

การศึกษาเบื้องต้นเพื่อใช้น้ำเวย์จากโรงงานเต้าหู้เลี้ยงจุลินทรีย์

อรัญ หันพงศ์กิตติกุล, เรณู ปิ่นทอง และ ชินอิจิ คิโนชิตะ

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เชียงใหม่ 50002

และ

ศูนย์ร่วมมือวิจัยและพัฒนาทางด้านวิศวกรรมของจุลินทรีย์ ระหว่างประเทศ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยโอซาก้า

PRELIMINARY STUDIES

ON

MICROBIAL UTILIZATION OF SOYBEAN WHEY FROM TOFU FACTORY

Aran H-Kittikun, Renu Pinthong and Shinichi Kinoshita

Department of Food Science and Technology

Faculty of Agriculture, Chiang Mai University

Chiang Mai 50002

and

International Center of Cooperative Research and

Development in Microbial Engineering (ICME),

Faculty of Engineering, Osaka University

ABSTRACT: Preliminary study was carried out by using soybean whey (waste water from tofu factories) to cultivate different types of microorganisms in order to produce biomass,

biogas, riboflavin and cellulase enzyme. The soybean whey was composed of reducing sugar (0.5 mg/ml), total sugar (5.5 mg/ml) total amino acid (4.1 mg/ml) and total nitrogen (1.62 mg/ml). More than 30 microorganisms isolated from spoiled tofu were grown in soybean whey. The best isolate was yeast which could grow in whey with maximal growth of 2.52 units (OD 660 nm) in one day. The residue from cow-dung biogas plant was used as a starter for producing whey biogas which was done in a litre bottle by semi-batch process. The production rate was 200 ml in 2 days. *Eremothecium ashbyii* grown in whey for 5 days synthesized 0.09 mg/ml riboflavin. This production rate could be increased to 0.92 mg/ml by adding 14% soybean residue. Lastly, 5 day-old culture of *Sporotrichum cellulophilum* was able to synthesize 0.78 unit/ml of cellulase and in the addition of 10% soybean residue the cellulase production increased to 1.28 unit/ml.

บทคัดย่อ : การศึกษาเบื้องต้นนี้ทำขึ้นเพื่อที่จะหาทางใช้ประโยชน์จากน้ำเวย์ ซึ่งได้จากการตกตะกอนแยกเต้าหู้แล้ว โดยเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิต มวลชีวภาพ ก๊าซชีวภาพ ไบโกลานอสโง และเอ็นไซม์เซลลูเลส ผลการทดลองสรุปได้ดังนี้ น้ำเวย์ประกอบด้วยน้ำตาลรีดิวซ์ 0.5 มก./มล. น้ำตาลทั้งหมด 5.5 มก./มล. กรดอะมิโน 4.1 มก./มล. และไนโตรเจนทั้งหมด 1.62 มก./มล. จุลินทรีย์มากกว่า 30 ชนิด แยกได้จากน้ำเต้าหู้ดิบเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงในน้ำเวย์ใหม่ได้มีสารขึ้นโต พบว่าจุลินทรีย์ที่เจริญดีที่สุดคือ ยีสต์ ซึ่งให้ค่า OD 660 เป็น 2.52 หน่วย ภายใน 1 วัน การทดลองผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเวย์ได้ใช้กากเหลือจากการหมักก๊าซชีวภาพจากมูลวัวเป็นเชื้อเริ่มต้น 15 การหมักเป็นแบบกึ่งต่อเนื่อง พบว่าในขวดหมักขนาด 1 ลิตร สามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้ 200 มล. ภายใน 2 วัน การเลี้ยง *Eremothecium ashbyii* ในน้ำเวย์เป็นเวลา 5 วัน สามารถผลิตไรโบฟลาวินได้ 0.09 มก./มล. ในน้ำเวย์ที่เติมกากตัวเหลือ 14% จะผลิตไรโบฟลาวินได้เป็น 0.92 มก./มล. และการเลี้ยง *Sporotrichum cellulophilum* ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเวย์เป็นเวลา 5 วัน สามารถผลิตเซลลูเลสได้ 0.78 หน่วย/มล. และเมื่อเติมกากตัวเหลือ 10% จะได้เซลลูเลสเพิ่มเป็น 1.28 หน่วย/มล.

คำนำ

เต้าหู้เป็นอาหารโปรตีนสูงทำจากถั่วเหลือง นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย การผลิตเต้าหู้ในปัจจุบันส่วนใหญ่นิยมทำเป็นแบบอุตสาหกรรมครัวเรือน คาดว่าในอนาคตคงจะมีการผลิตเป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ วิธีการผลิตเต้าหู้อาจทำได้หลายวิธี ถ้าใช้ถั่วเหลือง 1 กิโลกรัม ควรใช้น้ำ 10-15 ลิตร เพื่อแช่แล้วหมักก่อนที่จะตกตะกอนโปรตีนออกมา ของเสียที่ได้จากการทำเต้าหู้คือ กากถั่วเหลือง น้ำทิ้งจากการแช่ถั่ว และน้ำเวย์ที่ได้หลังจากตกตะกอนโปรตีนแล้ว กากถั่วเหลืองทั้งหมดถูกนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์แต่น้ำทิ้งและน้ำเวย์มักปล่อยลงในแหล่งน้ำธรรมชาติ ในน้ำเวย์ นอกจากจะมีเศษโปรตีนหลงเหลืออยู่แล้ว ยังมีคาร์โบไฮเดรต และสารประกอบอินทรีย์หลายชนิด ตลอดจนเกลือแร่และวิตามิน ซึ่งเหมาะต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และมีค่า BOD สูง หากมีปริมาณและยังคงปล่อยทิ้งลงในแหล่งน้ำธรรมชาติ ก็จะมีผลเสียต่อระบบนิเวศน์วิทยาของแหล่งน้ำได้

นักวิทยาศาสตร์ได้หาทางนำน้ำเวย์มาใช้ประโยชน์เช่น Sugimoto (1974) ได้ใช้น้ำเวย์หลังการผลิตถั่วเหลืองเกล็ดสะกัตน้ำมัน (defatted soybean flakes) เลี้ยง *Derbaryomyces kioeckerii* พบว่าสามารถผลิตยีสต์ได้ 14.61 กรัม ของน้ำหนักแห้งต่อน้ำเวย์ 1 ลิตร Wong (1985) ได้ใช้น้ำเวย์หลังจากแยกโปรตีนแล้ว เลี้ยงสาหร่าย 2 ชนิด คือ *Chlorella pyrenoidosa* และ *Scenedesmus quadricaula* พบว่าสามารถใช้สาหร่ายเหล่านั้นเป็นอาหารสัตว์ได้ดี นอกจากนี้ Yongsmith และ Apiraktivongse (1983) ใช้น้ำเวย์เลี้ยง *Propionibacterium freudenreichii* และพบว่าสามารถผลิตวิตามินบีสิบสองได้

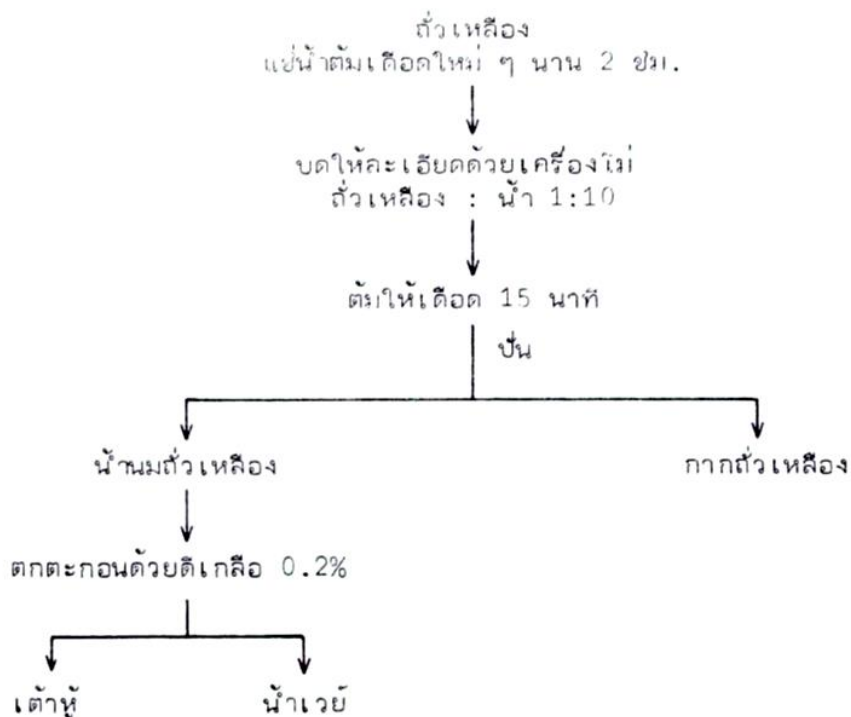
การศึกษาเบื้องต้นครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์ที่จะหาทางนำน้ำเวย์มาใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เพื่อผลิตมวลชีวภาพ วิตามินบีสิบสอง เอ็นไซม์เซลลูเลส และก๊าซชีวภาพ

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

จุลินทรีย์

1. จุลินทรีย์ใช้ผลิตมวลชีวภาพ เป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากน้ำเวย์ที่ปล่อยให้สลายตัวตามธรรมชาติ
2. จุลินทรีย์เริ่มต้น (seeding culture) สำหรับผลิตก๊าซชีวภาพ ใช้จากมูลวัวจากบ่อหมักก๊าซชีวภาพ ของสถาบันบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่
3. *Eremothecium ashbyii* สำหรับผลิตไรโบฟลาวิน และ
4. *Sporotrichum cellulophilum* สำหรับผลิตเซลลูเลส ได้รับความเชื้อเพื่อจาก ICME

การเตรียมน้ำเวย์ และการเพาะเลี้ยงน้ำเวย์ที่ใช้ในการทดลอง ได้รับความเชื้อเพื่อจากโรงงานทำเต้าหู้ในเชียงใหม่ มีขั้นตอนการทําดังแสดงตามแผนภาพ



การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ เพื่อผลิตมวลชีวภาพ ไโรโบฟลาวิน และเซลล์ เลส ใช้ น้ำเวย์ 50 มล. ใส่ฟลากลขนาด 500 มล. นำไปฆ่าเชื้อที่ 120°C . 15 นาที แล้วจึง เติมจุลินทรีย์ที่ต้องการศึกษา นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อ นาที ที่อุณหภูมิห้อง

การผลิตก๊าซชีวภาพ ได้ใช้น้ำเวย์โดยไม่ผ่านการฆ่าเชื้อใด ๆ ใส่ในขวดปาก แคบขนาด 1 ลิตร ใช้เชื้อเริ่มต้น 100 มล. ผสมกับน้ำเวย์ 900 มล. ปล่องให้หมัก 3 วัน แล้วถ่ายน้ำเวย์ในขวดออก 500 มล. ทุก ๆ 2 วัน แล้วเติมน้ำเวย์ใหม่ลงไปแทน ในปริมาณเท่า ๆ กัน

การตรวจวิเคราะห์

1. การตรวจมวลชีวภาพ ใช้วิธีวัดความขุ่นที่ OD 660 โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (Spectronic 21)

2. การวัดปริมาตรก๊าซที่ผลิตได้ ใช้วิธีการแทนที่น้ำ

3. การตรวจหาไโรโบฟลาวิน ทำโดยเติม 50 mM sodium acetate buffer pH 4.5 ลงในน้ำเวย์ที่เพาะเลี้ยง *E. ashbyii* ในปริมาณเท่า ๆ กัน ต้ม ให้เดือด 3 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาส่วนใสไปวัดหาปริมาณไโรโบฟลาวิน โดยวิธี fluorometric method วัดด้วย เครื่อง fluorometer ใช้ช่วงคลื่น excitation ที่ 440 nm และมี peak emission สูงที่สุด 475 (Association of Vitamin Chemists 1966)

4. การตรวจหาปริมาณเอ็นไซม์เซลล์เลสปั่นน้ำเวย์ที่เพาะเชื้อ *S. cellu-
lophilum* ด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมา 0.5 มล. ผสมกับ 0.5 มล. ของ 1% carboxymethyl cellulose (CMC) ใน 50 mM sodium acetate buffer pH 4.5 ปล่องให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้น 10 นาที ที่อุณหภูมิ 40°C .

แล้วนำไปวิเคราะห์หา reducing sugar เอ็นไซม์ 1 หน่วย หมายถึงปริมาณเอ็นไซม์ที่เปลี่ยน CMC ไปเป็นกลูโคสได้ 1 โมล ภายใน 1 นาที

5. การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำเวย์ น้ำเวย์มาวิเคราะห์หาน้ำตาลทั้งหมดโดย phenol sulphuric method (Dubois *et al.* 1956) หา Reducing sugars โดยใช้ DNS reagent (Miller 1951) หากกรดอะมิโนทั้งหมดและ TCA precipitated protein โดยใช้ Folin phenol (Lowry *et al.* 1951) การหาสารประกอบไนโตรเจนใช้วิธี micro Kjeldahl หาปริมาณของแข็งทั้งหมด โดยอบที่ 80°C. จนได้น้ำหนักคงที่ และหาเถ้าโดยเผาที่ 550°C. จนกระทั่งได้เถ้าขาว

ผลการทดลองและวิจารณ์

องค์ประกอบของน้ำเวย์

การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำเวย์ พบว่ามี pH 6.4 มีค่า COD 24000 ppm. และมีองค์ประกอบต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยมีน้ำตาลทั้งหมดและกรดอะมิโนทั้งหมดเป็น 5.5 และ 4.1 มก./มล. ตามลำดับ Yongsmi และ Apirakti-vongse (1983) ได้วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำเวย์ และรายงานว่านอกจากจะมีคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนแล้วยังมีธาตุพวกเหล็ก สังกะสี แคลเซียม แมงกานีส ทองแดง โพแทสเซียม และโซเดียมด้วย

การเจริญของจุลินทรีย์ในน้ำเวย์

การทดลองนี้แยกได้จุลินทรีย์ 30 ชนิด จากเต้าหู้เสีย เป็นแบคทีเรีย 7 ชนิด และยีสต์ 23 ชนิด แต่ยังไม่ได้จัดจำแนกว่าเป็นจุลินทรีย์ genus และ species ใดบ้าง เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในน้ำเวย์ได้ผลตามตารางที่ 2 พบว่ายีสต์เจริญได้ดีกว่าแบคทีเรีย และ

ทำให้หน้าเวทย์มี pH เป็นต่าง ยีสต์หมายเลข 4 เจริญดีที่สุด วัด OD 660 nm ได้ 2.52 เมื่อวิเคราะห์หาน้ำตาลทั้งหมด และกรดอะมิโนในน้ำเวย์หลังจากเลี้ยงจุลินทรีย์ พบว่ายังคงเหลืออยู่ 40-50% ทั้งนี้อาจเนื่องจากการอาหารที่เหลืออยู่ในรูปที่จุลินทรีย์ไม่สามารถย่อยได้ หรืออาจจะเนื่องจากในน้ำเวย์ขาดธาตุอาหารที่จำเป็นบางอย่าง

การผลิตโรโบฟลาวิน

การเพาะเลี้ยง *E. ashbyii* ในน้ำเวย์ที่ไม่ได้เติมสารอาหารอื่นใด เป็นเวลา 5 วัน สามารถผลิตไวตามินบีสองได้เพียง 0.09 มก/มล. เมื่อเติมกากถั่วเหลือง (มีความชื้น 70%) ปริมาณต่าง ๆ กันลงไป ผลการผลิตโรโบฟลาวินแสดงในตารางที่ 3 พบว่าเมื่อเติมกากถั่วเหลืองลงไป 14% สามารถผลิตโรโบฟลาวินได้ถึงถึง 0.92 มก/มล. แต่ถ้าใช้กากถั่วเหลืองในปริมาณที่สูงกว่านี้อัตราการผลิตจะลดต่ำลง

เนื่องจากการหาตัวไนซ์ซัลเฟต ($MgSO_4$) เป็นตัวทำให้โปรตีนตกตะกอน ดังนั้นสารพวกฟอสเฟอรัสที่มีอยู่อาจตกตะกอนด้วย จึงเป็นสาเหตุให้จุลินทรีย์เจริญในน้ำเวย์ได้ไม่ดี เมื่อทดลองเติม KH_2PO_4 ลงในน้ำเวย์ในปริมาณต่าง ๆ กัน แล้วเลี้ยง *E. ashbyii* พบว่าปริมาณ KH_2PO_4 ที่เหมาะสมคือ 5 มก/มล. ถ้าเติม KH_2PO_4 ในปริมาณที่สูงกว่านี้จะมีผลยับยั้งการผลิตโรโบฟลาวิน (ตารางที่ 4)

การผลิตเซลลูเลส

การเพาะเลี้ยง *S. cellulophilum* ในน้ำเวย์ โดยไม่เติมสารอาหารใด ๆ เป็นเวลา 5 วัน สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ 0.78 หน่วย/มล. การเติมกากถั่วเหลืองปริมาณต่าง ๆ กันลงไป พบว่า สามารถกระตุ้นการผลิตเซลลูเลสในน้ำเวย์ได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ตารางที่ 5) โดยการเติมกากถั่วเหลืองลงไป 10% จะ

ช่วยเพิ่มการผลิตเซลลูเลสได้สูงสุดเป็น 1.28 หน่วย/มล. เนื่องจาก *S. Cellulophilum* ต้องการอากาศมาก จึงได้เพาะเลี้ยงเชื้อราบนกากถั่วเหลืองโดยตรง โดยใช้กากถั่วเหลือง 20 กรัม ใส่ฟลาสขนาด 500 มล. พบว่าเมื่อครบ 5 วัน สามารถผลิตเซลลูเลสได้ 7 หน่วยต่อกรัม ของกากถั่วเหลือง

การผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำเวย์

ในช่วง 2-3 วันแรก มีก๊าซออกมามาก เนื่องจากจุลินทรีย์ได้รับอาหารจากกากมูลโคร่วมกับน้ำเวย์ หลังจากหมักได้ 3 วัน และทำการเปลี่ยนน้ำเวย์ทุก ๆ 2 วัน พบว่าสามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้ 200 มล. ภายใน 2 วัน โดยน้ำเวย์มี COD เริ่มต้น 24000 ppm. และหลังจากหมัก 2 วัน มี COD ลดท้าย 8000 ppm. ซึ่งยังคงมีค่าสูงมาก แสดงว่าสภาพการหมักยังไม่เหมาะสม การผลิตก๊าซชีวภาพนอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบแล้ว ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีอิทธิพลต่อการผลิต เช่น ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ความเป็นกรดและปริมาณอาหารที่เติม ระยะเวลาที่หมัก pH และอุณหภูมิการหมัก ซึ่งน่าจะศึกษาต่อไป

Table 1. Compositions of whey.

	mg/ml
Reducing sugars	0.5
Total sugars	5.5
Total amino acids	4.1
Total proteins	0.9
Total nitrogen	1.6
Total solid	11.6
Ash	2.5

Table 2. Growth and nutrient utilization by different micro-organisms

Culture number	Growth (day)	Growth (OD 660)	final pH	Residual nutrients (mg/ml)	
				Total sugar	Total amino acid
2	2	3.60	7.76	1.0	2.1
4	1	2.52	7.34	2.3	2.2
5*	1	2.47	7.92	3.1	2.0
6	1	1.82	6.98	3.1	2.4
9*	2	1.40	8.12	3.7	2.2
10	2	1.00	6.36	4.6	2.5
11	2	1.60	6.40	3.7	2.4
14	1	2.32	7.16	3.1	2.3
15*	3	2.40	8.30	3.2	2.5
16*	3	2.23	8.30	3.1	2.2
19	1	1.62	6.94	3.1	2.6
20	2	2.00	7.54	3.1	2.1
21*	3	2.12	8.52	3.1	2.2
22	2	1.90	6.26	3.3	2.4
23*	3	2.11	8.43	3.1	2.2
24	2	1.40	6.18	3.9	2.4
26	1	1.80	6.86	3.1	2.5
28*	3	2.31	8.35	3.4	2.2

* bacteria

Table 3. Effect of soybean residue on riboflavin production by *E. ashbyii* (5 day old culture).

Amount of soybean residue added into 50 ml of whey (g)	Riboflavin production (mg/ml)
0	0.090
1	0.115
5	0.411
7	0.920
10	0.480
15	0.400

Table 4. Effect of phosphate on riboflavin production by *E. ashbyii* (5 day old culture)

KH_2PO_4 (mg/ml)	Riboflavin production (mg/ml.)
0	0.095
0.5	0.117
1.5	0.207
5.0	0.263
15.0	0.154
50.0	0.151

Table 5. Effect of soybean residue on cellulase production by *S. cellulophilum* (5 day old culture)

Amount of soybean residue added into 50 ml of whey (g)	Cellulase production (unit/ml)
0	0.78
1	1.04
3	1.13
5	1.28
7	1.24
10	1.06
15	1.01

เอกสารอ้างอิง

- Association of Vitamin Chemists. (1966). Methods of Vitamin assay 3rd ed. The Association of Vitamin chemist, Inc. Interscience Publishers, New York.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 28:350-356.
- Lowry, O.H.; Rosenbrough, J.J.; Farr, A.L.; and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:256-275.
- Miller, G.L. (1956). Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31:426-428.
- Sugimoto, H. (1974). Treatment of soybean spent solubles by means of yeast cultivation. J. Food Sci. 39:934-938.
- Wong, M.H. (1985). Cultivation of microalgae in refuse compost and soybean waste extracts. Agricultural wastes. 12: 225-233.
- Youngsmith, B. and Apiraktivongse, P. (1983). Vitamin B₁₂ production from soybean curd whey with Propionibacterium freudenreichii. J. Ferment. Technol. 61:105-107.