เป็น fraction 6

↓

นำทั้ง 6 fraction ไปวิเคราะห์หาปริมาณไอโซฟลาโวน

ภาพที่ 3.8 การทำให้สารสกัดไอโซฟลาโวนบริสุทธิ์

จากนั้นนำข้อมูลไอโซฟลาโวนที่ได้มาวิเคราะห์หาร้อยละความบริสุทธิ์ของสารสกัดไอโซฟลาโวนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยเรซินชนิดต่างๆ

ในการทดลองที่ 2 นี้จะทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของเอทานอล และชนิดของเรซินที่เหมาะสม ซึ่งจะถูกใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการออกแบบระบบสกัดและระบบการผลิตไอโซฟลาโวนบริสุทธิ์ในโครงการระยะที่ 4 ต่อไป