

หัวข้อคุณูปการ	การผลิตไอโซฟลาโวนอะไกลโคนจากถั่วเหลืองโดยใช้ กล้าเชื้อบริสุทธิ์
ผู้เขียน	นายเรวัต พงษ์พิสุทธินันท์
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์ ดร. สายสมร ถ้ายอง อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ศาสตราจารย์ ดร. ไพโรจน์ วิริยจารี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วสุ ปฐมอริย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ไอโซฟลาโวนเป็นสารในกลุ่มไฟโตเอสโตรเจนพบมากในถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง มีคุณสมบัติในการลดความเสี่ยงของโรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคกระดูกพรุนและอาการวัยทอง ไอโซฟลาโวนมีโครงสร้างหลักอยู่ 2 แบบ คือ อะไกลโคนและกลูโคไซด์ โครงสร้างแบบอะไกลโคนเป็นโครงสร้างที่ร่างกายสามารถดูดซึมได้เร็วและออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนมากกว่าโครงสร้างแบบกลูโคไซด์ โดยทั่วไปไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองจะมีโครงสร้างแบบกลูโคไซด์แต่จะถูกเปลี่ยนเป็นแบบอะไกลโคนเมื่อถั่วเหลืองถูกย่อยด้วยเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดส ในกระบวนการหมักจึงทำให้พบไอโซฟลาโวนอะไกลโคนสูงในผลิตภัณฑ์หมักจากถั่วเหลือง ดังนั้นจึงมีการวิจัยเพื่อผลิตไอโซฟลาโวนอะไกลโคนจากถั่วเหลืองโดยใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์

การคัดเลือกกล้าเชื้อที่เหมาะสมจากเชื้อ *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากถั่วเน่า (35 ไอโซเลต) และนัตโต (6 ไอโซเลต) พบว่า ไอโซเลต PR03 สามารถผลิตไอโซฟลาโวนอะไกลโคนได้สูงที่สุดในการระบุสปีชีส์ด้วยลักษณะพื้นฐานวิทยา วิธีการทางชีวเคมีและการหาลำดับเบสของยีนส์ด้วย 16S rDNA เทียบกับฐานข้อมูล พบว่า เป็น *Bacillus coagulans*

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอโซฟลาโวนอะไกลโคนระดับห้องปฏิบัติการที่ระดับ 1 กิโลกรัมจากถั่วเหลืองต่อกะ พบว่า จมูกถั่วเหลืองจากถั่วเหลืองพันธุ์ สจ2 มีความเหมาะสมใช้เป็นแหล่งไอโซฟลาโวนกลูโคไซด์ โดยสภาวะที่เหมาะสมในการหมัก คือ ใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ของ *B. coagulans* PR03 ร้อยละ 15 ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน และมีอัตรา

การผลิตไอโซพลาโวนอะไกลโคนจำเพาะเท่ากับ 198.38 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม-วัน เมื่อทำการขยายการผลิตที่ระดับ 5 กิโลกรัมจากแก้วเหลืองต่อกะในถังหมักแบบหมุนขนาด 46 ลิตร โดยหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมในถังหมัก พบว่า อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมคือ 6 ลิตรต่อนาที สามารถลดระยะเวลาจากการหมักในระดับห้องปฏิบัติการเหลือ 4 วัน และมีอัตราการผลิตไอโซพลาโวนอะไกลโคนจำเพาะเท่ากับ 230.67 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม-วัน

การศึกษาการสกัดไอโซพลาโวนอะไกลโคนด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม พบว่า การสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 ร่วมกับการสกัดที่ความเร็วรอบ 3,986.95 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90.31 นาที สามารถสกัดไอโซพลาโวนอะไกลโคนออกจากจุกแก้วเหลืองหมักได้มากที่สุด เท่ากับ 293.73 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักเปียก จากนั้นศึกษาการทำสารสกัดไอโซพลาโวนอะไกลโคนให้บริสุทธิ์โดยเปรียบเทียบเรซิน 4 ชนิด คือ Diaion HP-20, Amberlite XAD-4, Amberlite XAD-7HP และ Amberlite XAD-16HP พบว่า ชนิดของเรซินที่เหมาะสม คือ Amberlite XAD-4 โดยไอโซพลาโวนอะไกลโคนที่ผลิตได้มีร้อยละความบริสุทธิ์และร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 71.92 และ 75.42 ตามลำดับ

การผลิตไอโซพลาโวนชนิดผงโดยใช้ไอโซพลาโวนอะไกลโคนบริสุทธิ์ผสมโซเดียมอัลจินเต ร้อยละ 1 เป็นสารช่วยยึดเกาะอัตราส่วน 1 ต่อ 3 ลักษณะผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีเหลืองอ่อนและได้ปริมาณร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 3 ประกอบด้วยไคซิอิน เจนีสทีอิน ไกลซิทีอินและไอโซพลาโวนอะไกลโคนรวม เท่ากับ 13,446.51, 3,310.06, 6,001.92 และ 22,778.50 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมผงตามลำดับ

การศึกษาความคงตัวของไอโซพลาโวนระหว่างการเก็บรักษาภายใต้สภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 4, 25, 35, 45 และ 55 องศาเซลเซียส พบว่า ไอโซพลาโวนชนิดผงมีอายุการเก็บรักษาในตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส) เท่ากับ 2.09 ปี ในห้องปรับอากาศ (25 องศาเซลเซียส) เท่ากับ 2.08 ปี และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส) เท่ากับ 1.87, 1.63 และ 1.38 ปี ตามลำดับ

Dissertation Title	Production of Soy Isoflavone Aglycones Using Pure Starter Culture	
Author	Mr. Rewat Phongphisutthiant	
Degree	Doctor of Philosophy (Applied Microbiology)	
Advisory Committee	Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Advisor
	Prof. Dr. Pairote Wiriyacharee	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Wasu Pathom-aree	Co-advisor

ABSTRACT

Isoflavones are phytoestrogens that particularly present in soybeans and soybean products. Many potential health benefits of isoflavones have been investigated, such as reducing the risk of cancer, vascular diseases, osteoporosis and menopausal symptoms. Isoflavones are classified into 2 forms including aglycones and glucosides. Aglycone forms are rapidly absorbed in the body and have higher estrogenicity than glucoside forms. Generally, isoflavones structure in soybean is in glucoside forms. Nonetheless, the glucosides of isoflavone will change into aglycones when soybean is hydrolyzed by β -glucosidase in fermentation process. As the result, the amount of isoflavone aglycones is increased in fermented soybean products. Therefore, this research aimed to produce soy isoflavone aglycones using pure starter culture.

Suitable starter culture of *Bacillus* spp. was selected from isolates in thua nao (35 isolates) and natto (6 isolates). It was found that isolate PR03 could produce the highest amount of isoflavone aglycones. The isolate was identified as *Bacillus coagulans* based on morphology, biochemical tests and 16S rDNA sequence.

The investigation of suitable optimum condition of isoflavone aglycones production in lab scale (1 Kg soygerm/batch) had found that soygerm from soybean SJ2 variety was a suitable source of isoflavone glucosides. The appropriate environment for fermentation was using 15% (v/w) concentration of *B. coagulans* PR03 at the temperature of 30 °C for

5 days. The resulting specific isoflavone aglycones formation rate was 198.38 mg/100 g-day. When the production was scaled up to 5 Kg soygerm/batch in 46L rotating fermenter, it was found that optimum air flow rate of 6 L/min could decrease the fermentation duration to 4 days compared with the lab scale process. Moreover, the specific isoflavone aglycones formation rate of the scaled up process was 230.67 mg/100 g-day

The study of extracting isoflavone aglycones by various solvents, concentrations, extraction speeds and extraction times had found that extracting with 80% ethanol at 3,986.95 rpm for 90.31 min can extract isoflavone aglycones from fermented soygerm with the highest amount, which was 293.73 mg/100 g wet weight. The study of purification process by comparing 4 types of resin; including Diaion HP-20, Amberlite XAD-4, Amberlite XAD-7HP and Amberlite XAD-16HP, had found that the suitable resin was Amberlite XAD-4. The isoflavone aglycones purified by this resin had the purity and yield of 71.92% and 75.42%, respectively.

The isoflavone aglycones powder production was conducted with 1:3 ratio of purified isoflavone aglycones extract and 1% sodium alginate solution. The color of powder was light yellow with the yield of 3%. The resulting powder contained daidzein, genistein, glycitein and total isoflavone aglycones at 13,446.51, 3,310.06, 6,001.92 and 22,778.50 mg/ 100 g powder, respectively.

Stability of isoflavone aglycones during storage was studied in accelerates temperature condition at 4, 25, 35, 45 and 55 °C. It was found that, shelf-life of the isoflavone aglycones powders at refrigerating temperature (4 °C), air conditioning (25 °C) and room temperature (30, 35 and 40 °C) were 2.09, 2.08, 1.87, 1.63 and 1.38 years, respectively.