รหัสโครงการ SUT 3-305-54-24/5

รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ทางชีวภาพ คุณค่าทางโภชนาการและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของถั่วเหลืองและถั่วขาวที่ผ่านการหมัก

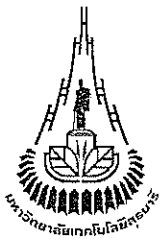
(Biological activity, nutritional and functional properties of fermented soybeans and fermented white kidney bean)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT 3-305-54-24/5



รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ทางชีวภาพ คุณค่าทางโภชนาการและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของถั่วเหลืองและถั่วขาวที่ผ่านการหมัก

(Biological activity, nutritional and functional properties of fermented soybeans and fermented white kidney bean)

คณะผู้วิจัย
หัวหน้าโครงการ
ผศ.ดร.รัชฎาพร อุ่นดิวิไลย์
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2556
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2556

ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือ 1,3และ 10 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทุกท่านที่อำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดการทำการวิจัย และการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2553

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

ปัจจุบันนี้ผู้คนมีความสนใจในอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของพวกเขา ถั่วเหลืองหมักต่างๆ เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเชิงหน้าที่ที่มีอยู่อย่างแพร่หลายในเกือบทุกประเทศ ฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ที่มีในถั่วเหลืองเป็นสารประกอบที่เกิดขึ้นที่ดีต่อสุขภาพ เดอิสซีนและเจนิสทีนเป็นสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลักในกลุ่มของไอโซฟลาโวนที่พบในถั่วเหลือง นอกจากนี้การหมักถั่วเหลืองจะเพิ่มจำนวนของสารเหล่านี้ การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่ปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์,เดอิสซีน และเจนิสทีนในการหมักถั่วเหลืองและถั่วขาว โดยใช้ *Bacillus subtilis* SB-MYP – 1 และการศึกษานี้ยังมุ่งเน้นไปที่ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของถั่วเหลือง / ถั่วขาว และถั่วเหลือง / ถั่วขาวที่ผ่านการหมัก ซึ่งจะถูกสกัดด้วยน้ำ เอทานอล สารสกัดจากถั่วเหลืองหมักมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด,ฟลาโวนอยด์,เดอิสซีน และเจนิสทีนที่สูงกว่าสารสกัดจากถั่วขาวหมักทั้งสารสกัดน้ำและเอทานอล สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด,ฟลาโวนอยด์,เดอิสซีน และเจนิสทีนของสารสกัดถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยเอทานอล พบว่าสูงกว่าสารสกัดถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สารสกัดถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยเอทานอลแสดงให้เห็นว่ามีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด,ฟลาโวนอยด์,เดอิสซีน และเจนิสทีน 35.02 mg gallic acid equivalent/g extract and 14.02 mg catechin equivalent/g extract, 8,968.64 mg/kg extract and 16,416.10 mg/kg extract ตามลำดับ นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด, ฟลาโวนอยด์, เดอิสซีน และเจนิสทีนของสารสกัดจากถั่วเหลืองหมักสูงกว่าสารสกัดจากถั่วเหลือง ในขณะที่สารสกัดถั่วขาวที่สกัดด้วยน้ำมีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด,ฟลาโวนอยด์,เดอิสซีน และเจนิสทีนที่ต่ำสุด เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลายที่นำมาใช้สกัดพบว่าเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ส่งเสริมให้ค่าของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด,ฟลาโวนอยด์,เดอิสซีน และเจนิสทีนสูงขึ้น

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ได้ศึกษาด้วย DPPH , ABTS และ FRAP รวมทั้งใช้ Trolox และวิตามินซีเป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ สารสกัดถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยเอทานอลแสดงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เมื่อทดสอบโดย DPPH , ABTS และ FRAP ซึ่งมีค่า IC_{50} 18.453 mg/ml, 4.519 mg/ml and 0.078 mmol Fe2+/mg extract สารสกัดจากถั่วเหลืองหมักมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าสารสกัดจากถั่วขาวหมักทั้งสารสกัดน้ำและเอทานอล สารสกัดถั่วเหลืองหมักมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าสารสกัดถั่วเหลือง ในขณะที่สารสกัดน้ำจากถั่วขาว แสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลาย ใน DPPH , ABTS และ FRAP พบว่าตัวทำละลายเอทานอลแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าตัวทำละลายน้ำ

ทั้งสารสกัดน้ำและเอทานอลควรจะมีการหาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ เพื่อประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในอนาคตอันใกล้นี้

Abstract

Today, people are more interested in the foods beneficial on their health. Various fermented soybean, as functional food products, are widely available in almost the countries. Total phenolic and flavonoids containing in soybean are the potentially health ingredient. Daidzein and genistein were mainly bioactive compounds in isoflavone group that found in soybean. In addition, soybean fermentation could enhance the amount of its. This study is therefore focused at the expected value of total phenolics, flavonoids, daidzein and genistein in fermented soybean and white kidney bean processing by the use of *Bacillus subtilis SB-MYP-1*.And focused on antioxidant activity. Soybean/White kidney bean and fermented soybean/white kidney bean were extracted by water and ethanol solvent.Both water and ethanol extract, fermented soybean extract showed higher total phenolics, flavonoids, daidzein and genistein content than fermented white kidney bean extract. The total phenolics, flavonoids, daidzein and genistein content of fermented soybean ethanol extract was found significantly higher ($p< 0.05$) than that of fermented soybean water extract. Ethanol extract of fermented soybean showed a total phenolics, flavonoids, daidzein and genistein content of at 35.02 mg gallic acid equivalent/g extract and 14.02 mg catechin equivalent/g extract, 8,968.64 mg/kg extract and 16,416.10 mg/kg extract respectively.In addition ,The total phenolics, flavonoids, daidzein and genistein content of fermented soybean extract was found higher than that of soybean extract. Whereas white kidney bean water extract showed lowest phenolic and flavonoid contents and daidzein and genistein of white kidney bean extract can not detected. Comparing the extract solvent effectiveness, ethanol solvent showed the enhancing the content of total phenolics, flavonoids, daidzein and genistein value.

The antioxidant activity of crude extracts was studied with DPPH,ABTS and FRAP assay including commercial standard (Trolox and Ascorbic acid). Fermented soybean ethanol extract displayed the highest antioxidant activities determined by DPPH assay, ABTS assay and FRAP assay at the IC_{50} 18.453 mg/ml, 4.519 mg/ml and 0.078 mmol $Fe2^{+}$/mg extract respectively. Both water and ethanol extract, fermented soybean extract showed higher antioxidant activity than fermented white kidney bean extract. Fermented soybean crude extract showed higher antioxidant activity than soybean crude extract. Whereas white kidney bean water extract showed lowest antioxidant activity. Comparing the extract solvent effectiveness, In DPPH,ABTS and FRAP assay ethanol solvent showed higher antioxidant activity than water solvent.

To conclude, both water and ethanol crude extracts functional properties studied in vitro should be done for beneficial in application in food products and dietary supplement in the near future.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
ขอบเขตของการวิจัย	2
ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
วิธีดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
การเตรียมสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และ ถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมัก	16
การวิเคราะห์ปริมาณของ Total Phenolic , Flavonoids และ Isoflavone.....	17
การวิเคราะห์คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ.....	18
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
อภิปรายผล	20
บทที่ 5 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	30
บรรณานุกรม	31
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์.....	36
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์.....	39
ประวัติคณะผู้วิจัย	44

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 : ปริมาณสารที่ได้จากไอโซฟลาโวนในแหล่งอาหารต่างๆ 5

ตารางที่ 2 : ข้อมูลวัตถุดิบถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ถั่วเน่า 10

ตารางที่ 3 : ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาว ที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล 21

ตารางที่ 4 : ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาว ที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล 22

ตารางที่ 5 : ปริมาณไอโซฟลาโวนของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาว ที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล 23

ตารางที่ 6 : ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhy-drazyl (DPPH) ของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล 25

ตารางที่ 7 : ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล 26

ตารางที่ 8 : สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระนของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล 28

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญรูปภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	ไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง	4
รูปที่ 2	สูตรโครงสร้างของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH radical)	8
รูปที่ 3	สูตรโครงสร้างของ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt	9
รูปที่ 4	ปฏิกิริยาของ FRAP assay	10
รูปที่ 5	: ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาว ที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล	21
รูปที่ 6	: ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาว ที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล	23
รูปที่ 7	: ปริมาณไอโซฟลาโวนของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาว ที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล	24
รูปที่ 8	: ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhy-drazyl (DPPH) ของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล	26
รูปที่ 9	: ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล	27
รูปที่ 10	: สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระนของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล	29

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ถั่วเน่าเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นเมืองที่นิยมใช้เป็นเครื่องปรุงในการประกอบอาหารของประชาชนทางภาคเหนือของประเทศไทย ผลิตภัณฑ์นี้ได้จากการหมักถั่วเหลืองที่แช่น้ำค้างคืนแล้วทำให้สุก หลังจากนั้นห่อด้วยใบตองหมักทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-4 วัน หรือจนกระทั่งปรากฏสารเมือกเหนียวเคลือบทั่วผิวของเมล็ดถั่ว ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะอุดมไปด้วยฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารคัดหลั่งจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของถั่วเหลือง รวมทั้งอุดมด้วยคุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ มีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นทั้งในรูปของ Total amino acid (TAA) และ Free amino acid (FAA) ที่สูงขึ้นจากการหมัก TAA และ FAA ถูกดูดซึมได้อย่างรวดเร็วในระบบทางเดินอาหาร มีวิตามินไทอามินและไรโบฟลาวินซึ่งเป็นวิตามินหลักสำหรับผู้สูงอายุ และยังมีส่วนประกอบสำคัญคือ Isoflavone ซึ่งมีผลเพิ่มฮอร์โมนเพศหญิงในวัยหมดประจำเดือน ดังนั้นผลิตภัณฑ์จากสารสกัดถั่วเหลืองหมักจึงเป็นอาหารเชิงหน้าที่ที่ช่วยป้องกันโรคไม่ติดต่อเรื้อรังที่สำคัญในกลุ่มผู้สูงอายุ ได้แก่ กลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือด โดยมีผลช่วยลดปริมาณคลอเลสเตอรอลในเลือด โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง ช่วยบรรเทาอาการของหญิงวัยหมดประจำเดือน ด้วยคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์นี้จึงเป็นทางเลือกหนึ่งของอาหารประเภทเสริมสุขภาพ เพื่อป้องกันกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือดและกลุ่มวัยหมดประจำเดือน นอกจากนี้คุณสมบัติที่สำคัญของสารสกัดถั่วขาวคือประกอบด้วย Phaseolamine ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α-amylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการย่อยแป้งในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ ก่อให้เกิดผลดีในด้านช่วยควบคุมน้ำหนักจากการลดการดูดซึมสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต จึงเป็นส่วนประกอบสำคัญสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพสำหรับกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานที่ต้องการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด อีกทั้งยังเป็นทางเลือกสำหรับกลุ่มมังสวิรัติซึ่งมักขาดสารอาหารในกลุ่มกรดอะมิโนที่จำเป็นซึ่งสามารถทดแทนได้จากถั่วหมัก ในงานวิจัยนี้เน้นการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ โดยการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* ในการหมักและการแปรรูปถั่วหมักให้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารพร้อมบริโภคเพื่อเป็นทางเลือกสำหรับกลุ่มผู้สูงอายุ หญิงวัยหมดประจำเดือน กลุ่มผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนักและผู้ป่วยโรคเบาหวาน

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ศึกษาคุณสมบัติสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมัก ได้แก่ ศึกษาหาปริมาณ Total phenolic , Flavonoids , Isoflavone (Diadzein และ Genistein) และศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้แบ่งเป็น 2 ขั้นการทดลองได้แก่

3.1 การเตรียมสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว โดยใช้สารสกัดสองชนิดคือ น้ำ และ เอทานอล

3.2 ศึกษาคุณสมบัติสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมัก

3.2.1 ศึกษาหาปริมาณ Total phenolic Flavonoids , Isoflavone (Diadzein และ Genistein)

3.2.2 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

4. ทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย (Conceptual Framework)

ความเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างโภชนาการ และสุขภาพ มีผลต่อการพัฒนาแนวความคิดของอาหารเชิงหน้าที่(Functional Food) ซึ่งหมายถึงการปฏิบัติและการเข้าหาแบบใหม่ ๆ เพื่อที่จะได้รับภาวะสุขภาพที่แข็งแรง โดยสนับสนุนการกินดีอยู่ดีและลดภาวะความเสี่ยงต่อการเป็นโรค การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับอาหารเชิงหน้าที่กับการป้องกันโรคเรื้อรังที่ไม่มีการติดต่อ ได้แก่ โรคมะเร็ง โรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจ โรคเบาหวาน เป็นต้น ได้กระตุ้นความสนใจในสารพฤษเคมีจากพืชตระกูลถั่วโดยเฉพาะถั่วเหลืองและถั่วขาวในแง่ขององค์ประกอบที่เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านการป้องกันโรคต่างๆดังกล่าวข้างต้น แต่การนำถั่วเหลืองและถั่วขาวซึ่งผ่านการหมักแล้วมาประยุกต์ใช้หรือพัฒนาเป็นอาหารเสริมสุขภาพยังไม่กว้างขวางและยังขาดข้อมูลของการกำหนดปริมาณของวัตถุดิบในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เหมาะสมและมีฤทธิ์ในการป้องกันโรคเมื่อบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพที่ได้พัฒนาขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะศึกษากรรมวิธีการเตรียมสารสกัดจากถั่วเหลืองหมัก ถั่วขาวหมัก และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดดังกล่าว เพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลในการประยุกต์ใช้ถั่วเหลืองหมักและถั่วขาวหมักไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ ได้แก่ healthy snack bar เครื่องดื่ม เป็นต้น ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพที่เหมาะสมสำหรับผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน ผู้สูงอายุที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดและหัวใจ กลุ่มผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนักและระดับน้ำตาลในเลือด

5.วิธีดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง / เก็บข้อมูล

1. เตรียมสารสกัดจากถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักโดยใช้ตัวทำละลายคือน้ำและเอทานอลตามวิธีของ เกตุการและคณะ (2011)
2. ศึกษาคุณสมบัติสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมัก

2.1 ศึกษาหาปริมาณ total phenolic โดยวิธี Folin-Ciocalteu method (Prior และคณะ, 2007) , ปริมาณของ Flavonoid ตามวิธีของ Juan และ Chou (2010)

2.2 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay โดยวิธีของรัชฎาพรและคณะ (2007), FRAP assay โดยวิธีของ Wong และคณะ (2006), และ ABTS โดยวิธีของ Ksouri และคณะ (2009)

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผู้ใช้ประโยชน์จากการวิจัย

1. นักวิชาการที่ทำวิจัยเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ
2. กลุ่มประชากรเป้าหมายที่ผลิตและจำหน่ายผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ
3. ผู้บริโภคผลิตภัณฑ์มีสารสกัดจากถั่วขาวและถั่วเหลืองหมักเป็นส่วนประกอบ

7. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยี หรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

7.2 นำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ

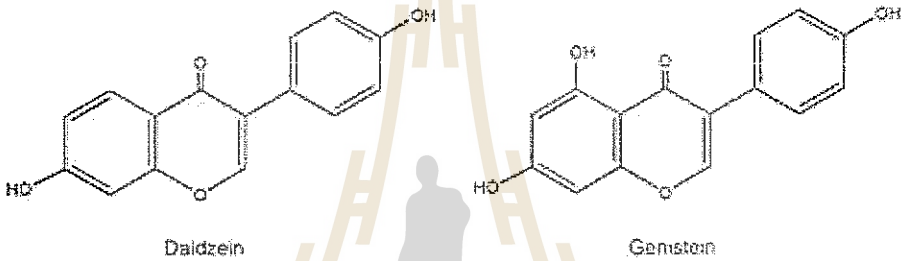
7.3 จัดฝึกอบรมแก่กลุ่มประชากรเป้าหมายหรือหน่วยงานในท้องถิ่นที่ผลิตและจำหน่ายผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก และผู้บริโภคผลิตภัณฑ์มีสารสกัดถั่วขาวและถั่วเหลืองหมักเป็นส่วนประกอบ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. Isoflavone สารสำคัญในถั่วเหลือง

ไอโซฟลาโวน (isoflavone) คือ กลุ่มของสารประเภท ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ซึ่งเป็นสารองควัตถุไม่จัดเป็นสารอาหารเพราะไม่ให้พลังงาน และไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของร่างกายพบตามธรรมชาติในอาหารเช่น ถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง เช่น เต้าหู้ เต้าเจี้ยว ถั่วเน่า น้ำเต้าหู้ นอกจากนี้ยังพบในถั่วเมล็ดแห้ง (legume) ชนิดอื่น เช่น ถั่วเขียว ถั่วลันเตา



รูปที่ 1 ไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง

ที่มา: http://www.med.cmu.ac.th/dept/obgyn/2011/index.php?option=com_content&view=article&id=210&Itemid=242

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณสารที่ได้จาก Isoflavones ในแหล่งอาหารต่าง ๆ

ชนิดอาหาร	Daidzein (mg/100g.)	Genistein (mg/100g.)	Glycetein (mg/100g.)	Total (mg/100g.)
Roasted soybeans	56.3	86.9	19.3	162.5
Textured vegetable protein	47.3	70.7	20.2	138.2
Green soybean	54.6	72.9	7.9	135.4
Soyflour	22.6	81.0	8.8	112.4
เทมเป้ (Tempeh)	27.3	32.0	3.2	62.5
เต้าหู้ (Tofu)	14.6	16.2	2.9	33.7
Tofu yogurt	5.7	9.4	1.2	16.4
Soy hot dog	3.4	8.2	3.4	15.0
Soy noodle (dry)	0.9	3.7	3.9	8.5

ที่มา: http://www.med.cmu.ac.th/dept/obgyn/2011/index.php?option=com_content&view=article&id=210&Itemid=242

สารไอโซฟลาโวนที่พบใน ถั่วเหลืองคือ เดอิสซีน (daidzein) และ เจนิสทีน (genistein) เป็นสารพฤกษเคมี (phytochemicals) ที่มีสรรพคุณที่ดีต่อสุขภาพ เป็นสารโภชนเภสัช มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และเป็น ไฟโตอิสโทรเจน (phytoestrogen) ซึ่งทำงานคล้ายกับฮอร์โมนเพศหญิง (Estrogen, 17b-estradiol E2 Isoflavones) เนื่องจากมีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกัน ทำให้เดอิสซีนสามารถจับกับโปรตีนตัวรับของเอสโตรเจน (estrogen receptor) ในร่างกายได้ สามารถใช้สารนี้ลดปัญหาที่เกี่ยวเนื่องกับอาการ หลังการหมดประจำเดือน (menopausal symptoms) หรืออาจมีผลป้องกันหรือปรับเปลี่ยนภาวะความผิดปกติของร่างกายหรือการเกิดโรคต่างๆ เช่น มะเร็งบางชนิด โรคหัวใจและหลอดเลือด

2.สารประกอบฟีนอลในพืชและคุณสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชัน

คุณสมบัติที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันของสารประกอบฟีนอล คือการเป็นสารต้านออกซิเดชัน และสารต้านการกลายพันธุ์ (antimutagens) ซึ่งเกิดจากอนุมูลอิสระ (free radical) และการใช้สารประกอบฟีนอลในการป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคหัวใจขาดเลือด และมะเร็ง

โดยสารประกอบฟีนอลจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของไขมันและโมเลกุลอื่นๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็วดังปฏิกิริยาต่อไปนี้(Husain และคณะ 1987; Rice-Evans และคณะ 1997)

$ROO^{\bullet} + PPH \longrightarrow ROOH + PP^{\bullet}$ ---------- 1.1)

$RO^{\bullet} + PPH \longrightarrow ROH + PP^{\bullet}$ ---------- (1.2)

เมื่อ $ROO^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$ คือ free radicals, PPH คือ polyphenolic compound

เมื่อสารประกอบฟีนอลให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลจะค่อนข้างมีเสถียรภาพ ดังนั้นจึงไม่ทำปฏิกิริยาอื่นต่อไป ยิ่งไปกว่านั้นอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลบางชนิดยังคงสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้อีกด้วย จึงทำให้สารประกอบฟีนอลเหล่านั้นลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้ถึง 2 เท่า ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

$ROO^{\bullet} + PP^{\bullet} \longrightarrow ROOPP$ ---------- (1.3)

$RO^{\bullet} + PP^{\bullet} \longrightarrow ROPP$ ---------- (1.4)

สารประกอบฟีนอลที่ถูกพบว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน นั้น สามารถพบได้ในส่วนต่างๆของพืช เช่น เมล็ด (ได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วลิสง เมล็ดฝ้าย ข้าวและงา) ผล (ได้แก่ องุ่น ส้ม และ พริกไทยดำ) ใบ (ได้แก่ ชา และเครื่องเทศต่างๆ) และส่วนอื่นๆ (ได้แก่ มันเทศ และหัวหอม) และหนึ่งในสารประกอบฟีนอลที่เป็นที่รู้จักกันดีก็คือ flavonoids (ได้แก่ flavones, flavonols, isoflavones, catechins, flavonones และ chalcones) และ cinnamic acid derivatives (caffeic acid, ferulic acid, chlorogenic acid และ อื่นๆ) โดยสามารถพบได้ในเกือบทุกส่วนของพืชแต่จะมีความแตกต่างกันออกไปในด้านของชนิดและปริมาณ

2. อนุมูลอิสระ

เป็นสารที่มีอิเล็คตรอนอิสระ(Unpaired electron) อยู่วงนอกของอะตอมหรือโมเลกุล โดยอาจมีจำนวนอิเล็คตรอนอิสระ 1 ตัวหรือมากกว่า 1 ตัว ทำให้ไม่เสถียร มีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยา โดยรับอิเล็คตรอนจากสารอื่นๆใกล้เคียง ทำให้ตัวมันเองเสถียรมากขึ้น ในขณะเดียวกันก็ชักนำให้สารที่ให้อิเล็คตรอนไปนั้น มีอิเล็คตรอนไม่ครบคู่ และเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ (Chapple and Matthews , 2007) ซึ่งหากมีจำนวนอนุมูลอิสระมากเกินกว่าที่กลไกของร่างกายจะกำจัดได้หมด อาจก่อให้เกิดความผิดปกติขึ้นในเซลล์ ผนังเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะต่างๆ และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด มะเร็งในบางอวัยวะ โรคข้ออักเสบ เป็นต้น (Eskin and Przybylski , 2001) อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกายปกติมีหลายชนิด เช่น อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ (Superoxide radical , $O_2^{\bullet}$) อนุมูลไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical , $HO^{\bullet}$) อนุมูลไนตริกออกไซด์ (Nitricoxide radical , $NO^{\bullet}$) อนุมูลเพอร์รอกซิล (Peroxyl radical , $ROO^{\bullet}$) อนุมูลไฮโดรเพอร์รอกซิล (Hydroperoxyl radical , $HOO^{\bullet}$) เป็นต้น (Punchard and Kelly,1996)

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น แบ่งได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

1. อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย ซึ่งเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมตามปกติในร่างกาย หรือเกิดจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่มีการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมา เพื่อสู้กับเชื้อโรคบางชนิด

2. อนุมูลอิสระที่มาจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ซึ่งได้แก่ สารเคมีและ สิ่งปนเปื้อนที่มากับอากาศที่เราหายใจเข้าไป สารเติมแต่งอาหาร สีผสมอาหาร สารเคมีปนเปื้อนในอาหาร สารกันบูด หรือสารเคมี ต่างๆ ที่ใช้ในการเกษตร ฯลฯ

จากที่กล่าวมาแล้วว่า อนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกายเอง และในภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรค หรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษ โดยภาวะที่ผิดปกติ จะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจำเป็นที่ร่างกายต้องหาทางป้องกัน สิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตัวเองก็คือ ระบบต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งประกอบไปด้วยสารหรือเอนไซม์ต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ก็สามารถชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา แต่อย่างไรก็ตามมีบางภาวะที่ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินกว่าที่ระบบต้านอนุมูลอิสระจะจัดการได้ จะเกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ขึ้นมา ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต และรุนแรงไปถึงการเกิดโรค

ด้วยเหตุนี้มนุษย์เราจึงจำเป็นต้องรับประทานอาหารที่เป็นแหล่งของสารต้านออกซิเดชัน ได้แก่ วิตามิน เอ วิตามิน ซี วิตามิน อี สารสกัดจากพืชบางชนิด

คุณสมบัติของสารประกอบฟีนอลทางเคมีที่ใช้มีความหมายว่า เป็นตัวกำจัดอนุมูลอิสระ (radical) ซึ่งนั่นคือ ความสามารถในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอล สำหรับสารประกอบฟีนอล สามารถนิยามความหมายของคำว่า สารต้านออกซิเดชัน ได้โดยอาศัยหลักพื้นฐาน 2 ข้อ ดังนี้คือ

1. ที่ความเข้มข้นต่ำๆ สารตั้งต้นก็จะสามารถถูกชะลอ หรือสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาได้
2. อนุมูลอิสระ (radical) ที่ถูกกำจัดออกไปแล้วจะต้องมีความเสถียร (stable)

3.วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลและตรวจสอบความสามารถในการเป็นตัวต้านออกซิเดชัน

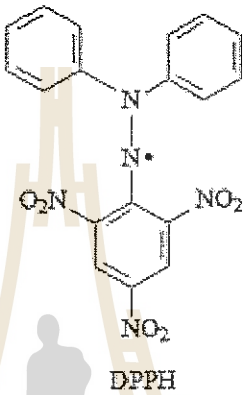
วิธีการวิเคราะห์ปริมาณของอนุมูลอิสระ

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณของอนุมูลอิสระเป็นความสามารถในการเป็นตัวต้านออกซิเดชันของโมเลกุล หรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว โดยวิธีที่นิยมใช้ ได้แก่ 2, 2-azobis (3-ethyl-benzothialzoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferric reducing

antioxidant power (FRAP) และ the oxygen radical absorption capacity (ORAC) และอื่นๆ ซึ่งมักนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นตัวต้านออกซิเดชันในผักและผลไม้ชนิดต่างๆ

3.1 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay)

DPPH assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (รูปที่ 2) เป็น stable radical ในตัวทำละลาย methanol ซึ่งสารละลายนี้มีสีม่วง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 nm



DPPH

รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH radical) (Osman, 2011)

โดย $DPPH^{\bullet}$ จะเกิดปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) หรือกับ radical species ($R^{\bullet}$) ได้ดังสมการที่ (1.1) และ (1.2)

$$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet} \quad \text{----------(1.5)}$$

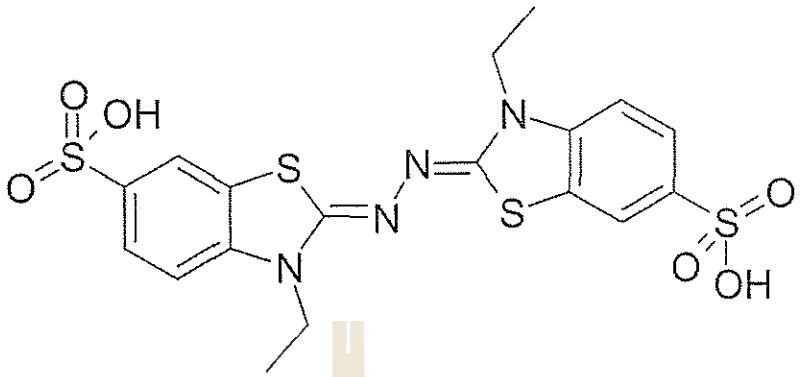
$$DPPH^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow DPPH\text{-}R \quad \text{----------(1.6)}$$

ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงก็จะลดลง ซึ่งจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% effective concentration (EC_{50}) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ $DPPH^{\bullet}$ เหลืออยู่ 50% (Brand- William et al., 1995 และ Gil et al., 2002)

3.2 วิธี 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical -scavenging assay : (ABTS assay)

ABTS assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (antioxidant capacity) ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium

salt (รูปที่ 3) เป็น stable radical ใน aqueous solution สารละลายนี้มีสีเขียว ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 734 nm รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างของ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt



รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างของ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt

การทำให้เกิด ABTS cation radical ทำได้หลายวิธี ดังนี้

1. ใช้ enzyme reaction คือ ใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันให้เกิด ABTS cation radical เช่น peroxidase, myoglobin เป็นต้น

2. ใช้ chemical reaction โดยใช้สารเคมี เช่น manganese dioxide, potassium persulfate,2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane)(ABAP) เป็นต้น

$$OH + ABTS \longrightarrow ABTS+ + H2O \text{ ----------(1.6)}$$

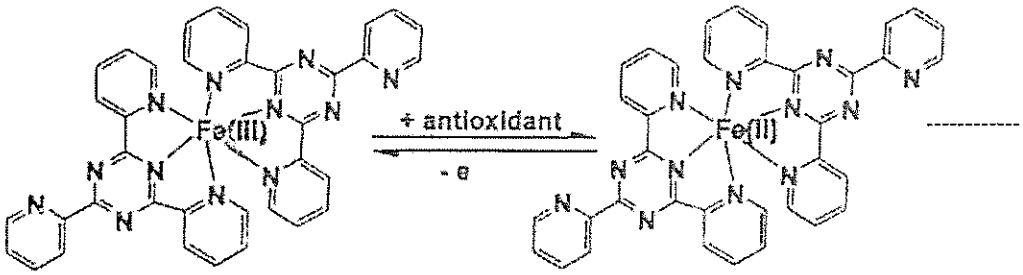
antioxidant (AH) จะทำปฏิกิริยากับ ABTS+ ดังนี้

$$ABTS+ AH \longrightarrow ABTS + A \text{ ---------- (1.7)}$$

มีผลให้ความเข้มของสารละลายสีเขียวลดลงด้วย โดยจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% effective concentration (EC_{50}) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ $ABTS^{+}$ เหลืออยู่ 50% หรือรายงานผลเป็น 50% inhibition concentration (IC_{50}) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ ABTS+ ลดลง 50%

3.3 Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay)

FRAP assay เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยอาศัย ปฏิกิริยารีดอกซ์ และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบเชิงซ้อน คือ เมื่อสารประกอบเชิงซ้อน ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPTZ) ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชัน แล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+}-TPTZ) ที่มีสีม่วงน้ำเงิน ดังสมการ



รูปที่ 4 ปฏิกิริยาของ FRAP assay

วิธี FRAP สามารถติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยวัดค่า absorbance ที่ 595 nm จากนั้นศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันในสารตัวอย่าง โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Ferrous sulfate แล้วรายงานเป็นค่า FRAP value ข้อดีของวิธีนี้ก็คือ เสียค่าใช้จ่ายน้อย สะดวก รวดเร็ว มีขั้นตอนในการทดลองไม่ยุ่งยาก ซับซ้อนและมี reproducibility ดี (Benzie and Strain, 1999; Guo et al., 2003; Jimenez-Escrig et al., 2001)

การทบทวนวรรณกรรม (reviewed literature) / สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ถั่วเหลืองจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ ใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมภายในประเทศหลายชนิด มีแหล่งผลิตกระจายในทุกภาคของประเทศไทย ซึ่งจากรายงานจากข้อมูลสถิติการเกษตรประจำปี 2539/40 (http://doae.go.th/plant/soybn.htm) พบว่าภาคเหนือมีพื้นที่การเพาะปลูกมากที่สุด คือ 1,618,846 ไร่ หรือคิดเป็นร้อยละ 73.82 ส่วนภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคอื่นๆ คิดเป็นร้อยละ 15.3 , 3.77 ,และ 7.11 ตามลำดับ จังหวัดที่ปลูกถั่วเหลือง ได้แก่ เชียงใหม่ สุโขทัย ตาก อุตรดิตถ์ พิษณุโลก กำแพงเพชร ชัยภูมิ ขอนแก่น นครสวรรค์ อุทัยธานี นครราชสีมา เป็นต้น พันธุ์ถั่วเหลืองที่ผ่านการรับรองพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตร และส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกในปัจจุบันมี 9 สายพันธุ์ คือ สจ.1(SJ.1) , สจ.2(SJ.2) ,สจ.4(SJ.4) ,สจ.5(SJ.5) , นครสวรรค์ 1 (นว.1 : NS.1) , เชียงใหม่ 60 (ชม 60: CM60) , มข.35(KKU.35) , สุโขทัย1. (สข.1 : ST.1) และ สุโขทัย2. (สข.2 : ST.2) จะเห็นได้ว่าถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบที่มีอยู่แล้ว และหาได้ง่ายในท้องถิ่น ดังนั้นการนำวัตถุดิบถั่วเหลืองมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ จึงเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบ ดังจะเห็นได้จากข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลวัตถุดิบถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ถั่วเน่า

ข้อมูล	จำนวน
ผลผลิตถั่วเหลืองต่อไร่	275-380[a] (กก./ไร่)
ราคาถั่วเหลืองที่เกษตรกรขายได้ปี 2540/41	11.00[b] (บาท/กก.)
ผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าสดที่ได้ต่อวัตถุดิบถั่วเหลืองที่ใช้	220/100[c] (กรัม/กรัม)
ผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าแผ่นต่อวัตถุดิบถั่วเหลืองที่ใช้	ไม่มีข้อมูลแต่คาดว่าไม่ต่ำกว่า 100 กรัม/100กรัม[d]
ราคาผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าแผ่น	5 กรัม/บาท

ที่มา : [a] สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร (2543)

[b] กรมส่งเสริมการเกษตร (2543)

[c] Steinkraus (1996)

[d] พิจารณาจาก % ความชื้นของผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าแผ่นเทียบกับวัตถุดิบถั่วเหลือง

และหากนำวัตถุดิบถั่วเหลืองมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ จึงเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบ และหากนำเทคโนโลยีที่เหมาะสม เช่น เทคโนโลยีการหมัก และเทคโนโลยีการทำแห้ง มาประสานกับภูมิปัญญาชาวบ้านในการผลิตและแปรรูปถั่วเหลืองเป็นผลิตภัณฑ์ถั่วเน่า ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์อาหารพื้นบ้าน ให้มีคุณภาพและเหมาะสมแก่ผู้บริโภคมากขึ้น จะช่วยให้ผู้บริโภคหันมาสนใจบริโภคอาหารพื้นเมืองของประเทศไทยมากขึ้น ด้วยเหตุผลที่ถั่วเน่าเป็นอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ ราคาไม่แพง และสามารถใช้เป็นแหล่งโปรตีน ทดแทนอาหารจากเนื้อสัตว์ ใช้ประกอบอาหารมังสวิรัติ เป็นการขยายกลุ่มผู้บริโภคให้กว้างขึ้น

ถั่วเหลืองมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ Glycine max (L.) Merrill อยู่ในตระกูล Leguminosae เป็นพืชที่นิยมนำมาบริโภค เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เช่น วิตามิน เอ บี ซี และเกลือแร่ที่ร่างกายต้องการปริมาณสูง (Jing และ Zhang, 2006) มีรายงานทางการแพทย์ที่เกี่ยวกับประโยชน์ของการรับประทานถั่วเหลืองในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ เช่นช่วยป้องกันโรคอ้วน (Garcia et al., 1997) โรคมะเร็ง (Messina และ Barnes,1991; Hawrylewicz et al., 1995) โรคกระดูกพรุน (Chiechia et al., 2002) โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน (Sumi et al., 1987 ; Anthony et al., 1996; Anderson et al., 1999) และโรคไต (Brenner et al.,1982) ถั่วเหลืองยังเป็นแหล่งของไอโซฟลาโวน 2 ชนิด คือ genistein และ daidzein ซึ่งมีความสำคัญต่อหน้าที่ต่างๆ ในร่างกาย เช่น ช่วยลดคลอเลสเตอรอล และมีคุณสมบัติเป็น antioxidant ยับยั้งการเกิด LDL-oxidation ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน และนำไปสู่โรคหัวใจขาดเลือด (Nagata et al., 1998 ; Kenneth et al.,1999)

การบริโภคถั่วเหลืองอาจบริโภคในลักษณะที่เป็นถั่วเหลืองทั้งเมล็ดหรือนำมาแปรรูปเป็นอาหารชนิดอื่น เช่น นมถั่วเหลือง เต้าเจี้ยว ซีอิ๊ว และถั่วเน่า เป็นต้น ถั่วเหลืองนอกจากจะมีคุณค่าทางโภชนาการเพราะอุดมไปด้วยโปรตีนแล้ว ยังพบว่าในถั่วเหลืองยังมีสารสำคัญอีกมากมาย เช่น isoflavones , saponin , phytosterols และoligosaccharides โดยเฉพาะ isoflavones นั้นเป็นสารที่พบมากในถั่วเหลืองซึ่งเป็น flavonoid ที่ได้จากธรรมชาติและมีคุณสมบัติคล้ายกับ estrogen จึงจัดว่าเป็น phytoestrogen มีฤทธิ์ลดการสร้างอนุมูลอิสระและช่วยต้านมะเร็งเนื่องจากไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับฮอร์โมนเอสโตรเจน (Jing และ Zhang, 2006) ดังนั้นสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองจึงสามารถทดแทนเอสโตรเจนในร่างกายได้และจำเป็นอย่างยิ่งในวัยหญิงหมดประจำเดือน ในปัจจุบันถั่วเหลืองถูกนำมาแปรรูปอย่างแพร่หลายทั้งทางอาหารและยา จากฤทธิ์ที่ได้ทำการ ศึกษาก่อนหน้านี้ ได้แก่ antioxidant , estrogenic , antiosteoporotic สามารถขจัด lipid peroxyl radicals จึงสามารถต้านการเกิด arthrosclerosis ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและ

หลอดเลือดได้ นอกจาก soy isoflavones มีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระแล้ว ยังสามารถกระตุ้นการสร้างและยับยั้ง การสลายคอลลาเจน และป้องกันผิวหนังจากการทำลายของรังสี UV ดังนั้น soy isoflavones จึงสามารถชะลอความชรา (anti-aging) ต้านการเกิดริ้วรอยได้ สารกลุ่ม isoflavone ที่พบมากในเมล็ดถั่วเหลืองประกอบด้วยสารกลุ่มที่มีน้ำตาลในโมเลกุลที่เรียกว่าสารกลุ่มกลูโคไซด์ (glucoside) คือ genistin , daidzin และ glycitin และสารประกอบที่ปราศจากน้ำตาลในโมเลกุลที่เรียกว่าสารกลุ่มอะกลัยโคน (aglycone) คือ genistein , daidzein และ glycitein โดยมีสัดส่วนของ genistein เป็นปริมาณสูงสุด ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง แต่สารในกลุ่มกลูโคไซด์สามารถละลายในน้ำได้ดี จึงอาจจะสูญเสียไปในระหว่างการแปรรูปถั่วเหลืองได้ และสารในกลุ่มกลูโคไซด์นี้ เมื่อรับประทานเข้าไปในร่างกายจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยแบคทีเรียในลำไส้ ได้เป็นสารในกลุ่มอะกลัยโคน (Heinonen, 2002) จากการศึกษาพบว่ากระบวนการหมักถั่วเหลืองจะทำให้ได้สาร isoflavones ในกลุ่มอะกลัยโคนในปริมาณที่มากกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักโดยในกระบวนการหมักถั่วเหลืองจะใช้เชื้อ *Aspergillus oryzae* ซึ่งจะเข้าไปย่อยส่วนที่เป็นน้ำตาลในโมเลกุลทำให้ได้เฉพาะส่วนที่เป็นอะกลัยโคนออกมา และส่วนที่เป็นอะกลัยโคนนี้เป็นรูปแบบที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ได้ทันที นอกจากนี้กระบวนการหมักยังช่วยลดการสูญเสียปริมาณสารสำคัญไปในระหว่างการแปรรูปได้

ในประเทศจีน Han และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษารูปแบบของกรดอะมิโนที่พบในกระบวนการหมักถั่วเหลืองโดยใช้เชื้อราที่มีแหล่งกำเนิดในประเทศจีนที่เรียกว่า Sufu ผลการศึกษาพบว่าปริมาณกรดอะมิโนรวม (Total amino acid : TAA) เท่ากับ 547 , 551 และ 351 ใน sufu pehtz (fungal ferment tofu) และ salted pehtz mg/g dry matter ตามลำดับ ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (Free amino acid : FAA) มีปริมาณเท่ากับ 1.3 ถึง 1.5 mg/g dry matter ใน pehtz หลังจากผ่านการหมัก tofu โดยเชื้อ *Acinomucor elegans* และมีปริมาณสูงถึง 26-42 mg/g ในการหมักที่ใช้เกลือ 14% และยังพบว่ารูปแบบของกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acids) ที่พบมีคุณสมบัติเหมือนกับกรดอะมิโนที่จำเป็นในไข่และนมวัว

Ren และคณะ (2006) ในประเทศญี่ปุ่นพบฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ต่อ benzo(α) pyrene (>50%) ใน red furus ซึ่งได้เสนอแนะไว้ว่า เป็นฤทธิ์ที่เกิดจากสารที่ปลดปล่อยออกมาจากเชื้อแบคทีเรียมากกว่าสารสำคัญในถั่วเหลืองและพบฤทธิ์ anti-oxidant อีกด้วย และ Kim และคณะ (2008) รายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและ antiangenotoxic ของถั่วเหลืองหมักเกาหลีซึ่งภาษาท้องถิ่นเรียกว่า Chungkookjang และสรุปว่าอาจจะเป็นฤทธิ์ของสารสำคัญหลักในถั่วหมักคือ isoflavone , genistein และ diadzein และแนะนำถั่วหมักไปประยุกต์ใช้ในแง่ของอาหารเสริมสุขภาพในด้านการป้องกัน oxidative stress Kwak และ คณะ (2007) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ Chungkookjang ในระดับสูงเกิดเนื่องจากการเพิ่มปริมาณของ aglycone , malonylglycoside และ isoflavone ระหว่างกระบวนการหมัก ข้อสรุปนี้มีความสัมพันธ์กับงานวิจัยของ Nakajima และคณะ (2005) ที่ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์ Isoflavone-Enrich Tempeh โดยการเติม soybean germ (hypcotyls) ในกระบวนการหมัก

และสามารถวิเคราะห์พบปริมาณของ isoflavone ในปริมาณที่สูงขึ้นใน Tempeh นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดเมทานอลของถั่วเหลืองดำหมัก (fermented black soybean) ต่อสารก่อกลายพันธุ์ benzo(α) pyrene ของ Hung และคณะ (2009) ในประเทศเกาหลี และทดสอบฤทธิ์ดังกล่าวของสารสกัดเมื่อผ่านระบบการย่อยอาหารจำลองในกระเพาะและลำไส้มนุษย์ สรุปได้ว่าสารสกัดถั่วเหลืองดำหมักมีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์และมีฤทธิ์ลดลงเมื่อผ่านระบบการย่อยอาหารแต่ยังคงระดับการออกฤทธิ์ที่มีนัยสำคัญ ในประเทศไต้หวัน Su และคณะ (2007) ศึกษาพบฤทธิ์เหนี่ยวนำ apoptosis ของเซลล์มะเร็งตับ (Hep 3B) ของสารละลาย (supernatant) ของถั่วเหลืองหมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย

ในระหว่างการหมักถั่วเน่ามีการเพิ่มขึ้นของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา ผลิต ภัณฑ์มีค่า pH สูงขึ้น แบคทีเรียที่พบมากจะอยู่ในจีนัส Bacillus และยังพบเชื้อในกลุ่ม Lactobacillus ด้วย สำหรับกิจกรรมทางชีวเคมีพบว่า การทำงานของเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลส มีค่าเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 60 และ 72 ของการหมัก (Chukeatirote และคณะ., 2005) *Bacillus subtilis* เจริญได้ดีในช่วง pH ที่กว้าง (5.5 – 8.5) ซึ่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสและสร้างสารประกอบทางชีวเคมีที่มีประโยชน์ (Chantawannakul และคณะ., 2002) Chukeatirote และ Thakang (2006) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในถั่วเน่า พบว่าปริมาณโปรตีน ไขมัน และน้ำตาลรีดิวซ์ สูงขึ้นเล็กน้อย ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส ไลเปส และอะไมเลส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ในระหว่างการหมัก การทำงานของเอนไซม์จะค่อยๆ สูงขึ้นและสูงที่สุดเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก โดยโปรติเอสจะย่อยโปรตีนและปลดปล่อยแอมโมเนียออกมาระหว่างการหมัก การหมักจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ isoflavone โดยพบว่า isoflavone ในกลุ่ม glycoside ที่พบในถั่วเหลือง จะถูกย่อยโดยเอนไซม์ beta-glucosidase จากจุลินทรีย์ ทำให้ได้ isoflavone ในกลุ่ม aglycone เพิ่มสูงขึ้นในระหว่างการหมัก (Kwak และคณะ., 2007)

จากการศึกษาของ Dajanta และคณะ (2011) พบว่าถั่วเหลืองที่หมักด้วย *Bacillus subtilis* TN51 ให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ(FAA) สูงกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก ซึ่งพบว่า *Bacillus subtilis* TN51 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียที่พบในถั่วเน่าทั้ง 171 สายพันธุ์ ในอินเดีย Moktan และคณะ (2008) ได้ศึกษาความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชั่น ของถั่วเหลืองที่หมักด้วย *Bacillus subtilis* DK-W1 พบว่าถั่วเหลืองหมักสามารถต้านการเกิดออกซิเดชั่นได้สูงกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก และยังพบว่า ปริมาณ total phenol ในถั่วเหลืองหมักสูงกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมักถึง 144% Yao และคณะ (2010) ศึกษาความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชั่นของถั่วเหลืองดำที่หมักด้วยเชื้อจุลินทีย์ต่างชนิดกัน โดยมีการหมักด้วยยีสต์ (*Issatchenkia orientalis*) แบคทีเรีย (*Bacillus sp.*) และเชื้อรา (*Aspergillus sp.*) พบว่าถั่วเหลืองดำที่หมักด้วย *Bacillus sp.* สามารถต้านออกซิเดชั่นได้สูงสุด และมีปริมาณ total phenolic สูงที่สุดด้วย

ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

และสามารถวิเคราะห์พบปริมาณของ isoflavone ในปริมาณที่สูงขึ้นใน Tempeh นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดเมทานอลของถั่วเหลืองดำหมัก (fermented black soybean) ต่อสารก่อกลายพันธุ์ benzo(α) pyrene ของ Hung และคณะ (2009) ในประเทศเกาหลี และทดสอบฤทธิ์ดังกล่าวของสารสกัดเมื่อผ่านระบบการย่อยอาหารจำลองในกระเพาะและลำไส้มนุษย์ สรุปได้ว่าสารสกัดถั่วเหลืองดำหมักมีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์และมีฤทธิ์ลดลงเมื่อผ่านระบบการย่อยอาหารแต่ยังคงระดับการออกฤทธิ์ที่มีนัยสำคัญ ในประเทศไต้หวัน Su และคณะ (2007) ศึกษาพบฤทธิ์เหนี่ยวนำ apoptosis ของเซลล์มะเร็งตับ (Hep 3B) ของสารละลาย (supernatant) ของถั่วเหลืองหมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย

ในระหว่างการหมักถั่วเน่ามีการเพิ่มขึ้นของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา ผลิต ภัณฑ์มีค่า pH สูงขึ้น แบคทีเรียที่พบมากจะอยู่ในจีนัส Bacillus และยังพบเชื้อในกลุ่ม Lactobacillus ด้วย สำหรับกิจกรรมทางชีวเคมีพบว่า การทำงานของเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลส มีค่าเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 60 และ 72 ของการหมัก (Chukeatirote และคณะ., 2005) *Bacillus subtilis* เจริญได้ดีในช่วง pH ที่กว้าง (5.5 – 8.5) ซึ่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสและสร้างสารประกอบทางชีวเคมีที่มีประโยชน์ (Chantawannakul และคณะ., 2002) Chukeatirote และ Thakang (2006) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในถั่วเน่า พบว่าปริมาณโปรตีน ไขมัน และน้ำตาลรีดิวซ์ สูงขึ้นเล็กน้อย ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส ไลเปส และอะไมเลส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ในระหว่างการหมัก การทำงานของเอนไซม์จะค่อยๆ สูงขึ้นและสูงที่สุดเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก โดยโปรติเอสจะย่อยโปรตีนและปลดปล่อยแอมโมเนียออกมาระหว่างการหมัก การหมักจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ isoflavone โดยพบว่า isoflavone ในกลุ่ม glycoside ที่พบในถั่วเหลือง จะถูกย่อยโดยเอนไซม์ beta-glucosidase จากจุลินทรีย์ ทำให้ได้ isoflavone ในกลุ่ม aglycone เพิ่มสูงขึ้นในระหว่างการหมัก (Kwak และคณะ., 2007)

จากการศึกษาของ Dajanta และคณะ (2011) พบว่าถั่วเหลืองที่หมักด้วย *Bacillus subtilis* TN51 ให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ(FAA) สูงกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก ซึ่งพบว่า *Bacillus subtilis* TN51 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียที่พบในถั่วเน่าทั้ง 171 สายพันธุ์ ในอินเดีย Moktan และคณะ (2008) ได้ศึกษาความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชั่น ของถั่วเหลืองที่หมักด้วย *Bacillus subtilis* DK-W1 พบว่าถั่วเหลืองหมักสามารถต้านการเกิดออกซิเดชั่นได้สูงกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก และยังพบว่า ปริมาณ total phenol ในถั่วเหลืองหมักสูงกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมักถึง 144% Yao และคณะ (2010) ศึกษาความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชั่นของถั่วเหลืองดำที่หมักด้วยเชื้อจุลินทีย์ต่างชนิดกัน โดยมีการหมักด้วยยีสต์ (*Issatchenkia orientalis*) แบคทีเรีย (*Bacillus sp.*) และเชื้อรา (*Aspergillus sp.*) พบว่าถั่วเหลืองดำที่หมักด้วย *Bacillus sp.* สามารถต้านออกซิเดชั่นได้สูงสุด และมีปริมาณ total phenolic สูงที่สุดด้วย

ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ในขณะที่ถั่วเหลืองดำที่หมักด้วยยีสต์จะมีปริมาณ total flavoniod สูงที่สุด ซึ่งสูงกว่าถั่วเหลืองดำที่หมักด้วย *Bacillus sp.* เล็กน้อย

Isoflavone เป็น phytoestogen ชนิดหนึ่งซึ่งพบได้ในพืชต่าง ๆ โดยเฉพาะในถั่วเหลือง มีโครงสร้างและการออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (Setchell., 1998) กล่าวคือ เป็นสารที่สามารถใช้ทดแทนการขาดหรือน้อยลงของฮอร์โมนเอสโตรเจนได้ ซึ่งฮอร์โมนเอสโตรเจนนี้มีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งในหญิงวัยหมดประจำเดือน การให้ฮอร์โมนทดแทนมีความเสี่ยงต่อผลข้างเคียงอื่น ๆ เช่น รายงานการวิจัยของ Messina (1999) พบว่าการใช้ฮอร์โมนทดแทนทำให้เกิดมะเร็ง อย่างไรก็ตาม งานวิจัยหลายชิ้นเสนอแนะว่าการบริโภคสาร isoflavone ในระดับ 100 mg ต่อวัน อาจลดภาวะไม่พึงประสงค์ของวัยหมดประจำเดือนได้ สาร isoflavone มีอนุพันธ์ 4 กลุ่ม คือacetyl glycoside (acetyldaidzin, acetylgenistin และ acetylglycintin), aglycone (daidzein, genistein และ glycitein), glycoside (daidzin, genistin และ glycitin) และ malonyl glycoside (malonyl daidzin, malonyl genistin และ malonyl glycitin) (Kim et al., 2005)

จากการศึกษาของ Wu และคณะ (1996) ได้ศึกษาในสตรีชาวเอเชียได้แก่ ชาวญี่ปุ่น จีน ซึ่งบริโภคอาหารมีส่วนประกอบถั่วเหลืองเป็นประจำ ไม่ค่อยมีอาการของหญิงวัยหมดประจำเดือน ได้แก่ ร้อนวูบวาบ ภาวะโรคกระดูกพรุน หรืออัตราการเกิดมะเร็งเต้านมต่ำกว่าสตรีชาวตะวันตก ไอโซฟลาโวนที่พบในถั่วเหลืองนั้น เป็นสารกลุ่มที่มีโครงสร้างคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน จึงสามารถไปจับกับตัวรับเอสโตนเจนในร่างกายได้ สารในกลุ่มนี้ที่พบมากคือ genistein, daidzain และ coumestrol (Patricia et al., 2010)

ไอโซฟลาโวนมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับไอพรีฟลาโวน ซึ่งไอพรีฟลาโวนถูกใช้เป็นยาสำหรับการยับยั้งการสลายของกระดูกในอิตาลีและญี่ปุ่น (Valente et al.,1994). Ajimandiet et al ., 1995ศึกษาเปรียบเทียบการให้อาหารที่มีถั่วเหลืองและอาหารที่ปราศจากถั่วเหลืองในหนูที่ถูกตัดรังไข่ พบว่าหนูที่ได้รับอาหารที่มีถั่วเหลืองมีการเพิ่มขึ้นของมวลกระดูกสูงกว่าหนูที่ได้รับอาหารที่ปราศจากถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

และมีการศึกษาผลของเจนิสทีนต่อกระดูก โดย Anderson และคณะ(1987) พบว่าในหนูที่ถูกตัดรังไข่เมื่อให้อาหารจำกัดปริมาณแคลเซียมที่มีเจนิสทีนในระดับต่ำ 1 มิลลิกรัมต่อวัน พบว่ามวลกระดูกเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับตัวควบคุม ส่วนที่ให้เจนิสทีนในระดับสูงคือ 3.2 และ 10 มิลลิกรัมต่อวัน ให้ผลไม่แตกต่างกับตัวควบคุม และในการศึกษาของ Blair และคณะ(1996) พบว่าน้ำหนักกระดูกต้นขาของหนูที่ถูกตัดรังไข่เมื่อรับเจนิสทีน 30 ไมโครโมลต่อวัน เป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่าน้ำหนักกระดูกต้นขาเพิ่มขึ้น 12% เมื่อเทียบกับตัวควบคุม สำหรับสตรีนั้นพบว่า มวลกระดูกจะมีความสัมพันธ์กับระดับฮอร์โมนเพศหญิงในร่างกายในสตรีวัยทองซึ่งมีภาวะการขาดฮอร์โมนเพศหญิงนั้นมวลกระดูกจะลดลง (Liu, 1997) โดยเอสโตรเจนมีส่วนสำคัญทำให้กระดูกแข็งแรง เมื่อ

ระดับเอสโตรเจนลดลง เนื้อกระดูกจะมีการสลายมากกว่าการสร้าง กระดูกจะบางลงเรียกว่าภาวะกระดูกพรุน(osteoporosis) ซึ่งทำให้สตรีสูงวัยกระดูกเปราะ หักง่าย กระดูกสันหลังอ่อนตัวทำให้หลังโก่ง และอาจมีอาการปวดข้อ กล้ามเนื้ออ่อนเปลี้ย (ณัฐวุฒิ บุญยืน, 2551) อาการที่เกิดกับสตรีวัยหมดรอบเดือนหรือวัยทอง (menopause) มีการบำบัดด้วยการทดแทนฮอร์โมน (Hormone Replacment Therapy : HRT) เป็นมาตรการบำบัดด้วยการผสมผสานฮอร์โมนเอสโตรเจนกับฮอร์โมนโปรเจสติน ซึ่งถึงแม้ว่าการบำบัดด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์นี้ จะให้ผลดีในการลดอาการร้อนแดงที่ผิวหนังซึ่งมักเกิดขึ้นบ่อย แต่มักมีผลข้างเคียงระยะยาว รวมทั้งมีโอกาสเพิ่มปัจจัยเสี่ยงต่อการพัฒนาของโรคมะเร็งบางชนิดได้ จึงมีการเสาะหาวิธีธรรมชาติบำบัดอื่นๆ แทน โดยเฉพาะการหันไปใส่ใจกับการบริโภคสารอาหารธรรมชาติและปรับเปลี่ยนพฤติกรรมในการดำรงชีวิต (Brandi, 1999) โดยพบว่าถั่วเหลืองมีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของอาการในสตรีวัยหมดประจำเดือนได้ การรับประทานอาหารที่ทำจากถั่วเหลือง ซึ่งมีไอโซฟลาโวนเป็นส่วนประกอบและมีสูตรโครงสร้างคล้ายเอสโตรเจนอย่างสม่ำเสมอ จึงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของผู้หญิงที่ไม่ต้องการใช้ฮอร์โมนทดแทน แล้วยังช่วยป้องกันโรคมะเร็งเต้านมและมะเร็งที่พึ่งฮอร์โมนรวมทั้งลดระดับไขมันในเลือดได้ (ศรีนารี แก้วฤดี)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมถั่วเหลืองหมัก

3.1.1 เตรียมเชื้อ

นำ *Bacillus subtilis* SB-MYP-1 จาก stock ซึ่งอยู่ใน 20% glycerol มาทำให้ละลายแล้ว vortex จากนั้นปิเปตมา 100 ul ใส่ลงใน Nutrient Broth 25 ml แล้วนำไปบ่มที่ 37°c 180 rpm 24 ชั่วโมง เชื้อที่บ่มครบ 24 ชั่วโมงนำไป streak บนอาหาร Nutrient Agar จากนั้นบ่มที่ 37°c 24 ชั่วโมง เลือกเก็บโคโลนีเดี่ยวๆของเชื้อใส่ลงใน Nutrient Broth 25 ml แล้วนำไปบ่มที่ 37°c เขย่าที่ 180 rpm 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g ที่ 4 °c นาน 15 นาที จากนั้นเอาเฉพาะส่วนขุ่นที่ตกตะกอน (เซลล์ของ *Bacillus*) มาเจือจางใน 0.85% NaCl โดยเทียบกับ MacFarland No.1($3x10^8$ cfu/ml)

3.1.2 เตรียมถั่วเหลืองหมัก

การหมักถั่วทำตามวิธีของ ปิยะวรรณและรัชฎาพร (2011) นำถั่วเหลืองมาล้างทำความสะอาดจากนั้นแช่ถั่วเหลืองไว้ประมาณ 12 ชั่วโมงให้ถั่วเหลืองอิ่มน้ำ เมื่อครบเวลานำมาล้างทำความสะอาดอีกครั้ง แล้วนำไป autoclave ที่ 121 °c นาน 15 นาที นำถั่วเหลืองที่ฆ่าเชื้อแล้วมาผึ่งให้แห้งโดยต้องใช้ aseptic technique จากนั้นผสมเชื้อกับถั่วเหลืองในอัตราส่วน ถั่ว 500 g ต่อเชื้อ 1 ml ใส่ลงในถาดที่ห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ จากนั้นปิดด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์แล้วนำไปบ่มที่ 37°c 72 ชั่วโมง

3.2 การเตรียมสารสกัด

3.2.1 สารสกัดถั่วเหลือง

เตรียมสารสกัดถั่วเหลือง 2 ชนิด คือสารสกัดน้ำ และเอทานอลตามวิธีของ เกตุการและคณะ 2011 โดยนำถั่วเหลืองมาบดหรือโม่ จากนั้นชั่งถั่วเหลือง 2 g ละลายใน 10 ml ของแต่ละตัวทำละลาย ใส่ใน screw – cap tube 50 ml ผสมให้เข้ากันโดยนำไป vortex 1 นาที แล้วนำไป sonicated เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3200 rpm เป็นเวลา 30 นาที ที่ 30 °c เก็บส่วนใสไว้ จากนั้นนำไปสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายเดิม 10 ml ที่สภาวะเดิม นำส่วนใสทั้ง 2 ครั้งรวมกัน และกรองด้วยเครื่องกรองแบบสุญญากาศ ปรับปริมาตรใน volumetric flask ทำให้แห้งตามวิธีของรัชฎาพร 2010 และ วรวลัญช์และรัชฎาพร 2012 โดยปิเปตสารสกัดใส่หลอดทดลอง (ขนาด 5 ml) ปริมาณ 2 ml เฉพาะสารสกัดน้ำนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไปทำแห้งโดยเครื่อง Freeze dryer (GEA, LYOVAC GT2-S, MD) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนสารสกัดเอทานอล

นำไปเข้าเครื่อง Therbo vap (Caliper, LV, USA) จัดเก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.2 สารสกัดถั่วเหลืองหมัก

เตรียมสารสกัดถั่วเหลืองหมัก 2 ชนิด คือสารสกัดน้ำ และเอทานอลตามวิธีของ เกตุการและคณะ 2011 โดยนำถั่วหมักไปทำแห้งโดยเครื่อง Freeze dryer (GEA, LYOVAC GT2-S, MD) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาบดหรือโม่ จากนั้นชั่งถั่วเหลืองหมักผง 2 g ละลายใน 10 ml ของแต่ละตัวทำละลาย ใส่ใน screw – cap tube 50 ml ผสมให้เข้ากันโดยนำไป vortex 1 นาที แล้วนำไป sonicated เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3200 rpm เป็นเวลา 30 นาที ที่ 30 °c เก็บส่วนใสไว้จากนั้นนำไปสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายเดิม 10 ml ที่สภาวะเดิม นำส่วนใสทั้ง 2 ครั้งรวมกัน และกรองด้วยเครื่องกรองแบบสุญญากาศ ปรับปริมาตรใน volumetric flask ทำให้แห้งตามวิธีของรัชฎาพร 2010 และ วรวลัญช์และรัชฎาพร 2012 ปิเปตสารสกัดใส่หลอดทดลอง (ขนาด 5 ml) ปริมาณ 2 ml เฉพาะสารสกัดน้ำนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไปทำแห้งโดยเครื่อง Freeze dryer (GEA, LYOVAC GT2-S, MD) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนสารสกัดเอทานอลนำไปเข้าเครื่อง Therbo vap (Caliper, LV, USA) จัดเก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3. การศึกษาสารประกอบออกฤทธิ์

3.3.1 Total Phenolic โดยวิธี Folin-ciocalteu method ตามวิธีของ Oonsivilai et al.,2007

ทำละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลายน้ำหรือเอทานอล แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่าง 20 ul ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำ DI 1.58 ml เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 100 ul ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 20% Na_2CO_3 300 ul ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร หา Total Phenolic Compound โดยใช้ Gallic acid เป็นมาตรฐาน ระดับความเข้มข้นของ Gallic acid ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานคือ 0 , 50 , 150 , 250 , 300 ,และ 350 ppm ใน 95% เอทานอล ผลการวิเคราะห์รายงานในรูปสมมูลของมิลลิกรัม Gallic acid / 100 มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้ง

3.3.2 Flavonoids ตามวิธีของ Juan MY and Chou CC .,2010

ทำละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลายน้ำหรือเอทานอล แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่าง 250 ul ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำ DI 1.25 ml เติม 5% $NaNO_2$ 75 ul ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นเติม 10% $AlCl_3$ 150 ul เติม NaOH 1 M 500 ul เติมน้ำ DI 275 ul ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ Catechin เป็นสารมาตรฐาน โดยจะมีระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 350 mg/L ผลการวิเคราะห์รายงานในรูปสมมูลของมิลลิกรัม Catechin / กรัมของน้ำหนักแห้ง

3.3.3 Isoflavone

การหาปริมาณของไอโซฟลาโวนโดยใช้ HPLC ทำตามวิธีของ Punjaisee และคณะ 2011 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างสารสกัดใส่ screw cap tube แล้วเติมเมทานอล 5 ml ผสมให้เข้ากันจากนั้นเติมน้ำ DI ลงไปให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10 ml ผสมให้เข้ากัน 5 นาที ด้วย vortex และนำไป sonicated เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่ 25 °c กรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 um จากนั้นฉีดเข้าเครื่อง HPLC 20 ul สำหรับการวิเคราะห์ด้วย HPLC ใช้ reverse phase คอลัมน์ Zorbax SB C18 150x4.6 mm , 5 um , Agilent technologies USA โดยมีอัตราการไหล 1.0 ml/min โดย mobile phase ประกอบด้วย MeOH:Water (10:90) และ 0.1% Formic acid ใน reservoir A และ MeOH ผสมกับ 0.1% Formic acid ใน reservoir B โดย solvent B จากเวลาที่ 0 นาทีถึง 25 นาที จะเพิ่มจาก 10% ถึง 100% ปริมาณของไอโซฟลาโวนหาได้จากข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงที่ 254 นาโนเมตร โดยสารมาตรฐานไอโซฟลาโวนที่ใช้คือ daidzein และ genistein

3.4 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.4.1 ABTS Assay

การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทำตามวิธีของ Ksouri และคณะ 2009 ทำละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลายน้ำหรือเอทานอล แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่าง 50 ul ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารผสม (ABTS และ $K_2S_2O_8$) 950 ul โดยสารผสมนี้จะต้องผสมทิ้งไว้ 16 ชั่วโมงก่อนจะทำมาใช้ทำปฏิกิริยา โดยสารที่จะนำมาใช้ได้ต้องมีค่าดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.700 ± 0.02 เมื่อใส่สารผสมลงไปทำปฏิกิริยากับสารละลายตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ด้วย spectrophotometer ใช้ Trolox และ Ascorbic acid เป็น control และหา % inhibition ได้จากสูตร

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(A_{control} - A_{sample})}{A_{control}} \times 100$$

3.4.2 DPPH Assay

การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทำตามวิธีของ Oonsivilai และคณะ 2007 และ Singthong และคณะ 2011 ทำละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลายน้ำหรือเอทานอล แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่าง 100 ul ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย DPPH 1.90 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในที่มืด 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ใช้ Trolox และ Ascorbic acid เป็น Positive control และหา % inhibition ได้จากสูตร

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A_{control} - (A_{sample} - A_{blank})}{A_{control}} \times 100$$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.4.3 FRAP Assay

การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทำตามวิธีของ Wong และคณะ 2006 ทำละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลายน้ำหรือเอทานอล แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่าง 50 ul ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย FRAP 1.5 ml โดยสาร FRAP นี้จะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนจะทำมาใช้ทำปฏิกิริยา โดยสารนี้จะได้จากการผสม 300 mM glacial acetic acid buffer pH 3.6 + 10 mM 2,4,6 Tris(2-pyridyl)-s-triazine + 20 mM ferric chloride เมื่อใส่สารผสมลงไปทำปฏิกิริยากับสารละลายตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืดที่ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 4 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ด้วย spectrophotometer ใช้ Troloxและ Ascorbic acid เป็น control และใช้ Ferrous sulphate เป็นสารมาตรฐาน โดยมีความเข้มข้นระหว่าง 0.2 – 1 mM โดย Ferric-reducing antioxidant power หาได้จากกราฟของสารมาตรฐาน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

อภิปรายผลการทดลอง

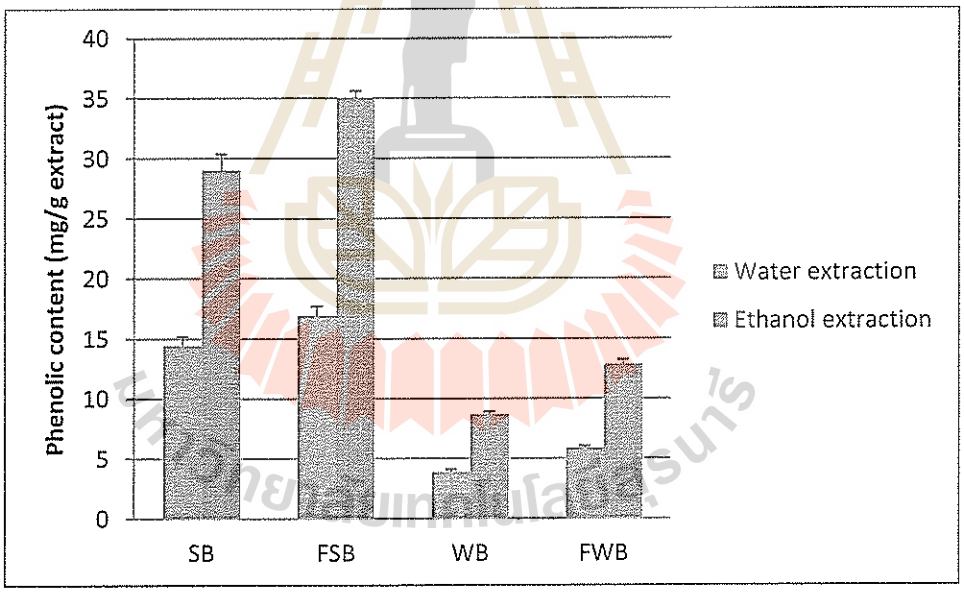
1. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันคือ น้ำ และเอทานอล วิเคราะห์โดยการใช้ Folin-Ciocalteu reagent งานวิจัยหลายชิ้นได้แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกในผัก ผลไม้และธัญพืชมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ(Kwak et al, 2007) ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดแต่ละชนิดได้แสดงไว้ในตารางที่ 3 และรูปที่ 5 ซึ่งพบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดถั่วเหลืองหมักสูงกว่าสารสกัดถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lee และคณะ (2008) ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของถั่วดำที่หมักด้วย *A.awanori* , *R.azygosporus* หรือ *Rhizopus sp No.2* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับถั่วดำที่ไม่ผ่านการหมัก และรายงานของ Chaia และคณะ(2012) เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจะแสดงความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ สำหรับตัวอย่าง สารสกัดถั่วเหลืองที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 29.020 mg gallic acid equivalent/g extract ในขณะที่สารสกัดถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่สูงกว่า คือ 35.02 mg gallic acid equivalent/g extract ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเอทานอลจะสูงกว่าสารสกัดน้ำ และสารสกัดถั่วเหลืองหมักมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าสารสกัดถั่วขาวหมัก ทั้งสารสกัดน้ำและเอทานอล ซึ่งสารสกัดถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด (35.02 mg gallic acid equivalent/g extract) และสารสกัดถั่วขาวที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดต่ำที่สุด (3.89 mg gallic acid equivalent/g extract)

ตารางที่ 3 : ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล

Samples	Total phenolic (mg gallic acid equivalent/g extract)	
	Water	Ethanol
Soybean extract	14.43 ± 0.77^{c}	29.02 ± 1.37^{c}
Fermented Soybean extract	16.94 ± 0.77^{d}	35.02 ± 0.60^{d}
White kidney bean Extract	3.89 ± 0.22^{a}	8.68 ± 0.23^{a}
Fermented White kidney bean extract	5.85 ± 0.19^{b}	12.86 ± 0.37^{b}

Note: The values are mean ± SD.
โดยตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)



รูปที่ 5 : เปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล (mg gallic acid equivalent/g extract) (SB:สารสกัดถั่วเหลือง ,FSB: สารสกัดถั่วเหลืองหมัก , WB:สารสกัดถั่วขาว และ FWB:สารสกัดถั่วขาวหมัก)

2.การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์

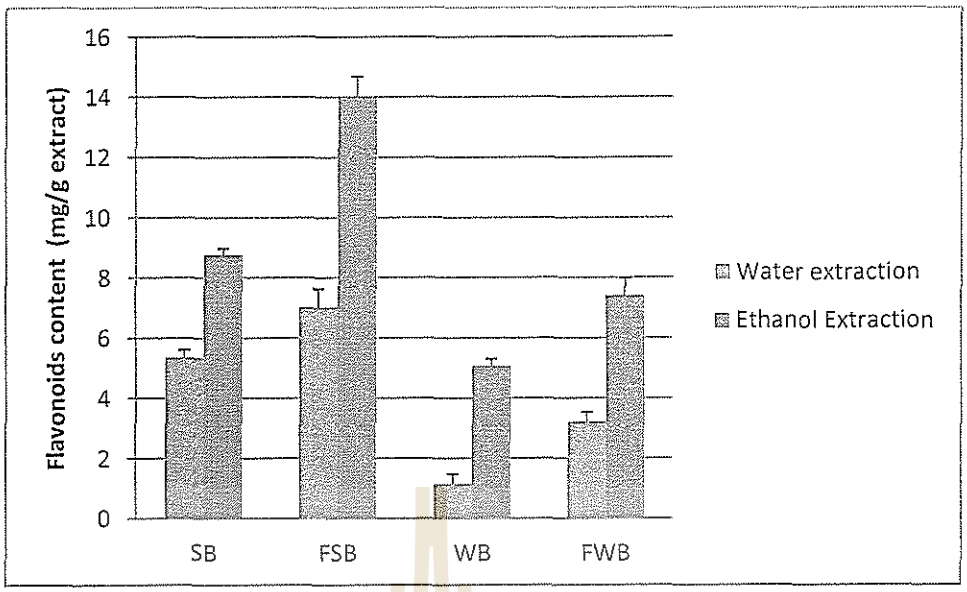
ในรูปที่ 6 ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mg catechin equivalent/g extract) ของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันคือ น้ำ และเอทานอล ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดแต่ละชนิดได้แสดงไว้ในตารางที่ 4 ซึ่งพบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดถั่วเหลืองหมักสูงกว่าสารสกัดถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สารสกัดถั่วเหลืองที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟลาโวนอยด์ 8.77 mg catechin equivalent/g extract ในขณะที่สารสกัดถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟลาโวนอยด์ ที่สูงกว่า คือ 14.02 mg catechin equivalent/g extract ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดเอทานอลจะสูงกว่าสารสกัดน้ำ และสารสกัดถั่วเหลืองหมักมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงกว่าสารสกัดถั่วขาวหมัก ทั้งสารสกัดน้ำและเอทานอล ซึ่งสารสกัดถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุด (14.02 mg catechin equivalent/g extract) และสารสกัดถั่วขาวที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟลาโวนอยด์ต่ำที่สุด (1.15 mg catechin equivalent/g extract)

ตารางที่ 4 : ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล

Samples	Total flavonoids (mg catechin equivalent/g extract)	
	Water	Ethanol
Soybean extract	5.37 ± 0.24 [c]	8.77 ± 0.21 [c]
Fermented Soybean extract	7.02 ± 0.61 [d]	14.02 ± 0.66 [d]
White kidney bean extract	1.15 ± 0.33 [a]	5.08 ± 0.23 [a]
Fermented White kidney bean extract	3.21 ± 0.34 [b]	7.40 ± 0.59 [b]

Note. The values are mean ± SD.

โดยตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)



รูปที่ 6 : เปรียบเทียบปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล (mg catechin equivalent/g extract) (SB:สารสกัดถั่วเหลือง ,FSB: สารสกัดถั่วเหลืองหมัก , WB:สารสกัดถั่วขาว และ FWB:สารสกัดถั่วขาวหมัก)

3.การหาปริมาณไอโซฟลาโวน

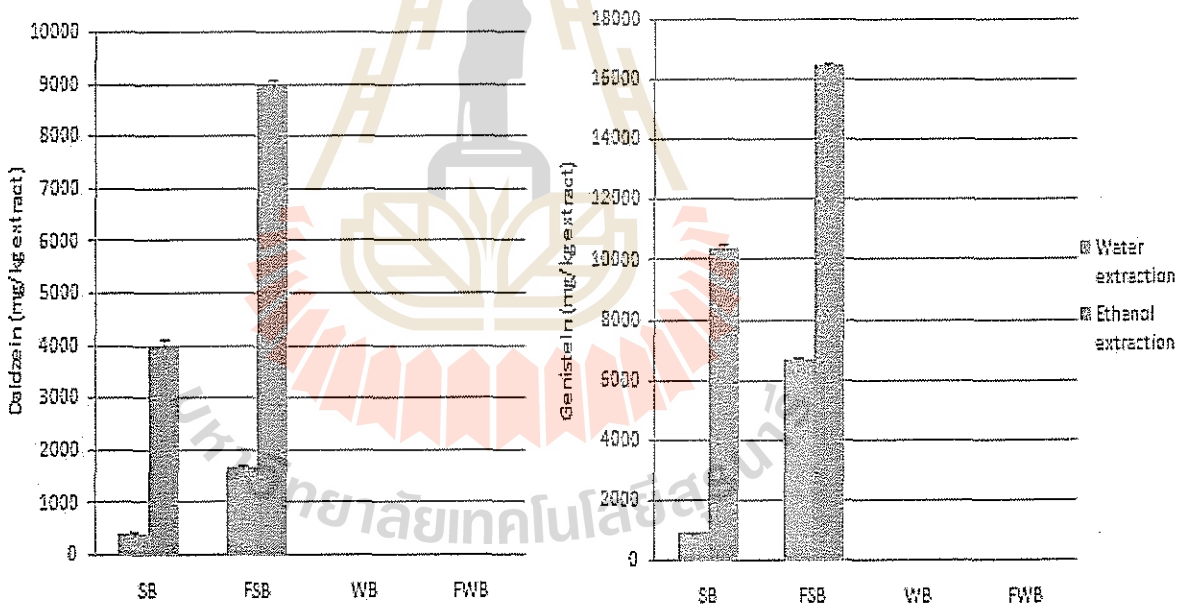
ตารางที่ 5 : ปริมาณไอโวฟลาโวน(Daidzein และ Genistein) ของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล

Sample	Daidzein (mg/kg extract)		Genistein(mg/kg extract)	
	Water	Ethanol	Water	Ethanol
Soybean extract	389.31±41.82[a]	3,988.36±129.10[a]	854.15±69.26[a]	10,320.52±194.89[a]
Fermented Soybean extract	1,652.95±57.66[b]	8,968.64±96.32[b]	6,656.12±75.78[b]	16,416.10±124.00[b]
White kidney bean extract	-	-	-	-
Fermented White kidney bean extract	-	-	-	-

Note. The values are mean ± SD.
โดยตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$) และ – คือตรวจไม่พบ

ปริมาณของเดอิสซีนและเจนิสทีน (mg/kg extract) ของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักใช้การวิเคราะห์ด้วย HPLC ปริมาณของเดอิสซีนและเจนิสทีนของสารสกัดแต่ละชนิดแสดงดังตารางที่ 5 และรูปที่ 7 ซึ่งพบว่าปริมาณของเดอิสซีนและเจนิสทีนของสาร

สกัดถั่วเหลืองหมักสูงกว่าสารสกัดถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Cho และคณะ (2011), ในระหว่างการหมัก cheonggukjang ด้วย *B. subtilis* CS90 พบว่าระดับของไอโซฟลาโวนในกลุ่มอะกลัยโคนสูงขึ้น ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ b-glucosidase และ esterase เพิ่มขึ้นเช่นกัน และรายงานของ Dajanta และคณะ (2009), ถั่วเหลืองที่หมักด้วยกล้าเชื้อบริสุทธิ์ของ *Bacillus subtilis* แสดงปริมาณของไอโซฟลาโวนสูงกว่าถั่วเหลืองที่หมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด สำหรับตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยเอทานอลแสดงปริมาณของเดอิสซีนและเจนิสทีน 3,988.36 mg /kg extract, 10,320.52 mg /kg extract ตามลำดับ ในขณะที่พบปริมาณของเดอิสซีนและเจนิสทีนที่สูงกว่าในสารสกัดถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยเอทานอล ซึ่งมีปริมาณของเดอิสซีนและเจนิสทีน 8,968.64mg /kg extract, 16,416.10mg /kg extract ตามลำดับ ปริมาณของเดอิสซีนและเจนิสทีนของสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสูงกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ และยังพบว่าถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยเอทานอลปริมาณของเดอิสซีนและเจนิสทีนสูงที่สุด ส่วนสารสกัด ถั่วขาว/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักทั้งสารสกัดน้ำและเอทานอล ไม่สามารถตรวจพบปริมาณของเดอิสซีนและเจนิสทีนได้



รูปที่ 7 : เปรียบเทียบปริมาณเดอิสซีนและเจนิสทีนของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล (mg /kg extract) (SB:สารสกัดถั่วเหลือง ,FSB: สารสกัดถั่วเหลืองหมัก , WB:สารสกัดถั่วขาว และ FWB:สารสกัดถั่วขาวหมัก)

2. การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

2.1 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

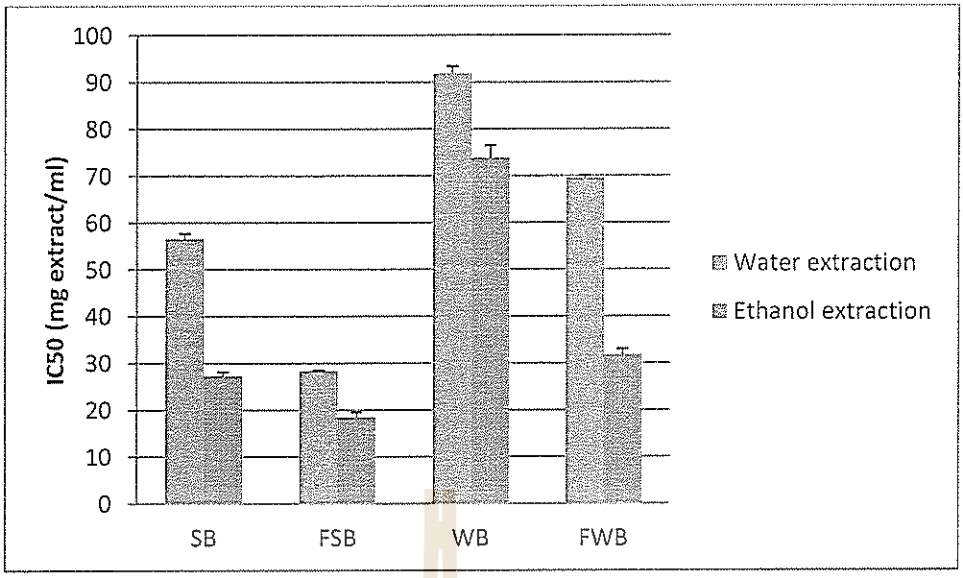
ตารางที่ 6 : ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhy-drazyl (DPPH) ของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล

Samples	IC_{50} (mg / ml)	
	Water (mg extract/ ml)	Ethanol (mg extract/ ml)
Soybean	56.501 ± 1.216^{c}	27.209 ± 0.956^{c}
Fermented Soybean	28.349 ± 0.022^{d}	18.453 ± 1.015^{d}
White Kidney Bean	91.823 ± 1.592^{a}	73.791 ± 2.704^{a}
Fermented White Kidney Bean	69.413 ± 0.686^{b}	31.763 ± 1.249^{b}
Trolox	0.087 ± 0.010	
Ascorbic acid	0.073 ± 0.009	

Note: The values are mean ± SD.

โดยตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhy-drazyl (DPPH) เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรที่อยู่ในสารละลาย โดย DPPH คือ อนุภาคอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้ เมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ ในการศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดในการทำให้ความเข้มข้นของ $DPPH^{\bullet}$ ลดลง 50% (IC_{50}) โดยใช้ Trolox และ Ascorbic acid เป็นตัวควบคุมได้แสดงไว้ในตารางที่ 6 และรูปที่ 8 โดยพบว่า ถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด (18.453 mg / ml) ตามด้วยถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยน้ำ (28.349 mg / ml) ส่วนถั่วขาวที่สกัดด้วยน้ำพบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด (91.823 mg / ml) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจะสูงกว่าสารสกัดน้ำ และสารสกัดถั่วเหลืองหมักมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดถั่วขาวหมัก ทั้งสารสกัดน้ำและเอทานอล



รูปที่ 8 : เปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhy-drazyl (DPPH) ของสารของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (IC_{50} mg/ml) (SB:สารสกัดถั่วเหลือง ,FSB: สารสกัดถั่วเหลืองหมัก , WB:สารสกัดถั่วขาว และ FWB:สารสกัดถั่วขาวหมัก)

2.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

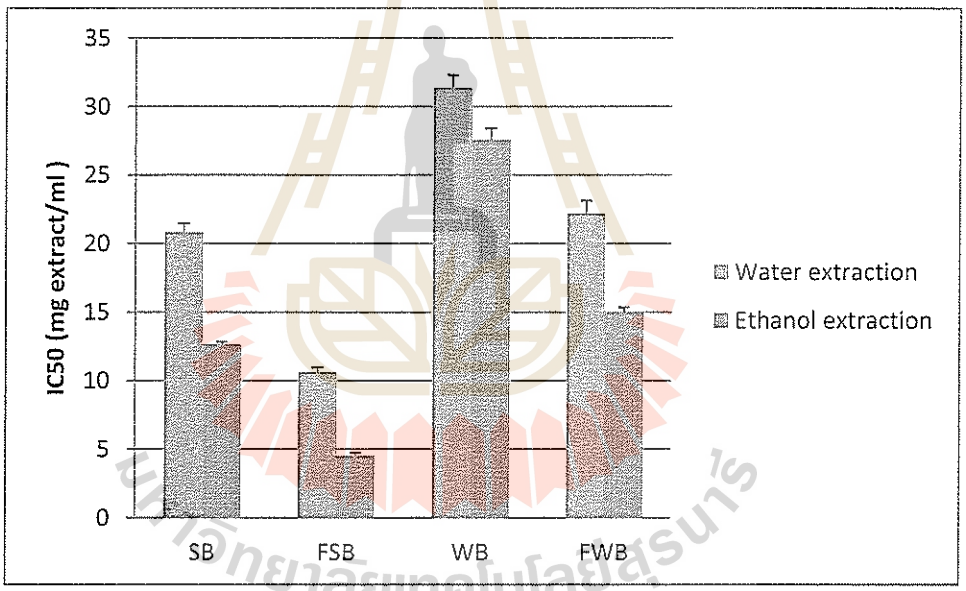
ตารางที่ 7 : ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย ,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)ของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล

Samples	**IC_{50} (mg / ml)**	
	Water (mg extract/ ml)	Ethanol (mg extract/ ml)
Soybean	20.847 ± 0.628^{b}	12.623 ± 0.1988^{b}
Fermented Soybean	10.616 ± 0.333^{a}	4.519 ± 0.216^{a}
White Kidney Bean	31.385 ± 0.903^{d}	27.573 ± 0.828^{d}
Fermented White Kidney Bean	22.201 ± 0.917^{c}	14.976 ± 0.371c
Trolox	0.087 ± 0.010	
Ascorbic acid	0.073 ± 0.009	

Note. The values are mean ± SD.

โดยตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด โดย ABTS จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระด้วยการเติมโซเดียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ในการศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดโดยใช้ Trolox และ Ascorbic acid เป็นตัวควบคุม ได้แสดงไว้ในตารางที่ 7 และรูปที่ 9 โดยพบว่าถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด (4.519mg / ml) ตามด้วยถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยน้ำ (10.616 mg / ml) ส่วนถั่วขาวที่สกัดด้วยน้ำพบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด (31.385mg / ml) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจะสูงกว่าสารสกัดน้ำ และสารสกัดถั่วเหลืองหมักมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดถั่วขาวหมัก ทั้งสารสกัดน้ำและเอทานอล



รูปที่ 9 เปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (IC_{50} mg/ml) (SB:สารสกัดถั่วเหลือง ,FSB: สารสกัดถั่วเหลืองหมัก , WB:สารสกัดถั่วขาว และ FWB:สารสกัดถั่วขาวหมัก)

2.3 การวัดสมบัติการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด

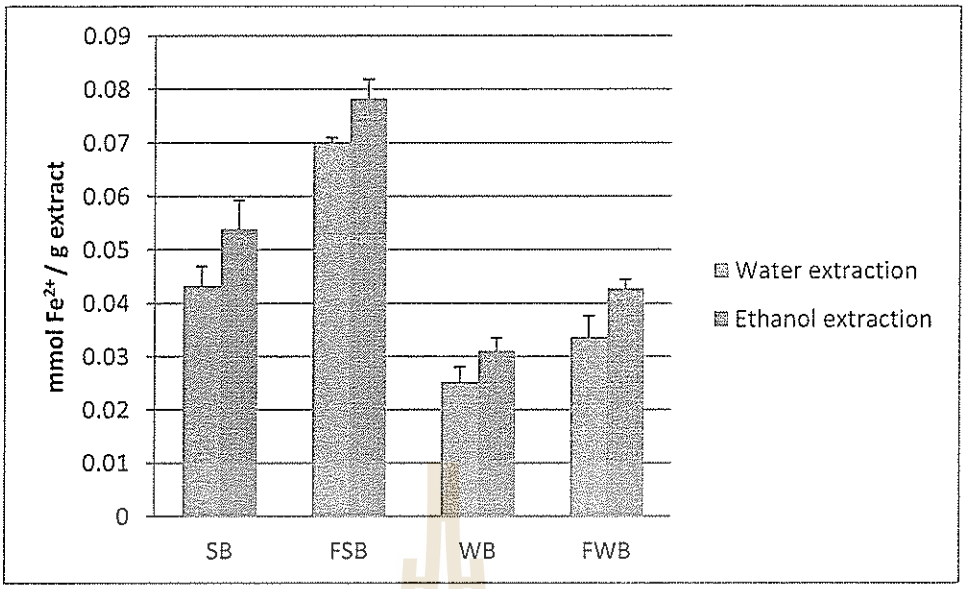
ตารางที่ 8 : ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล

Samples	Ferric-reducing antioxidant power (mmol Fe^{2+} / g extract)	
	Water (mg extract/ ml)	Ethanol(mg extract/ ml)
Soybean	0.043 ± 0.004^{c}	0.054 ± 0.005^{c}
Fermented Soybean	0.070 ± 0.001^{d}	0.078 ± 0.004^{d}
White Kidney Bean	0.025 ± 0.003^{a}	0.031 ± 0.003^{a}
Fermented White Kidney Bean	0.034 ± 0.004^{b}	0.043 ± 0.002^{b}
Trolox	9.681 ± 0.303	
Ascorbic acid	10.867 ± 1.035	

Note. The values are mean ± SD.

โดยตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดซึ่งเกิดจากการรีดิวซ์ โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอริค Fe^{3+} กับ TPTZ (ferric tripyridyltriazine) ได้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอรัส Fe^{2+} กับ TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงิน และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ในการศึกษาสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด พบว่าตัวอย่างที่สกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าน้ำ ดังแสดงในตารางที่ 8 และรูปที่ 10 โดยพบว่าถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด (0.078 mmol Fe^{2+} / g extract) ตามด้วยถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยน้ำ (0.070 mmol Fe^{2+} / g extract) ส่วนถั่วขาวที่สกัดด้วยน้ำพบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด (0.025 mmol Fe^{2+} / g extract) และสารสกัดถั่วเหลืองหมักมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดถั่วขาวหมัก ทั้งสารสกัดน้ำและเอทานอล



รูปที่ 7 : เปรียบเทียบสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (mmol Fe^{2+} / g extract) (SB:สารสกัดถั่วเหลือง ,FSB: สารสกัดถั่วเหลืองหมัก , WB:สารสกัดถั่วขาว และ FWB:สารสกัดถั่วขาวหมัก)

จากการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay พบว่า สารสกัดเอทานอลมีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันได้ดีที่สุด โดยสามารถเรียงลำดับความสามารถในการต้านออกซิเดชันจากสูงสุดไปต่ำสุดตามชนิดของสารสกัดได้ ดังนี้ สารสกัดถั่วเหลืองหมัก สารสกัดถั่วเหลือง สารสกัดถั่วขาวหมัก และสารสกัดถั่วขาวหมัก ตามลำดับ หากเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคือ Ascorbic acid และ Trolox พบว่าสารสกัดถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักมีประสิทธิภาพต่ำกว่าสารมาตรฐาน และความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจะสอดคล้องกับปริมาณของ Total phenolic ที่มีในตัวอย่าง หากสารสกัดใดมีปริมาณของ Total phenolic มากจะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิกกับความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของ Jacobo-Velazquez และคณะ(2009)

บทที่ 5
บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากถั่วเหลือง/ถั่วขาว และถั่วเหลือง/ถั่วขาวที่ผ่านการหมักในด้านการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเตรียมสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำและเอทานอล จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากถั่วเหลืองหมักมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด,ฟลาโวนอยด์,เดอิสซีน และเจนิสทีนที่สูงกว่าสารสกัดจากถั่วขาวหมักทั้งสารสกัดน้ำและเอทานอล สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด,ฟลาโวนอยด์,เดอิสซีน และเจนิสทีนของสารสกัดถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยเอทานอล พบว่าสูงกว่าสารสกัดถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สารสกัดถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยเอทานอลแสดงให้เห็นว่ามีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด,ฟลาโวนอยด์,เดอิสซีน และเจนิสทีน 35.02 mg gallic acid equivalent/g extract and 14.02 mg catechin equivalent/g extract, 8,968.64 mg/kg extract and 16,416.10 mg/kg extract ตามลำดับ นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด, ฟลาโวนอยด์, เดอิสซีน และเจนิสทีนของสารสกัดจากถั่วเหลืองหมักสูงกว่าสารสกัดจากถั่วเหลือง ในขณะที่สารสกัดถั่วขาวที่สกัดด้วยน้ำมีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด,ฟลาโวนอยด์,เดอิสซีน และเจนิสทีนที่ต่ำสุด เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลายที่นำมาใช้สกัดพบว่าเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ส่งเสริมให้ค่าของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด,ฟลาโวนอยด์,เดอิสซีน และเจนิสทีนสูงขึ้น และเมื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay พบว่า สารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดที่ ค่า IC_{50} 18.45 mg extract /ml, 4.52 mg extract /ml และ 0.079 mmol Fe^{2+}/g extract ตามลำดับ รองลงมาได้แก่สารสกัดน้ำของถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักและสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลือง ส่วนสารสกัดน้ำของถั่วขาวมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด

ดังนั้นการสกัดด้วยเอทานอลจึงจัดเป็นสารสกัดที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ เนื่องจากมีปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมด(Total phenolic) มากกว่าสารสกัดอื่นๆ และความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากขึ้นด้วยเช่นกัน

บรรณานุกรม

ณัฐวุฒิ บุญยืน.กระทู้วิชาการ.(ออนไลน์). สืบค้นจาก: http://www.vcharkarn.com/vcafe/141067 [6 ตุลาคม 2553].

ศรีนารี แก้วฤดี.(มม).ฮอร์โมนสำหรับสตรีวัยหมดประจำเดือนและโรคกระดูกพรุน,ภาควิชาสูติศาสตร์ และนรีเวชวิทยา,คณะแพทยศาสตร์ ,มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Ajimandi,B.H.,Alekel,L.,Hollis,B.W.,Amin,D.,Stawicz-Sapuntzakis,M.,Guo,P.,and Kukerja,S.C.(1995).Dietary soybean protein prevents bone loss in an Ovariectomized rat model ofosteoporosis.***J.Nutr.***126:161.

Anderson,J.J.B.,Thomsen,K., and Christiansen,C.(1987) .Hight protein meals, insular hormones and urinary calcium eccretion in human .subjects.***In Osteoporosis***. 240-245.

Anderson,J.W.,Smith,B.M,and Washnock,C.S.(1999).Cardiovascular and renal benefit of dry bean and soybean intake .***Am.J.Chin.***Nutr.70:464s-474s.

Anthony,M.S.,Carkson,T.B., Hughes,V.L.,Jr.Morgan,T.M., and Burke,G.L.(1996).Soy isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkey.***J.Nutr***.126:43-50.

Benzie I.F. and Strain J.J.(1999).Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. ***Methods Enzymol***. 299:15-27.

Blair,H.C.,Jordan,S.E.,Peterson,T.G., and Barnes,S.(1996)Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats.***J.Cellular Biochem***.61:629.

Brandi,M.L.(1999).Phytoestrogens and menopause.***Environmental Toxicology and Pharmacology.***7:213-216.

Brand-Williams W, Bondet V, and Berset C. (1995). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. ***Food Sci Technol*** . 30: 609-615.

Brenner ,B.M.,Meyer,T.W., and Hastetter,T.H.(1982).Dietary protein intahe and the progressive nature of kidney disease:the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging , renal ablation, and intrinsic renal disease.***N.Eng.J.Med***.307:652-659.

Chaia, C., Jua, H.K., Kimc, S.C., Parka, J.H., Limd, J., Kwona, S.W. and Lee, J. (2012). Determination of bioactive compounds in fermented soybean products using GC/MS and further investigation of correlation oftheir bioactivities, ***J. Chromatograp B.*** 880:42–49.

Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote, E. and Lumyong, S. (2002) . Characterization of protease of Bacillus subtilis strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand, ***ScienceAsia.*** 28 : 241-245.

Chapple I.L. and Matthews J.B.(2007). The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. ***Periodontology 2000***. 43:160–232.

Chiechia, L.M., Secretob, G., Amorec, M.D., Fanellid , M., Venturellib, E., Cantatorec, F., Valerioa, T ., Laselvac, G. and Loizzia, P .2002. Efficacy of a soy rich diet in preven- ting postmenopausal osteoporosis: the Menfis randomized trial, ***Maturitas.*** 42:295-300.

Cho K.M, Lee J.H , Yun H.D, Ahn B.Y, Kime H, and Seo W.T . (2011) Changes of phytochemical constituents (isoflavones, flavanols, and phenolicacids) during cheonggukjang soybeans fermentation using potential probiotics Bacillus subtilis CS90. ***Journal of Food Composition and Analysis.*** 24:402–410.

Chukeatirote, E. and Thakang, P. (2006) . Chemical composition of thua nao-a Fermented Soybean Food of Northern Thailand,***Chaing Mai J.Sci.*** 33(2): 243-245.

Chukeatirote, E., Dajanta, K. and Apichartsrangkoon,A. (2010) . Thua nao, Indigenous Thai Fermented Soybean:Review , ***J. Biol.Sci.*** 10(6): 581-583.

Dajanta, K., Chukeatirote, E., Apichartsrangkoon, A. and. Frazier, R. A. (2009). Enhanced aglycone production of fermented soybean products by Bacillus species. ***Acta Biologica Szegediensis.*** 53(2):93-98.

Dajanta, K., Apichartsrangkoon, A. Chukeatirote, E. and. Frazier, R. A. (2011). Free-amino acid profiles of thua nao, a Thai fermented soybean,***Food Chem .*** 125:342–347.

Eskin and Przybylski (2001).Antioxidant and shelf life of foods. In: N.A.M. Eskin and D.S. Robinson, Editors, Food shelf life stability: chemical, biochemical and microbiological changes, CRC Press, Boca Raton, Fla : 176–202.

Gasaluck P and Oonsivilai R. (2011). Decreasing of undesirable aroma compound and valuating nutritional fermented soybean by the use of Bacillus subtilis as fermentation starter culture . ***Suranaree university of technology.***

Garcia,M.C., Torre,M., Marina,M.L., and Laborada,F.(1997).Composition and characterization of soybean and related products.Cri.Rev.***Food Sci.Nutr***.37:361-391.

Gil,M.I., Toma´s-Barbera´n,F.A., Hess-Pierce,B., Holcroft,D,M., and Kader,A.A. (2000).Antioxidant acitivity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing.***J. Agric. Food Chem***. 48: 4581 4589.

Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., & Jiang, Y. (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. ***Nutrition Research***. 23: 1719–1726.

Han,B-Z.Rombouts,F.M.,and Nout,M.J.R.(2004).Amino acid profile of sufu,a chinese fermented soybean food.***J.Food Composition and analysis***.17:689-698.

Hawrylewicz,E.J.,Zapata,J.J.,and Blair,W.H.(1995).Soy and experimental cancer :animal study.***J.Nutr***.125:698S-708S.

Heinonen S, W.h.l. K.(2002) Phytochemistry Reviews 1: Metabolism of isoflavones inhuman subjects. & Herman Adlercreutz.***Spine***: Volume 29 : Issue 11 : 1196-1201.

Hung,Y-H.,Wang,Y-J.,and Chou,C-C.(2009). Antimutagenic activity of *Azpergillus awamori* fermented black soybean response to stimulated digestive juice treatment and its antimutagenic mechanism.***LWT-Food Science and Technology***.42:56-62.

Jacobo- Velazquez, D.A. and Cisneros-Zevallos, L. (2009). Correlations of Antioxidant Activity against Phenolic Content Revisited: A New Approach in Data Analysis for Food and Medicinal Plants. ***Journal of Food Science***. 74:9.

Jimenez-Escrig, A., Rincon, M., Pulido, R., Saura-Calixto, F., (2001).Guava fruit (Psidium guajava L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***. 49:5489–5493.

Jing, L.G. and Zhang, Y. Z., (2006), Determination of Soybean Isoflavones Extracted from Soybean by HPLC,***Journal of US-China Medical Science***, 26(3): 629-632.

Juan, M-Y. and Chou, C-C. (2010) . Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with Bacillus subtilis BCRC14715 , **Food Microbiol.** 27:586-591.

Kenneth,D.,Setchell,R., and Cassidy,A.(1999).Dietary isoflavones:biological effects and revelance to human health.***J.Nutr***.129:758S-767S.

Kim,J.J., Kim S.H.,b.,Hahn ,S.J.,and Chung,I.M. (2005) . Changing soybean isoflavone composition and concentrations under two different storage conditions over three years.***Food Research International*** . 38 : 435–444.

Kim,N.Y.,Song,E.J.,Kwon,D.Y.,Kim,H.P., and Heo,M.Y.(2008).Antioxidant and antimutagenic activities of Korean fermented soybean.***Food and chemical toxicology***.46:1184-1189.

Ksouri,R., Falleh, H., Megdiche ,W., Trabelsi, N ., Mhamdi, B., Chaieb, K., Bakrouf, A.,Magné , C., and Abdelly, C.(2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica L.* and related polyphenolic constituents. **Food and Chemical Toxicology** 47 : 2083–2091.

Husain, S. R.; Cillard, J.; Cillard, P(1987). Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. ***Phytochemistry***. 26: 2489-2491.

Kwak,C.K.,Lee,M.S.,and Park,S.C.(2007). Higher antioxidant properties of Chungkookjang a fermented soybean paste,may be due to increased aglycone and malonylglycoside isoflavone during fermentation.***Nutrition Research***.27:719-727.

Liu, K .(1997).Soybeans : Chemistry ,Technology,and Ultilization.***Book***.

Lee, I-H. Hung, Y-H. and Chou, C-C . (2008) . Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean , ***Int. J. Food Microbiol***. 121:150–156.

Messina,M.,and Barns,S.(1991).The role of soy products in reduced risk of cancer. ***J.Natl.Cancer Inst***.83:541-546.

Messina, M. J. (1999) Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. ***Am. J. Clin. Nutr***. 70, 439S-450S.

Moktan, B., Saha, J. and Sarkar, P. K. (2008) . Antioxidant activities of soybean as affected by Bacillus-fermentation to kinema ,***Food Res Int.*** 41:586–593.

Nagata,C.,Takatsuka,N.,Kurisu,Y., and Shimisu,H.(1998).Decreased serum total cholesterol concentration is associated with high intake of soy products in Japanese men and woman.***J.Nutr***.128:209-213.

Nakajima,N.,Nozaki,N.,Ishihara,K.,Ishikawa,A.,andTsuji,H.(2005).Analysis of Isoflavone content in Tempeh , a fermented soybean,and preparation of a new isoflavone-enriched Tempeh.***J of Bioscience and Bioengineering***.6:685-687.

Oonsivilai,R.,Cheng,C.,Bomser,J.A.,Ferruzzi,M.G.,and Ningsanond,S.(2007). Phytochemical profiling and detoxification properties of *Thunbergia Laurifolia* Lindl(Rang Chuet) extracts. ***Journal of Ethnopharmacology***.114:300-306.

Oonsivilai, R., Chaijareonudomroung, N., Huantanom, Y. and Oonsivilai, A. (2010) . Extraction condition of Echinocactus grusonii ,**World *Academy of Science, Engineering and Technology Journal.***7:366- 369.

Osman, A.M. (2011). Multiple pathways of the reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH•) with (+)-catechin: Evidence for the formation of a covalent adduct between DPPH• and the oxidized form of the polyphenol. ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, 412: 473-478.

Patricia,D.C.,Pascle,T.,Guy,L., and Yves,J.(2010).Controversies concerning the use of phytoestrogens in menopause management:Bioavailability and metabolism. ***Journal of Maturitas***.65:334-339.

Prior,R.L.,Cao,G.,Martin,A.,Sofic.E.,McEwen,J.,and O'Brien,C.(2007).Antioxidant capacity as influence by total phenolic and anthocyanin content maturity and variety of vaccinium species.***Journal of Agricultureal and food chemistry***. 46:2686-2693.

Punchard, N.A and Kelly, F.J. (1996). Free radicals, a practical approach, ***IRL Press, Oxford.*** 271–285.

Punjaisee C, Chaiyasut C, Chansakaow S,Tharata S, Visessanguan W, and Punjaisee S.(2011). 8-Hydroxygenistein formation 0f soybean fermented with *Aspergillus oryzae* BCC 3088. ***African journal of Agricultural Research.*** 6(4):785-789.

Ren,H.,Liu,H.,Endo,H.,Takagi,Y.,and Hayashi,T.(2006).Anti-mutagenic and anti-oxidant activities found in traditional soybean fermented products furu.***J Food chemistry***.95:71-76.

Rice-Evans, C.A., N.J. Miller, and G. Paganga. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. ***Trends Plant Sci***.2: 152-159.

Samruan, W. and Oonsivilai, R. (2012) . Soybean and fermented soybean extract antioxidant activities, ***World Academy of Science, Engineering and Technology Journal.*** 72:1169- 1172.

Setchell K.D.R.(1998) Phytroestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of isoflavones. ***Am.J.Clin.Nutr*** . 68,1333s-1346s.

Singthong, J. Oonsivilai, R., Oonmetta-aree., and Ningsanond, S. (2011). Phytochemical profile, antioxidant activity and cytotoxicity of Tiliacora triandra (Colebr.) Diels. (Yanang) extracts on Caco-2-cells. ***The 5th Thailand Congress of Nutrition 2011.*** September 5-7. Oral Presentation.

Su,C-L., Wu,C-J., Chen,F-N., Wang, B-J., Sheu ,S-R and Won,S-J.(2007). Supernatant of bacterial fermented soybean induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma Hep 3B cells via activation of caspase 8 and mitochondria. ***Food and Chemical Toxicology***.45:2303-2314 .

Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H., and Muraki, H.(1987). A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. ***Experientia***, 43: 1110–1111.

Valente,M.,Bufalino,L.Castiglione,G.N.,Angelo,R.D.,Mancuso,A.,Gallopi,P.,and Zichella,L.(1994).Effect of 1-year treatment with isoflavone on bone in postmenopausal women with low bone mass.***Calcif.Tissue Int***.54:377.

Wong,C.C., Li,H., Cheng,K., and Chen,F.(2006). A systemic survey of antioxidant activity of 30 chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. ***Food Chem***.97:705-711.

Wu,A.H., Ziegler,R.G.,.Horn-Ross,P.L., Nomura,A.M., Weat,P.W., Kolonel, L.N.,Rosenthal,J.F., Hoover,R.N., and Pike,M.C.(1996).Tofu and risk of breast cancer in Asian-Americans. **Cancer** ***Epidemiology. Biomarkers and Prevention.*** 5(11) :901-906.

Yao, Q., Nan, J-X., and Dong, P-H.(2010). Comparison of Antioxidant Activities in Black Soybean Preparations Fermented with Various Microorganisms. ***Agricultural Sciences in China.*** 9(7) : 1065-1071.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. **การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 20 % (w/v)**

   ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 20 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

2. **การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid stock solution 5 mg/ml**

   ละลาย gallic acid 0.5 กรัม ใน 95% เอทานอล 10 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

3. **การเตรียมสารละลาย DPPH 62.5 µM**

   ละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 2.4643 มิลลิกรัม ในเมทานอลเล็กน้อย จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 100 มิลลิลิตร

4. **การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid stock solution 0.5 mg/ml**

   ละลาย Ascorbic acid 25.0 mg ในเมทานอลและปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร

5. **การเตรียมสารละลาย Acetate buffer 300 mM pH 3.6**

   ละลายโซเดียมอะซีเตตไตรไฮเดรต 1.55 กรัม ในกรดอะซีติก 8 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร

6. **การเจือจาง HCl ให้มีความเข้มข้น 40 mM**

   ปีเปต HCl เข้มข้น (12.04 M) 1.66 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร

7. **การเตรียมสารละลาย TPTZ 10 mM**

   ละลาย TPTZ 0.0312 กรัม ใน 10 มิลลิลิตรของสารละลาย HCl 40 mM โดยต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนนำมาวิเคราะห์

8. **การเตรียมสารละลาย ferrous chloride 20 mM**

   ละลายเฟอริคคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) 0.054 กรัมในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร โดยต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนนำมาวิเคราะห์

โรงวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

9. **การเตรียมสารละลายมาตรฐานเฟอรัสซัลเฟต 2 mM (stock solution)**

ละลายเฟอรัสซัลเฟต (FeSO4.7H2O) 0.0278 กรัมในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร

10. **การเตรียมสารละลาย potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) 4.9 mM**

ละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 0.0662 กรัมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร

11. **การเตรียมสารละลาย ABTS 14 mM**

ละลาย ABTS 0.0385 กรัม ในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด

12. **การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox stock solution 10 mg/ml**

ละลาย Trolox 50.0 mg ในเอทานอล 95% และปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

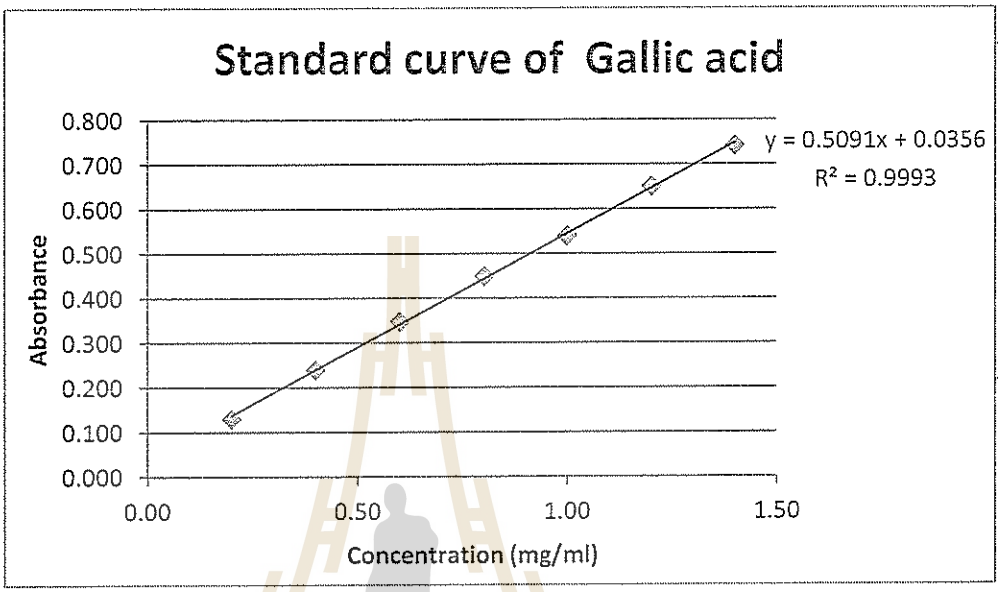
ภาคผนวก ข

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์

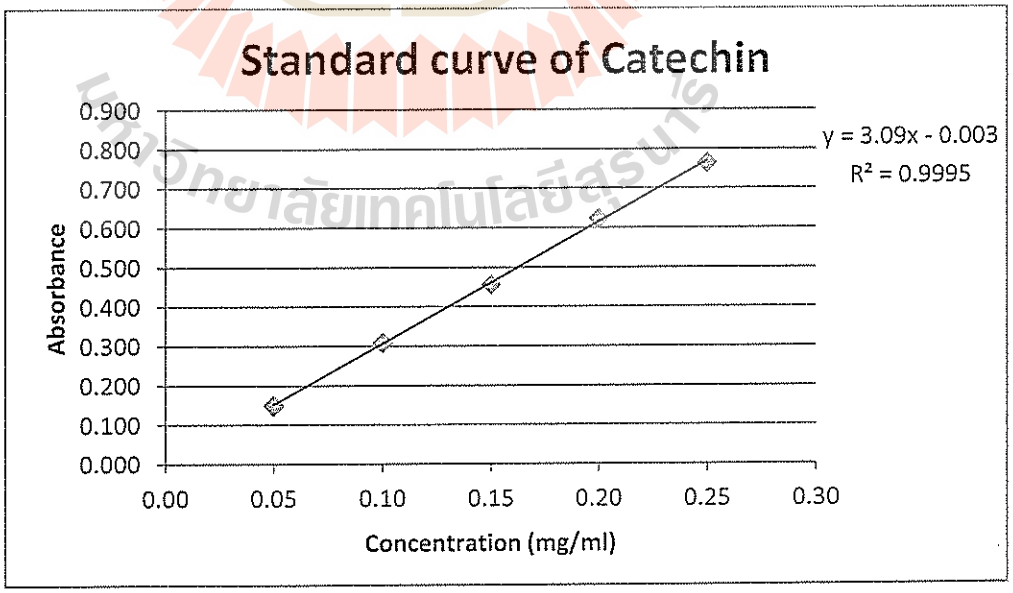
1. กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ Total Phenolic

1.1 กราฟมาตรฐานของ Gallic acid



2. กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ Flavonoids

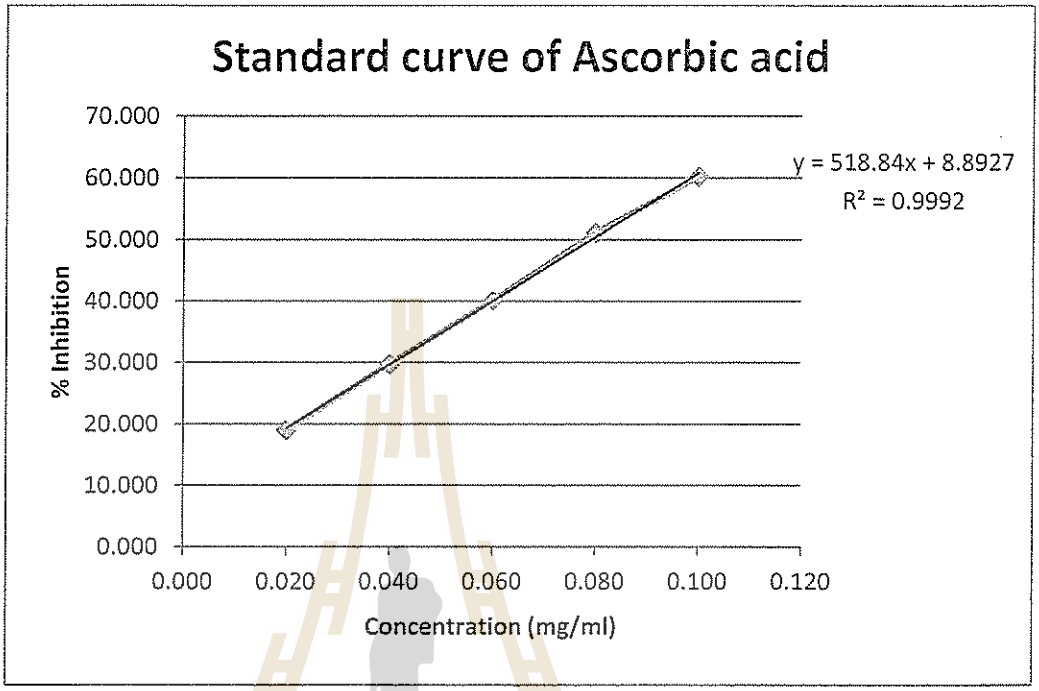
1.1 กราฟมาตรฐานของ Catechin



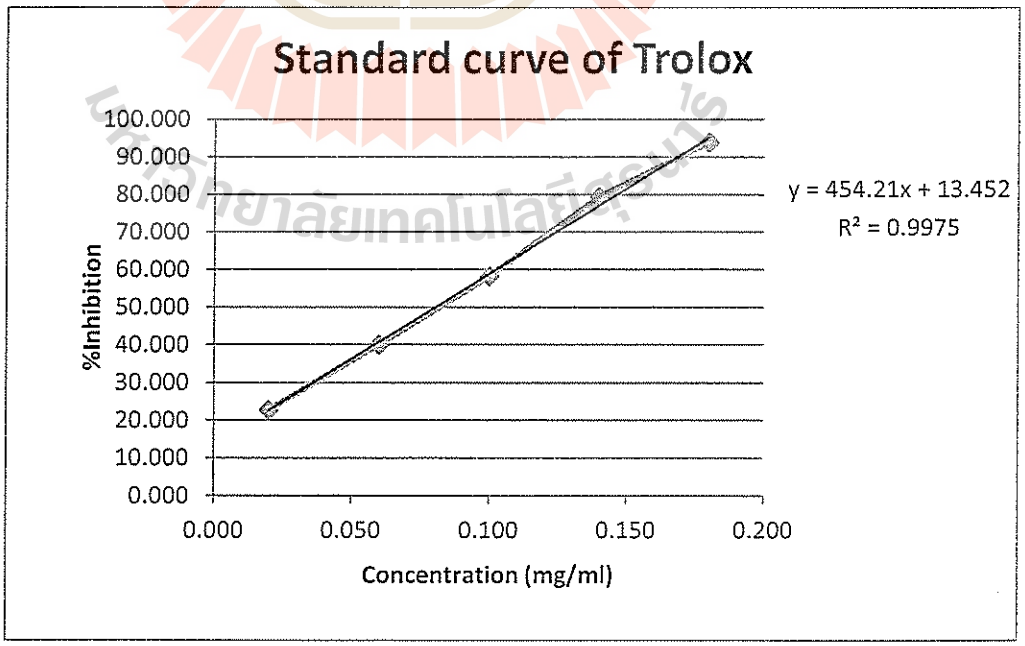
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ Antioxidation ด้วย DPPH Assay

3.1 กราฟมาตรฐานของ Ascorbic acid

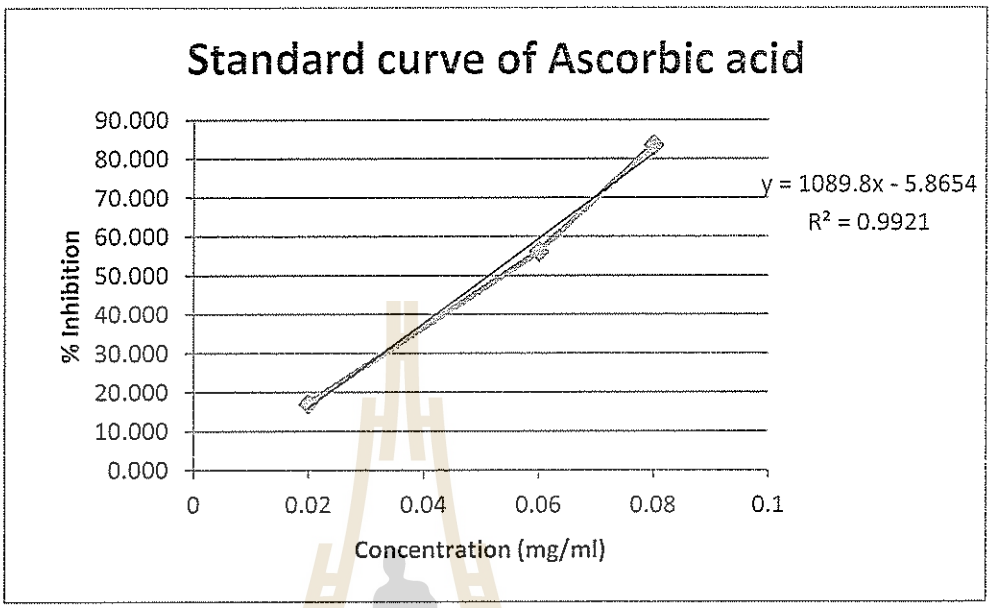


3.2 กราฟมาตรฐานของ Trolox

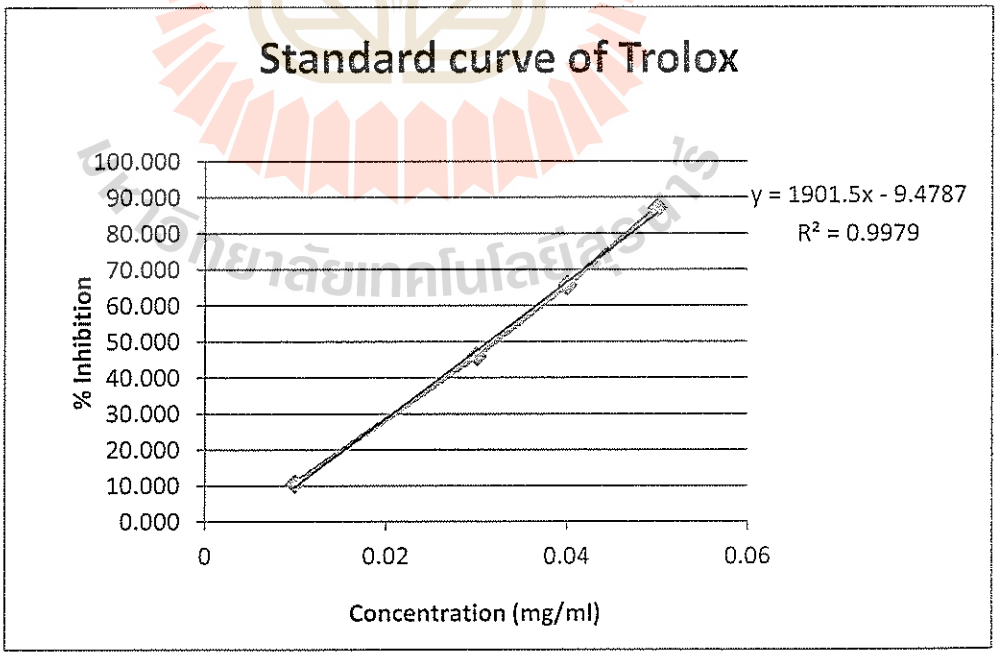


4. กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ Antioxidation ด้วย ABTS Assay

4.1 กราฟมาตรฐานของ Ascorbic acid

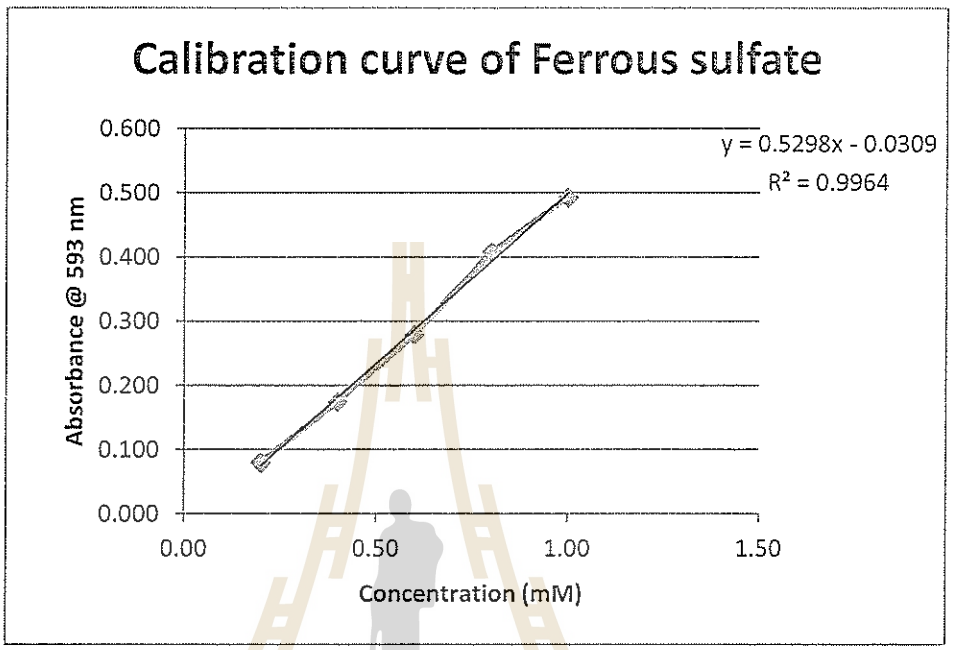


4.2 กราฟมาตรฐานของ Trolox



5. กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ Antioxidation ด้วย FRAP Assay

5.1 กราฟมาตรฐานของ Ferrous sulphate



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติคณะผู้วิจัย (ต้องระบุประวัติคณะผู้วิจัย / ที่ปรึกษาโครงการฯ ครบทุกคน)

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์
   (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Ratchadaporn Oonsivilai
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-4099-00848-97-8
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
   อาจารย์ ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
   มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail
   สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
   จังหวัดนครราชสีมา 30000
   โทรศัพท์ 0-442-242-32, 0-442-242-33 โทรสาร 0-442-243-87, 0-442-241-50
   E-mail address : roonsivi@sut.ac.th
5. ประวัติการศึกษา
   ปริญญาตรี สาขาวิชาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (พยาบาล)
   สถาบัน คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
   ปีที่สำเร็จ 2530
   ปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร
   สถาบัน Dalhousie University DalTech, Canada
   ปีที่สำเร็จ 2543
   หัวข้อวิทยานิพนธ์ที่ทำ : The Effect of β-Glucan Polymers on the Rheological and Filtration Properties of Wort"
   แหล่งทุนที่ได้รับ : ทุนผู้ช่วยวิจัย NSERC Canada
   ปริญญาเอก สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
   สถาบัน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
   ปีที่สำเร็จ 2549
   หัวข้อวิทยานิพนธ์ที่ทำ : Nutraceutical and Functional properties of Rang Chuet (*Thunbergia Laurifolia* Lindl.) Extracts
   แหล่งทุนที่ได้รับ : ทุนพัฒนาอาจารย์ของทบวงมหาวิทยาลัย
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   สมุนไพร อาหารเสริมสุขภาพ ฤทธิ์ทางชีวภาพ คุณสมบัติทางวิทยากระแสของอาหาร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย : การประยุกต์ใช้ neural network สำหรับค้าหาค่าความเข้มข้นวิกฤตในสารละลาย β-glucan

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

1. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการการประยุกต์ใช้ neural network สำหรับค้นหาค่าความเข้มข้นวิกฤตในสารละลาย β-glucan แหล่งทุน มทส.

2. รายงานฉบับสมบูรณ์เรื่องการเตรียมสารสกัดอุดมด้วยวิตามินซีจากผัก แหล่งทุน IRPUS สกว.

7. Publications:

1) **Oonsivilai, R.**, Speers, R.A. and Paulson, A.T. 2000. Effects of pH, maltose and ethanol on the physical properties of model beta-glucan suspensions. Presented at IOB 2000, Institute of Brewing, Asia-Pacific Section 26th Convention, Mar. 19-24, Singapore, SGP.

2) **Oonsivilai, R.** Patelakis, S.J.J., Speers, R.A., and Paulson, A.T. 1999. Rheological and filtration properties of beta-glucan polymers in the brewing process. CIFST Annual Meeting, Presentation #OR-12, June 6-9, Kelowna, BC.

3) Speers, R. A., Patelakis, S.J.J., A. T. Paulson, and **Oonsivilai, R.** 2004. Shear rate during brewing operations. MBAA TQ vol. 41, no. 3, pp. 241-247.

4) **Oonsivilai, R.**, Cheng, C., Ningsanond, S., Bomser, J.A. and Ferruzzi, M.G. 2006. Induction of quinone reductase activity in murine hepatoma cells by extracts of *Thunbergia Laurifolia* Lindl. Presented at EB 2006. Moscone Convention Center, April 1-5, San Francisco, CA.

5) **Oonsivilai, R.**, Cheng, C., Bomser, J.A., Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S. 2007. Phytochemical profiling and detoxification properties of *Thunbergia Laurifolia* Lindl (Rang Chuet) extracts. Journal of Ethnopharmacology. 114 pp: 300-306.

6) **Oonsivilai, R.**, Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S. 2007. Antioxidant activity and Cytotoxicity of Rang Chuet (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) Extracts. Presented at FoSTAT 2007. BITEC, June 14-15, Bangkok, Thailand.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

7) **Oonsivilai, R.** and Oonsivilai, A. 2007. Probabilistic neural network for β-glucan suspensions. Proceedings of the 7th WSEAS International Conference on Simulation, Modelling and Optimization. Beijing, China, pp. 159-164, ISBN ~ ISSN:1790-5117 , 978-960-6766-07-7.

8) Oonsivilai, A. and **Oonsivilai, R.** 2008. Genetic algorithms approach to twin-screw food extrusion process frequency domain parameter estimation. Proceeding of 7th WSEAS Int. Conf. on Applied Computational Science (ACACOS'08), Hangzhou, China, April 6-8. ISBN~ ISSN: 1790-5117, 978-960-6766-49-7.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี