บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

การทดลองที่ 1 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนจากจมูกถั่วเหลืองหมัก

การทดลองที่ 1.1 ผลของการเตรียมจมูกถั่วเหลืองก่อนหมักต่อปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน

ลักษณะของจมูกถั่วเหลืองก่อนและหลังหมักอาจจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน เนื่องจากความสม่ำเสมอในการได้สัมผัสเชื้อมีความแตกต่างกัน

ดังนั้นในการทดลองนี้จะทำการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะก่อนการหมักของจมูกถั่วเหลือง คือ การบดก่อนหมัก และไม่บดก่อนหมัก ที่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1 และร้อยละการเปลี่ยนแปลงของไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนในจมูกถั่วเหลืองหมัก

Sample type	**Aglycones' family (mg/ 100g dry weight)**			**Total Aglycones (mg/ 100g dry weight)**
	Diadzein	**Genistein**	**Glycitein**	
Sterilised soygerm	117.76 $\pm$ 0.45	22.70 $\pm$ 0.12	75.60 $\pm$ 0.13	216.06 $\pm$ 0.46
Ground soygerm	232.37 $\pm$ 2.59	41.26 $\pm$ 1.20	113.64 $\pm$ 0.40	387.27 $\pm$ 3.57
Unground soygerm	376.45 $\pm$ 1.61	66.25 $\pm$ 1.03	207.65 $\pm$ 1.37	650.35 $\pm$ 4.02

ตารางที่ 4.2 ร้อยละการเปลี่ยนแปลงของไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน

Sample type	Aglycones' family (%)			Total Aglycones (%)
	Diadzein	Genistein	Glycitein	
Grinded soygerm	97.33	81.76	50.31	79.24
Not grinded soygerm	219.67	191.86	174.66	201.00

หมายเหตุ: ร้อยละการเปลี่ยนแปลงของไอโซฟลาโวนชนิด อะไกลโคน คิดเทียบจากปริมาณไอโซฟลาโวนจากจมูกถั่วเหลืองหมักเริ่มต้น (Sterliled soygerm)

จากผลการทดลอง พบว่า ในการหมักด้วยจมูกถั่วเหลืองแบบไม่บดมีปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน มากกว่าการหมักด้วยจมูกถั่วเหลืองแบบบดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากจมูกถั่วเหลืองแบบบดที่เข้าสู่กระบวนการหมักจะทำให้จมูกถั่วเหลืองเกิดการรวมตัวกันเป็นก้อนส่งผลต่อพื้นที่ผิวในการสัมผัสเชื้อจุลินทรีย์น้อยลง จึงส่งผลต่อประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงของไอโซฟลาโวนชนิดกลูโคไซด์เป็นอะไกลโคนลดลง ต่างจากการหมักจมูกถั่วเหลืองแบบไม่บดซึ่งไม่มีการจับตัวกันเป็นก้อนในขั้นตอนการหมัก ทำให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเปลี่ยนแปลงของไอโซฟลาโวนชนิดกลูโคไซด์เป็นอะไกลโคน

ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้จมูกถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการบดเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นของกระบวนการหมัก

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียต่อคุณภาพของจมูกถั่วเหลืองหมัก

จากที่ได้กล่าวข้างต้นในบทที่ 3 ว่าในการทดลองนี้จะใช้เชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ในการหมักจมูกถั่วเหลืองเพื่อผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน แต่เนื่องจากยังไม่ทราบถึงปริมาณเชื้อที่เหมาะสมต่อการหมัก ในการทดลองนี้จึงทำการแปรผันปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ ปริมาณไอโซฟลาโวน ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส และปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่นับได้ ซึ่งได้ผลการทดลอง แสดงในตารางที่ 4.3, 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 ผลของปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ที่ได้รับต่อการผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนในจมูกถั่วเหลืองหมัก

Inoculum size of *Bacillus coagulans* PR03 (%)	**Aglycones' family (mg/ 100g dry weight)**			**Total Aglycones (mg/ 100g dry weight)**
	Diadzein	**Genistein**	**Glycitein**	
5	700.47 ± 6.64^{b}	119.75 ± 1.12^{c}	416.47 ± 3.96^{ab}	$1,236.69 \pm 11.73^{b}$
10	805.38 ± 54.35^{ab}	184.16 ± 4.45^{b}	447.40 ± 59.63^{a}	$1,436.94 \pm 118.43^{ab}$
15	843.88 ± 9.43^{a}	196.01 ± 0.76^{a}	458.63 ± 7.13^{a}	$1,498.52 \pm 17.32^{a}$
20	741.97 ± 6.09^{ab}	175.20 ± 1.45^{b}	310.65 ± 3.33^{b}	$1,227.82 \pm 10.87^{b}$

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับข้อมูลในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่า ค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองจะเห็นว่าปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ที่สามารถผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) คือ ร้อยละ 15 โดยสามารถผลิต ไดซิอิน เจนิสทิอิน ไกลซิทิอิน และ ไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนรวม ได้ถึง 843.88, 196.01, 458.63 และ 1,498.52 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับงานทดลองของ ไพโรจน์ และคณะ (2554) ได้ทำการแปรผันปริมาณเชื้อในการหมักถั่วเน่าพื้นบ้าน พบว่า เมื่อถั่วเหลืองได้รับปริมาณเชื้อที่สูงถึงระดับหนึ่งจะส่งผลให้ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน มีปริมาณสูงที่สุด

ตารางที่ 4.4 ปริมาณค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากการได้รับปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ที่แตกต่างกัน

Inoculum size of *Bacillus coagulans* PR03 (%)	**Activity enzyme of β-glucosidase (mU/g)**
5	0.59 ± 0.03^{d}
10	2.00 ± 0.12^{b}
15	2.80 ± 0.18^{a}
20	1.40 ± 0.03^{c}

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับข้อมูลในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่า ค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส พบว่า ได้ผลสอดคล้องกับปริมาณไอโซฟลาโวน คือในสิ่งทดลองที่ได้รับปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ร้อยละ 15 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสมากที่สุดเท่ากับ 2.8 มิลลิยูนิตต่อกรัม และสิ่งทดลองที่ได้รับเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ร้อยละ 20 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสต่ำที่สุดเท่ากับ 1.4 มิลลิยูนิตต่อนาที

ตารางที่ 4.5 ปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ในจมูกถั่วเหลืองหมักที่นับได้ในการได้รับปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ที่ต่างกัน

Sample type	Number of colony (log CFU/g)
5	6.04 ± 0.02^{b}
10	4.54 ± 0.21^{c}
15	4.57 ± 0.04^{c}
20	8.20 ± 0.01^{a}

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับข้อมูลในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่า ค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ในส่วนของปริมาณเชื้อที่นับได้ พบว่าในสิ่งทดลองที่ได้รับปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ร้อยละ 20 มีปริมาณเชื้อที่นับได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 8.20 log CFU ต่อกรัม และสิ่งทดลองที่ได้รับเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ร้อยละ 10 และ 15 กลับให้ปริมาณเชื้อที่นับได้น้อยที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.54 และ 4.57 log CFU ต่อกรัม ตามลำดับ

จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 4.3-4.5 แสดงให้เห็นว่าปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ที่ร้อยละ 15 เหมาะสมต่อการผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนมากที่สุด เนื่องจากให้ปริมาณไอโซฟลาโวนที่มากที่สุดสอดคล้องกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ก็มากที่สุดเช่นกัน

ดังนั้นจึงใช้ปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ที่ร้อยละ 15 ในการหมักจมูกถั่วเหลืองในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 1.3 การศึกษาปริมาณอากาศในระบบการหมักต่อคุณภาพของจมูกถั่วเหลืองหมัก

จากการทดลองที่ 1.2 ทำให้ทราบถึงปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ที่เหมาะสมในการผลิตไอโซฟลาชนิดอะไกลโคน ซึ่งในการทดลองนี้จะแปรผันปริมาณอากาศเพื่อให้ได้ปริมาณอากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน เนื่องจากในเชื้อ *Bacillus spp.* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญโดยการทดลองนี้จะทำการวิเคราะห์ ปริมาณไอโซฟลาโวน ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส และ ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่นับได้ ซึ่งได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลของปริมาณอากาศต่อการผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนในจมูกถั่วเหลืองหมัก

Volume of air (litre/min)	**Aglycones' family (mg/ 100g dry weight)**			**Total Aglycones (mg/ 100g dry weight)**
	Daidzein	**Genistein**	**Glycitein**	
1	319.16 ± 7.65^{c}	80.64 ± 2.11^{b}	273.14 ± 6.42^{c}	672.93 ± 16.77^{c}
3	505.69 ± 16.72^{b}	143.43 ± 5.62^{a}	426.40 ± 19.25^{b}	$1,075.53 \pm 41.59^{b}$
4	513.67 ± 2.14^{b}	146.82 ± 0.48^{a}	420.79 ± 3.23^{b}	$1,081.28 \pm 0.61^{b}$
5	570.10 ± 14.06^{a}	134.93 ± 7.00^{a}	435.45 ± 17.20^{b}	$1,140.49 \pm 38.26^{ab}$
6	538.41 ± 24.47^{ab}	143.66 ± 8.38^{a}	490.76 ± 7.15^{a}	$1,172.83 \pm 39.99^{a}$

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับข้อมูลในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่า ค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลอง พบว่าในสิ่งทดลองที่ได้รับอากาศปริมาณ 5 และ 6 ลิตรต่อนาที ให้ปริมาณไดซิอินสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 570.10 และ 538.41 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง เช่นเดียวกันกับปริมาณ เจนิสทิอิน โดยมีค่าเท่ากับ 134.93 และ 143.66 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง รวมไปถึงไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนรวมในสิ่งทดลองที่ได้รับอากาศ 5 และ 6 ลิตรต่อนาทีก็ไม่แตกต่างกันและสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 1,140.49 และ 1,172.83 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง

ตารางที่ 4.7 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในจมูกถั่วเหลืองหมักที่ได้รับปริมาณอากาศแตกต่างกัน

Volume of air (litre/min)	Activity enzyme of β-glucosidase (mU/g)
1	1.50 ± 0.04^{d}
3	1.62 ± 0.23^{d}
4	2.33 ± 0.64^{b}
5	1.81 ± 0.21^{c}
6	2.50 ± 0.06^{a}

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับข้อมูลในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่า ค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองในส่วนของค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส พบว่าในสิ่งทดลองที่ได้รับอากาศปริมาณ 6 ลิตรต่อนาที ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ที่สูงสุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 2.50 มิลลิยูนิตต่อกรัม และสิ่งทดลองที่ได้รับปริมาณอากาศ 1 และ 3 ลิตรต่อนาที มีค่ากิจกรรมของเอนไซมเบต้ากลูโคซิเดสต่ำที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 1.56 และ 1.62 มิลลิยูนิตต่อกรัม ตามลำดับ

ตารางที่ 4.8 ปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ในจมูกถั่วเหลืองหมักที่นับได้ในการได้รับปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ที่ต่างกัน

Volume of air (litre/min)	Number of colony (log CFU/g)
1	5.88 ± 0.03^{e}
3	6.00 ± 0.10^{d}
4	6.71 ± 0.34^{c}
5	6.96 ± 0.23^{b}
6	7.11 ± 0.05^{a}

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับข้อมูลในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่า ค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.8 พบว่าจมูกถั่วเหลืองหมักที่ได้รับปริมาณอากาศ 6 ลิตรต่อนาที ให้ปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ที่นับได้มากที่สุด เท่ากับ 7.11 log CFU ต่อกรัม ซึ่งมากกว่าจมูกถั่วเหลืองหมักที่ได้รับปริมาณอากาศ 5, 4, 3 และ 1 ลิตรต่อนาที ที่มีปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ที่นับได้เท่ากับ 6.96, 6.71, 6.00 และ 5.88 ตามลำดับ

ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากตารางที่ 4.6-4.8 จึงสรุปได้ว่าปริมาณอากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนมากที่สุดคือ 6 ลิตรต่อนาที ซึ่งให้ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส และปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ที่นับได้มากที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต

การทดลองที่ 1.4 ศึกษาอุณหภูมิในระบบการหมักต่อคุณภาพของจมูกถั่วเหลืองหมัก

จากการทดลองที่ 1.2 และ 1.3 ทำให้ทราบถึงปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 และปริมาณอากาศที่เหมาะสมในการผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน คือใช้ปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ร้อยละ 15 ของจมูกถั่วทั้งหมด ร่วมกับปริมาณอากาศที่ 6 ลิตรต่อนาที จากนั้นนำผลการทดลองดังกล่าวมาใช้ในการทดลองที่ 1.4 โดยจะทำการแปรผันระดับอุณหภูมิในการหมักจมูกถั่ว และสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนในตัวอย่างแห้ง ซึ่งได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนจากจมูกถั่วเหลืองหมักที่ระดับอุณหภูมิในการหมักต่างๆ

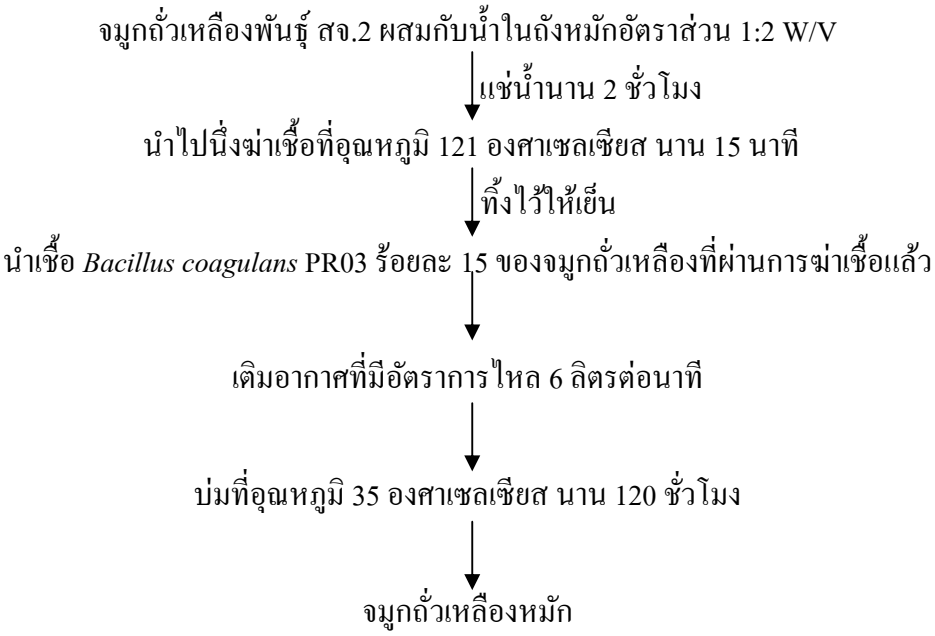
Temperature (°C)	**Aglycones' family (mg/ 100g dry weight)**			**Total Aglycones (mg/ 100g dry weight)**
	Diadzein	**Genistein**	**Glycitein**	
30	685.70 ± 3.78^{c}	125.07 ± 1.04^{a}	459.10 ± 0.92^{c}	$1,269.87 \pm 3.90^{b}$
35	870.81 ± 0.84^{b}	104.98 ± 0.03^{b}	545.60 ± 4.82^{a}	$1,521.39 \pm 3.95^{a}$
40	926.15 ± 2.58^{a}	75.50 ± 0.16^{c}	517.55 ± 11.15^{b}	$1,519.20 \pm 14.16^{a}$

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับข้อมูลในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่า ค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลอง พบว่าเมื่อพิจารณาในส่วนของไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนรวมแล้ว สิ่งทดลองที่ได้รับอุณหภูมิในการหมัก 35 และ 40 องศาเซลเซียส สามารถผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนรวมได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ 1,521.39 และ 1,519.20 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และสิ่งทดลองที่ได้รับอุณหภูมิในการหมักที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่ามีปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนรวมน้อยที่สุดเท่ากับ 1,269.87 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง

ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้อุณหภูมิในการหมักจมูกถั่วเหลืองที่ 35 องศาเซลเซียส เนื่องจากให้ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนรวมไม่ต่างจากการใช้อุณหภูมิในการหมัก 40 องศาเซลเซียส และยังช่วยลดการใช้พลังงานในการให้ความร้อนแก่ระบบการหมักด้วย

จากการทดลองที่ 1 จึงสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักจมูกถั่วเหลืองเพื่อผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนมากที่สุดคือ ใช้จมูกถั่วเหลืองชนิดไม่บดก่อนหมักด้วยเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ปริมาณร้อยละ 15 ของจมูกถั่วเหลืองทั้งหมด ร่วมกับ ปริมาณอากาศ 6 ลิตรต่อนาที และอุณหภูมิในการหมัก 35 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.1 การหมักจมูกถั่วเหลืองพันธุ์สจ.2 ในสภาวะที่เหมาะสม

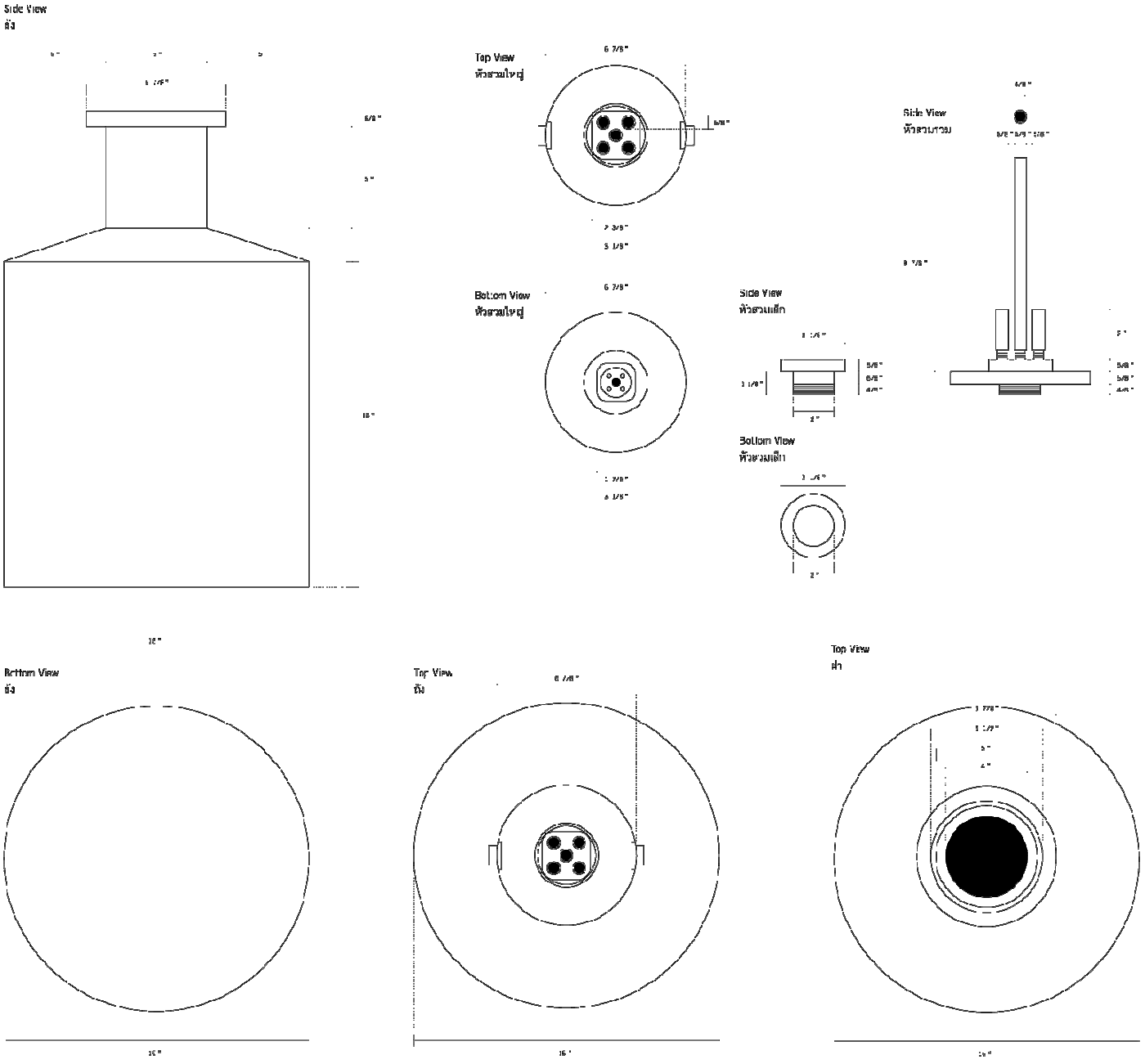
การทดลองที่ 2 การออกแบบถังหมักชีวภาพที่เหมาะสมสำหรับผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนจากจมูกถั่วเหลือง

จากการทดลองที่ 1 ทำให้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการหมักจมูกถั่วเหลืองเพื่อจะผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน ได้แก่ ไดซิอิน เจนิสทิอิน และไกลซิทิอิน โดยในการทดลองนี้จะใช้สภาวะที่เหมาะสม (ภาพที่ 4.1) มาใช้ในการออกแบบระบบถังหมักชีวภาพ (Bioreactor) แสดงดังภาพที่ 4.2 และ 4.3 ซึ่งประกอบด้วย

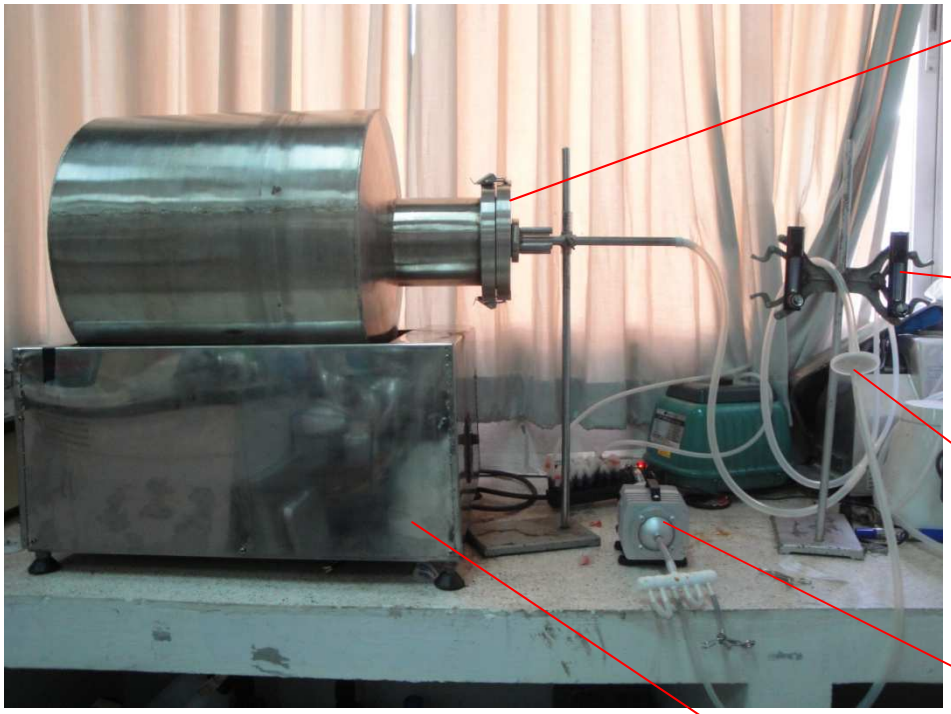
- ปั๊มอากาศ
- เครื่องวัดปริมาณอากาศ

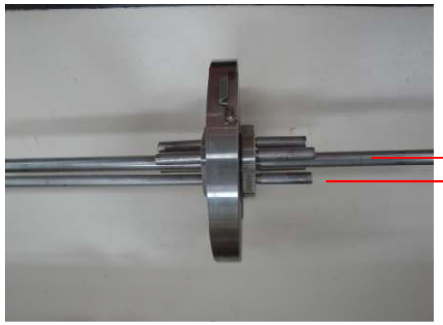
- แผ่นกรองอากาศขนาด 0.2 ไมโครเมตร
- ท่ออากาศ
- เครื่องหมุนถังความเร็วต่ำ
- ถังหมักชีวภาพแบบแนวนอนผลิตจากเหล็กปลอดสนิม โดยในโครงการวิจัยนี้จะใช้ชื่อถังหมักชีวภาพที่ออกแบบว่า “WIRIYA” Model: S46L ปริมาตรบรรจุ (Volume) 46 ลิตร ปริมาตรผลิต (Working volume) 15 ลิตร สามารถผลิตโดยใช้จมูกถั่วเหลืองประมาณ 7 กิโลกรัม

จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของถังหมักชีวภาพที่ออกแบบได้ โดยทำการผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนจากจมูกถั่วเหลืองหมัก และคำนวณหาค่าจลนพลศาสตร์การผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนรวม ($q_{total\ aglycone}$) โดยเฉพาะการผลิต ไดซิอิน ($q_{Diadzein}$) เจนิสทิอิน ($q_{Genistein}$) ไกลซิทิอิน ($q_{Glycitein}$) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส



ภาพที่ 4.2 ถังหมักจมูกถั่วชีวภาพ
รุ่น WIRIYA model : S46L





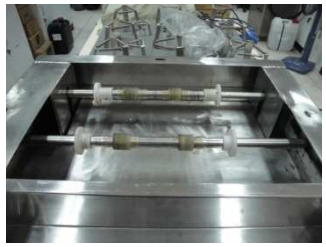
ท่ออากาศเข้า

ท่ออากาศออก

เครื่องวัดปริมาณอากาศ

แผ่นกรองอากาศก่อนเข้าถังหมัก ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

ปั๊มอากาศ

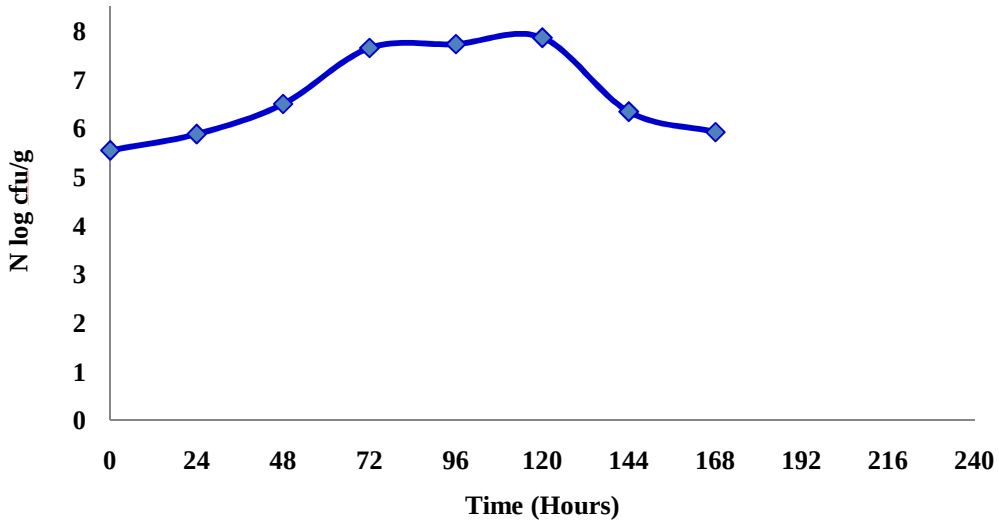


เครื่องหมุนถังหมักความเร็วรอบต่ำ

ภาพที่ 4.3 ระบบถังหมักชีวภาพ รุ่น WIRIYA model : S46L

การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03

การทดลองนี้ศึกษาถึงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ที่ใช้ในกระบวนการหมักจมูกถั่วชีวภาพ และใช้เป็นข้อมูลในการติดตามผลของปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03ในการหมักจมูกถั่วชีวภาพแต่ละช่วงเวลา ตั้งแต่เริ่มต้นหมักจนถึง 168 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 4.4 และตารางที่ 4.10



ภาพที่ 4.4 ปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 จากจมูกถั่วชีวภาพ ที่ช่วงเวลาต่างๆ

ตารางที่ 4.10 ปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ในจมูกถั่วชีวภาพที่ช่วงเวลาต่างๆ

Time (hours)	Number of colony (CFU/g)	Number of colony (N log CFU/g)	Number of colony (N ln CFU/g)
0	3.5×10^5	5.54 ± 0.26^h	12.77 ± 0.67^h
24	7.6×10^5	5.88 ± 0.32^g	13.54 ± 0.72^g
48	3.2×10^6	6.50 ± 0.47^d	14.98 ± 1.01^d
72	4.5×10^7	7.65 ± 0.03^c	17.62 ± 0.89^c
96	5.4×10^7	7.73 ± 0.53^b	17.80 ± 0.76^b
120	7.4×10^7	7.86 ± 0.89^a	18.12 ± 0.45^a
144	2.2×10^6	6.34 ± 0.04^e	14.60 ± 0.65^e
168	8.3×10^5	5.92 ± 0.38^f	13.63 ± 0.87^f

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับข้อมูลในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่า ค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากภาพที่ 4.4 และตารางที่ 4.10 พบว่า ปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 จะเพิ่มจำนวนอย่างต่อเนื่องและมีปริมาณสูงสุดที่ 120 ชั่วโมง โดยมีค่าเท่ากับ 7.86 log CFU ต่อ กรัม จากนั้นจะเริ่มลดลง

การหาอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ในการผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนจากจมูกถั่วเหลืองหมัก

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ข้างต้นนำมาใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการหมักจมูกถั่วเหลืองเพื่อผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนเป็นระยะเวลา 168 ชั่วโมง พบว่า เชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 มีการเจริญในระยะ Log phase อยู่ในชั่วโมงที่ 24-72 (ภาพที่ 4.3) โดยนำข้อมูลจากตารางที่ 4.9 ไปใช้วิเคราะห์หาค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 ในการหมักจมูกถั่วเหลือง ดังนี้

อัตราการเจริญ $dx/dt = \mu X$ ----------1

เมื่อ dx = ค่าที่เพิ่มขึ้นของมวลชีวภาพในช่วงเวลา dt

$dx/x = \mu \cdot dt$ ----------2

เมื่อทำการ Integrate สมการที่ 2 จะได้

$Xt = X_0 \cdot e^{\mu t}$ ----------3

เมื่อ X_0 = ค่ามวลชีวภาพ t=0

Xt = ค่ามวลชีวภาพ หรือ ค่าความขุ่นภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา t ชั่วโมง

เมื่อใส่ Natural logarithm ในสมการที่ 3 จะได้

$\ln Xt = \ln X_0 + \mu t$----------4

ดังนั้นจะได้สมการ

$$\mu = \frac{\ln (Xt/X0)}{t}$$ ----------5

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate)

โดยที่ อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ (μ) จะแทนค่าลงในสมการที่ 6 เพื่อหาช่วงเวลาของเชื้อที่สามารถแบ่งตัวจากหนึ่งเซลล์เป็นสองเซลล์ (Doubling time)

$$\text{Doubling time (T)} = \ln 2/\mu \text{----------6}$$

ทำการแทนค่าสมการที่ 5 ด้วยข้อมูลที่แสดงจากตาราง 4.9 เพื่อใช้คำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะของ *Bacillus coagulans* PR03

อัตราการเจริญจำเพาะของ *Bacillus coagulans* PR03

$$\mu_{PR03} = [\ln (X_{120}/X_0)] - [\ln (X_{24}/X_0)] /t$$

$$= [\ln (7.4 \times 10^7 / 3.5 \times 10^5)] - [\ln (7.6 \times 10^5/3.5 \times 10^5)]/(72-24)$$

$$= 0.095\ hr^{-1}$$

$$\text{Doubling time}_{PR03} = \ln 2/ \mu_{PR03}$$

$$= \ln 2/0.095$$

$$= 7.30\ hr$$

จากการคำนวณสามารถอธิบายได้ว่าเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้เป็น 0.095 CFU ต่อ เวลา 1 ชั่วโมง และเชื้อจะสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจากหนึ่งเซลล์เป็นสองเซลล์เมื่อเวลาผ่านไปทุกๆ 7.30 ชั่วโมง

จลนพลศาสตร์การใช้อาหารและการสร้างผลิตภัณฑ์

ประสิทธิภาพการสร้างผลิตภัณฑ์จากอาหาร

$$\text{Process product yield } (Y_{p/s}) = (P_{agy}1 - P_{agy}0)/(S_{glu}0 - S_{glu}1) \text{----------7}$$

เมื่อ $Y_{p/s}$ = ประสิทธิภาพการสร้างไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน

$P_{agy}1$ = ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนสุดท้าย

$P_{agy}0$ = ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนเริ่มต้น

$S_{glu}0$ = ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดกลูโคไซด์เริ่มต้น

$S_{glu}1$ = ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดกลูโคไซด์สุดท้าย

ประสิทธิภาพการสร้างไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนจากเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03

ประสิทธิภาพในการสร้างผลิตภัณฑ์ (Product yield coefficient ; $Y_{p/s}$) = $(P_{agy}1- P_{agy}0)/(S_{glu}0- S_{glu}1)$

= (1181.68-501.92)/(667.54-66.28)

= 1.13 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง

จากการคำนวณข้างต้นแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการสร้างผลิตภัณฑ์ คือ ประสิทธิภาพในการสร้างไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน เท่ากับ 1.13 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง

จลนพลศาสตร์การสร้างผลิตภัณฑ์

อัตราเร็วที่ผลิตภัณฑ์สร้างขึ้น = การสร้างผลิตภัณฑ์ – ผลิตภัณฑ์ที่ถูกทำลาย

$dP/dt = (q_pX)-kP$ ----------8

เนื่องจากกระบวนการหมักเป็นการเลี้ยงแบบกะ ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ถูกทำลายมีปริมาณน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับการสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างการหมัก ดังนั้นจึงไม่นำค่า kP มาใช้ในสมการนี้และเขียนสมการใหม่ได้เป็น สมการดังนี้

$dP/dt = (q_pX)$ ----------9

$(1/X) \cdot dP/dt = q_p$ ----------10

เมื่อ q_p = อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (Specific product formation rate)

X = ปริมาณจุลินทรีย์

dP/dt = อัตราเร็วที่ผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น

$q_p/q_s = dP/ds$ ----------11

และสมการ 7 เท่ากับ สมการ 11

$Y_{p/s} = q_p/q_s = dP/ds$ ----------12

เมื่อหารสมการ 12 ด้วยสมการ 1

q_p/μ = $[(1/X)dP/dt\ ]x[X \bullet dt/dX]$ ----------13

q_p/μ = $dp/dX = Y_{p/x}$----------14

q_p = $(dp/dX) \bullet \mu$ ----------15

เมื่อ dp = อัตราการเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์เริ่มต้นและสุดท้าย

dX = อัตราการเปลี่ยนแปลงของ ln CFU ต่อกรัม ของ ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 120

μ = อัตราการเจริญจำเพาะของ *Bacillus coagulans* PR03 เท่ากับ 0.095 hr^{-1}

อัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนจำเพาะ

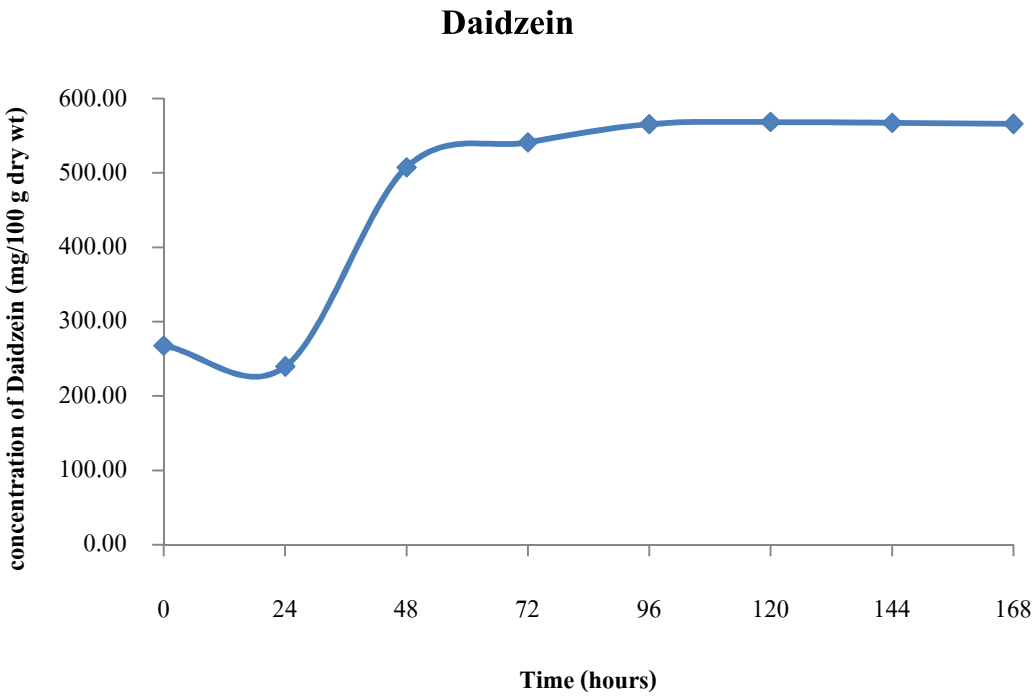
ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนในจมูกถั่วเหลืองหมัก ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 168 แสดงดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนในจมูกถั่วเหลืองหมัก ณ เวลาต่างๆ

Time of fermentation (hours)	**Aglycones' family (mg/ 100g dry weight)**			
	Daidzein	**Genistein**	**Glycitein**	**Total Aglycones**
0	267.61 ± 5.21[d]	52.20 ± 0.74[d]	182.10 ± 3.17[d]	501.92 ± 9.61[d]
24	239.49 ± 0.73[e]	45.57 ± 0.29[e]	69.93 ± 0.04[e]	354.99 ± 0.48[e]
48	507.54 ± 5.06[c]	115.36 ± 0.96[c]	459.31 ± 1.44[c]	1082.21 ± 7.46[c]
72	541.17 ± 20.61[b]	122.37 ± 5.95[b]	472.99 ± 16.92[bc]	1136.54 ± 43.48[b]
96	565.78 ± 2.20[a]	128.98 ± 0.28[a]	473.74 ± 0.24[bc]	1168.50 ± 2.24[ab]
120	568.64 ± 1.47[a]	128.75 ± 0.42[a]	482.05 ± 0.28[b]	1179.43 ± 1.33[a]
144	567.37 ± 0.61[a]	129.86 ± 0.89[a]	497.06 ± 0.96[ab]	1194.29 ± 0.53[a]
168	566.00 ± 5.99[a]	128.65 ± 1.14[a]	487.03 ± 5.07[a]	1181.68 ± 12.20[a]

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับข้อมูลในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่า ค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

อัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณไดซิอินจำเพาะ



ภาพที่ 4.5 ปริมาณไดซิอินของจมูกถั่วเหลืองหมัก ณ ช่วงเวลาต่างๆ

จากตารางที่ 4.11 และ ภาพที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่า ปริมาณไดซิอินเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 จนถึงชั่วโมงที่ 96 และเริ่มคงที่ไปเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 168 ดังนั้นจึงนำข้อมูลดังกล่าวมาคำนวณ โดยให้

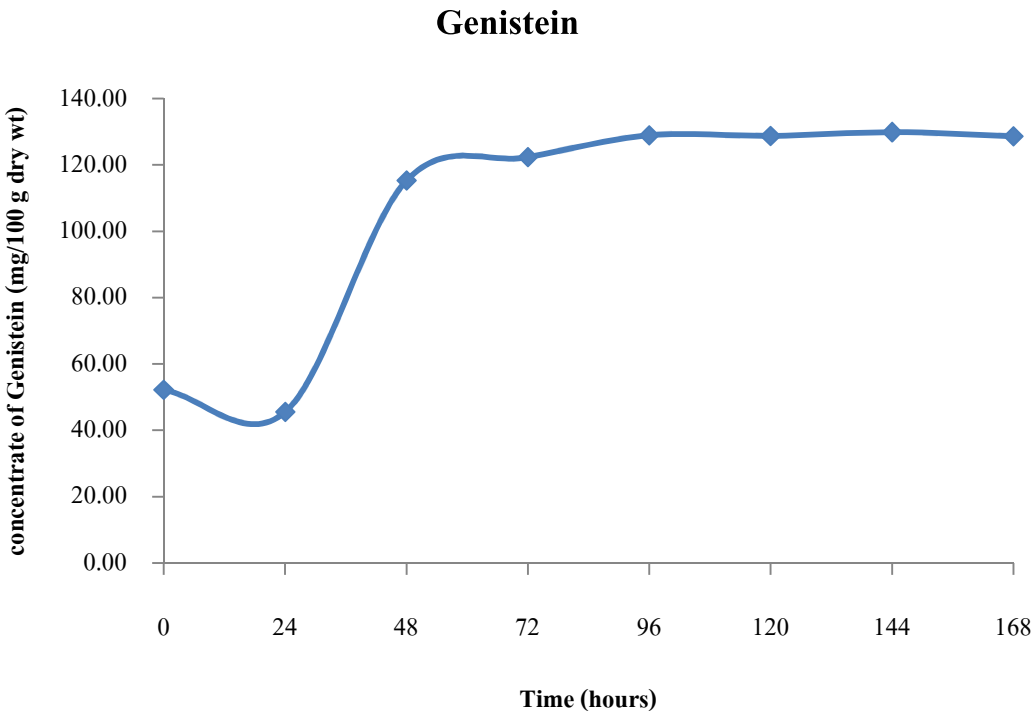
$$q_{Daidzein} = (dp/dX) \cdot \mu$$

$$= [(566-267.61)/(18.12-12.77)]x\ 0.095$$

$$= 5.30 \quad \frac{mg \cdot hr^{-1}}{100g}$$

ค่าจากการคำนวณ พบว่า การเพิ่มขึ้นของปริมาณไดซิอินในจมูกถั่วเหลืองหมักเท่ากับ 5.30 มิลลิกรัม ต่อเวลา 1 ชั่วโมง ในตัวอย่างจมูกถั่วเหลืองหมัก 100 กรัม น้ำหนักแห้ง

อัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณเจนิสทิอินจำเพาะ



ภาพที่ 4.6 ปริมาณเจนิสทิอินของจมูกถั่วเหลืองหมัก ณ ช่วงเวลาต่างๆ

ภาพที่ 4.6 และตารางที่ 4.11 แสดงให้เห็นว่า ปริมาณเจนิสทิอินเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 จนถึงชั่วโมงที่ 96 และเริ่มคงที่ไปเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 168

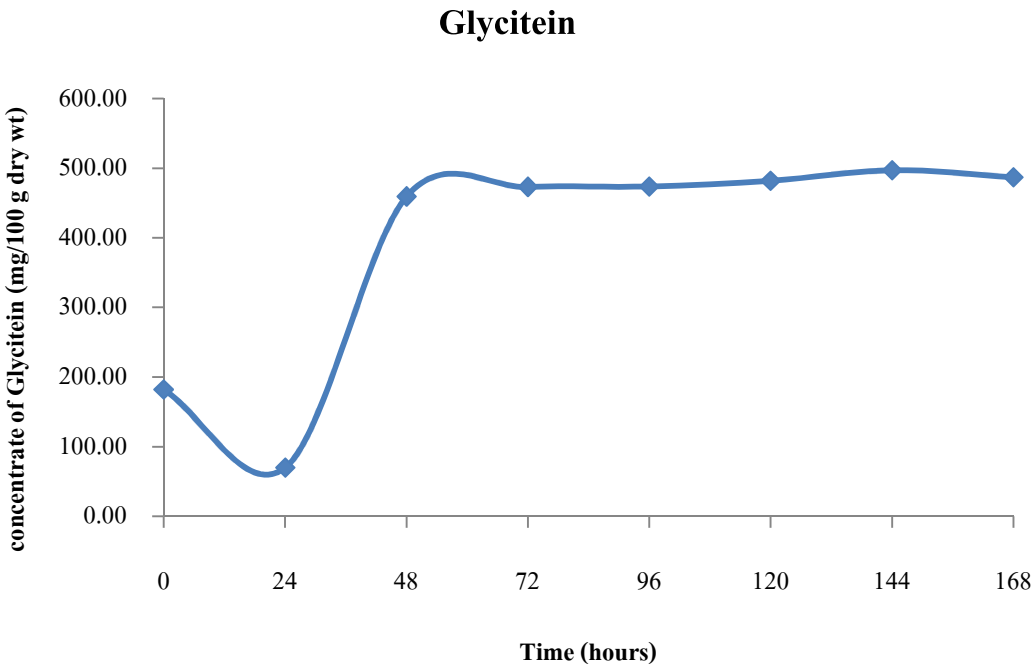
$$q_{Genistein} = (dp/dX) \cdot \mu$$

$$= [(128.65 - 52.20)/(18.12 - 12.77)] \times 0.095$$

$$= 1.36 \ \frac{mg \cdot hr^{-1}}{100g}$$

ค่าจากการคำนวณ พบว่า การเพิ่มขึ้นของปริมาณเจนิสทิอินในจมูกถั่วเหลืองหมักเท่ากับ 1.36 มิลลิกรัม ต่อเวลา 1 ชั่วโมง ในตัวอย่างจมูกถั่วเหลืองหมัก 100 กรัม น้ำหนักแห้ง

อัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณไกลซิทิอินจำเพาะ



ภาพที่ 4.7 ปริมาณไกลซิทิอินของจมูกถั่วเหลืองหมัก ณ ช่วงเวลาต่างๆ

ภาพที่ 4.7 และตารางที่ 4.11 แสดงให้เห็นว่า ปริมาณไกลซิทิอินเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 จนถึงชั่วโมงที่ 96 และเริ่มคงที่ไปเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 168

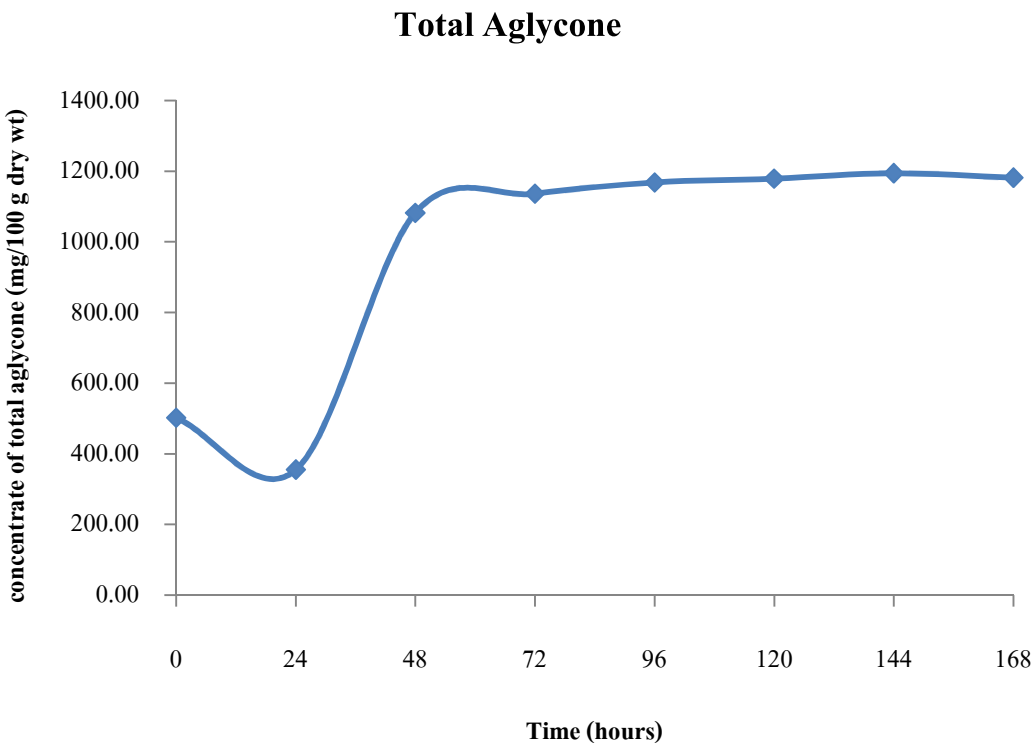
$$q_{Glycitein} = (dp/dX) \cdot \mu$$

$$= [(487.03 - 182.10)/(18.12 - 12.77)] \times 0.095$$

$$= 5.41 \quad \frac{mg \cdot hr^{-1}}{100g}$$

ค่าจากการคำนวณ พบว่า การเพิ่มขึ้นของปริมาณไกลซิทิอินในจมูกถั่วเหลืองหมักเท่ากับ 5.41มิลลิกรัม ต่อเวลา 1 ชั่วโมง ในตัวอย่างจมูกถั่วเหลืองหมัก 100 กรัม น้ำหนักแห้ง

อัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนรวมจำเพาะ



ภาพที่ 4.8 ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนรวมจำเพาะของจมูกถั่วเหลืองหมัก ณ ช่วงเวลาต่างๆ

จากภาพที่ 4.8 และตารางที่ 4.11 แสดงให้เห็นว่า ปริมาณอะไกลโคนรวมเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 จนถึงชั่วโมงที่ 96 และเริ่มคงที่ไปเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 168

$$q_{\text{total aglycone}} = (dp/dX) \cdot \mu$$

$$= [(1181.68 - 501.92)/(18.12 - 12.77)] \times 0.095$$

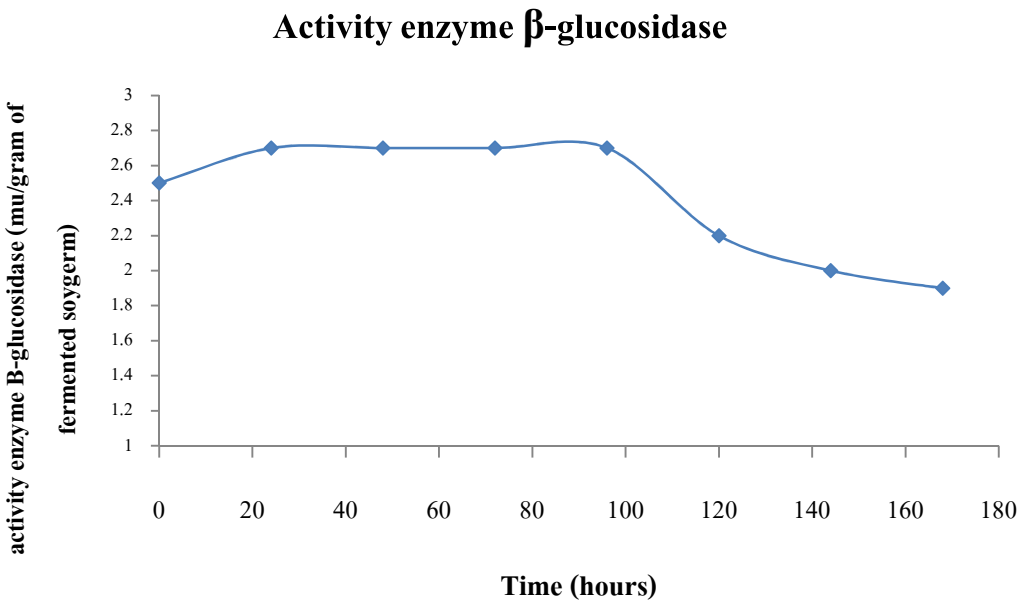
$$= 12.07 \ \frac{mg \cdot hr^{-1}}{100g}$$

ค่าจากการคำนวณ พบว่า การเพิ่มขึ้นของปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนรวมจำเพาะในจมูกถั่วเหลืองหมักเท่ากับ 12.07 มิลลิกรัม ต่อเวลา 1 ชั่วโมง ในตัวอย่างจมูกถั่วเหลืองหมัก 100 กรัม น้ำหนักแห้ง

จากการหาอัตราเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวนจำเพาะ ชนิดไดซิอิน เจนิสทิอิน ไกลซิทิอิน และไอโซฟลาโวนรวมชนิดอะไกลโคน มีค่าเท่ากับ 5.30, 1.36, 5.41 และ 12.07 มิลลิกรัม ต่อเวลา 1 ชั่วโมง ต่อปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 เริ่มต้นปริมาณ 1 CFU ในตัวอย่างจมูกถั่วเหลืองหมัก 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

จากการศึกษาจลนพลศาสตร์ในการหมักถั่วเหลือง พบว่าปริมาณไดซิอิน เจนิสทิอิน ไกลซิทิอิน และไอโซฟลาโวนรวมชนิดอะไกลโคน จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งครบ 96 ชั่วโมง และคงที่ในที่สุด เหตุนี้ จึงทำการเก็บเกี่ยวจมูกถั่วหมักที่ 96 ชั่วโมง ซึ่งขัดแย้งกับการทดลองในระยะที่ 1 ที่ต้องใช้เวลาในการหมักถึง 120 ชั่วโมง จึงสามารถเก็บเกี่ยวได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากพันธุ์ของถั่วเหลืองที่ใช้มีความแตกต่างกัน อีกทั้งในการทดลองนี้ใช้เฉพาะจมูกถั่วเหลืองในการหมักจึงทำให้ประสิทธิภาพการหมักมีมากขึ้น

ศึกษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในแต่ละช่วงเวลาของการหมักจมูกถั่วเหลือง



ภาพที่ 4.9 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสของจมูกถั่วเหลืองหมักในแต่ละช่วงเวลา

จากภาพที่ 4.9 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสของจมูกถั่วเหลืองหมัก จะเพิ่มสูงขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 24 ซึ่งมีค่าสูงสุดเท่ากับ 2.7 มิลลิยูนิตต่อกรัม และคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 96 จากนั้นลดลงไปเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 168 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.9 มิลลิยูนิตต่อกรัม ดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในแต่ละช่วงเวลา

Time of fermentation (Hours)	Activity enzyme β-glucosidase (mU/g)
0	2.5 ± 0.01^{b}
24	2.7 ± 0.03^{a}
48	2.7 ± 0.01^{a}
72	2.7 ± 0.01^{a}
96	2.7 ± 0.05^{a}
120	2.2 ± 0.01^{c}
144	2.0 ± 0.01^{d}
168	1.9 ± 0.02^{d}

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับข้อมูลในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่า ค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบตต้ากลูโคซิเดสจะเพิ่มขึ้นตั้งแต่เริ่มต้นหมัก (ชั่วโมงที่ 0) จนถึงชั่วโมงที่ 24 จะมีค่าสูงสุดและคงที่ ที่ 2.7 มิลลิยูนิตต่อกรัม ไปจนถึงชั่วโมงที่ 96 แล้วจึงเริ่ม มีค่าที่ต่ำที่สุดที่ ชั่วโมงที่ 168 มีค่าเท่ากับ 1.9 มิลลิยูนิตต่อกรัม

สรุปว่าประสิทธิภาพของถังหมัก โดยมีอัตราการเจริญของเชื้อ *Bacillus coagulans* PR03 (μ) เท่ากับ 0.095 CFU ต่อ เวลา 1 ชั่วโมง และมีค่าอัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณไดซิอิน เจนิสทิอิน ไกลซิทิอิน และไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนรวม เท่ากับ 5.30, 1.36, 5.41 และ 12.07 มิลลิกรัมต่อเวลา 1 ชั่วโมง ในตัวอย่างจมูกถั่วเหลืองหมัก 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวจมูกถั่วเหลืองหมักที่ผ่านการหมักด้วยถังหมักชีวภาพ เท่ากับ 96 ชั่วโมง

การทดลองที่ 3 การศึกษาการสกัดไอโซฟลาโวนและการผลิตไอโซฟลาโวนบริสุทธิ์ที่ผลิตจากระบบถังหมัก

การทดลองที่ 3.1 การศึกษาระดับความเข้มข้นของเอทานอลต่อปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนที่สกัดได้ในสารสกัดหยาบ

ในการทดลองนี้จะทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดไอโซฟลาโวนจากจมูกถั่วเหลืองหมัก เพื่อให้ได้ปริมาณไอโซฟลาโวนที่สกัดได้มากที่สุด ซึ่งได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนจากการสกัดด้วยเอทานอล

Concentrate of ethanol (%)	Aglycones' family (mg/ 100ml of ethanol extracted)			Total Aglycones (mg/ 100ml of)
	Daidzein	Genistein	Glycitein	
40	196.98 ± 4.07^{b}	29.53 ± 0.69^{c}	52.41 ± 0.18^{d}	278.91 ± 4.94^{d}
60	247.94 ± 1.68^{a}	39.25 ± 0.78^{a}	82.24 ± 0.68^{c}	369.42 ± 3.14^{b}
80	256.33 ± 0.17^{a}	40.95 ± 0.02^{a}	97.02 ± 0.96^{a}	394.30 ± 0.77^{a}
95	203.93 ± 4.53^{b}	32.23 ± 0.87^{b}	87.71 ± 2.11^{b}	323.86 ± 7.51^{c}

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับข้อมูลในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่า ค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.13 แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเอทานอลมีผลต่อปริมาณสารสกัดไอโซฟลาโวน โดยเมื่อพิจารณาทั้งปริมาณ ไดซิอิน เจนิสทิอิน ไกลซิทิอิน และ ไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนรวมแล้ว พบว่า การสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 80 ให้ปริมาณสารทั้งหมดที่กล่าวข้างต้นมากกว่าการสกัดด้วย เอทานอลร้อยละ 40, 60 และ 95 ตามลำดับ และมีงานทดลองของ Sang *et al*. (2005) ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการสกัดไอโซฟลาโวนจากจมูกถั่วเหลือง โดยพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง สามารถสกัดไอโซฟลาโวนจากจมูกถั่วได้มากที่สุด ซึ่งขัดแย้งกับงานทดลองของผ่องศรี และคณะ (2544) ที่ทำการศึกษาการสกัดไอโซฟลาโวนจากกากถั่วเหลืองด้วยเอทานอล พบว่าระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการสกัดไอโซฟลาโวนจากกากถั่วเหลือง คือเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 64 ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส นาน 110 นาที ทั้งนี้อาจเนื่องจากการทดลองข้างต้นมีการเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดด้วยจึงทำให้ลดปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมในการสกัดลง

ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 80 ในการสกัดไอโซฟลาโวนจากจมูกถั่วเหลืองหมัก

การทดลองที่ 3.2 ศึกษาการผลิตไอโซฟลาโวนให้บริสุทธิ์

ในการทดลองนี้จะนำสารสกัดหยาบที่ได้จากการทดลองที่ 3.1 มาทำให้บริสุทธิ์มากที่สุด โดยใช้เรซินต่างชนิดกัน ได้แก่ Diaion HP20, Amberlite XAD-4, Amberlite XAD-7HP และ Amberlite XAD-16HP ได้ผลการทดลองดังนี้

ตารางที่ 4.14 ร้อยละความบริสุทธิ์ของสารสกัดไอโซฟลาโวนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เรซินชนิด Diaion HP-20

Step of coluumn operation Diaion HP20	Fraction	Operating volume(ml)	Mass of concentrate(mg)	Mass ratio of concentrate(%)	Mass of isoflavones (mg)	Yield of isoflavone(%)	Purity of isoflavone(%)
Adsorption	1	285.00	10680.00	63.56	159.93	14.82	1.50
Washing(DI water)	2	400.00	1562.00	9.30	20.71	1.92	1.33
Step-gradient elution							
20% Ethanol	3	400.00	237.00	1.41	13.79	1.28	5.82
40% Ethanol	4	400.00	1088.00	6.48	303.00	28.09	27.85
60% Ethanol	5	400.00	1981.00	11.79	520.34	48.23	26.27
80% Ethanol	6	400.00	1254.00	7.46	61.06	5.66	4.87
Total		-	16802.00	100.00	1078.83	100.00	

หมายเหตุ : ความบริสุทธิ์ของไอโซฟลาโวนในสารสกัดเริ่มต้นมีค่าเท่ากับร้อยละ 5.30 ของปริมาณสารสกัดเข้มข้น

adsorption = สารละลายไอโซฟลาโวนจาก อัตราส่วน crude extract of defated soyferment : Ethanol 80% : DI water ; 1:2:4

operating volume (ml) = ปริมาณสารละลายที่ใช้ในการชะคอลัมน์ในแต่ละ fraction

mass of concentrate (mg) = ปริมาณของแข็งในแต่ละ fraction

mass ratio of concentrate (%) = (mass of concentrate;mg) /total mass of concentration) x 100

mass of isoflavone(mg) = ปริมาณไอโซฟลาโวนในแต่ละ fraction

yield of isoflavone(%) = (mass of isoflavones ; mg) / total mass of isoflavone) x 100

purity of isoflavones(%) = (mass of isoflavones ; mg / mass of concentrate ; mg) x 100

ตารางที่ 4.15 ร้อยละความบริสุทธิ์ของสารสกัดไอโซฟลาโวนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เรซินชนิด Amberlite XAD-4

Step of coluumn operation XAD-4	**Fraction**	**Operating volume(ml)**	**Mass of concentrate(mg)**	**Mass ratio of concentrate(%)**	**Mass of isoflavones (mg)**	**Yield of isoflavone(%)**	**Purity of isoflavone(%)**
Adsorption	1	285.00	10130.00	71.90	225.17	24.51	2.22
Washing(DI water)	2	400.00	1068.00	7.58	17.90	1.95	1.68
Step-gradient elution							
20% Ethanol	3	400.00	161.00	1.14	8.49	0.92	5.27
40% Ethanol	4	400.00	602.00	4.27	117.64	12.81	19.54
60% Ethanol	5	400.00	988.00	7.01	375.31	40.86	37.99
80% Ethanol	6	400.00	1140.00	8.09	174.12	18.95	15.27
Total		-	14089.00	100.00	918.63	100.00	

หมายเหตุ : ความบริสุทธิ์ของไอโซฟลาโวนในสารสกัดเริ่มต้นมีค่าเท่ากับร้อยละ 5.30 ของปริมาณสารสกัดเข้มข้น

adsorption = สารละลายไอโซฟลาโวนจาก อัตราส่วน crude extract of defated soyferment : Ethanol 80% : DI water ; 1:2:4

operating volume (ml) = ปริมาณสารละลายที่ใช้ในการชะคอลัมน์ในแต่ละ fraction

mass of concentrate (mg) = ปริมาณของแข็งในแต่ละ fraction

mass ratio of concentrate (%) = (mass of concentrate;mg) /total mass of concentration) x 100

mass of isoflavone(mg) = ปริมาณไอโซฟลาโวนในแต่ละ fraction

yield of isoflavone(%) = (mass of isoflavones ; mg) / total mass of isoflavone) x 100

purity of isoflavones(%) = (mass of isoflavones ; mg / mass of concentrate ; mg) x 100

ตารางที่ 4.16 ร้อยละความบริสุทธิ์ของสารสกัดไอโซฟลาโวนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เรซินชนิด Amberlite XAD-7HP

Step of coluumn operation XAD-7HP	Fraction	Operating volume(ml)	Mass of concentrate(mg)	Mass ratio of concentrate(%)	Mass of isoflavones (mg)	Yield of isoflavone(%)	Purity of isoflavone(%)
Adsorption	1	285.00	10,860.00	69.39	286.44	27.02	2.64
Washing(DI water)	2	400.00	1,149.00	7.34	12.19	1.15	1.06
Step-gradient elution							
20% Ethanol	3	400.00	181.00	1.16	18.62	1.76	10.29
40% Ethanol	4	400.00	774.00	4.95	223.21	21.06	28.84
60% Ethanol	5	400.00	1,515.00	9.68	406.75	38.37	26.85
80% Ethanol	6	400.00	1,172.00	7.49	112.89	10.65	9.63
Total		-	15,651.00	100.00	1,060.10	100.00	

หมายเหตุ : ความบริสุทธิ์ของไอโซฟลาโวนในสารสกัดเริ่มต้นมีค่าเท่ากับร้อยละ 5.30 ของปริมาณสารสกัดเข้มข้น

adsorption = สารละลายไอโซฟลาโวนจาก อัตราส่วน crude extract of defated soyferment : Ethanol 80% : DI water ; 1:2:4

operating volume (ml) = ปริมาณสารละลายที่ใช้ในการชะคอลัมน์ในแต่ละ fraction

mass of concentrate (mg) = ปริมาณของแข็งในแต่ละ fraction

mass ratio of concentrate (%) = (mass of concentrate;mg) /total mass of concentration) x 100

mass of isoflavone(mg) = ปริมาณไอโซฟลาโวนในแต่ละ fraction

yield of isoflavone(%) = (mass of isoflavones ; mg) / total mass of isoflavone) x 100

purity of isoflavones(%) = (mass of isoflavones ; mg / mass of concentrate ; mg) x 100

ตารางที่ 4.17 ร้อยละความบริสุทธิ์ของสารสกัดไอโซฟลาโวนที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เรซินชนิด Amberlite XAD-16HP

Step of coluumn operation XAD-16HP	**Fraction**	**Operating volume(ml)**	**Mass of concentrate(mg)**	**Mass ratio of concentrate(%)**	**Mass of isoflavones (mg)**	**Yield of isoflavone(%)**	**Purity of isoflavone(%)**
Adsorption	1	285.00	10,660.00	64.83	226.43	21.14	2.12
Washing(DI water)	2	400.00	1,394.00	8.48	13.93	1.30	1.00
Step-gradient elution							
20% Ethanol	3	400.00	157.00	0.95	9.77	0.91	6.22
40% Ethanol	4	400.00	896.00	5.45	261.82	24.44	29.22
60% Ethanol	5	400.00	1,884.00	11.46	408.98	38.18	21.71
80% Ethanol	6	400.00	1,453.00	8.84	150.32	14.03	10.35
Total		-	16,444.00	100.00	1071.25	100.00	

หมายเหตุ : ความบริสุทธิ์ของไอโซฟลาโวนในสารสกัดเริ่มต้นมีค่าเท่ากับร้อยละ 5.30 ของปริมาณสารสกัดเข้มข้น

adsorption = สารละลายไอโซฟลาโวนจาก อัตราส่วน crude extract of defated soyferment : Ethanol 80% : DI water ; 1:2:4

operating volume (ml) = ปริมาณสารละลายที่ใช้ในการชะคอลัมน์ในแต่ละ fraction

mass of concentrate (mg) = ปริมาณของแข็งในแต่ละ fraction

mass ratio of concentrate (%) = (mass of concentrate;mg) /total mass of concentration) x 100

mass of isoflavone(mg) = ปริมาณไอโซฟลาโวนในแต่ละ fraction

yield of isoflavone(%) = (mass of isoflavones ; mg) / total mass of isoflavone) x 100

purity of isoflavones(%) = (mass of isoflavones ; mg / mass of concentrate ; mg) x 100

จากตารางที่ 4.14 - 4.17 แสดงให้เห็นว่าในเรซินแต่ละชนิดที่แตกต่างกันมีประสิทธิภาพในการทำให้สารสกัดไอโซฟลาโวนบริสุทธิ์ได้ต่างกันเช่นกัน โดยในขั้นตอนแรกเมื่อทำการเทสารสกัดลงไปในคอลัมน์แล้วไอโซฟลาโวนส่วนมากจะเกาะติดกับตัวเรซิน หลังจากนั้นจึงนำน้ำที่ผ่านการกำจัดประจุอิออน (DI water) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ล้างคอลัมน์เพื่อกำจัดสารที่ไม่ต้องการออก จากนั้นจึงนำเอทานอลแต่ละความเข้มข้น ได้แก่ ร้อยละ 20, 40, 60 และ 80 โดยใช้ความเข้มข้นละ 400 มิลลิลิตร มาชะเอาไอโซฟลาโวนที่ติดอยู่กับเรซินออก แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไอโซฟลาโวน และคำนวณหาค่าร้อยละความบริสุทธิ์ของไอโซฟลาโวน (Purity ofisoflavone) และร้อยละปริมาณผลผลิตที่ได้ (Yield of isoflavone) จากนั้นเลือกระดับความเข้มข้นของเอทานอลที่สามารถให้ความบริสุทธิ์มากที่สุดในแต่ละชนิดเรซิน มาเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ในแต่ละเรซิน ได้ผลการทดลองดังนี้

ตารางที่ 4.18 ค่าร้อยละปริมาณผลผลิตที่ได้และค่าร้อยละความบริสุทธิ์ของไอโซฟลาโวนในเรซินแต่ละชนิด

Resin	%yield40-60%	%purity 40-60%
diaion HP20	76.32 ± 14.25^{a}	26.83 ± 1.12^{c}
Amberlite XAD-4	53.66 ± 19.83^{d}	31.00 ± 13.04^{a}
Amberlite XAD-7HP	59.42 ± 12.24^{c}	27.52 ± 1.14^{b}
Amberlite XAD-16HP	62.62 ± 5.31^{b}	24.13 ± 5.31^{d}

หมายเหตุ: ความบริสุทธิ์ของไอโซฟลาโวนในสารสกัดเริ่มต้นมีค่าเท่ากับร้อยละ 5.30 ของปริมาณสารสกัดเข้มข้น

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับข้อมูลในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่า ค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.18 เมื่อพิจารณาส่วนของค่าความบริสุทธิ์ของไอโซฟลาโวนแล้ว พบว่า Amberlite XAD-4 มีความบริสุทธิ์ของไอโซฟลาโวนมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 31 ของของแข็งทั้งหมด และ Amberlite XAD-16HP มีความบริสุทธิ์น้อยที่สุดเท่ากับร้อยละ 24 ของของแข็งทั้งหมด ซึ่งมีงานทดลองของ Aimin *et al.* (2001) โดยศึกษาการดูดซับ Phenolic compounds จำนวน 4 ชนิดด้วย Amberlite XAD-4 พบว่า Amberlite XAD-4 สามารถดูดซับสาร Phenolic compounds ทั้ง 4 ชนิด ได้เพิ่มขึ้นมากกว่าร้อยละ 20 ทั้งนี้เนื่องจาก Amberltie XAD-4 เป็นเรซินชนิด Macroporous styrene-divinylbenzenecopolymer ซึ่งพบว่าเป็นเรซินที่ดีที่สุดสำหรับการกำจัดสาร Phenolic compounds จากสารละลายที่ละลายได้ด้วยน้ำแต่จะไม่สามารถกำจัดสารที่ไม่สามารถละลายได้ด้วยน้ำ (Li *et al.,* 2001) ดังนั้นจึงใช้ Amberlite XAD-4 ในการผลิตไอโซฟลาโวนบริสุทธิ์ต่อไป