



การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลืองสำหรับผู้หญิงวัยทอง

โดย

นางสาวสุภาภรณ์ วงศ์พิพันธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตด้วยเห็ดสำหรับผู้หญิงวัยทอง

โดย

นางสาวสุภาภรณ์ วงศ์พิพันธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

**DEVELOPMENT OF FUNCTIONAL FOOD FROM SOYBEAN YOGHURT FOR
MENOPAUSE**

**By
Supaporn Vongpiphan**

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

MASTER OF SCIENCE

Department of Food Technology

Graduate School

SILPAKORN UNIVERSITY

2007

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลืองสำหรับผู้หญิงวัยทอง” เสนอโดย นางสาวสุภาภรณ์ วงศ์พิพันธ์ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริชัย ชินะดังกูร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณศรี ลีจิระจำเนียร
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บัณฑิต อินณวงศ์
3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปราโมทย์ คุ้มจิตรจากรู

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกพันธ์ แก้วมณีชัย)
...../...../.....

.....กรรมการ	 กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัศมี ชัยสุขสันต์)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณศรี ลีจิระจำเนียร)
...../...../.....	/...../.....

.....กรรมการ	 กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บัณฑิต อินณวงศ์)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปราโมทย์ คุ้มจิตรจากรู)
...../...../.....	/...../.....

47403213 : สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

คำสำคัญ : โยเกิร์ตถั่วเหลือง/อาหารเพื่อสุขภาพ/ไอโซฟลาโวนส์/เคดซิน/เจนิสทีน

ศุภภรณ์ วงศ์พิพันธ์ : การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลือง
สำหรับผู้สูงอายุ. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร.อรุณศรี ลีจิระจำเริญ , ผศ.ดร.บัณฑิต
อินดวงศ์ และ ผศ.ดร.ปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ. 100 หน้า.

เชื้อจุลินทรีย์ *Rhizopus sp.*, *Lactobacilli* และ *Bifidobacteria* สามารถเปลี่ยน
ไอโซฟลาโวนส์ชนิด Glucosides ซึ่งเป็นไอโซฟลาโวนส์ที่อยู่ในรูปที่ร่างกายดูดซึมและนำไปใช้
ประโยชน์ได้ยากให้อยู่ในรูปของไอโซฟลาโวนส์ชนิด Aglycones ซึ่งเป็นไอโซฟลาโวนส์ที่อยู่ใน
รูปที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (daidzein, genistein และ glycitein) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้
ทำการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณไอโซฟลาโวนส์ในรูป daidzein และ genistein ในนมเปรี้ยวซึ่งหมัก
ด้วยเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* กับปริมาณไอโซฟลาโวนส์ในรูป daidzein และ genistein ใน
โยเกิร์ตจากถั่วเหลืองซึ่งหมักด้วยเชื้อ 2 กลุ่ม คือ เชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus bulgaricus* และ
Streptococcus thermophilus และเชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus*
thermophilus และ *Bifidobacterium bifidum* วิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่อง HPLC การทดลองได้แบ่ง
นมเปรี้ยวที่อุณหภูมิ 25, 35 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง และหมัก
โยเกิร์ตจากถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 ชั่วโมง
พบว่า โยเกิร์ตจากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus*
thermophilus และ *Bifidobacterium bifidum* เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์ใน
รูป daidzein และ genistein สูงกว่าในโยเกิร์ตจากถั่วเหลืองที่หมักเป็นระยะเวลา 2, 6, 8, 10 และ 12
ชั่วโมง และยังมีปริมาณสูงกว่าในนมเปรี้ยว, นมถั่วเหลือง และโยเกิร์ตจากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ
ผสมระหว่าง *Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* คือ มีปริมาณ
ไอโซฟลาโวนส์ในรูป daidzein และ genistein อยู่ในช่วง 40.03 ถึง 70.38 และ 88.74 ถึง 174.09
ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ ผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลือง 1 ชิ้น
(น้ำหนักประมาณ 4 กรัม) มีค่า A_{280} เท่ากับ 0.711 และมีปริมาณไอโซฟลาโวนส์ในรูป daidzein และ
genistein เท่ากับ 4.71 และ 5.94 ไมโครกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ ผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจาก
โยเกิร์ตถั่วเหลืองสามารถเก็บได้นาน 1 เดือนเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. 2. 3.

47403213 : MAJOR : FOOD TECHNOLOGY

KEYWORD : SOY YOGHURT/FUNCTIONAL FOOD/ISOFLAVONES/DAIDZEIN/GENISTEIN

SUPAPORN VONGPIPHAN : DEVELOPMENT OF FUNCTIONAL FOOD FROM SOYBEAN YOGHURT FOR MENOPAUSE. THESIS ADVISORS : ASST.PROF. ARUNSRI LEEJEERAJUMNEAN, Ph.D., ASST.PROF. BHUNDIT INNAWONG, Ph.D. AND ASST.PROF. PRAMOTE KHUWIJITJARU, Ph.D.100 pp.

Soybean and soybean products contain high content of isoflavones or phytoestrogens which have been reported to have health beneficial effects similar to human estrogens. It has been shown that *Rhizopus sp.*, *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* can hydrolyze the glucoside isoflavones to aglycones, the bioavailability forms of isoflavones. So the aim of the research was to investigate the quantity of isoflavones (daidzein and genistein) in tempeh, soy yoghurt fermented from soy milk with yoghurt bacteria (*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*) and soy yoghurt fermented with soy yoghurt bacteria and bifidobacteria (*Bifidobacterium bifidum*). Quantification of isoflavones using HPLC was analyzed during incubation tempeh at 25, 35 and 55 °C for 24, 36 and 48 hours and during incubation soy yoghurt at 43 °C for 2, 4, 6, 8, 10 and 12 hours. The results found that the amount of daidzein and genistein in soy yoghurt fermented with yoghurt bacteria and bifidobacteria were higher than tempeh and soy yoghurt fermented with only yoghurt bacteria and. The highest concentration of daidzein and genistein (40.03-70.38 and 88.74-174.09 µg/g dry wt.) were obtained after incubation soy yoghurt at 43°C for 4 hours. A_w of the functional food products from soy yoghurt were 0.711. The amount of daidzein and genistein in functional food products from soy yoghurt were 4.71 µg and 5.94 µg per piece (weight per one piece around 4 g). The shelf life of functional food products was 30 days at 8°C

Department of Food Technology Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2007

Student's signature

Thesis Advisors' signature 1. 2. 3.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ภายใต้โครงการทุนวิจัย
มหาบัณฑิตสกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปี 2548

ขอขอบพระคุณผศ.ดร.อรุณศรี ลีจิระจำเริญ ที่ได้สละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษา ชี้แนะและ
ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ จนสำเร็จ ตลอดจนคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยี
อาหารทุกท่านที่ให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆเสมอมา

ขอขอบคุณพี่ๆเจ้าหน้าที่ภาควิชาทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกทุกอย่าง

ขอบคุณพี่อู๋ที่ช่วยดำเนินการ ติดต่อกับสถาบันอาหาร อำนวยความสะดวก และหาสถานะที่
เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วย HPLC และขอบคุณเจ้าหน้าที่สถาบันอาหารที่ช่วยอำนวยความสะดวก
ในการส่งวิเคราะห์ตัวอย่าง

ขอบคุณบอย วรรณ ทศ กอล์ฟ ฝน หงษ์ อู๊ด พี่แอน ที่ให้ความช่วยเหลือทุกๆด้าน ช่วยส่ง
เสบียง มาอยู่เป็นเพื่อนเมื่อต้องทำการทดลองตลอดทั้งวันทั้งคืนติดต่อกันหลายๆวัน และคอยให้
กำลังใจตลอดมา ขอบคุณน้องเมย์ น้องเหมียวที่สอนทำกัมมีเยลลี่อย่างละเอียดทุกขั้นตอน

ขอบคุณแม่ที่ให้ความรัก ให้ความห่วงใย คอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดเวลา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่เป็นที่สุด ที่ให้ความรักความอบอุ่น ความห่วงใยให้
การสนับสนุนทุกด้าน และเป็นแรงผลักดันทำให้ลูกมีวันนี้ รวมถึงคุณตา คุณยาย ป้า น้าๆ และ
น้องๆที่คอยห่วงใยและเป็นกำลังใจเสมอมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญรูป	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
เอกสารอ้างอิง	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
ถั่วเหลือง.....	4
ไอโซฟลาโวนส์	7
เทมเป้.....	11
การหมักถั่วเหลืองและการผลิตโยเกิร์ตจากถั่วเหลือง.....	12
ผลิตภัณฑ์กัมและเซลล์.....	17
เอกสารอ้างอิง	27
3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวนส์ในกระบวนการหมักเทมเป้	35
บทคัดย่อ.....	35
บทนำ.....	35
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	37
อุปกรณ์และวิธีการ	37
ผลและวิจารณ์ผล.....	39
สรุป.....	43
เอกสารอ้างอิง.....	43
4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวนส์ในกระบวนการหมักโยเกิร์ต	
จากถั่วเหลือง.....	49

	บทคัดย่อ	49
	บทนำ.....	50
	วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	50
	อุปกรณ์และวิธีการ.....	50
	ผลและวิจารณ์ผล.....	51
	สรุป	61
	เอกสารอ้างอิง.....	62
5	การผลิตผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลืองและการหา	
	อายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลือง.....	64
	บทคัดย่อ	64
	บทนำ.....	64
	วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	65
	อุปกรณ์และวิธีการ.....	65
	ผลและวิจารณ์ผล.....	68
	เอกสารอ้างอิง.....	75
	ข้อเสนอแนะ	76
	ภาคผนวก	77
	ภาคผนวก ก แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส.....	78
	ภาคผนวก ข การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี	80
	ภาคผนวก ค การวิเคราะห์คุณสมบัติทางจุลินทรีย์.....	83
	ภาคผนวก ง การวิเคราะห์การวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนส์	
	ด้วยเครื่อง HPLC.....	86
	ภาคผนวก จ กราฟมาตรฐานและโครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์	
	ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ด้วยเครื่อง HPLC.....	92
	ประวัติผู้วิจัย	99

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติของเจลลาติน Type A และ Type B	19
2	ความเข้มข้นของกรดต่างชนิดที่มี pH เท่ากัน.....	21
3	ปริมาณส่วนผสมและการควบคุมกระบวนการผลิตกัมและเยลลี่จากสาร ที่ทำให้เกิดเจลต่างชนิดกัน	23
4	ปริมาณ daidzein และ genistein ในถั่วเหลืองดิบและในเทมเป้ โดยใช้วิธีสกัด 4 วิธี.....	40
5	ปริมาณ daidzein และ genistein ในถั่วเหลืองดิบและในเทมเป้	41
6	ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein ในถั่วเหลืองดิบ นํ้านมถั่วเหลืองและ โยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ <i>Streptococcus thermophilus</i> และ <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	53
7	ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด genistein ในถั่วเหลืองดิบ นํ้านมถั่วเหลืองและ โยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ <i>Streptococcus thermophilus</i> และ <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	54
8	ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein ในถั่วเหลืองดิบ นํ้านมถั่วเหลือง และ โยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> และเชื้อ <i>Bifidobacterium bifidum</i>	58
9	ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด genistein ในถั่วเหลืองดิบ นํ้านมถั่วเหลือง และ โยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> และเชื้อ <i>Bifidobacterium bifidum</i>	59
10	ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยผู้บริโภคที่ไม่ผ่านการฝึกฝนโดยใช้วิธี ratio profile.....	69
11	ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษา	73

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างของเมล็ดถั่วเหลือง.....	4
2	โครงสร้างของโอลิโกแซคคาไรด์(oligosaccharides) ที่พบในถั่วเหลือง.....	6
3	ผลของ genistein จากการบริโภคผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองในปริมาณสูง เพียงพอสู่สุขภาพ.....	7
4	โครงสร้างของไอโซฟลาโวนส์ชนิด Aglycones.....	8
5	โครงสร้างของไอโซฟลาโวนส์ชนิด Glucosides.....	8
6	โครงสร้างของ genistein, daidzein และการเปลี่ยน โครงสร้างของ 6"-O- Malonyldaidzin	10
7	โครงสร้างทางเคมีของ malonyl-, acetyl- และไอโซเมอร์ของ β -glucoside isoflavone และการเปลี่ยนโครงสร้างไปเป็น aglycone isoflavones เนื่องจากเป็นผลจากกิจกรรมของ β -glucosidase ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียในระหว่างการหมักนํ้านมถั่วเหลือง.....	10
8	ผลของการให้ความร้อนต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการเสีรูปร่าง ของไอโซฟลาโวนส์ 4 ชนิด	11
9	ขั้นตอนในกระบวนการผลิตกัม เกล็ดและพาสติลล์	22
10	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างและปริมาณกรดแลคติกใน ระหว่างกระบวนการหมักโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองด้วยเชื้อ <i>Streptococcus thermophilus</i> และ <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	52
11	ปริมาณเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการหมักโยเกิร์ต จากนมถั่วเหลืองด้วยเชื้อ <i>Streptococcus thermophilus</i> และ <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	52
12	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างและปริมาณกรดแลคติกในระหว่าง กระบวนการหมักโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองด้วยเชื้อ <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> และเชื้อ <i>Bifidobacterium bifidum</i>	56

13	ปริมาณเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการหมัก โยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองด้วยเชื้อ <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> และเชื้อ <i>Bifidobacterium bifidum</i> 56	56
14	วิธีการทำกัมมี่เยลลี่ 66	66
15	ผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลือง 68	68
16	กราฟไทม์แมมมแสดงลักษณะของผลิตภัณฑ์ตัวอย่างและผลิตภัณฑ์ ในอุดมคติ 69	69
17	การเปลี่ยนแปลงค่า A_w ของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ต ถั่วเหลือง 71	71
18	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของผลิตภัณฑ์อาหาร เพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลือง 72	72
19	ลักษณะของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลืองเมื่อเก็บ ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 วัน 74	74
20	ลักษณะของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลืองเมื่อเก็บ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน 74	74
21	กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein 94	94
22	กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ไอโซฟลาโวนส์ชนิด genistein 93	93
23	โครมาโทแกรมของไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 94	94
24	โครมาโทแกรมของไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ที่ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 95	95
25	โครมาโทแกรมของไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 96	96
26	โครมาโทแกรมของไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ในตัวอย่างโยเกิร์ตที่หมักด้วยเชื้อ <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> 97	97
27	โครมาโทแกรมของไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ในตัวอย่างโยเกิร์ตที่หมักด้วยเชื้อ <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> และเชื้อ <i>Bifidobacterium bifidum</i> เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง 98	98

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันตลาดอาหารเพื่อสุขภาพมีแนวโน้มสูงมากไม่ว่าจะเป็นตลาดต่างประเทศและในประเทศ เนื่องจากผู้บริโภคเอาใจใส่สุขภาพมากขึ้น ในประเทศไทยมีการขยายตัวค่อนข้างสูง มีการพัฒนารูปแบบและรสชาติแปลกใหม่อยู่เสมอ อาหารเพื่อสุขภาพส่วนใหญ่จะเน้นเพื่อเด็ก ผู้สูงอายุ และวัยรุ่น มีน้อยชนิดที่มุ่งเน้นสำหรับผู้หญิงวัยทอง

ผู้หญิงวัยทองจะมีการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมน โดยเฉพาะเอสโตรเจน ซึ่งส่งผลกระทบต่อความแข็งแรงของกระดูก สุขภาพของหลอดเลือดหัวใจ และมักเกิดอาการร้อนวูบวาบ ซึ่งเป็นอาการที่พบบ่อยในผู้หญิงวัยนี้ แพทย์จึงต้องบำบัดโดยวิธีให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนทดแทน งานวิจัยนี้จึงต้องการที่จะพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากถั่วเหลืองสำหรับผู้หญิงวัยทอง เพื่อเพิ่มปริมาณไอโซฟลาโวนส์ในอาหารขบเคี้ยวแทนการบำบัดด้วยฮอร์โมน

ถั่วเหลืองเป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางอาหารสูง ไม่มีโคเลสเตอรอล มีกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วน พบว่าถั่วเหลืองมีสาร phytochemicals หลายชนิดที่ช่วยป้องกันและรักษาโรค เช่น เลซิธิน (lecithin) ช่วยเสริมสร้างประสาท บำรุงสมอง ไรฟอ ซาโปนิน (saponins) ช่วยควบคุมปริมาณโคเลสเตอรอล Food and Drug Administration (FDA) ยืนยันว่าการบริโภคถั่วเหลืองอาจช่วยลดความเสี่ยงสำหรับโรคหลอดเลือดหัวใจ (Wang และคณะ, 2002) นอกจากนี้ ถั่วเหลืองยังมีสารสำคัญ คือ ไอโซฟลาโวนส์ ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิก (คัคนางค์, 2542) ที่จัดเป็น phytoestrogens ชนิดหนึ่ง มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนในร่างกายมนุษย์ (Beck และคณะ, 2003; Bronus, 2002) โดยไอโซฟลาโวนส์จะออกฤทธิ์จำเพาะเจาะจงกับเนื้อเยื่อ จึงจัดว่า ไอโซฟลาโวนส์เป็น selective estrogen receptor modulators (SERMs) ซึ่ง SERMs แตกต่างจากเอสโตรเจนตรงที่มีความจำเพาะเจาะจง ออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนในบางเนื้อเยื่อ แต่ไม่ออกฤทธิ์หรืออาจออกฤทธิ์ต้านเอสโตรเจนในเนื้อเยื่ออื่นๆ พบว่าเอสโตรเจนจะเพิ่มจำนวนเซลล์มดลูกซึ่งส่งผลเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งมดลูก และยังเพิ่มระดับไขมันชนิดไตรกลีเซอไรด์ แต่ ไอโซฟลาโวนส์ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์มดลูก และไม่มีผลหรืออาจลดระดับไตรกลีเซอไรด์เล็กน้อย (Messina และคณะ, 2004)

จากประโยชน์และคุณสมบัติของไอโซฟลาโวนส์ข้างต้นผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดที่จะพัฒนาอาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลืองสำหรับผู้หญิงวัยทอง ซึ่งผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลืองนี้จะใช้เชื้อ *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* และเชื้อ *Bifidobacterium bifidum* ในการหมักโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองเพื่อเปลี่ยนไอโซฟลาโวนส์ให้อยู่ในรูปแบบที่ใช้ประโยชน์ได้ (bioactive compounds)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาความคงตัวและปริมาณไอโซฟลาโวนส์ในถั่วเหลืองที่ใช้เป็นวัตถุดิบ, เทมเป้, น้ามนถั่วเหลือง, โยเกิร์ตจากถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากถั่วเหลือง
- 1.2.2 ผลิตอาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลือง
- 1.2.3 ศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลือง

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.3.1 เป็นข้อมูลเชิงลึกที่ได้จากการวิจัยในแง่ปริมาณของสารไอโซฟลาโวนส์ที่พบในถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง โดยทำการศึกษาปริมาณของสารไอโซฟลาโวนส์ ตั้งแต่วัตถุดิบ และถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการหมักในช่วงเวลาต่างๆกัน โดยเฉพาะในแง่ bioactive compounds ต่างๆของไอโซฟลาโวนส์ ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ซึ่งจะนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากถั่วเหลืองชนิดอื่นๆต่อไปได้
- 1.3.2 ได้ผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากถั่วเหลืองสำหรับผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน เป็นการเพิ่มราคาผลผลิตทางการเกษตร
- 1.3.3 องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้พัฒนาการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพโดยผสมกับผลไม้ที่มีราคาต่ำในช่วงฤดูที่ผลไม้ล้นตลาด ได้ผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค ซึ่งจะทำให้เกิดมูลค่าเพิ่มและศักยภาพในการส่งออก สำหรับภาคเอกชนและอุตสาหกรรม และเป็นการส่งเสริมเศรษฐกิจในภาพรวมของประเทศ

เอกสารอ้างอิง

- คัตนangk์ ทองสุก. “ถั่วเหลืองอาหารสุขภาพ.” อาหาร, 3(2542): 212-213.
- Beck, V., Unterrieder, E., Krenn, L., Kubelka, W., and Jungbauer, A. “Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy.” Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 84(2003): 259-268.
- Bronus, F. “Soya isoflavones: a new promising ingredient for the health food sector.” Journal of Food Research International, 35(2002): 187-193.
- Messina, M., Ho, S., and Alekel, D.L. “Skeletal benefits of soy isoflavones: a review of the clinical trial and epidemiologic data.” Current Opinion Clinical Nutrition Metabolism Care 7, 6(2004): 649-658.
- Wang, Y.C., Yu, R.C., and Chou, C.C. “Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drink.” Food Microbiology, 19(2002): 501-508.

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

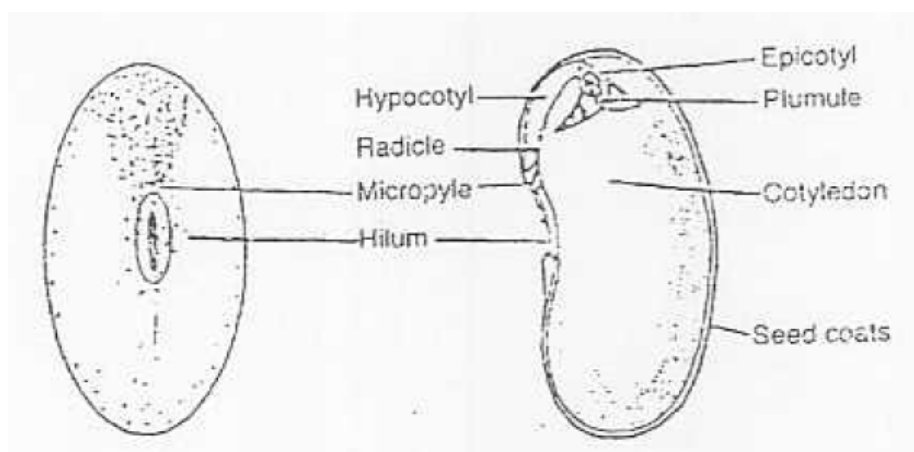
2.1 ถั่วเหลือง

2.1.1 ลักษณะทางวิทยาศาสตร์และแหล่งปลูก

ถั่วเหลืองมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max.*(L.) Merrill มีถิ่นกำเนิดในแถบภูมิภาคเอเชียตอนใต้ ต่อมาได้แพร่กระจายไปยังทวีปต่างๆ ซึ่งในปัจจุบันประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นผู้ผลิตถั่วเหลืองรายใหญ่ที่สุดของโลก สำหรับในประเทศไทย มีการปลูกถั่วเหลืองในภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง และแพร่ ภาคกลางตอนเหนือ ได้แก่ จังหวัดเลย และนครราชสีมา (คมสัน และวาริ, 2542)

2.1.2 ส่วนประกอบและคุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลือง

เมล็ดถั่วเหลืองประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน คือ เปลือกหุ้มเมล็ด(seed coat) เอ็มบริโอ (embryo) และส่วนที่เก็บสะสมอาหาร โดยที่เอ็มบริโอจะประกอบด้วย cotyledon 2 ส่วน ที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมอาหาร(Lui, 1997) โครงสร้างของเมล็ดถั่วเหลืองแสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างของเมล็ดถั่วเหลือง

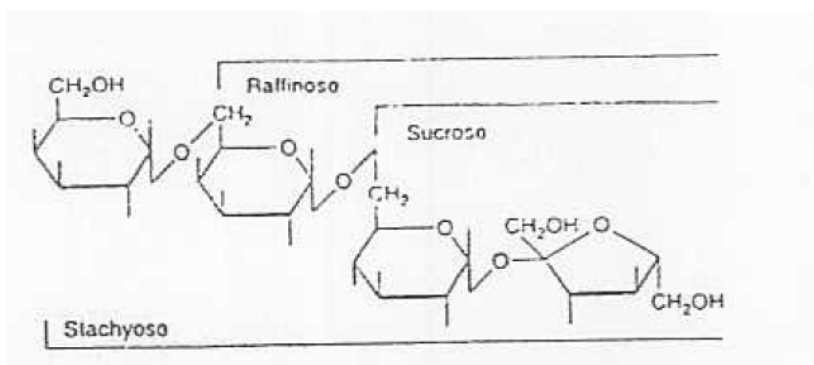
ที่มา: Lui(1997)

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีคุณค่าทางอาหารสูง โดยเฉพาะโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบราคาของโปรตีนที่ได้จากถั่วเหลืองกับโปรตีนที่ได้จากสัตว์ จะพบว่าโปรตีนจากถั่วเหลืองมีราคาถูกกว่าหลายเท่า องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลืองมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่ปลูก โดยมีความชื้นร้อยละ 6-10 โปรตีนร้อยละ 37-45 และไขมันร้อยละ 19-22 พบว่าถั่วเหลืองพันธุ์พื้นเมืองมีปริมาณโปรตีนมากกว่าถั่วเหลืองสายพันธุ์ผสมร้อยละ 49.5 แต่มีไขมันต่ำกว่าร้อยละ 5.4(วิเชียร, 2534)

โปรตีนจากถั่วเหลืองมีปริมาณของ lysine สูง แต่มี methionine และ cysteine ก่อนข้างต่ำ พบว่าโปรตีนในถั่วเหลืองมีปริมาณสูงเป็น 2 เท่าของปริมาณโปรตีนที่ได้จากเนื้อสัตว์ มีปริมาณเป็น 3-4 เท่าของโปรตีนที่ได้จากไข่หรือแป้งสาลี และมีปริมาณเป็น 5-6 เท่าของขนมปัง(วิเชียร, 2534) จึงกล่าวได้ว่าโปรตีนจากถั่วเหลืองเป็นโปรตีนที่มีราคาถูก แม้ว่าปริมาณโปรตีนจะน้อยกว่าน้ำมันวัว และงา แต่เมื่อเสริม methionine ลงไปจะทำให้โปรตีนจากถั่วเหลืองมีความสมบูรณ์มากขึ้น(สมชาย, 2532) จึงเหมาะสำหรับผู้บริโภคกลุ่มมังสวิรัตและผู้ที่มีอาการแพ้เนื้อโค

ไขมันในถั่วเหลืองมีปริมาณร้อยละ 19-22 ซึ่งส่วนใหญ่จะประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว คือ linoleic acid ปริมาณร้อยละ 45-62 linolenic acid ปริมาณร้อยละ 43-56 และ oleic acid ปริมาณร้อยละ 15-33(Smith และ Circle, 1978) และยังประกอบด้วย lecithin ซึ่งเป็นไขมันที่มีบทบาทสำคัญต่อเซลล์สมองและเซลล์ประสาท ที่สำคัญคือ ในถั่วเหลืองไม่มีโคเลสเตอรอล (ถักนางค์, 2542)

ถั่วเหลืองมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 35 แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้(Soluble carbohydrate) ประกอบด้วย disaccharide และ oligosaccharide ได้แก่ sucrose ร้อยละ 2.5-8.2, raffinose ร้อยละ 0.1-0.9 และ stachyose ร้อยละ 1.4-4.1 ดังแสดงในรูปที่ 2 ซึ่งร่างกายของมนุษย์ไม่มีเอนไซม์ที่ใช้ย่อย raffinose และ stachyose จึงทำให้น้ำตาลดังกล่าวตกค้างและถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ ผลิตก๊าซไฮโดรเจน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซมีเทนออกมา ส่งผลให้ผู้บริโภครู้สึกอึดอัด(Garcia และคณะ, 1997) ส่วนคาร์โบไฮเดรตชนิดที่ไม่ละลายน้ำ(Insoluble carbohydrate) ประกอบด้วย cellulose, hemicellulose, pectin และ starch ปริมาณเล็กน้อย องค์ประกอบส่วนใหญ่เรียกว่าใยอาหาร (Dietary fiber) ซึ่งช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ ช่วยควบคุมระดับน้ำตาลและโคเลสเตอรอลในเลือด(Saio, 1994)



รูปที่ 2 โครงสร้างของโอลิโกแซคคาไรด์(oligosaccharides) ที่พบในถั่วเหลือง

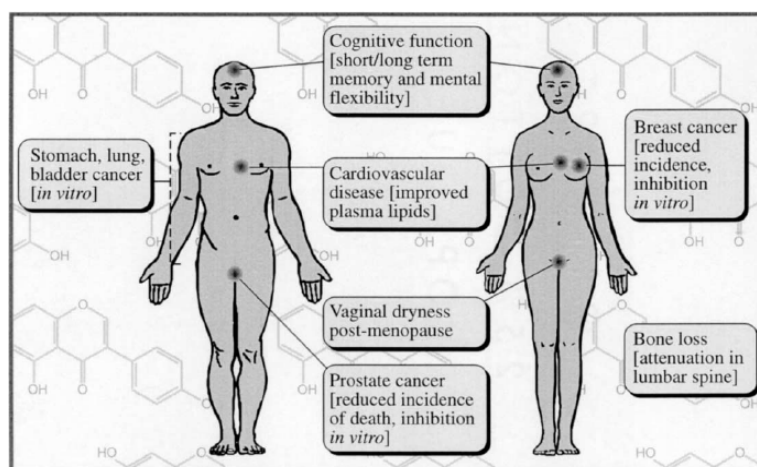
ที่มา: Lui (1997)

ในถั่วเหลืองประกอบด้วยวิตามินและเกลือแร่หลายชนิด ได้แก่ วิตามินเอ วิตามินดี วิตามินอี วิตามินเค และยังมีวิตามินบีในปริมาณสูง แต่เมื่อนำถั่วเหลืองไปผ่านความร้อนสูงจะส่งผลให้ปริมาณวิตามินลดลงครั้งหนึ่ง ส่วนเกลือแร่ที่สำคัญ ได้แก่ โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม และฟอสฟอรัส สารประกอบในถั่วเหลืองที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ คือ phytin ซึ่งเป็นแหล่งที่มีฟอสฟอรัสมากที่สุด

นอกจากนี้ยังพบว่า ในถั่วเหลืองมีสาร phytochemical ที่สำคัญคือ ไอโซฟลาโวนส์ ซึ่งมีรายงานว่าช่วยป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคกระดูกพรุน ทั้งยังมีโครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศหญิง จึงมีการศึกษาคุณสมบัติของ ไอโซฟลาโวนส์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการบำบัดสำหรับผู้หญิงวัยทอง ปัจจุบันมีการสกัด ไอโซฟลาโวนส์ ออกมาจำหน่ายในรูปยาเม็ด และผลิตเพื่อเป็นส่วนประกอบในอาหารต่างๆ เช่น ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ ผลิตภัณฑ์นม เครื่องดื่ม และผลิตภัณฑ์เนื้อเทียม เป็นต้น รูปแบบการบริโภค ถั่วเหลืองในปัจจุบัน มีการบริโภคสดในรูปผักถั่วเหลืองต้ม น้านมถั่วเหลือง เต้าหู้ เต้าสอย เต้าเจี้ยว ซีอิ๊ว เตมเป้ โยเกิร์ต และยังมีการผลิตเป็นแป้งถั่วเหลืองเพื่อใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารโปรตีนสูง เช่น โปรตีนเกษตร และขนมขบเคี้ยว(คักนางค์, 2542)

2.2 ไอโซฟลาโวนส์

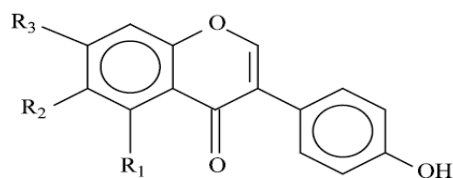
ไอโซฟลาโวนส์ เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่ทำให้เกิดรสขมในถั่วเหลือง(คัลนังก์, 2542) จัดเป็น phytoestrogens ชนิดหนึ่ง มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนในร่างกายมนุษย์ (Beck และคณะ, 2003; Bronus, 2002) มีงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าไอโซฟลาโวนส์มีผลต่ออาการต่างๆที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนในผู้หญิงวัยทอง เช่น ช่วยป้องกันการสูญเสียมวลกระดูก (Alekel และคณะ, 2000; Anderson และ Carner, 1997; Potter และคณะ, 1998) ช่วยลดอาการร้อนวูบวาบ (Albertazzi และคณะ, 1998; Mukies และคณะ, 1995) ลดอาการช่องคลอดแห้ง (Brzezinski และคณะ, 1997) ผลของ genistein จากการบริโภคผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองในปริมาณสูงเพียงพอต่อสุขภาพ แสดงในรูปที่ 3 จึงมีผู้สนใจที่จะนำไอโซฟลาโวนส์มาใช้ทดแทนฮอร์โมนในผู้หญิงวัยทอง (Cassidy และคณะ, 1994) ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ที่แนะนำต่อวันคือ 60-100 มิลลิกรัมต่อวัน (Markiewicz และคณะ, 1993)



รูปที่ 3 ผลของ genistein จากการบริโภคผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองในปริมาณสูงเพียงพอต่อสุขภาพ ที่มา: Richard และ Daneel(2002)

ไอโซฟลาโวนส์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม 12 ชนิด คือ กลุ่มของ Aglycones ซึ่งเป็นกลุ่มที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ได้แก่ daidzein, genistein และ glycitein โครงสร้างของ Aglycones แสดงดังรูปที่ 4, กลุ่มของ Glucosides ซึ่งเป็นไอโซฟลาโวนส์ที่เชื่อมอยู่กับโมเลกุลของน้ำตาล ได้แก่ daidzin, genistin และ glycitin, กลุ่มของ 6''-O-acetyl glucosides ได้แก่ 6''-O-acetyl-daidzin, 6''-O-acetyl-genistin และ 6''-O-acetyl-glycitin, กลุ่มของ 6''-O-malonyl glucosides

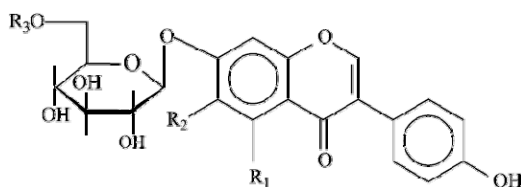
ได้แก่ 6''-O-malonyl-daidzin, 6''-O-malonyl-genistin และ 6''-O-malonyl-glycitin โครงสร้างของ Glucosides แสดงดังรูปที่ 5



Compound	R ₁	R ₂	R ₃	M / g/mol
Daidzein	H	H	OH	254
Genistein	OH	H	OH	270
Glycitein	H	OCH ₃	OH	284

รูปที่ 4 โครงสร้างของไอโซฟลาโวนส์ชนิด Aglycones

ที่มา: Nurmi และคณะ(2002)

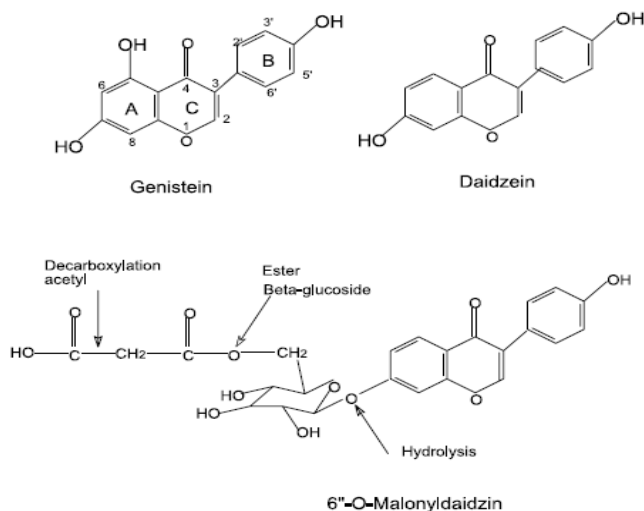


Compound	R ₁	R ₂	R ₃	M / g/mol
Daidzin	H	H	OH	416
Malonyldaidzin	H	H	COCH ₂ COOH	502
Acetyldaidzin	H	H	COCH ₃	458
Genistin	OH	H	OH	432
Malonylgenistin	OH	H	COCH ₂ COOH	518
Acetylgenistin	OH	H	COCH ₃	474
Glycitin	H	OCH ₃	H	446
Malonylglycitin	H	OCH ₃	COCH ₂ COOH	532
Acetylglycitin	H	OCH ₃	COCH ₃	488

รูปที่ 5 โครงสร้างของไอโซฟลาโวนส์ชนิด Glucosides

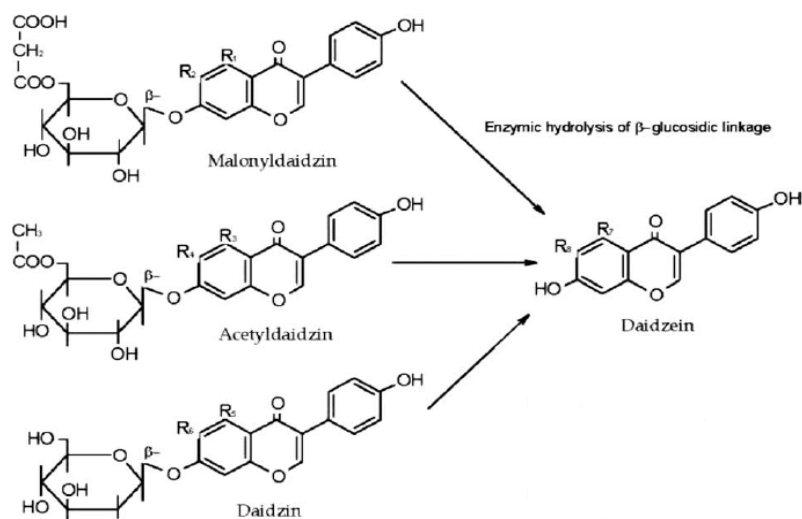
ที่มา: Nurmi และคณะ(2002)

ไอโซฟลาโวนส์ในถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก เช่น soy protein, soy milk จะอยู่ในรูปของ Glucosides เป็นส่วนใหญ่ (Naim และคณะ, 1974) ส่วนในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก เช่น miso, tempeh จะประกอบด้วย Aglycones เป็นส่วนใหญ่ (Coward และคณะ, 1993) หลังจากรับประทานไอโซฟลาโวนส์เข้าไป ไอโซฟลาโวนส์ชนิด Glucosides จะผ่านการย่อยในลำไส้เล็กและปลดปล่อย Aglycones (Bowey และคณะ, 2003) ซึ่งเป็นไอโซฟลาโวนส์ที่อยู่ในรูปที่นำไปใช้ประโยชน์ได้ (Izumi และคณะ, 2000) มีรายงานว่าน้ำลายของมนุษย์สามารถเปลี่ยน Glucosides ไปอยู่ในรูปของ Aglycones (Allred และคณะ, 2001) ซึ่งทำให้ Aglycones ส่วนหนึ่งสามารถดูดซึมได้ในกระเพาะอาหาร ก่อนที่ส่วนใหญ่จะถูกดูดซึมในลำไส้เล็ก (Piskula และคณะ, 1999) ส่วนไอโซฟลาโวนส์ชนิด Glucosides นั้นจะดูดซึมได้ยากเพราะมีน้ำหนักและมีความชอบน้ำมากกว่า (Chang และ Nair, 1995) ไอโซฟลาโวนส์ชนิด Glucosides สามารถเปลี่ยนเป็น ไอโซฟลาโวนส์ชนิด Aglycones ได้ด้วยเอนไซม์ β -glucosidase (Toda และคณะ, 2001) ที่ผลิตจากแบคทีเรียในลำไส้มนุษย์ ซึ่งการเปลี่ยนรูปไอโซฟลาโวนส์ให้อยู่ในรูปที่ร่างกายสามารถใช้ประโยชน์ได้ขึ้นอยู่กับความสามารถของแบคทีเรียในลำไส้ของแต่ละคน (Xu และคณะ, 1995) จึงมีงานวิจัยที่ศึกษาการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการหมักอาหารที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบเพื่อเปลี่ยน ไอโซฟลาโวนส์ให้อยู่ในรูปที่ร่างกายสามารถใช้ประโยชน์ได้ และพบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ β -glucosidase ซึ่งเปลี่ยนไอโซฟลาโวนส์ชนิด Glucosides ให้อยู่ในรูปของ Aglycones ได้ เช่น *Lactobacilli* (Choi และคณะ, 1999; Matsuda และคณะ, 1994), *Bifidobacteria* (Jeon และคณะ, 2002; Winter และคณะ, 1989) และ *Rhizopus sp.* (Klus และ Barz, 1995) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไอโซฟลาโวนส์แสดงดังรูปที่ 6 และ 7



รูปที่ 6 โครงสร้างของ genistein, daidzein และการเปลี่ยนโครงสร้างของ 6''-O-malonyldaidzin

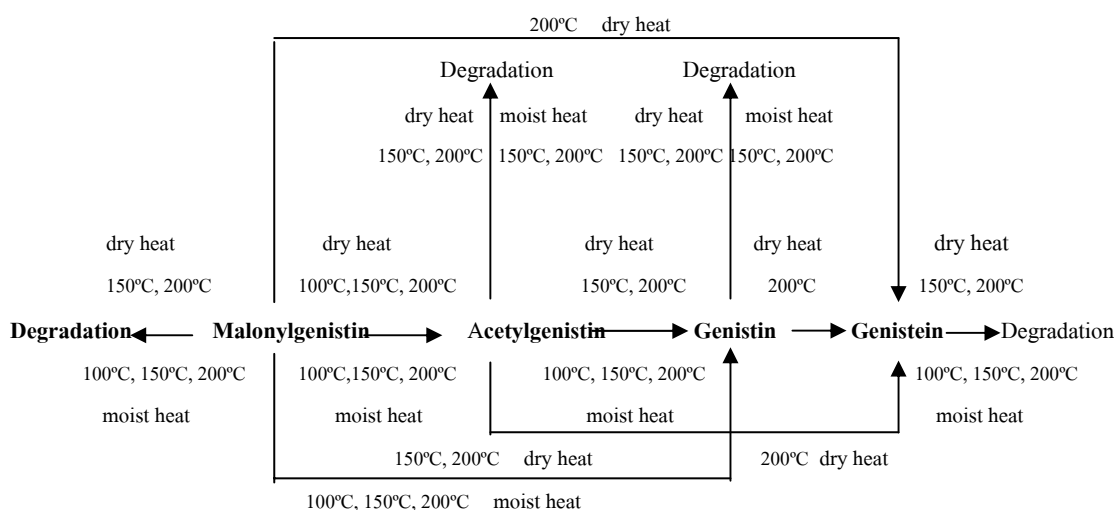
ที่มา: Pyo และคณะ(2005)



รูปที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของ malonyl-, acetyl- และไอโซเมอร์ของ β -glucoside isoflavone และการเปลี่ยนโครงสร้างไปเป็น aglycone isoflavones เนื่องจากเป็นผลจากกิจกรรมของ β -glucosidase ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียในระหว่างการหมักน้ำนมถั่วเหลือง

ที่มา: Tsangalis และคณะ(2004)

ไอโซฟลาโวนส์สามารถเปลี่ยนโครงสร้างหรือถูกทำลายได้โดยการให้ความร้อนดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 ผลของการให้ความร้อนต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการเสีรูปของไอโซฟลาโวนส์ 4 ชนิด

ที่มา: Chien และคณะ(2005)

2.3 เทมเป้

เทมเป้เป็นอาหารหมักพื้นบ้านที่นิยมมากของอินโดนีเซีย เตรียมได้จากการหมักวัตถุดิบจำพวกเมล็ดธัญพืชด้วยเชื้อราสกุล *Rhizopus sp.* พบว่า *R. fermosaesis* และ *R. oligosporus* เหมาะสมสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์ในการทำเทมเป้มากที่สุด วัตถุดิบที่นิยมใช้ในการหมักเทมเป้ คือ ถั่วเหลือง ซึ่งการหมักจะสิ้นสุดลงเมื่อเชื้อราสร้างเส้นใยสีขาวปกคลุมวัตถุดิบอย่างหนาแน่นจนรวมตัวเป็นก้อน การหมักเทมเป้เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรตและสารประกอบซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมี โดยเชื้อราจะผลิตเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ซึ่งทำให้ได้สารที่มีโมเลกุลเล็กลงหลายชนิด เช่น กรดอะมิโน กรดไขมัน น้ำตาลกลูโคส เป็นต้น กระบวนการหมักเทมเป้จะเพิ่มปริมาณของไอโซฟลาโวนส์ชนิด Aglycones คือ daidzein และ genistein โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ β -glucosidase (Coward และคณะ, 1993; Wang และ Murphy, 1994a, 1996; Kaufman และคณะ, 1997; Murphy และคณะ, 1999)

Hutchins และคณะ (1995) และ Slavin และคณะ (1998) รายงานว่าการหมักถั่วเหลืองสุกด้วยเชื้อ *Rhizopus oligosporus* จะเพิ่มปริมาณไอโซฟลาโวนส์ที่ร่างกายสามารถใช้ประโยชน์ได้ Murakami และคณะ (1984) ได้ศึกษาเปรียบเทียบชนิดของไอโซฟลาโวนส์ในอาหารจากถั่วเหลือง

กับเทมเป้ที่หมักด้วยเชื้อ *Rhizopus oligosporus* เป็นเวลา 40 ชั่วโมง พบว่าในเทมเป้มีเฉพาะ ไอโซฟลาโวนส์ชนิด Aglycones เท่านั้นและไม่พบไอโซฟลาโวนส์ชนิด Glucosides

2.4 การหมักนมถั่วเหลืองและการผลิตโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลือง

โยเกิร์ต เป็นผลิตภัณฑ์ที่หมักจากจุลินทรีย์ที่พบในระบบทางเดินอาหาร เช่น *Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* เป็นต้น จุลินทรีย์เหล่านี้จะทำการย่อยน้ำตาล monosaccharide ให้เป็นกรดแลคติก ทำให้โปรตีนตกตะกอนมีลักษณะเป็นลิ่มค่อนข้างนุ่ม มีลักษณะเนื้อสัมผัสแข็งกึ่งเหลว มีกลิ่นและรสชาติเฉพาะตัว และมีจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ในปริมาณสูง จากการที่จุลินทรีย์แลคติกยังสามารถมีชีวิตอยู่ได้หลังการหมักและทำหน้าที่ได้ในสภาวะที่เหมาะสม จึงมีคุณสมบัติในการส่งเสริมสุขภาพ โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ซึ่งกรดแลคติกที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ มีผลในการลดและทำลายแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค การผลิตโยเกิร์ตจากถั่วเหลืองเป็นการเพิ่มทางเลือกในการบริโภคและการใช้ประโยชน์จากถั่วเหลือง และเป็นประโยชน์สำหรับบุคคลที่มีอาการแพ้นมและกลุ่มมังสวิรัต เนื่องจากร่างกายของมนุษย์ไม่สามารถย่อยสาร oligosaccharide จำพวก raffinose, stachyose และ arabinose ที่มีอยู่ในถั่วเหลืองได้ จึงได้มีการค้นคว้าหาวิธีการย่อยสารเหล่านี้ในถั่วเหลือง พบว่าจุลินทรีย์พวกที่สามารถสร้างกรดแลคติก มีเอนไซม์ galactosidase ที่สามารถย่อยสาร oligosaccharide ได้ อย่างไรก็ตาม การหมักนมถั่วเหลืองเป็นผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตได้เริ่มต้นมาตั้งแต่ปี 1934 แต่ยังไม่เป็นที่แพร่หลายเท่าที่ควร เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลืองแตกต่างจากองค์ประกอบทางเคมีของนม ทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัส รวมถึงกลิ่นรสของโยเกิร์ตถั่วเหลืองแตกต่างจากโยเกิร์ตจากนมวัว (Lui, 1997) จึงมีงานวิจัยที่ทำการศึกษาร่วมประกอบและวิธีการผลิตโยเกิร์ตจากถั่วเหลืองเพื่อให้ได้โยเกิร์ตที่มีลักษณะใกล้เคียงกับโยเกิร์ตจากนมโค นอกจากนี้ ถั่วเหลืองยังมีกลิ่นเฉพาะตัวที่เรียกว่ากลิ่นถั่ว ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ lipoxygenase ที่มีอยู่ในถั่วเหลือง ทำให้ผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองไม่เป็นที่ยอมรับและไม่เป็นที่นิยมของผู้บริโภคบางกลุ่ม ได้มีการศึกษาหาทางลดกลิ่นถั่ว คือ การให้ความร้อนต่อเมล็ดถั่วเหลืองก่อนหรือระหว่างกระบวนการแปรรูป เพื่อระงับการทำงานของเอนไซม์ lipoxygenase การสกัดเอาไขมันออก เพื่อป้องกันกลิ่นเหม็นเขียว รวมถึงการใช้กระบวนการหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกที่เหมาะสม ซึ่งวิธีหลังนี้ได้ประสบผลสำเร็จมาแล้ว ในการใช้เชื้อรา เช่น *Rhizopus oligosporus*, *Neurospora sitophila* และ *Aspergillus oryzae* ตลอดจนเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus natto* (Kanda และคณะ, 1976)

2.4.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักโยเกิร์ต

เชื้อโยเกิร์ตโดยทั่วไปประกอบด้วย *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* ลักษณะของเชื้อ *Streptococcus thermophilus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นรูปโซ่ ส่วนเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เชลล์มีลักษณะเป็นท่อน อาจอยู่เป็นเชลล์เดี่ยวหรือคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ เจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส (วรารุณี และรุ่งนภา, 2532)

การเจริญของเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* ในระหว่างการหมักโยเกิร์ตเป็นแบบพึ่งพาอาศัยกัน(symbiosis) คือ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเชื้อ *Streptococcus thermophilus* จะเจริญได้ดีและสร้าง diacetyl และสารประกอบคล้ายกันซึ่งทำให้โยเกิร์ตมีกลิ่นรสที่ดี นอกจากนี้ *Streptococcus thermophilus* ยังช่วยกำจัดออกซิเจนจากนม ซึ่งหากมีออกซิเจนเหลืออยู่อาจก่อให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ การเจริญของเชื้อ *Streptococcus thermophilus* จะดำเนินต่อไปจนกระทั่งมีค่าความเป็นกรดต่างประมาณ 5.5 ซึ่งจะมีสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* คือ 45 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* เจริญและมีปริมาณกรดแลคติกมากพอ จะสร้าง acetaldehyde ซึ่งให้กลิ่นรสเฉพาะของโยเกิร์ต เชื้อ *Streptococcus thermophilus* ก็สามารถสร้างสารให้กลิ่นรสพวก acetaldehyde ได้แต่มีปริมาณน้อยกว่า acetaldehyde ที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* (วรารุณี และรุ่งนภา, 2532)

เรณู(2523) ได้ศึกษาการพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตจากนํ้านมถั่วเหลืองโดยเปรียบเทียบทางด้านรสชาติ แบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ใช้นํ้านมถั่วเหลืองหมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* กลุ่มที่ 2 ใช้นํ้านมถั่วเหลืองหมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus* ร่วมกับ *Lactobacillus bulgaricus* กลุ่มที่ 3 ใช้นํ้านมถั่วเหลืองหมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus* เพียงอย่างเดียว และกลุ่มที่ 4 ใช้นํ้านมถั่วเหลืองที่ทำให้เป็นกรดโดยการเติมกรดแลคติกลงไปโดยไม่เติมเชื้อจุลินทรีย์ ผลการศึกษาพบว่า การหมักนมถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* เพียงชนิดเดียวทำให้ได้กรดเพียงพอ ให้รสชาติเป็นที่ยอมรับมากที่สุด และถ้าใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการหมักคนละชนิดกัน คือ *Streptococcus thermophilus* หรือ *Lactobacillus bulgaricus* จะให้ผลที่แตกต่างกัน แสดงว่าคุณสมบัติทางด้านกิจกรรมชีวเคมี (Biochemical activities) ของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกัน ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกจึงต่างกัน

Kellogg(1934) เป็นผู้ริเริ่มใช้แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกในการหมักนมถั่วเหลืองเพื่อทำ butter-like products โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ต่อมา Gehrke และ Weiser(1947) พบว่า

นมถั่วเหลืองจัดเป็นอาหารที่ดีของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก แต่ปริมาณกรดแลคติกที่ได้จะน้อยกว่าการใช้นมโค นอกจากนี้เชื้อ *Streptococcus citrovorus* (Leu. *Cremoris*), *Streptococcus paracitrovorus* (Leu. *Dextranicum*) และ *Streptococcus lactis* สามารถสร้างกรดแลคติกได้เพียงครึ่งหนึ่งของนมโค เชื้อจะย่อยสลาย oligosaccharide ในน้ำนมถั่วเหลืองเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกโดยใช้เวลาหมักนานกว่า 10 ชั่วโมง เพื่อลดระดับความเป็นกรดต่างของน้ำนมถั่วเหลืองลงจาก 6.5 เป็น 4.7 และ 4.3 สำหรับเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* ตามลำดับ (เรณู, 2523) อย่างไรก็ตาม การเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของนมถั่วเหลืองและเพิ่มคุณสมบัติของแบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถทำได้ โดยการหมักนมถั่วเหลืองด้วยแบคทีเรียแลคติก ร่วมกับ *Bifidobacteria* ซึ่ง Wang และคณะ (2003) ได้ศึกษาพบว่า การหมักนมถั่วเหลืองด้วยแบคทีเรียแลคติก ร่วมกับ *Bifidobacteria* จะมีปริมาณของ acetic acid, fructose, glucose และ galactose มากกว่าการหมักนมถั่วเหลืองด้วยแบคทีเรียแลคติกเพียงอย่างเดียว

Ariyama (1963) ได้พัฒนากระบวนการหมักนมถั่วเหลืองเพื่อทำโยเกิร์ตโดยเติมน้ำตาล sucrose ร้อยละ 15 และหมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* หรือทั้ง *Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* ปรากฏว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็นที่น่าสนใจ นักวิจัยหลายคนได้สรุปว่าเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* ไม่มีความสามารถใช้ sucrose ได้เลย ดังนั้น จึงต้องใช้เชื้อทั้ง 2 ชนิดเพื่อให้ *Streptococcus thermophilus* ใช้ sucrose หรือผลผลิตที่ได้จากการย่อย sucrose ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* จึงสรุปว่าการสร้างกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์ให้ดีและมีปริมาณสูง จำเป็นต้องใช้เชื้อโยเกิร์ตทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน และถ้าผลิตภัณฑ์จากนมถั่วเหลืองที่ได้มีปริมาณของแข็งรวม (total solid) สูง จะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะและความหนืดแตกต่างจากการใช้นมโค

Yamanaka และ Furukawa (1970) ได้ทำการศึกษาการสร้างกรดแลคติกในนมถั่วเหลืองกับนมถั่วเหลืองผสมหางนม เปรียบเทียบกับการใช้หางนมล้วนๆ พบว่า *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* และ *Lactobacillus casei* สามารถสร้างกรดได้มากในนมถั่วเหลืองผสมหางนมโดยที่มีระดับนมถั่วเหลืองมากถึงร้อยละ 70 ในส่วนผสม ส่วนในหางนมจะเกิดน้อยกว่า นอกจากนี้เขายังเติม glucose ลงในนมผสม พบว่าเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดสามารถสร้างกรดได้มาก ในขณะที่การเพิ่ม sucrose นั้น เชื้อ *Lactobacillus acidophilus* จะให้กรดมากเพียงชนิดเดียว จึงสรุปว่าความแข็งแรงของเคิร์ด (curd) จะมากขึ้นตามปริมาณของนมถั่วเหลืองที่ใช้ Pinthong และคณะ (1980) ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวจากนมถั่วเหลือง พบว่าเมื่อใช้เชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* บ่มในนมถั่วเหลืองที่มี glucose ร้อยละ 1 และสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0.1 จะได้ผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวที่มีความเป็นกรดอย่างเพียงพอ และนมถั่วเหลือง

ที่หมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* มีรสชาติดีที่สุด นุชบา(2520) ได้รายงานการใช้แบคทีเรียผสม *Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* หมักนมเปรี้ยวจากถั่วเหลือง ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ที่ดีกว่าการหมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus casei*

Angeles และ Marth(1971) รายงานว่าถ้าเพิ่ม glucose หรือ lactose ลงในน้ำนมถั่วเหลืองจะช่วยให้เชื้อ *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, *Lactobacillus caesei* และ *Lactobacillus helveticus* ผลิตกรดได้เพิ่มขึ้น Mital และคณะ(1974) ทำการทดลองแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกในการใช้ oligosaccharide ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตในนมถั่วเหลือง เพื่อใช้ในการผลิตกรด พบว่า *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus cellobiose* และ *Lactobacillus plantarum* มีความสามารถในการเจริญเติบโตและสร้างกรดได้มากอย่างมีนัยสำคัญ ส่วน *Lactobacillus buchneri* จะใช้ sucrose จากนมถั่วเหลืองมาสร้างกรดได้น้อยกว่า สำหรับ *Lactobacillus bulgaricus* นั้นมีการเจริญเติบโตและสร้างกรดได้น้อยมาก เนื่องจากไม่สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตที่มีในนมถั่วเหลืองได้ นอกจากนี้ lactose และ glucose ยังเป็นน้ำตาลที่เหมาะสมที่สุดในการเติมลงในนมถั่วเหลืองเพื่อให้จุลินทรีย์ผลิตกรดได้เพิ่มขึ้นซึ่งการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Wang และคณะ(1974) ที่ได้ศึกษาการสร้างกรดระหว่างเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* และเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* พบว่าเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* สามารถสร้างกรดได้รวดเร็วกว่าเพราะใช้คาร์โบไฮเดรตได้ดีกว่าและยังสามารถลดกลิ่นถั่วได้อีกด้วย

2.4.2 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อโพรไบโอติกในโยเกิร์ต

โพรไบโอติก(Probiotic) ถูกนำมาใช้เป็นครั้งแรกในรายงานวิจัยของ Metchnikoff(1908) โดยกล่าวถึงจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในอาหารที่มีประโยชน์ต่อผู้บริโภคและสามารถอาศัยและเจริญเพิ่มปริมาณในลำไส้ ซึ่งจะผลิตกรดทำให้ความเป็นกรดต่างในลำไส้ลดลง ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และเพิ่มการเคลื่อนไหวของลำไส้ เพื่อขับจุลินทรีย์ที่ก่อโรคต่างๆออกมา Lilly และ Stillwell(1965) ให้คำจำกัดความว่า โพรไบโอติก คือ สารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งขับออกมาและช่วยกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ส่วน Fuller(1989) อธิบายว่า โพรไบโอติก คือ อาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต สามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย

ปัจจุบันได้มีการเติมเชื้อโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเพื่อเพิ่มคุณสมบัติของโยเกิร์ต จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีการนำมาใช้ในการผลิตโยเกิร์ต ได้แก่ *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus casei* และ *Lactobacillus acidophilus*(Gomes และ Malcata, 1999) โดยการผลิตโยเกิร์ตตามขั้นตอนปกตินั้นจะมีการเติมเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus*

delbrueckii bulgaricus (Dave และ Shah, 1997) เพื่อให้เกิดกระบวนการหมักที่ได้ผลิตภัณฑ์นมกลิ่นและรสชาติดี (วรารุณี และ รุ่งนภา, 2532)

ธนารัตน์ (2542) ได้สรุปประโยชน์ของโพรไบโอติกที่มีต่อร่างกายไว้ว่า กรดแลคติกที่แบคทีเรียโพรไบโอติกผลิตออกมาจะทำให้สภาวะภายในลำไส้มีความเป็นกรดมากพอที่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ช่วยให้ระบบขับถ่ายดี ลดอัตราเสี่ยงของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งตับ ซึ่ง *Bifidobacteria* สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและกำจัดสารก่อมะเร็งบางชนิด เช่น การลดปริมาณสาร Nitrosamine ของ *Bifidobacterium breve* วิตามินบีที่ได้จากการสังเคราะห์ของ *Bifidobacteria* ทำให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้การผลิตเม็ดเลือดแดงดีขึ้น นอกจากนี้ *Bifidobacterium* spp. ยังช่วยบรรเทาอาการแพ้ น้ำตาล lactose เนื่องจากร่างกายไม่ผลิตเอนไซม์ β -galactosidase ที่ย่อยน้ำตาล lactose

เชื้อ *Bifidobacterium* spp. ถูกพบครั้งแรกในปี 1899 ในอุจจาระเด็กที่ดูคนมมารดา *Bifidobacterium* spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เคลื่อนที่ด้วยตัวเองไม่ได้และไม่สร้างสปอร์ มีลักษณะเป็นเซลล์รูปแท่งและอาจมีรูปร่างเป็น Y-shaped, V-shaped, X-shaped หรือเป็นแท่งโค้ง ขึ้นกับส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยง (Ballongue, 1998; Tamine, 2002) เชื้อ *Bifidobacterium* spp. จัดเป็นแบคทีเรียประเภทไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic bacteria) แต่บางสปีชีส์สามารถทนออกซิเจนได้ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37-41 องศาเซลเซียส ไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 46 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดที่เหมาะสมในการเจริญคือ 6.5-7.0 ไม่เจริญที่ค่าความเป็นกรดต่าง 4.5-5.0 หรือ 8.0-8.5 (Tamine, 2002) สามารถหมัก glucose ให้เป็นกรดอะซิติกและกรดแลคติกในอัตราส่วน 3:2 และไม่สามารถสังเคราะห์คาร์บอนไดออกไซด์ได้ (Arunachalam, 1999) ปัจจุบันพบเชื้อ *Bifidobacterium* ถึง 30 สปีชีส์จากแหล่งต่างๆ แต่มีเพียง 5 สปีชีส์เท่านั้นที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมนมหมัก ได้แก่ *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* และ *Bifidobacterium adolescentis* (Tamine, 2002)

Kamaly (1997) ได้ศึกษาการหมักนํ้านมถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *Bifidobacteria* โดยศึกษาการเจริญและการสร้างกรดของ *Bifidobacteria* 2 สายพันธุ์ คือ *Bifidobacterium longum* และ *Bifidobacterium bifidum* ที่หมักในนมผงพร่องมันเนย นํ้านมถั่วเหลืองและอาหารเลี้ยงเชื้อ modified MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่า อัตราการเจริญของเชื้อ *Bifidobacteria* เรียงลำดับจากมากไปน้อย ได้แก่ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในนมผงพร่องมันเนย และในนํ้านมถั่วเหลือง ซึ่งเชื้อ *Bifidobacterium longum* และ *Bifidobacterium bifidum* สามารถลดค่า

ความเป็นกรดต่างในนมผงพร้อมมันเนย เท่ากับ 1.18 และ 1.59 ตามลำดับ และในน้ำนมถั่วเหลือง เท่ากับ 1.01 และ 1.30 ตามลำดับ

Chou และ Hou(2000) ศึกษาการเจริญของ *Bifidobacterium infantis* CCRC14633 และ *Bifidobacterium longum* B6 ในนมถั่วเหลือง พบว่านมถั่วเหลืองส่งเสริมการเจริญของเชื้อ Bifidobacteria ทั้ง 2 สายพันธุ์ โดย *Bifidobacterium infantis* สามารถเจริญได้ดีกว่า *Bifidobacterium longum* เมื่อเสริมนมถั่วเหลืองด้วยกลุ่มของ bifitose (isomaltooligosaccharide) ได้แก่ glucose, lactose หรือ galactose หากไว้นาน 48 ชั่วโมง จะทำให้ *Bifidobacterium infantis* และ *Bifidobacterium longum* เจริญได้ดีขึ้น

Wang และคณะ(2003) ศึกษาปริมาณน้ำตาลและกรดในน้ำนมถั่วเหลืองที่หมักด้วย แบคทีเรียแลคติกอย่างเดี่ยวและใช้แบคทีเรียแลคติกร่วมกับ Bifidobacteria แบ่งการทดลองเป็น 6 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 หมักนมถั่วเหลืองโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus acidophilus* กลุ่มที่ 2 ใช้เชื้อ *Streptococcus thermophilus* กลุ่มที่ 3 ใช้ *Lactobacillus acidophilus* ร่วมกับ *Bifidobacterium infantis* กลุ่มที่ 4 ใช้ *Lactobacillus acidophilus* ร่วมกับ *Bifidobacterium longum* กลุ่มที่ 5 ใช้ *Streptococcus thermophilus* ร่วมกับ *Bifidobacterium infantis* และกลุ่มที่ 6 ใช้ *Streptococcus thermophilus* ร่วมกับ *Bifidobacterium longum* โดยใช้ระยะเวลาในการบ่ม 32 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยแบคทีเรียแลคติกร่วมกับ Bifidobacteria สามารถผลิตน้ำตาล sucrose, fructose, glucose, galactose และ acetic acid ได้สูงกว่าในขณะที่ raffinose และ stachyose มีปริมาณลดลงมากกว่ากลุ่มการทดลองที่ใช้แบคทีเรียแลคติกเพียงอย่างเดียว

Chien และคณะ(2006) ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณไอโซฟลาโวนส์และ β -glucosidase activity ในนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* พบว่า เชื้อ *Streptococcus thermophilus* มี β -glucosidase activity สูงที่สุดและสามารถเพิ่มไอโซฟลาโวนส์ชนิด aglycones ในนมถั่วเหลืองหมักได้ดีที่สุด นอกจากนี้ เชื้อ *Streptococcus thermophilus* และเชื้อ *Bifidobacterium longum* มีความสามารถในการเปลี่ยนไอโซฟลาโวนส์ชนิด glucosides ให้เป็น aglycones ได้เหมือนกัน

2.5 ผลิตภัณฑ์กัมและเยลลี่

ผลิตภัณฑ์ประเภทกัม (gums) และเยลลี่ (jellies) เป็นผลิตภัณฑ์ประเภทลูกกวาดกลุ่มใหญ่ ที่มีกรรมวิธีการผลิตที่น่าสนใจแตกต่างกัน (Lee และ Jackson, 1973) ผลิตภัณฑ์ในกลุ่มนี้สำหรับผู้บริโภคทั่วไปมักจะเข้าใจว่าเป็นผลิตภัณฑ์เดียวกันและมักเรียกรวมๆกันว่า เยลลี่ เพราะมีลักษณะ

คล้ายๆกันคือ เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความหยุ่น นุ่ม เหนียว ต้องเคี้ยวกิน มีเนื้อสัมผัสที่แตกต่างกัน ออกไปตั้งแต่อ่อนนุ่มแต่มีความยืดหยุ่นสูง จนเหนียวแข็งกัดขาดได้ยาก กัมและเยลลี่เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความชื้นสูง คือ มีความชื้น 10-25 เปอร์เซ็นต์ แต่มีค่าความชื้นสัมพัทธ์สมดุลไม่สูงมากนัก ทั้งนี้เนื่องจากไฮโดรคอลลอยด์ที่เป็นส่วนประกอบทำหน้าที่ในการยึดจับน้ำส่วนหนึ่งไว้(สุวรรณ, 2543) เจลาตินเป็นส่วนประกอบที่ใช้กันโดยทั่วไปในการผลิตผลิตภัณฑ์ประเภทลูกกวาด เจลาตินจะมีหน้าที่ในการขึ้นรูปและปรับปรุงโครงสร้างและเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์(Garcia, 2000) ผลิตภัณฑ์ประเภทกัมและเยลลี่เจลาติน จะมีเนื้อสัมผัสค่อนข้างนุ่ม เหนียวและมีความยืดหยุ่น

2.5.1 ส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ในการทำเยลลี่

2.5.1.1 เจลาติน

เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่ได้จากเส้นใยคอลลาเจน ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 19 ชนิด ต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ (peptide) เป็นสายยาว ย่อยง่าย เจลาตินเป็นโปรตีนที่มีคุณค่าทางโภชนาการที่ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากขาดกรดอะมิโนที่จำเป็น คือ ทรีปโตเฟน เจลาตินผลิตจาก 3 แหล่งด้วยกัน คือ หนังกู กระดูกวัวและหนังวัว ที่กำจัดเกลื้อแร่่ออกแล้ว เจลาตินที่ได้จากคนละแหล่งจะมีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน(Glicksman, 1969) องค์ประกอบโดยทั่วไปของเจลาติน ประกอบด้วย คาร์บอนร้อยละ 50.11 ไฮโดรเจนร้อยละ 6.56 ไนโตรเจนร้อยละ 17.81 ซัลเฟอร์ร้อยละ 0.26 และออกซิเจนร้อยละ 25.26(Winton และ Winton, 1949) เจลาตินแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ Type A เป็นเจลาตินที่ผลิตจากหนังกู โดยการใช้กรดในการสกัด Type B เป็นเจลาตินที่ผลิตจากกระดูกวัวและหนังวัว โดยการใช้ด่างในการสกัด เจลาตินทั้ง 2 ชนิดนี้จะมีคุณสมบัติที่ต่างกัน ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของเจลาติน Type A และ Type B

คุณสมบัติ	Type A	Type B
Moisture	8-12%	8-12%
pH	3.8-5.5	5.0-7.5
Isoelectric point	7.0-9.0	4.7-5.1
Gel strength	50-300 bloom	50-275 bloom
Viscosity	2.0-7.0 cP	2.0-7.5 cP
Ash	0.3%	0.5-2.0%

ที่มา : Glicksman(1969)

Glicksman(1969) ได้กล่าวถึงสมบัติของเจลาติน ดังนี้ คือ การละลาย(solubility) ของเจลาตินจะไม่ละลายในน้ำเย็น แต่จะเกิดการพองตัวและสามารถละลายในน้ำร้อนได้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นอกจากนี้เจลาตินยังสามารถละลายในสารละลายโพลีไฮดริกแอลกอฮอล์ (polyhydric alcohols) เช่น ซอร์บิทอล (sorbital) โพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) และกลีเซอริน (glycerin) แต่จะไม่ละลายในสารละลายแอลกอฮอล์ (alcohol) และอะซิโตน (acetone)

ความหนืด(viscosity) ที่เกิดจากเจลาตินละลายในน้ำ ความหนืดเป็นคุณสมบัติหนึ่งของเจลาตินที่มีความสำคัญ เจลาตินโดยทั่วไปจะมีความหนืดประมาณ 2-7 cP ความหนืดของเจลาตินจะขึ้นอยู่กับมวลโมเลกุลมากกว่าความแข็งของเจล เจลาตินที่มีความแข็งของเจลสูงจะมีความหนืดต่ำกว่าเจลาตินที่มีความแข็งแรงของเจลต่ำ ในสารละลายที่ไม่มีเกลือ ความหนืดจะต่ำสุด จุด isoelectric point ความหนืดของเจลาตินจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเจลาตินสูงขึ้น และอุณหภูมิลดลง โดยสารละลายเจลาตินจะเริ่มเกิดเจลเมื่ออุณหภูมิลดลง ความหนืดจะสูงขึ้นอย่างช้าๆ จนกระทั่งการเกิดเจลคงที่

สี(color) สีของเจลาตินขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ และขั้นตอนการสกัด เจลาตินที่ผลิตจากหนังหมูจะมีสีจางกว่าจากกระดูก แต่สีของเจลาตินไม่มีอิทธิพลต่อคุณสมบัติของเจลาติน

ความขุ่น(turbidity) ความขุ่นเกิดจาก insoluble impurities ที่มาจากขั้นตอนการสกัด การเติมเกลือ (neutral salt) จะมีผลทำให้ความใส ความหนืด และความแข็งแรงของเจลของเจลาตินคงที่

ความแข็งแรงของเจล(gel strength) คุณสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งของเจลาติน คือสามารถเปลี่ยนกลับได้ (reversible) โดยขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ (Borchard และ Lechtenfeld, 2001) การเกิดเจลของเจลาตินเกิดจากโมเลกุลของเจลาตินจับกับน้ำด้วยพันธะไฮโดรเจน ความแข็งแรงของเจลจะวัดโดยใช้เครื่อง bloom gelometer ซึ่งเป็นเครื่องมือมาตรฐานสำหรับอุตสาหกรรม เจลาตินโดยทั่วไปจะมีความแข็งแรงประมาณ 50-300 bloom

ความแข็งของเจล(rigidity) เจลของเจลาตินจะมีความยืดหยุ่น (elastic) ความแข็งแรงของเจลจะมีความสัมพันธ์ผกผันกับอุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิลดลงความแข็งแรงของเจลก็จะเพิ่มขึ้น เวลาในการเกิดเจลขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเจลาติน ความแข็งแรงของเจลจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น

จุดหลอมละลาย(melting point) เจลาตินจะมีจุดหลอมละลายต่ำประมาณ 27-34 องศาเซลเซียส จุดหลอมละลายจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเจลาตินสูงขึ้น และจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับน้ำหนักโมเลกุลของเจลาติน คือถ้าน้ำหนักโมเลกุลของเจลาตินสูง จุดหลอมละลายสูงขึ้น

2.5.1.2 น้ำตาล

เป็นสารตัวหนึ่งในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต มีอยู่หลายชนิดแต่เมื่อพูดถึงน้ำตาล มักเป็นที่เข้าใจว่าน้ำตาล หมายถึง น้ำตาลทราย หรือซูโครส(sucrose) ซึ่งเป็นส่วนผสมหลักในการผลิตลูกกวาดทั่วไป น้ำตาลมีคุณสมบัติ คือ ให้ความหวาน ซึ่งเป็นลักษณะที่เด่นมากของผลิตภัณฑ์ในกลุ่มที่มีน้ำตาลเป็นส่วนผสมหลัก ให้เนื้อและน้ำหนักแก่ผลิตภัณฑ์ เนื่องจากในส่วนผสมโดยทั่วไปมีการใช้น้ำตาลถึงร้อยละ 70 ของน้ำหนักทั้งหมด(สุวรรณ, 2543)

2.5.1.3 กลูโคสไซรัป

จัดเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตลูกกวาดทุกชนิดรองลงมาจากน้ำตาล น้ำที่ของกลูโคสไซรัปคือ ทำให้น้ำตาลที่อยู่ในสภาวะเป็นสารละลายอึดตัวยิ่งยวดไม่ตกผลึกออกมา หรือเกิดผลึกช้าลงหรือน้อยลงนอกจากนี้ยังมีผลต่อรสชาติและอายุการเก็บรักษา ขึ้นอยู่กับว่ากลูโคสไซรัปนั้นมีองค์ประกอบอย่างไร และถูกใช้ในสัดส่วนเท่าใดในสูตร โดยกลูโคสไซรัปที่จำหน่ายจะมีค่า DE แตกต่างกันไปตามกรรมวิธีการผลิต(สุวรรณ, 2543) กลูโคสไซรัปที่ใช้ในอุตสาหกรรมประเภทลูกกวาด จะใช้อยู่ 3 ชนิด คือ ชนิด DE ต่ำ มีค่าประมาณ 20 ชนิด DE ปานกลาง มีค่า 40-42 และชนิด DE สูง มีค่า 60-65 ดังนั้นในการนำไปใช้งานจะต้องเลือกให้เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์แต่ละประเภท

2.5.1.4 กรด

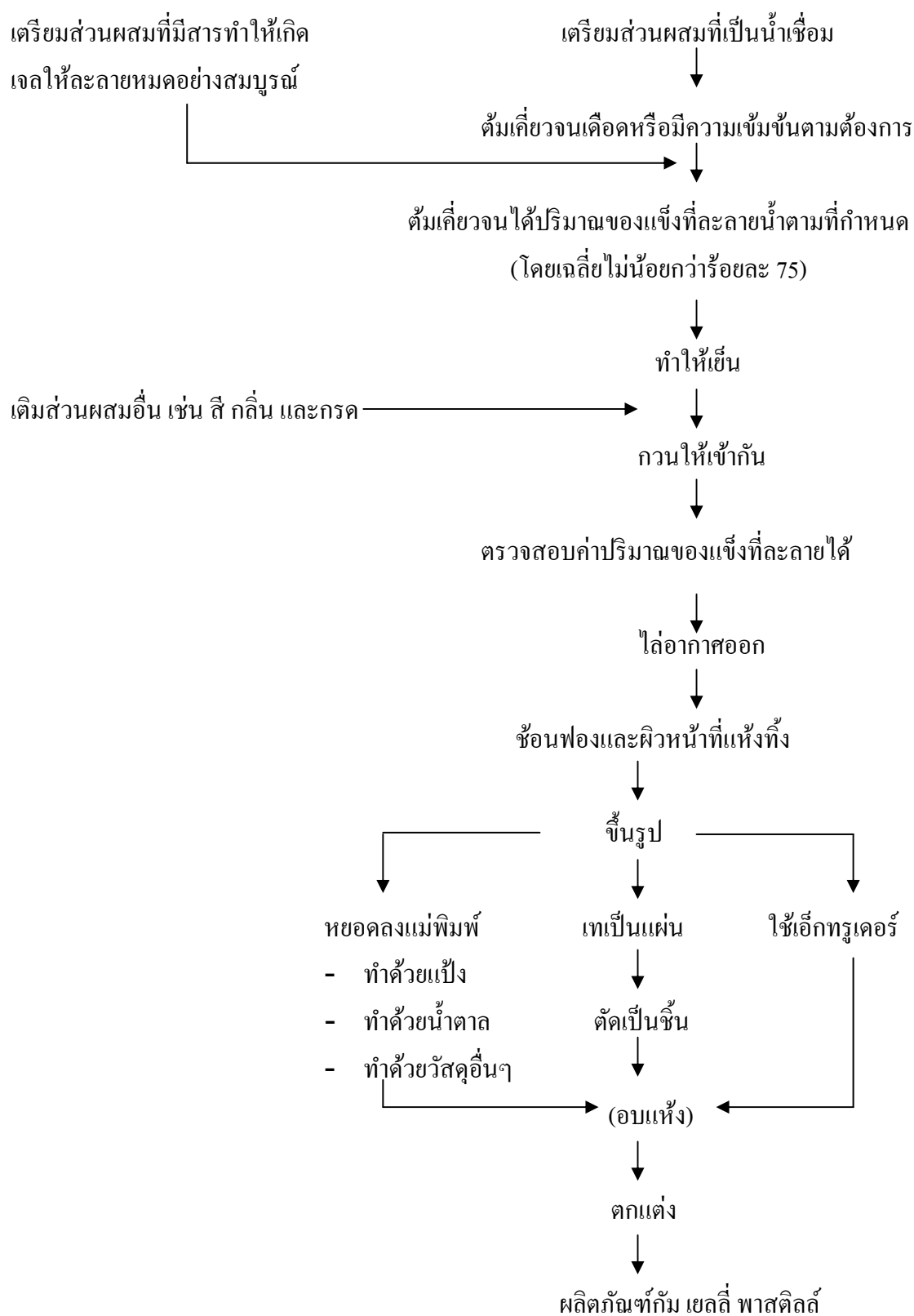
กรดเป็นสารปรุงแต่งที่ช่วยให้ผลิตภัณฑ์ลูกกวาด เยลลี่และกัม มีรสชาติดีขึ้น กรดที่นิยมใช้กับผลิตภัณฑ์ลูกกวาด มีอยู่ประมาณ 4-5 ชนิด ได้แก่ กรดซิตริก กรดมาลิก กรดทาร์ตาริก กรดแลกติก และกรดอะซิติก(Cooley, 1993) โดยในการวิเคราะห์หาปริมาณกรด จะรายงานในรูปแบบของกรดซิตริกเสมอ และปริมาณกรดที่ใช้มักจะไม่ได้บอกค่าความเป็นกรดต่าง (pH) (สุวรรณ, 2543) ดังตารางที่ 2 แสดงความเข้มข้นของกรดต่างๆที่มี pH เท่ากัน โดยค่า pH จะมีความสำคัญในการผลิตผลิตภัณฑ์ลูกกวาด ในการควบคุม pH จะมีผลในการป้องกันการเกิดอินเวอร์ชันของน้ำตาล ป้องกันการเกิดไฮโดรไลซิสของเจลาตินซึ่งจะมีผลให้ความแข็งแรงของเจลเจลาตินลดลง(Woo, 1998)

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของกรดต่างชนิดที่มี pH เท่ากัน

กรด	pH	ความเข้มข้น (ร้อยละ)
ไฮโดรคลอริก	2.0	0.032
ทาร์ตาริก	2.0	2.265
ซิตริก	2.0	2.440
แลกติก	2.0	1.912
อะซิติก	2.0	1.950

ที่มา: Lees และ Jackson(1973)

2.5.2 กรรมวิธีในการผลิตผลิตภัณฑ์กัมและเยลลี่(สุวรรณ, 2543) ได้แสดงขั้นตอนในการผลิตผลิตภัณฑ์กัมและเยลลี่ ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 ขั้นตอนในกระบวนการผลิตกัม เซลล์ีและพาสติลล์

ที่มา: สุวรรณ(2543)

ในการผลิตผลิตภัณฑ์กัมและเซลล์จากเจลาติน จะมีการใช้ปริมาณของส่วนผสมที่แตกต่างกัน และมีการควบคุมกระบวนการผลิตที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณส่วนผสมและการควบคุมกระบวนการผลิตกัมและเซลล์จากเจลาติน

กระบวนการผลิต	เจลาติน
ปริมาณที่ใช้ (%)	5-12.5
น้ำ/สารที่ทำให้เกิดเจล	2/1
อุณหภูมิที่ใช้ในการละลาย (°C)	60-65
ซูโครส/กลูโคส/ไซรัป	66/33-50/50
อุณหภูมิที่เติมกรด(°C)	71-82
อุณหภูมิที่หยอดใส่แม่พิมพ์(°C)	71-82
อุณหภูมิที่เซ็ดตัว(°C)	20-37
เวลาในการเซ็ดตัว(ชั่วโมง)	4+
เวลาที่อยู่ในพิมพ์แข็ง(ชั่วโมง)	12-24

ตารางที่ 3 (ต่อ)

กระบวนการผลิต	เกณฑ์
ความชื้นแป้งที่ใช้เป็นแม่พิมพ์(%)	5-8
อุณหภูมิแป้งที่ใช้เป็นแม่พิมพ์(°C)	26-37
ปริมาณของแข็งขณะหยอด(%)	72-78
ปริมาณของแข็งสุดท้าย(%)	78+
เนื้อสัมผัส	เหนียว
สารที่ทำให้เกิดเจลที่ใช้ร่วมกันได้	วุ้น, แป้ง
อุณหภูมิสุดท้ายในการผลิตที่ความดันบรรยากาศ	115
ผลของการใช้อุณหภูมิสูงเป็นระยะเวลานานที่มีต่อความแข็งแรงของเจล	ความแข็งแรงของเจลลดลงโดยเฉพาะสถานะที่เป็นกรด
pH ในระหว่างการให้ความร้อน	5.0-6.0
ปริมาณกรดที่ใช้(%)	0.2-0.3
บัฟเฟอร์	0.1% ถั่วเติมกรด
pH ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย	4.5-5.0

ตารางที่ 3 (ต่อ)

กระบวนการผลิต	เจลาติน
อายุการเก็บโดยประมาณ(เดือน)	4+
การปลดปล่อยกลิ่น	ไม่ดี
ความยากง่ายในการผลิต	ง่าย
การนำผลิตภัณฑ์มาใช้ใหม่	ง่าย

ที่มา: Lees และ Jackson(1973)

2.5.3 การขึ้นรูปผลิตภัณฑ์กัมและเยลลี่

การขึ้นรูปผลิตภัณฑ์กัมและเยลลี่ มีหลายวิธีด้วยกัน คือ

2.5.3.1 การขึ้นรูปโดยใช้แม่พิมพ์แข็ง

แม่พิมพ์แข็งเป็นแม่พิมพ์ที่ทำจากแข็ง โดยบรรจุแข็งในถาด เคลือบให้เรียบแล้วนำแบบพิมพ์ซึ่งทำจากปูนพลาสเตอร์มากดให้เป็นรูปร่างที่ต้องการ(Steels, 1992) แป้งที่ใช้ในต่างประเทศเป็นแป้งข้าวโพด ในประเทศไทยนิยมใช้แป้งมัน ส่วนแป้งที่ดีที่สุดในการทำแม่พิมพ์คือแป้งข้าวเจ้า แป้งที่ใช้จะมีการนำมาสเปรย์ด้วยน้ำมัน(mineral oil) ไม่เกิน 0.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนมากแล้วจะใช้เพียงแค่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ หรือน้อยกว่า ในการผลิตไม่นิยมใช้น้ำมันพืชเนื่องจากจะทำให้เกิดการหืนได้ง่าย น้ำมันที่จะช่วยให้แม่พิมพ์แข็งคงรูปได้ดี และผงแป้งไม่มีไฟฟ้าสถิตย์ สาเหตุที่ใช้ปริมาณน้ำมันต่างกันั้นเนื่องมาจากประสิทธิภาพของวิธีการผสมและเครื่องมือที่ใช้ในการผสม(สุวรรณ, 2543) ในการผลิตแม่พิมพ์แข็งจะนำแป้งไปอบโดยใช้ตู้อบแบบถาด (tray drying) เพื่อไล่ความชื้นออกจากแม่พิมพ์แข็ง การขึ้นรูปผลิตภัณฑ์กัมและเยลลี่จะใช้แป้งที่มีความชื้นน้อยกว่า 6 เปอร์เซ็นต์ โดยแม่พิมพ์แข็งจะดูดความชื้นออกจากผลิตภัณฑ์ ถ้าเยลลี่มีความหนืดมากจะต้องใช้น้ำพ่นเพื่อไม่ให้เกิดหางเวลาหยอด แม่พิมพ์จะดูดความชื้น 2 เปอร์เซ็นต์ หลังจากที่ย่อยและทิ้งไว้ในแม่พิมพ์ข้ามคืน แป้งที่ใช้จะนำไปอบให้แห้งเพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ได้

การขึ้นรูปด้วยแม่พิมพ์มีข้อดีคือสามารถเปลี่ยนรูปร่างของผลิตภัณฑ์ได้โดยไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายมาก (Pyrz, 1994) การใช้แม่พิมพ์แข็งจะต้องทิ้งผลิตภัณฑ์ให้เซตตัวในแม่พิมพ์แข็ง มี 2 วิธีใหญ่ๆ คือ ใช้เตาอบ อบที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส การอบจะใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ให้แข็งดูน้ำ ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 25-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 12-24 ชั่วโมง

2.5.3.2 การขึ้นรูปโดยใช้แม่พิมพ์จากวัสดุอื่น (starchless moulding)

การขึ้นรูปโดยใช้แม่พิมพ์จากวัสดุอื่น เริ่มเมื่อประมาณ 40 ปีก่อน โดยใช้แม่พิมพ์ยาง ภายหลังใช้เป็นยางซิลิโคน (silicone rubber) พลาสติก หรือ โลหะ แม่พิมพ์ชนิดนี้จะไม่ดูดความชื้น ดังนั้นในการขึ้นรูปจะต้องหยอดที่ความชื้นต่ำกว่าแม่พิมพ์แข็งประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ต้องระเหยน้ำมากขึ้นกว่าเดิม การแกะผลิตภัณฑ์ออกจากแม่พิมพ์จะต้องใช้ระบบลมเป่าให้หลุดออกจากแม่พิมพ์ โดยก่อนที่จะหยอดจะมีการสเปรย์สารที่ทำให้แม่พิมพ์หลุดออกง่าย (releasing agent) ลงในแม่พิมพ์(สุวรรณา, 2543)

2.5.3.3 การขึ้นรูปแบบเทเป็นแผ่น (slabbing)

วิธีนี้เหมาะกับการทำผลิตภัณฑ์ที่เป็นชั้นแบบขนมชั้น โดยปล่อยให้เจลแข็งตัวทีละชั้น ก่อนเทชั้นต่อไปทับลงไป(สุวรรณา, 2543)

2.5.3.4 การขึ้นรูปโดยใช้เอ็กสทรูเดอร์

การขึ้นรูปโดยใช้เอ็กสทรูเดอร์ จะใช้หม้อต้ม (cooker extruder) ในการผลิตเป็นการใช้อุปกรณ์เพียงชิ้นเดียวแล้วทำรูปร่างได้มากมาย(สุวรรณา, 2543)

2.5.4 การตกแต่งผลิตภัณฑ์

การตกแต่งผลิตภัณฑ์ เป็นขั้นตอนสุดท้ายในกระบวนการผลิต เพื่อทำความสะอาดผิวและป้องกันตัวขนมติดกันระหว่างการเก็บรักษา มีหลายวิธีดังต่อไปนี้ คือ

2.5.4.1 ล้าง (washing) เฉพาะผลิตภัณฑ์ที่ขึ้นรูปด้วยวิธีเทเป็นแผ่นหรือใช้แม่พิมพ์ที่ไม่ใช้แข็งและอาจมีการใช้สารที่ทำให้แม่พิมพ์หลุดออกง่าย เมื่อล้างแล้วต้องนำไปอบแห้งต่อเพื่อป้องกันมิให้เกิดปัญหาจากจุลินทรีย์

2.5.4.2 เคาะออกจากแป้ง (destarching) เมื่อคว่ำถาดขนมและร่อนแป้งออก อาจมีเศษแป้งติดอยู่บนเนื้อขนมบ้าง หากจะนำไปเคลือบน้ำมันหรือเกลือน้ำตาล จะทำให้เป็นจุดดำไม่สวยงาม จึงต้องปัดแป้งส่วนนี้ออก โดยใช้ลมเป่า หรือเขย่า หรือใช้แปรงปัดก็ได้ ผลิตภัณฑ์บางชนิดจะต้องรอให้เนื้อแข็งพอก่อนจึงนำไปเคาะปัดเศษแป้งออก(Brisson, 1994)

2.5.4.3 อบไอน้ำ (seaming) โดยใช้ไอน้ำแห้ง เพื่อเจลาตินในส่วนแป้งที่มาจากแม่พิมพ์ ทำให้ผลิตภัณฑ์ขึ้นเงา

2.5.4.4 ทำให้เกิดผลึก (crystallization) เนื่องจากความชื้นในผลิตภัณฑ์บางชนิดค่อนข้างสูง จึงทำให้ความชื้นสัมพัทธ์สมดุลของผลิตภัณฑ์ค่อนข้างสูง และสูงกว่าความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศรอบๆ ทำให้เนื้อขนมแห้งเหี่ยวลงได้ จึงต้องเลือกใช้บรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสม หรือทำการเคลือบผลิตภัณฑ์ป้องกันไว้ก่อน โดยการทำให้เกิดผลึกน้ำตาลเป็นชั้นที่ผิวนอก ปกป้องตัวผลิตภัณฑ์ไว้

2.5.4.5 เคลือบน้ำมันหรือชักเงา (oiling and polishing) วิธีนี้นอกจากจะทำให้ผลิตภัณฑ์มันวาวแล้ว ยังช่วยป้องกันไม่ให้ผลิตภัณฑ์เกาะติดกันในห่อ (Brisson, 1994) และช่วยรักษาความชื้นของตัวผลิตภัณฑ์ด้วย น้ำมันที่ใช้เคลือบคือ วาสลีน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยทำในหม้อหมุน

เอกสารอ้างอิง

- คัลนางค์ ทองสุก. “ถั่วเหลืองอาหารสุขภาพ.” วารสารอาหาร, 3(2542): 212-213.
- คมสัน หุตะแพทย์ และ วารี ยินดีชาติ. ถั่วเหลือง: พืชมหัศจรรย์สารพันประโยชน์. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์เกษตรกรรมธรรมชาติ, 2542.
- ธารารัตน์ ศุภศิริ. “โพรไบโอติกแบคทีเรียเพื่อสุขภาพ.” วารสารวิทยาศาสตร์ 53, 6(2542): 357-360.
- บุษบา ขงสมิทธิ์. “การศึกษาการทดลองทำเครื่องคัมนมเปรี้ยวจากถั่วเหลือง.” รายงานวิจัยในโครงการแลกเปลี่ยนอาจารย์ ทบวงมหาวิทยาลัย, 2520.
- เรณู ปั่นทอง. “การพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตจากถั่วเหลือง.” วารสารอาหาร 12, 2(2523): 230-247.
- วรวิภา คุรุสง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ไอ.เอส.พรินติ้งเฮาส์, 2532.
- วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. ชีอิ้ว. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2534.
- สุวรรณ สุกิมารส. เทคโนโลยีการผลิตลูกกวาดและช็อกโกแลต. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2543.
- สมชาย ประภาวัต. “คุณค่าทางอาหารของถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง.” วารสารอาหาร 19, 3(2532): 174-179.

- Albertazzi, P., Pansini, F., Bonaccorsi, G., Zanotti, L., Forini, E., and De Aloysio, D. "The effects of soy supplementation on hot flashes." Obstetrics and Gynecology, 91(1998): 6-11.
- Alekel, D.L., Germain, A.S., Peterson, C.T., Hanson, K.B., Steward, J.W., and Toda, T. "isoflavone-rich soy protein isolate attenuate bone loss in the lumbar spine of perimenopausal woman." American Journal of Clinical Nutrition, 72(2000): 844-852.
- Allred, C.D., Ju, Y.H., Allred, K.F., Chang, J., and Helferich, W.G. "Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observes with genistein." Carcinogenesis 22, 10(2001): 1667-1673.
- Anderson, J.J.B., and Carner, S.C. "The effects of phytoestrogens on bone." Nutritional Research, 17(1997): 1617-1632.
- Angeles, A.C., and Marth, E.H. "Growth and activity of lactic acid bacteria in soy milk: Growth and acid production." Journal of Milk Food Technology, 34(1971): 30-36.
- Ariyama, H. "Process for the manufacture of synthetic yoghurt from soybean." U.S. Patent. 3,096,177, (2 July 1963).
- Arunachalam, K.D. "Role of Bifidobacteria in nutrition, Medicine and Technology." Nutrition Research 19, 10(1999): 1559-1597.
- Ballongue, J. "bifidobacteria and probiotic action." In Salmene, S., and Wright, A.V.(Eds.), Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. New York: Marcel Dekker, 1998.
- Beck, V., Unterrieder, E., Krenn, L., Kubelka, W., and Jungbauer, A. "Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy." Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 84(2003): 259-268.
- Borchard, W., and Lechtenfeld, M. "Time dependent properties of thermoreversible gels." Material Research Innovation, 4(2001):381-387.

- Bowey, E., Adlercreutz, H., and Rowland, I. "Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats." Food and Chemical Toxicology 41, 5(2003): 631-636.
- Brisson, S. "The finishing of cast starch items." The Manufacturing Confectioner 74, 10(1994): 81-85.
- Bronus, F. "Soya isoflavones: a new promising ingredient for the health food sector." Journal of Food Research International, 35(2002): 187-193.
- Brzezinski, A., Adlercreutz, H., Shaoul, R., Rosler, A., Shmueli, A., Tanos, V., and Schenker, G.J. "Short-term effects of phytoestrogen-rich diet on postmenopausal woman." Menopause, 4(1997): 89-94.
- Cassidy, A., Bingham, S., and Setchell, K.D.R. "Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women." American Journal of Clinical Nutrition, 60(1994): 333-340.
- Chang, Y., and Nair, M.G. "Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria." Journal of Natural Products, 58(1995): 1892-1896.
- Chien, H.L., Huang, H.Y., and Chou, C.C. "Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria." Food Microbiology, 23(2006): 772-778.
- Chien, J.T., Hsieh, H.C., Kao, T.H., and Chen, B.H. "Kinetic model for studying the conversion and degradation of isoflavones during heating." Food Chemistry, 91(2005): 425-434.
- Choi, Y., Woo, J.G., and Noh, W.S. "Hydrolysis of β -glucosidase bonds of isoflavone conjugates in the lactic acid fermentation of soymilk." Korean Journal of Food Science and Technology, 31(1999): 189-195.
- Chou, C.C., and Hou, J.W. "Growth of bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk drink during storage." International Journal of Food Microbiology, 56(2000): 113-121.
- Cooley, J. "Quality jelly candy: a synergy of art and science." The Manufacturing Confectioner 73, 11(1993): 69-76.

- Coward, L., Barnes, N.C., Setchell, K.D.R., and Barnes, S. "Genistein, daidzein and their glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets." Journal of Agricultural and Food Chemistry 41, 11(1993): 1961-1967.
- Dave, R.I., and Shah, N.P. "Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurt made from commercial starter cultures." International Dairy Journal, 7(1996):31-41.
- Fuller, R. "Probiotic in man and animals." Journal of Applied Bacteriology, 66(1989): 365-378.
- Garcia, M.C., Torre, M., Marina, M.L., and Laborda, F. "Composition and Characterization of Soybean and Related Product." Critical Reviews in Food Science and Nutrition 37, 4(1997): 361-391.
- Garcia, T. "Analysis of gelatin-based confections." The Manufacturing Confectioner 80, 6(2000): 93-101.
- Gehrke, C., and Weiser, H.H. "Comparative studies on growth and biochemical features of micro-organism grown in Cow's and Soybean milk." Food Research, 12(1947): 360-366.
- Glicksman, M. Gum Technology in Food Industry. New York: Academic Press, 1969.
- Gomes, A.M., and Malcata, F.X. "*Bifidobacterium spp.* And *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotic." Trends in Food Science and Technology, 10(1999): 139-157.
- Hutchins, A.M., Slavin, J.L., and Lampe, J.W. "Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products." Journal of the American Diet Association, 95(1995): 545-551.
- Izumi, T., Piskula, M., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Kubota, Y., and Kikuchi, M. "Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans." Journal of Nutrition 130, 7(2000): 1695-1699.
- Jeon, K.S., Ji, G.E., and Hwang, I.K. "Assay of β -glucosidase activity of bifidobacteria and hydrolysis of isoflavone glycosidase by *Bifidobacterium sp.* Int-57 in soymilk fermentation." Journal of Microbiology and Biotechnology, 12(2002): 8-13.

- Kamaly, K.M. "Bifidobacteria fermentation of soybean milk." Food Research International 30, 9(1997): 675-682.
- Kanda, H., Wang, H.L., Hesseltine, C.W., and Warner, K. "Yoghurt Production by *Lactobacillus* Fermentation of Soybean Milk." Process Chemistry, May(1976): 23.
- Kaufman, P.B., Duke, J.A., Briellmann, H., Boik, J., and Hoyt, J.E. "A comprehensive survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: implication for human nutrition and health." Journal of Alternate Complementary Medicine, 3(1997): 7-22.
- Kellogg, J.H. "Method of making acidophilus milk." U.S. Patent. 1,982,941, (4 December 1934).
- Klus, K., and Barz, W. "Formation of polyhydroxylated isoflavones from the soybean seed isoflavones daidzein and glycitein by bacteria isolated from tempe." Archives of Microbiology, 164(1995): 428-434.
- Lees, R., and Jackson, E.B. Sugar Confectionery and Chocolate Manufacture. New York: Leonard Hill Books, 1973.
- Lilley, D.M., and Stillwell, R.H. "Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms." Science, 147(1965): 747-748.
- Lui, K. Soybean: Chemistry, Technology and Utilization. New York: Chapman and Hall, 1997.
- Markiewicz, L., Garey, J., Adlercreutz, Z., and Gurpide, E. "In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens." Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 45(1993): 399-405.
- Matsuda, S., Norimoto, F., Matsumoto, Y., Ohba, R., Teramoto, Y., and Ohta, N. "Solubilization of novel isoflavone glycoside hydrolyzing β -glucosidase from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*." Journal of Fermentation and Bioengineering, (1994): 77439-77441.
- Metchinkoff, E. The prolongation of life. New York: G. Puthnam's Sons, 1908.
- Mital, B.K., Steinkraus, K.H., and Naylor, H.B. "Growth of lactic acid bacteria in soy milks." Journal of Food Science, 39(1974): 1018-1022.

Mukies, A.L., Lombard, C., Strauss, B.J.G., Wilcox, G., Burger, H.G., and Morton, M.S.

“Dietary flower supplementation decreases post-menopausal hot flushes: effect of soy and wheat.” Maturitas, 21(1995): 189-195.

Murakami, H., Asakawa, T., Tero, J., and Matsushita, S. “Antioxidant stability of tempeh and liberation of isoflavones by fermentation.” Agricultural and Biological Chemistry, 48(1984): 2971-2975.

Murphy, P.A., Song, T., Buseman, G., Baru, K., Beecher, G.R., Trainer, D., and Holden, J. “Isoflavones in retail and institutional soy foods.” Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(1999): 2697-2704.

Naim, M., Gestetner, B., and Zilkah, S. “Soybean isoflavones characterization, determination, and antifungal activity.” Journal of Agricultural and Food Chemistry 22, 5(1974): 806-810.

Nurmi, T., Mazur, W., Heinonen, S., Kokkonen, J., and Adlercreutz, H. “Isoflavone content of the soy based supplements.” Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 28(2002): 1-11.

Pinthong, R., Macrae, R., and Rothwell, J. “The development of soya-based yoghurt: Acid production by lactic acid bacteria.” Journal of Food Technology, 15(1980): 647-652.

Piskula, M.K., Yamakoshi, J., and Iwai, Y. “Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach.” Federation of European Biochemical Societies Letters, 447(1999): 287-291.

Potter, S.M., Baum, J.A., Teng, G., Stillman, R.J., Shay, N.F., and Erdman, J.W. “Soya protein and isoflavones: their effect on blood lipids and bone density in postmenopausal woman.” American Journal of Clinical Nutrition, 68(1998): 1375s-1379s.

Pyo, Y.H., Lee, T.C., and Lee, Y.C. “Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria.” Food Research International, 38(2005): 551-559.

Pyrz, J.E. “The starch moulding process.” The Manufacturing Confectioner 74, 10(1994): 75-80.

- Richard, A.D., and Daneel, F. "Molecules of Interest: Genistein." Phytochemistry, 60(2002): 205-211.
- Saio, K. "Soybean Foods: Nutritionally and Industrially Valuable." Paper of Proceeding World Soybean Research Conference V. Chaing Mai, 21-27 February 1994.
- Slavin, J.L., Karr, S.C., Hutchins, A.M., and Lampe, J.W. "Influence of soybean processing, habitual diet, and soy dose on urinary isoflavonoid excretion." American Journal of Clinical Nutrition, 68(1998): 1492s-1495s.
- Smith, A.K., and Circle, S.J. Soybean: Chemistry and Technology. Connecticut: The AVI Publishing, 1978.
- Steels, G. "Advances in starch and starchless confectionery moulding." The Manufacturing Confectioner 72, 5(1992): 69-78.
- Tamine, A.Y. "Microbiology of starter cultures. In Robisin, R.K." Dairy Microbiology Handbook. 3rd ed., New York: John Wiley and Sons, 2002.
- Toda, T., Sakamoto, A., Takayanagi, T., and Yokotsuka, K. "Changes in isoflavone composition of soybean during soaking process." Food Science and Technology Research, 6(2001): 314-319.
- Tsangalis, D., Ashton, J.F., Stojanovska, L., Wilcox, G., and Shah, N.P. "Development of an isoflavone aglycone-enriched soymilk using soy germ, soy protein isolate and bifidobacteria." Food Research International, 37(2004): 301-312.
- Wang, H.J., and Murphy, P.A. "Isoflavone content in commercial soybean foods." Journal of Agricultural and Food Chemistry 42, 8(1994a): 1666-1673.
- Wang, H.J., and Murphy, P.A. "Mass balance study of isoflavones during soybean processing." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44(1996): 2377-2383.
- Wang, H.L., Kraidej, L., and Hesseltine, C.W. "Lactic fermentation of soybean milk." Journal of Milk Food Technology, 37(1974): 71-73.

- Wang, Y.C., Yu, R.C., Yang, H.Y., and Chou, C.C. "Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with probiotic." Food Microbiology, 20(2003):333-338.
- Winter, J., Moore, L.H., Dowell, V.R., Jr., and Bokkenheuser, V.D. "C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria." Applied Environmental Microbiology, 55(1989): 1203-1208.
- Winton, A.L., and Winton, K.B. The Structure and Composition of Foods. Vol 3. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons, Inc, 1949.
- Woo, A. "Use of organic acids in confectionery." The Manufacturing Confectioner 78, 8(1998): 63-70.
- Xu, X., Harris, K.S., Wang, H.J., Murphy, P.A., and Hendrich, S. "Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in woman." Journal of Nutrition, 125(1995): 2307-2315.
- Yamanaka, Y., and Furukawa, N. "Studies on utilization of soybean protein for food manufacturingII: Influence of soymilk added to skim milk on the acidity and the hardness of curd produced by lactic bacteria for dairy use." Journal of Food Science and Technology, 17(1970): 456-461.

บทที่ 3

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวนส์ในกระบวนการหมักเทมเป้

บทคัดย่อ

ไอโซฟลาโวนส์เป็นสารที่มีโครงสร้างและทำหน้าที่คล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจนของผู้หญิงและพบในปริมาณสูงในเทมเป้ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาสถานะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิตเทมเป้ให้ได้ปริมาณไอโซฟลาโวนส์สูงสุด ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณของไอโซฟลาโวนส์ในเทมเป้ เพื่อเปรียบเทียบกับปริมาณไอโซฟลาโวนส์ในโยเกิร์ต ถั่วเหลืองในการทดลองถัดไป การทดลองได้วิเคราะห์ไอโซฟลาโวนส์ในถั่วเหลืองดิบที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเทมเป้ จากนั้นผลิตเทมเป้โดยการเติมเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* ในถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่คั่วคั้น ปอกเปลือกออก และนึ่งสุก โดยบ่มที่อุณหภูมิ 25, 35 และ 55 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างเทมเป้หลังจากการบ่มเป็นเวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมงมาสกัดและวิเคราะห์ไอโซฟลาโวนส์โดยวิธี HPLC ผลการทดลองพบว่า มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์ในถั่วเหลืองดิบวัดในรูปที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ได้ คือ daidzein และ genistein อยู่ในช่วง 2.97 ถึง 17.76 และ 3.52 ถึง 30.48 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง หลังบ่มจากเทมเป้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณของไอโซฟลาโวนส์สูงที่สุดที่ 48 ชั่วโมงและมีไอโซฟลาโวนส์วัดในรูป daidzein และ genistein อยู่ในช่วง 16.19 ถึง 55.49 และ 17.10 ถึง 84.44 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ แสดงว่าเชื้อราที่ใช้ในการหมักเทมเป้สามารถเพิ่มปริมาณไอโซฟลาโวนส์ให้สูงขึ้นเมื่อเทียบกับถั่วเหลืองดิบ

บทนำ

ไอโซฟลาโวนส์ เป็นสารประกอบฟีนอลิก (คัทนาล์, 2542) ที่จัดเป็น phytoestrogens ชนิดหนึ่ง มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนในร่างกายมนุษย์ (Beck และคณะ, 2003; Bronus, 2002) มีงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าไอโซฟลาโวนส์มีผลต่ออาการต่างๆที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนในผู้หญิงวัยทอง เช่น ช่วยป้องกันการสูญเสียมวลกระดูก (Alekel และคณะ, 2000; Anderson และ Carner, 1997; Potter และคณะ, 1998) ช่วยลดอาการร้อนวูบวาบ (Albertazzi และคณะ, 1998; Mukies และคณะ, 1995) ลดอาการช่องคลอดแห้ง (Brzezinski และคณะ, 1997) จึงมี

ผู้สนใจที่จะนำไอโซฟลาโวนส์มาใช้ทดแทนฮอร์โมนในผู้หญิงวัยทอง (Cassidy และคณะ, 1994) ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ที่แนะนำต่อวันคือ 60-100 มิลลิกรัมต่อวัน (Markiewicz และคณะ, 1993)

ไอโซฟลาโวนส์ในถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก เช่น soy protein, soy milk จะอยู่ในรูปของ Glucosides เป็นส่วนใหญ่ (Naim และคณะ, 1974) ส่วนในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก เช่น miso, tempeh จะประกอบด้วย Aglycones เป็นส่วนใหญ่ (Coward และคณะ, 1993) หลังจากรับประทานไอโซฟลาโวนส์เข้าไป ไอโซฟลาโวนส์ชนิด Glucosides จะผ่านการย่อยในลำไส้เล็กและปลดปล่อย Aglycones (Bowey และคณะ, 2003) ซึ่งเป็นไอโซฟลาโวนส์ที่อยู่ในรูปที่นำไปใช้ประโยชน์ได้ (Izumi และคณะ, 2000) มีรายงานว่าน้ำลายของมนุษย์สามารถเปลี่ยน Glucosides ไปอยู่ในรูปของ Aglycones (Allred และคณะ, 2001) ซึ่งทำให้ Aglycones ส่วนหนึ่งสามารถดูดซึมได้ในกระเพาะอาหาร ก่อนที่ส่วนใหญ่จะถูกดูดซึมในลำไส้เล็ก (Piskula และคณะ, 1999) ส่วนไอโซฟลาโวนส์ชนิด Glucosides นั้นจะดูดซึมได้ยากเพราะมีน้ำหนักและมีความชอบน้ำมากกว่า (Brown, 1988; Chang และ Nair, 1995) ไอโซฟลาโวนส์ชนิด Glucosides สามารถเปลี่ยนเป็นไอโซฟลาโวนส์ชนิด Aglycones ได้ด้วยเอนไซม์ β -glucosidase (Toda และคณะ, 2001) ที่ผลิตจากแบคทีเรียในลำไส้มนุษย์ ซึ่งการเปลี่ยนรูปไอโซฟลาโวนส์ให้อยู่ในรูปที่ร่างกายสามารถใช้ประโยชน์ได้ขึ้นอยู่กับความสามารถของแบคทีเรียในลำไส้ของแต่ละคน (Xu และคณะ, 1995) จึงมีงานวิจัยที่ศึกษาการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการหมักอาหารที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบเพื่อเปลี่ยนไอโซฟลาโวนส์ให้อยู่ในรูปที่ร่างกายสามารถใช้ประโยชน์ได้ และพบว่าเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ β -glucosidase ซึ่งเปลี่ยนไอโซฟลาโวนส์ชนิด Glucosides ให้อยู่ในรูปของ Aglycones ได้ เช่น *Lactobacilli* (Choi และคณะ, 1999; Matsuda และคณะ, 1994), *Bifidobacteria* (Jeon และคณะ, 2002; Winter และคณะ, 1989) และ *Rhizopus sp.* (Klus และ Barz, 1995)

เทมเป้เป็นอาหารหมักพื้นบ้านที่นิยมมากของอินโดนีเซีย เตรียมได้จากการหมักวัตถุดิบจำพวกเมล็ดธัญพืชด้วยเชื้อราสกุล *Rhizopus sp.* พบว่า *R. ferosaesis* และ *R. oligosporus* เหมาะสมสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์ในการทำเทมเป้มากที่สุด วัตถุดิบที่นิยมใช้ในการหมักเทมเป้ คือ ถั่วเหลือง ซึ่งการหมักจะสิ้นสุดลงเมื่อเชื้อราสร้างเส้นใยสีขาวปกคลุมวัตถุดิบอย่างหนาแน่นจนรวมตัวเป็นก้อน การหมักเทมเป้เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรตและสารประกอบ ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมี โดยเชื้อราจะผลิตเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ซึ่งทำให้ได้สารที่มีโมเลกุลเล็กลงหลายชนิด เช่น กรดอะมิโน กรดไขมัน น้ำตาลกลูโคส เป็นต้น กระบวนการหมักเทมเป้จะเพิ่มปริมาณของไอโซฟลาโวนส์ชนิด Aglycones คือ daidzein

และ genistein โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ β -glucosidase (Gyorgy และคณะ, 1964; Murakami และคณะ, 1984; Coward และคณะ, 1993; Wang และ Murphy, 1994a, 1996; Kaufman และคณะ, 1997; Murphy และคณะ, 1999) Hutchins และคณะ (1995) และ Slavin และคณะ (1998) รายงานว่าการหมักถั่วเหลืองสุกด้วยเชื้อ *Rhizopus oligosporus* จะเพิ่มปริมาณไอโซฟลาโวนส์ที่ร่างกายสามารถใช้ประโยชน์ได้ Murakami และคณะ (1984) ได้ศึกษาเปรียบเทียบชนิดของไอโซฟลาโวนส์ในอาหารจากถั่วเหลืองกับเทมเป้ที่หมักด้วยเชื้อ *Rhizopus oligosporus* เป็นเวลา 40 ชั่วโมง พบว่าในเทมเป้มีเฉพาะไอโซฟลาโวนส์ชนิด Aglycones เท่านั้นและไม่พบไอโซฟลาโวนส์ชนิด Glucosides

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวนส์ในกลุ่มของ Aglycones ซึ่งเป็นกลุ่มที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (bioactive compounds) ได้แก่ daidzein, genistein ในการหมักเทมเป้ ซึ่งในการหมักเทมเป้นี้จะใช้เชื้อ *Rhizopus oligosporus* โดยบ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน เพื่อศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มที่ทำให้เทมเป้มีปริมาณ daidzein และ genistein มากที่สุด เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับปริมาณ daidzein และ genistein ที่มีในโยเกิร์ตจากถั่วเหลือง หลังจากนั้นจะนำผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณ daidzein และ genistein มากที่สุดไปผลิตเป็นอาหารเพื่อสุขภาพสำหรับผู้หญิงวัยทองต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดไอโซฟลาโวนส์
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวนส์ในถั่วเหลืองที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเทมเป้ และเทมเป้ที่หมักเป็นระยะเวลาต่างกัน และนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับปริมาณไอโซฟลาโวนส์ในโยเกิร์ตถั่วเหลือง
3. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบอุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มที่ทำให้เทมเป้มีปริมาณ daidzein และ genistein มากที่สุด

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การคัดเลือกวิธีการสกัดไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ในเทมเป้

บดเทมเป้ด้วยโกร่ง ทำการสกัดโดยใช้ 4 วิธี คือ

1.1 การสกัดไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein โดยการ refluxed ด้วย 96% ethanol ผสมกับ 35% HCl ดัดแปลงวิธีของ Hui และคณะ (2001) ใช้ตัวอย่างบด จำนวน 2 กรัม สกัดด้วย 96% ethanol จำนวน 40 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.05% BHT และ 35% HCl จำนวน 10 มิลลิลิตร ทำการ refluxed นาน 4 ชั่วโมง นำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนของเหลวใสด้านบนไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

1.2 การสกัดไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ด้วย 80% methanol ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ดัดแปลงวิธีของ Li-Jun และคณะ (2004) ใช้ตัวอย่างบด จำนวน 2 กรัม สกัดด้วย 80% methanol จำนวน 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

1.3 การสกัดไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ด้วย 80% methanol ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ตามด้วยใช้ 50% methanol ผสมกับ n-Hexane ดัดแปลงวิธีของ Fukutake และคณะ (1996) ใช้ตัวอย่างบด จำนวน 10 กรัม สกัดด้วย 80% methanol จำนวน 100 มิลลิลิตร กวนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้น นำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 3800 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ละลายส่วนที่เหลือจากการระเหย (residues) ด้วย 50% methanol จำนวน 5 มิลลิลิตร และ n-Hexane จำนวน 20 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 4 ครั้ง นำไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator อีกครั้ง ละลายส่วนที่เหลือจากการระเหย (residues) ด้วย 80% methanol จำนวน 10 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 9000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

1.4 การสกัดไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ด้วย acetonitrile ผสมกับน้ำ ดัดแปลงวิธีของ Murphy และคณะ (2002) ใช้ตัวอย่างบด จำนวน 2 กรัม เติม acetonitrile จำนวน 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำ จำนวน 9 มิลลิลิตร กวนนาน 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.42 และระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ละลายส่วนที่เหลือจากการระเหย (residues) ด้วย 80% methanol จำนวน 15 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.42 และกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

สภาวะของเครื่อง HPLC (Agilant model 1100) คือ Column: Hypersil GOLD Column (5 μ m, 4.6 mm $\times$ 150 mm), Detector: Diode Array Detector วัดที่ความยาวคลื่น 260 nm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส Mobile phase: 4% acetic acid และ methanol (60:40), Flow rate: 1 ml/min, Injection volume: 10 μ l

2. การศึกษาปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ในถั่วเหลืองที่ใช้เป็นวัตถุดิบและในเทมเป้

2.1 การศึกษาปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ในถั่วเหลืองที่ใช้เป็นวัตถุดิบ นำถั่วเหลืองดิบมา คัดเฉพาะเมล็ดที่สมบูรณ์ บดด้วยเครื่องบดจนมีขนาด 100 mesh ทำการวิเคราะห์ปริมาณ daidzein และ genistein ตามวิธีการที่ได้จากข้อ 1

2.2 การศึกษาปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ในเทมเป้ เตรียมเทมเป้ โดยซังถั่วเหลืองดิบ จำนวน 500 กรัม เลือกเฉพาะเมล็ดที่สมบูรณ์ ล้างด้วยน้ำประปา 2 ครั้ง และแช่ในน้ำประปา อัตราส่วนถั่วเหลืองต่อน้ำเท่ากับ 1:4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นาน 14-16 ชั่วโมง และเปลือกออกและบีบเมล็ดถั่วให้แตกออกเป็น 2 ซีกด้วยมือ ล้างด้วยน้ำกรอง 1 ครั้ง ใส่น้ำส้มสายชูกลั่น ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตรร้อยละ 7.45 ของน้ำหนักถั่ว นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ทิ้งให้เย็นจนมีอุณหภูมิประมาณ 35 องศาเซลเซียส ใส่น้ำเชื้อ *Rhizopus oligosporus* ร้อยละ 0.2 คลุกเคล้าให้เข้ากันดี บรรจุลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 25, 35 และ 55 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างเทมเป้ทั้ง 3 อุณหภูมิทุก 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ปริมาณ daidzein และ genistein ตามวิธีการที่ได้จากข้อ 1

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกวิธีการสกัดไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ในเทมเป้

จากการวิเคราะห์ปริมาณ daidzein และ genistein โดยใช้วิธีการสกัด 4 วิธี คือ ได้ผลดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณ daidzein และ genistein ในเทมเป้ โดยใช้วิธีสกัด 4 วิธี

วิธีสกัด	daidzein ($\mu\text{g/g dry wt.}$)	genistein ($\mu\text{g/g dry wt.}$)
การ refluxed ด้วย 96% ethanol ผสมกับ 35% HCl	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ
การสกัดด้วย 80% methanol ที่อุณหภูมิ 80 °C	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ
การสกัดด้วย 80% methanol ที่อุณหภูมิ 60 °C ตามด้วยการใช้ 50% methanol ผสมกับ n-Hexane	11.3	11.6
การสกัดด้วย acetonitrile ผสมกับน้ำ	16.1	17.2

หมายเหตุ: ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

จากตารางที่ 4 พบว่า การสกัดโดยการ refluxed ด้วย 96% ethanol ผสมกับ 35% HCl ตัวอย่างจะเปลี่ยนเป็นสีดำหลังจากการ refluxed ส่วนการสกัดด้วย 80% methanol ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ตัวอย่างจะมีสีน้ำตาล และการสกัดทั้ง 2 วิธีนี้ตรวจไม่พบ daidzein และ genistein ทั้งนี้เนื่องจาก Aglycones จะเสียรูปไปเมื่อใช้ HCl ความเข้มข้นมากกว่า 1 นอร์มัล และการต้มที่ใช้ระยะเวลามากกว่า 2 ชม. (Wang และคณะ, 1990) ซึ่งผลที่ได้ขัดแย้งกับรายงานของ Hui และคณะ (2001) ที่ศึกษาไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein, genistein และ glycitein ในเต้าหู้ 23 ยี่ห้อ ทำการสกัดด้วยวิธี refluxed ด้วย 96% ethanol ผสมกับ 35% HCl และรายงานพบว่าพบไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein 0.39 ถึง 1.14 และ 0.38 ถึง 1.47 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ การสกัดด้วย 80% methanol ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ตามด้วยการใช้ 50% methanol ผสมกับ n-Hexane ได้ปริมาณ daidzein 11.3 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และได้ปริมาณ genistein 11.6 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนการสกัดโดยใช้ acetonitrile ผสมกับน้ำ ได้ปริมาณ daidzein 16.1 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และได้ปริมาณ genistein 17.2 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Barnes และคณะ (1994) และ Coward และคณะ (1998) ซึ่งรายงานว่าการสกัดด้วย 80% methanol ที่อุณหภูมิห้อง มีประสิทธิภาพมากกว่าการสกัดที่

อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Farmakalidis และ Murphy (1985) ได้รายงานว่าการสกัดด้วย acetonitrile-water, acetonitrile-HCl และ acetone-HCl มีประสิทธิภาพมากกว่าการสกัดด้วย 80% methanol

2. การศึกษาปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ในถั่วเหลืองที่ใช้เป็นวัตถุดิบและในเทมเป้

จากการวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ด้วย HPLC ได้ผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ปริมาณ daidzein และ genistein ในถั่วเหลืองดิบและในเทมเป้

ตัวอย่าง		ปริมาณ daidzein ($\mu\text{g/g dry wt.}$)	Range	ปริมาณ genistein ($\mu\text{g/g dry wt.}$)	Range
ถั่วเหลืองดิบ	ซ้ำที่ 1	2.97	10.37 $\pm$ 7.40	3.52	17.00 $\pm$ 13.48
	ซ้ำที่ 2	17.76		30.48	
เทมเป้ 24 ชั่วโมง	ซ้ำที่ 1	38.07	34.86 $\pm$ 3.22	48.05	51.76 $\pm$ 3.71
	ซ้ำที่ 2	31.64		55.47	
เทมเป้ 36 ชั่วโมง	ซ้ำที่ 1	19.49	31.94 $\pm$ 12.45	21.29	35.54 $\pm$ 14.25
	ซ้ำที่ 2	44.38		49.79	
เทมเป้ 48 ชั่วโมง	ซ้ำที่ 1	16.19	35.84 $\pm$ 19.65	17.10	50.77 $\pm$ 33.67
	ซ้ำที่ 2	55.49		84.44	

หมายเหตุ: ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

ในถั่วเหลืองดิบที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับทำเทมเป้ มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein อยู่ในช่วง 2.97 ถึง 17.76 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 3.52 ถึง 30.48 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งการทดลองนี้พบปริมาณ daidzein และ genistein น้อยกว่ารายงานของ Hutabarat และคณะ (2001) ซึ่งพบปริมาณ daidzein และ genistein ในถั่วดิบจาก

อเมริกา เท่ากับ 30.8 และ 72.3 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม, ปริมาณ daidzein และ genistein ใน ถั่วดิบจากอินโดนีเซีย เท่ากับ 127.7 และ 83.4 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม และพบปริมาณ daidzein และ genistein ในถั่วดิบจากออสเตรเลียเท่ากับ 96.4 และ 61.4 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณไอโซฟลาโวนส์ในถั่วเหลืองจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพื้นที่เพาะปลูก สถานที่ปลูก อายุการเก็บเกี่ยว และลักษณะภูมิประเทศ (Wang และ Murphy, 1994b; Mazur และ คณะ, 1998; Hoeck และคณะ, 2000) และสภาพภูมิอากาศ (Tsukamoto และคณะ, 1995) ถั่วเหลือง จากหลายพื้นที่เพาะปลูกของประเทศญี่ปุ่นมีอัตราส่วนของ malonyl isoflavones ต่อ glucosides สูง กว่าถั่วเหลืองที่ปลูกในอเมริกา (Wang และ Murphy, 1994b) การเก็บเกี่ยวเมล็ดถั่วเหลืองหลังจาก การเพาะปลูกในอุณหภูมิสูงจะทำให้ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Tsukamoto และคณะ, 1995)

จากการสุ่มตัวอย่างเทมเป้ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ daidzein และ genistein พบว่า การบ่ม เทมเป้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 55 องศาเซลเซียส นาน 24, 36 และ 48 ชั่วโมงไม่มีการ เจริญของเชื้อเทมเป้ เนื่องจากอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่ต่ำไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ของเชื้อเทมเป้ เชื้อจึงต้องใช้ระยะเวลาสำหรับปรับตัว จึงทำให้การเจริญของเชื้อใช้เวลานานกว่า ปกติ และอาจมีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญเติบโตแข่งกับเชื้อเทมเป้ ทำให้เชื้อเทมเป้ไม่สามารถ เจริญเติบโตได้ ส่วนการบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่สูงเกินไป ทำให้น้ำในถั่ว เหลืองระเหยออกมามากจนทำให้ถั่วเหลืองมีลักษณะแฉะจนไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ การ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่า ภายใน 24 ชั่วโมง เชื้อมีการเจริญและสร้างเส้นใยสีขาว บางๆ ปกคลุมบนผิวหน้าของถั่วเหลืองทั้งด้านบนและด้านล่างของจานเลี้ยงเชื้อ และ เมื่อบ่มครบ 48 ชั่วโมง เทมเป้จะมีเส้นใยหนาและถั่วเหลืองจับตัวกันแน่น อุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มเทมเป้ คือ 30-37 องศาเซลเซียส การบ่มที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส จะทำให้เชื้อชนิดอื่นเจริญได้ และอาจมีการสร้างสารพิษ ทำให้เชื้อเทมเป้เจริญไม่ได้ และการบ่มที่อุณหภูมิมากกว่า 40 องศาเซลเซียสจะทำให้เทมเป้ที่ได้มีคุณภาพไม่ดี (Hedger, 1982)

พบว่า เทมเป้จะมีปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein เพิ่มขึ้นจากถั่ว เหลืองดิบ และเทมเป้ที่บ่มเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein สูงที่สุด แสดงว่า เชื้อรา *Rhizopus oligosporus* ที่ใช้ในการหมักเทมเป้สามารถเพิ่มปริมาณ ไอโซฟลาโวนส์ให้สูงขึ้นเมื่อเทียบกับถั่วเหลืองดิบ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Hutchins และคณะ (1995) และ Slavin และคณะ (1998) ที่รายงานว่า การหมักถั่วเหลืองสุกด้วยเชื้อ *Rhizopus oligosporus* จะเพิ่มปริมาณไอโซฟลาโวนส์ที่ร่างกายสามารถใช้ประโยชน์ได้

สรุป

1. การสกัดด้วย acetonitrile ผสมกับน้ำ อัตราส่วน 10 ต่อ 9 ได้ปริมาณ daidzein และ genistein สูงกว่าการสกัดด้วย 96% ethanol ผสมกับ 35% HCl, การสกัดด้วย 80% methanol ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสและการสกัดด้วย 80% methanol ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ตามด้วยการใช้ 50% methanol ผสมกับ n-Hexane
2. ในถั่วเหลืองดิบที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเทมเป้ มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์วัดในรูปแบบที่สามารถนำไปใช้ได้ คือ daidzein และ genistein อยู่ในช่วง 2.97 ถึง 17.76 และ 3.52 ถึง 30.48 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง หลังบ่มจากเทมเป้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณของไอโซฟลาโวนส์สูงที่สุดที่ 48 ชั่วโมงและมีไอโซฟลาโวนส์วัดในรูปแบบ daidzein และ genistein อยู่ในช่วง 16.19 ถึง 55.49 และ 17.10 ถึง 84.44 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

- คัคนางค์ ทองสุก. “ถั่วเหลืองอาหารสุขภาพ.” วารสารอาหาร, 3(2542): 212-213.
- Albertazzi, P., Pansini, F., Bonaccorsi, G., Zanotti, L., Forini, E., and De Aloysio, D. “The effects of soy supplementation on hot flashes.” Obstetrics and Gynecology, 91(1998): 6-11.
- Alekel, D.L., Germain, A.S., Peterson, C.T., Hanson, K.B., Steward, J.W., and Toda, T. “isoflavone-rich soy protein isolate attenuate bone loss in the lumbar spine of perimenopausal woman.” American Journal of Clinical Nutrition, 72(2000): 844-852.
- Allred, C.D., Ju, Y.H., Allred, K.F., Chang, J., and Helferich, W.G. “Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observes with genistein.” Carcinogenesis 22, 10(2001): 1667-1673.
- Anderson, J.J.B., and Carner, S.C. “The effects of phytoestrogens on bone.” Nutritional Research, 17(1997): 1617-1632.

- Barnes, S., Kirk, M., and Coward, L. "Isoflavones and their conjugates in soy food: extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectrometry." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42(1994): 2466-2474.
- Beck, V., Unterrieder, E., Krenn, L., Kubelka, W., and Jungbauer, A. "Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy." The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 84(2003): 259-268.
- Bowey, E., Adlercreutz, H., and Rowland, I. "Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats." Food and Chemical Toxicology 41, 5(2003): 631-636.
- Bronus, F. "Soya isoflavones: a new promising ingredient for the health food sector." Journal of Food Research International, 35(2002): 187-193.
- Brown, J.P. Hydrolysis of glycosides and esters. In role of the gut flora in toxicity and cancer. San Diego: Academic Press, 1988.
- Brzezinski, A., Adlercreutz, H., Shaoul, R., Rosler, A., Shmueli, A., Tanos, V., and Schenker, G.J. "Short-term effects of phytoestrogen-rich diet on postmenopausal woman." Menopause, 4(1997): 89-94.
- Cassidy, A., Bingham, S., and Setchell, K.D.R. "Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women." American Journal of Clinical Nutrition, 60(1994): 333-340.
- Chang, Y., and Nair, M.G. "Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria." Journal of Natural Products, 58(1995): 1892-1896.
- Choi, Y., Woo, J.G., and Noh, W.S. "Hydrolysis of β -glucosidase bonds of isoflavone conjugates in the lactic acid fermentation of soymilk." Korean Journal of Food Science and Technology, 31(1999): 189-195.

- Coward, L., Smith, M., Kirk, M., and Barnes, S. "Chemical modification of isoflavones in soy food during cooking and processing." American Journal of Clinical Nutrition 68(suppl) (1998): 1486s-1491s.
- Farmakalidis, E., and Murphy, P. "Isolation of 6"-O-acetylgenistin and 6"-O-acetyldaidzin from toasted defatted soy flakes." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 33(1985): 385-389.
- Fukutake, M., Takahashi, M., Ishida, K., Kawamura, H., Sugimura, T., and Wakabayashi, K. "Quantification of Genistein and Genistin in Soybeans and Soybean Products." Food and Chemical Toxicology, 34(1996): 47-461.
- Gyorgy, P., Murata, K., and Ikehata, H. "Antioxidants isolated from fermented soybeans (tempeh)." Nature, 203(1964): 870-871.
- Hedger, J.N. "Production of Tempe, an Indonesian Fermented Food." [online]. Accessed 20 December 2005. Available from:<http://www.ncbe.readind.ac.uk/NCBE/PROTOCOLS/PRACBIOTECH/PDF/hedger.pdf>.
- Hoeck, J.A., Fehr, W.R., Murphy, P.A., and Welke, G.A. "Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean." Crop Science, 40(2000): 48-51.
- Hui, E., Henning, S.M., Park, N., Heber, D., and Go, V.L.W. "Genistein and daidzein/ glycitein content in tofu." Journal of Food Composition and Analysis, 14(2001): 199-206.
- Hutabarat, L.S., Greenfield, H., and Mulholland, M. "Isoflavones and Coumestrol in Soybeans and Soybean Products from Australia and Indonesia." Journal of Food Composition and Analysis, 14(2001): 43-58.
- Hutchins, A.M., Slavin, J.L., and Lampe, J.W. "Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products." Journal of the American Diet Association, 95(1995): 545-551.
- Izumi, T., Piskula, M., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Kubota, Y., and Kikuchi, M. "Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans." Journal of Nutrition 130, 7(2000): 1695-1699.

- Jeon, K.S., Ji, G.E., and Hwang, I.K. "Assay of β -glucosidase activity of bifidobacteria and hydrolysis of isoflavone glycosidase by *Bifidobacterium* sp. Int-57 in soymilk fermentation." Journal of Microbiology and Biotechnology, 12(2002): 8-13.
- Kaufman, P.B., Duke, J.A., Brielmann, H., Boik, J., and Hoyt, J.E. "A comprehensive survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: implication for human nutrition and health." Journal of Alternate Complementary Medicine, 3(1997): 7-22.
- Klus, K., and Barz, W. "Formation of polyhydroxylated isoflavones from the soybean seed isoflavones daidzein and glycitein by bacteria isolated from tempe." Archives of Microbiology, 164(1995): 428-434.
- Li-Jun, Y., Li-Te, L., Zai-Gui, L., Tatsumi, E., and Saito, M. "Changes in isoflavone contents and composition of sufu (ferment tofu) during manufacturing." Food Chemistry, 87(2004): 587-592.
- Markiewicz, L., Garey, J., Adlercreutz, Z., and Gurpide, E. "In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens." Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 45(1993): 399-405.
- Matsuda, S., Norimoto, F., Matsumoto, Y., Ohba, R., Teramoto, Y., and Ohta, N. "Solubilization of novel isoflavone glycoside hydrolyzing β -glucosidase from *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus*." Journal of Fermentation and Bioengineering, (1994): 77439-77441.
- Mazur, W.M., Duke, J.A., Wahala, K., Rasku, S., and Adlercreutz, H. "Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans." The Journal of Nutritional Biochemistry, 9(1998): 193-200.
- Mukies, A.L., Lombard, C., Strauss, B.J.G., Wilcox, G., Burger, H.G., and Morton, M.S. "Dietary flower supplementation decreases post-menopausal hot flushes: effect of soy and wheat." Maturitas, 21(1995): 189-195.
- Murakami, H., Asakawa, T., Tero, J., and Matsushita, S. "Antioxidant stability of tempeh and liberation of isoflavones by fermentation." Agricultural and Biological Chemistry, 48(1984): 2971-2975.

- Murphy, P.A., Song, T., Buseman, G., Baru, K., Beecher, G.R., Trainer, D., and Holden, J. "Isoflavones in retail and institutional soy foods." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(1999): 2697-2704.
- Murphy, P.A., Barua, K., and Hauck, C.C. "Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods." Journal of Chromatography B, 777(2002): 129-138.
- Naim, M., Gestetner, B., and Zilkah, S. "Soybean isoflavones characterization, determination, and antifungal activity." Journal of Agricultural and Food Chemistry 22, 5(1974): 806-810.
- Piskula, M.K., Yamakoshi, J., and Iwai, Y. "Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach." Federation of European Biochemical Societies Letters, 447(1999): 287-291.
- Potter, S.M., Baum, J.A., Teng, G., Stillman, R.J., Shay, N.F., and Erdman, J.W. "Soya protein and isoflavones: their effect on blood lipids and bone density in postmenopausal woman." American Journal of Clinical Nutrition, 68(1998): 1375s-1379s.
- Slavin, J.L., Karr, S.C., Hutchins, A.M., and Lampe, J.W. "Influence of soybean processing, habitual diet, and soy dose on urinary isoflavonoid excretion." American Journal of Clinical Nutrition, 68(1998): 1492s-1495s.
- Toda, T., Sakamoto, A., Takayanagi, T., and Yokotsuka, K. "Changes in isoflavone composition of soybean during soaking process." Food Science and Technology Research, 6(2001): 314-319.
- Tsukamoto, C., Shimada, S., Igita, K., Kudou, S., Kokubun, M., Okubo, K., and Kitamura, K. "Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins and composition of fatty acids at different temperatures during seed development." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43(1995): 1184-1192.
- Wang, G., Kuan, S.S., Francis, O.J., Ware, G.M., and Carman, A.S. "A Simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38(1990): 185-190.

- Wang, H.J., and Murphy, P.A. "Isoflavone content in commercial soybean foods." Journal of Agricultural and Food Chemistry 42, 8(1994a): 1666-1673.
- Wang, H.J., and Murphy, P.A. "Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year and location." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42(1994b): 1674-1677.
- Wang, H.J., and Murphy, P.A. "Mass balance study of isoflavones during soybean processing." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44(1996): 2377-2383.
- Winter, J., Moore, L.H., Dowell, V.R., Jr., and Bokkenheuser, V.D. "C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria." Applied Environmental Microbiology, 55(1989): 1203-1208.
- Xu, X., Harris, K.S., Wang, H.J., Murphy, P.A., and Hendrich, S. "Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in woman." Journal of Nutrition, 125(1995): 2307-2315.

บทที่ 4

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวนส์ในกระบวนการหมักโยเกิร์ตจากถั่วเหลือง

บทคัดย่อ

เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Lactobacilli* และ *Bifidobacteria* สามารถเปลี่ยนไอโซฟลาโวนส์ชนิด glucosides ซึ่งเป็นไอโซฟลาโวนส์ที่อยู่ในรูปที่ร่างกายดูดซึมและนำไปใช้ประโยชน์ได้ยาก ให้อยู่ในรูปของไอโซฟลาโวนส์ชนิด aglycones ซึ่งเป็นไอโซฟลาโวนส์ที่อยู่ในรูปที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (daidzein, genistein และ glycitein) งานวิจัยนี้มุ่งเน้นผลิตอาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลืองที่มีไอโซฟลาโวนส์ชนิดที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อยู่ในปริมาณที่สูงเพียงพอสำหรับผู้หญิงวัยทอง ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ในกระบวนการหมักโยเกิร์ตจากถั่วเหลืองโดยใช้เชื้อ 2 กลุ่ม คือ เชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* และเชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* และ *Bifidobacterium bifidum* ทำการวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ในถั่วเหลืองดิบ, น้านมถั่วเหลือง และโยเกิร์ตที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อทั้งสองกลุ่มเป็นระยะเวลา 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 ชั่วโมง เพื่อหาระยะเวลาในการหมักโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองที่มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein สูงสุดด้วยเครื่อง HPLC จากการศึกษาพบว่า การใช้เชื้อ *Bifidobacterium bifidum* ร่วมกับเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* ในการหมักโยเกิร์ตจากถั่วเหลืองทำให้มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ซึ่งเป็นไอโซฟลาโวนส์ในรูปที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มีปริมาณสูงขึ้น และมีปริมาณมากกว่าการหมักโยเกิร์ตจากถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์โยเกิร์ตเพียงอย่างเดียว โดยที่การหมักโยเกิร์ตจากถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *Bifidobacterium bifidum* ร่วมกับเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส ทำให้มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein สูงที่สุดคือ มีปริมาณเท่ากับ 40.03 ถึง 70.38 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 88.74 ถึง 174.09 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

บทนำ

ถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองมีปริมาณไอโซฟลาโวนส์ หรือ phytoestrogens อยู่ในปริมาณสูง ไอโซฟลาโวนส์มีผลต่ออาการต่างๆที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนในผู้หญิงวัยทอง เนื่องจากมีโครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมน estrogens ในร่างกายมนุษย์ เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Lactobacilli* (Choi และคณะ, 1999; Matsuda และคณะ, 1994) และ *Bifidobacteria* (Jeon และคณะ, 2002) สามารถเปลี่ยนไอโซฟลาโวนส์ชนิด glucosides ซึ่งเป็นไอโซฟลาโวนส์ที่อยู่ในรูปที่ร่างกายดูดซึมและนำไปใช้ประโยชน์ได้ยาก ให้อยู่ในรูปของไอโซฟลาโวนส์ชนิด aglycones ซึ่งเป็นไอโซฟลาโวนส์ที่อยู่ในรูปที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (daidzein และ genistein)

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ในกระบวนการหมักโยเกิร์ตจากถั่วเหลืองโดยเปรียบเทียบระหว่างเชื้อ 2 กลุ่ม คือ เชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* และเชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* และ *Bifidobacterium bifidum*
2. เพื่อศึกษาระยะเวลาในการบ่มที่ทำให้โยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองมีปริมาณ daidzein และ genistein สูงที่สุด

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาปริมาณไอโซฟลาโวนส์ในวัตถุดิบก่อนทำโยเกิร์ตนมถั่วเหลือง

โดยใช้ถั่วเหลืองเต็มเมล็ด คัดเฉพาะเมล็ดที่สมบูรณ์ บดด้วยเครื่องบดจนมีขนาด 100 mesh ทำการสกัดไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein โดยดัดแปลงวิธีการสกัดไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ตามวิธีของ Murphy และคณะ (2002) ใช้ตัวอย่างบด จำนวน 2 กรัม เติม acetonitrile จำนวน 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำ จำนวน 9 มิลลิลิตร กวนนาน 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.42 และระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ละลายส่วนที่เหลือจากการระเหย (residues) ด้วย 80% methanol จำนวน 7 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

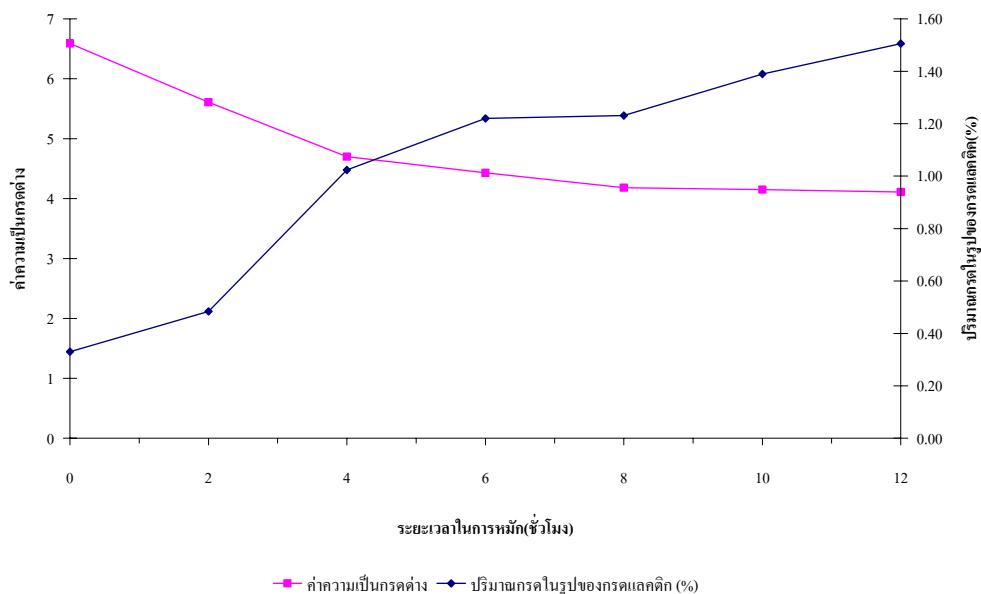
2. การศึกษาปริมาณไอโซฟลาโวนส์ในกระบวนการผลิตโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองโดยใช้เชื้อ 2 กลุ่ม

แช่ถั่วเหลืองในน้ำ อัตราส่วนน้ำต่อถั่ว 4:1 นาน 16 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำประปา 2 ครั้ง และเปลือกออกและล้างด้วยน้ำกรอง 1 ครั้ง ลวกถั่วในน้ำอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จากนั้นบดถั่วกับน้ำ อัตราส่วนถั่วต่อน้ำ 1:2 โดยน้ำหนัก ด้วยเครื่องปั่นผสม กรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น จากนั้นเตรียมส่วนผสมจากการผสมนํ้านมถั่วเหลือง 92% ถั่วเหลืองผง 7% น้ำตาลกลูโคส 0.8% และเจลาติน 0.2% ให้มีปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 16 นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็นจนมีอุณหภูมิ 43-45 องศาเซลเซียส นำไปวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ตามวิธีการของ Murphy และคณะ(2002) และปริมาณของแข็งทั้งหมด(AOAC, 1995) เดิมหัวเชื้อโยเกิร์ตสำเร็จรูป 2 กลุ่มคือ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* ปริมาณ 0.02% และ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* ปริมาณ 0.02% และ *Bifidobacterium bifidum* ปริมาณ 0.1% เขย่าให้เข้ากันดี แบ่งใส่ขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปิดฝาทันที บ่มที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2,4,6,8,10 และ 12 ชั่วโมงนำไปวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ตามวิธีการของ Murphy และคณะ(2002) นำโยเกิร์ตที่มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์สูงที่สุดไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพต่อไป

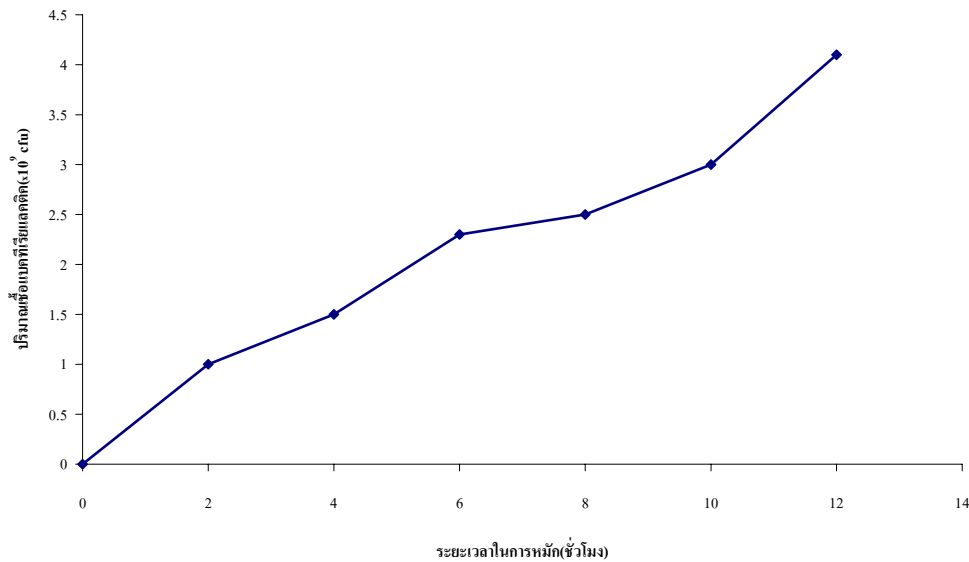
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การผลิต และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวนส์ ในกระบวนการผลิตโยเกิร์ตจากนํ้านมถั่วเหลือง โดยใช้เชื้อ 2 กลุ่ม

การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างและปริมาณกรดในรูปของกรดแลคติกระหว่างกระบวนการหมักโยเกิร์ตถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* แสดงดังรูปที่ 12 และปริมาณเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียในระหว่างการหมักโยเกิร์ตถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* แสดงดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างและปริมาณกรดแลคติกในระหว่างกระบวนการหมักโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus*



รูปที่ 11 ปริมาณเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการหมักโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus*

จากรูปที่ 10 และ 11 จะเห็นว่า การหมักนมถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* ทำให้ค่าความเป็นกรดต่างของนมถั่วเหลืองลดลงจาก 6.59 เมื่อ

เริ่มต้นการหมัก เป็น 4.11 เมื่อหมักเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ในขณะที่ปริมาณกรดในรูปกรดแลคติกเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.33 เป็นร้อยละ 1.51 และปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกเพิ่มขึ้น เป็น 4.1×10^9 cfu เมื่อหมักเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง นำถั่วเหลืองดิบ น้ำนมถั่วเหลือง และโยเกิร์ตที่หมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* มาวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ได้ค่าดังแสดงในตารางที่ 6 และ 7

ตารางที่ 6 ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein ในถั่วเหลืองดิบ น้ำนมถั่วเหลืองและโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus*

ตัวอย่าง		ปริมาณ daidzein (ไมโครกรัมต่อ กรัมน้ำหนักแห้ง)	Range
ถั่วเหลืองดิบ	ครั้งที่ 1	2.97	10.37 $\pm$ 7.40
	ครั้งที่ 2	17.76	
น้ำนมถั่วเหลือง	ครั้งที่ 1	16.08	27.08 $\pm$ 11.00
	ครั้งที่ 2	38.08	
หมักเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	26.79	26.31 $\pm$ 0.48
	ครั้งที่ 2	25.83	
หมักเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	24.67	23.55 $\pm$ 1.12
	ครั้งที่ 2	22.43	
หมักเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	25.43	29.24 $\pm$ 3.81
	ครั้งที่ 2	33.04	
หมักเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	33.00	26.91 $\pm$ 6.09
	ครั้งที่ 2	20.82	
หมักเป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	36.56	29.81 $\pm$ 6.75
	ครั้งที่ 2	23.06	
หมักเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	20.20	30.75 $\pm$ 10.55
	ครั้งที่ 2	41.30	

หมายเหตุ : ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

ตารางที่ 7 ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด genistein ในถั่วเหลืองดิบ น้านมถั่วเหลืองและโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus*

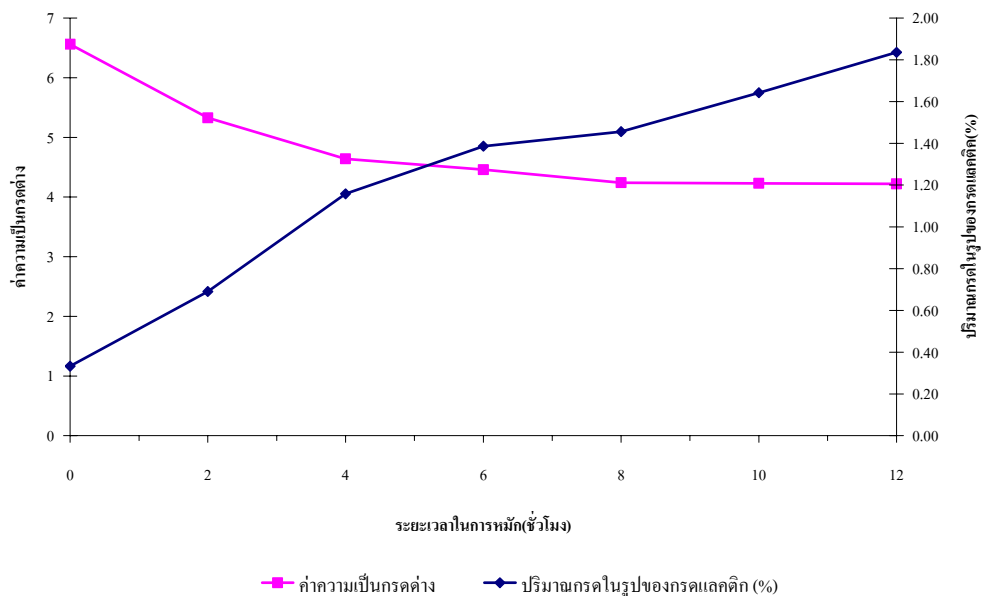
ตัวอย่าง		ปริมาณ genistein (ไมโครกรัมต่อ กรัมน้ำหนักแห้ง)	Range
ถั่วเหลืองดิบ	ครั้งที่ 1	3.52	17.00±13.48
	ครั้งที่ 2	30.48	
น้านมถั่วเหลือง	ครั้งที่ 1	45.50	66.75±21.25
	ครั้งที่ 2	88.00	
หมักเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	59.22	54.47± 4.74
	ครั้งที่ 2	49.73	
หมักเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	58.96	52.73± 6.24
	ครั้งที่ 2	46.49	
หมักเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	49.07	60.17±11.10
	ครั้งที่ 2	71.26	
หมักเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	60.06	51.92± 8.14
	ครั้งที่ 2	43.78	
หมักเป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	70.45	58.18±12.27
	ครั้งที่ 2	45.91	
หมักเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	47.75	70.88±23.12
	ครั้งที่ 2	94.00	

หมายเหตุ : ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

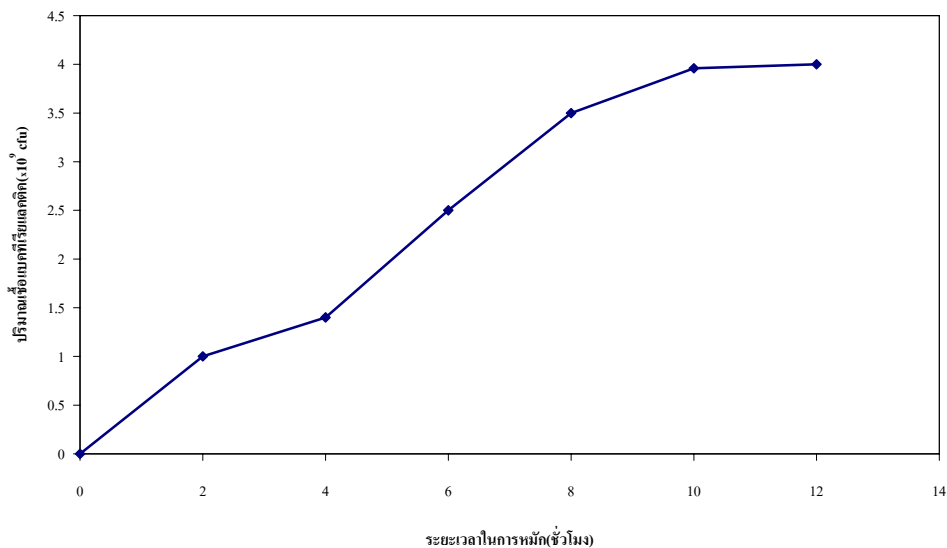
จากตารางที่ 6 และ 7 พบว่า ในถั่วเหลืองดิบ มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein อยู่ในช่วง 2.97 ถึง 17.76 และ 3.52 ถึง 30.48 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง โยเกิร์ตที่หมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์สูงกว่าในถั่วเหลืองดิบ และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์สูงที่สุดเมื่อหมักเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง คือ มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein อยู่ในช่วง 20.20

ถึง 41.30 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 47.75 ถึง 94.00 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จะเห็นว่าปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ในโยเกิร์ตที่หมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* มีค่าใกล้เคียงกันมาก ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะเชื้อทั้งสองชนิดนี้เป็นเชื้อที่ใช้หมักโยเกิร์ตจากนํ้านมโค ซึ่งมีองค์ประกอบแตกต่างจากนํ้าถั่วเหลือง โดยเฉพาะคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ เนื่องจากเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* ไม่สามารถใช้นํ้าตาลซูโครสได้จึงทำให้มีการเจริญเติบโตและสร้างกรดได้น้อย ในขณะที่เชื้อ *Streptococcus thermophilus* สามารถย่อยนํ้าตาลซูโครสในนํ้านมถั่วเหลืองได้ดี จึงมีการเจริญเติบโตและผลิตกรดได้มากกว่า ดังนั้นการย่อยสลาย oligosaccharide ในนํ้านมถั่วเหลืองเปลี่ยนเป็นกรดแลกติกต้องใช้เวลามากกว่า 10 ชั่วโมง เพื่อลดระดับความเป็นกรดต่างของนํ้านมถั่วเหลืองลงจาก 6.5 เป็น 4.7 และ 4.3 สำหรับเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* ตามลำดับ (เรณู, 2523) จึงต้องใช้เชื้อทั้ง 2 ชนิดเพื่อให้ *Streptococcus thermophilus* ใช้ sucrose หรือผลผลิตที่ได้จากการย่อย sucrose ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* ดังนั้น การสร้างกรดแลกติกในผลิตภัณฑ์ให้ดีและมีปริมาณสูง จำเป็นต้องใช้เชื้อโยเกิร์ตทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน และถ้าผลิตภัณฑ์จากนมถั่วเหลืองที่ได้มีปริมาณของแข็งรวม(total solid) สูง จะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะและความหนืดแตกต่างจากการใช้นํ้านมโค(Ariyama, 1963)

การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างและปริมาณกรดในรูปของกรดแลกติกระหว่างกระบวนการหมักโยเกิร์ตถั่วเหลืองด้วย *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* และเชื้อ *Bifidobacterium bifidum* แสดงดังรูปที่ 12 และปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติกในระหว่างการหมักโยเกิร์ตถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* และเชื้อ *Bifidobacterium bifidum* แสดงดังรูปที่ 13



รูปที่ 12 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างและปริมาณกรดแลคติกในระหว่างกระบวนการหมักโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* และเชื้อ *Bifidobacterium bifidum*



รูปที่ 13 ปริมาณเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการหมักโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* และเชื้อ *Bifidobacterium bifidum*

จากรูปที่ 12 และ 13 พบว่า ค่าความเป็นกรดต่างของนมถั่วเหลืองลดลงจาก 6.56 เป็น 4.22 ในขณะที่ปริมาณกรดในรูปกรดแลกติกเพิ่มขึ้น จาก 0.33 เป็น 1.84 เมื่อหมักเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง และเมื่อหมักเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติก 4×10^9 cfu ค่าความเป็นกรดต่างจากการทดลองใกล้เคียงกับรายงานของเรณู(2523) ซึ่งรายงานไว้ว่า เชื้อ *Streptococcus citrovorus*(Leu. *Cremoris*), *Streptococcus paracitrovorus*(Leu. *Dextranicum*) และ *Streptococcus lactis* สามารถสร้างกรดแลกติกได้เพียงครึ่งหนึ่งของนมโค เชื้อจะย่อยสลาย Oligosaccharide ใน นมถั่วเหลืองเปลี่ยนเป็นกรดแลกติก โดยใช้เวลานานกว่า 10 ชั่วโมง เพื่อลดระดับความเป็นกรดต่างของนมถั่วเหลืองลงจาก 6.5 เป็น 4.7 และ 4.3 สำหรับเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* ตามลำดับ(เรณู, 2523) ทั้งนี้ปริมาณกรดแลกติกที่ได้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตของเชื้อแต่ละชนิดด้วย พบว่า ปริมาณกรดแลกติกในนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* และเชื้อ *Bifidobacterium bifidum* สูงกว่านมถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* ในขณะที่ค่าความเป็นกรดต่างลดลงอยู่ในช่วงใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wang และคณะ(2003) ที่ศึกษาปริมาณน้ำตาลและกรดในนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยแบคทีเรียแลกติกอย่างเดียวและใช้แบคทีเรียแลกติกร่วมกับ *Bifidobacteria* และพบว่า โยเกิร์ตนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยแบคทีเรียแลกติกร่วมกับ *Bifidobacteria* สามารถผลิตน้ำตาล sucrose, fructose, glucose, galactose และ acetic acid ได้สูงกว่าในขณะที่ raffinose และ stachyose มีปริมาณลดลงมากกว่ากลุ่มการทดลองที่ใช้แบคทีเรียแลกติกเพียงอย่างเดียว

ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ในถั่วเหลืองดิบ นมถั่วเหลือง และ โยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อผสมระหว่าง *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* ร่วมกับเชื้อ *Bifidobacterium bifidum* ดังแสดงในตารางที่ 8 และ 9

ตารางที่ 8 ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein ในถั่วเหลืองดิบ นํ้านมถั่วเหลือง และโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* และเชื้อ *Bifidobacterium bifidum*

ตัวอย่าง	ปริมาณ daidzein (ไมโครกรัมต่อ กรัมน้ำหนักแห้ง)	Range
ถั่วเหลืองดิบ	ครั้งที่ 1	2.97 10.37± 7.40
	ครั้งที่ 2	17.76
นํ้านมถั่วเหลือง	ครั้งที่ 1	16.08 27.08±11.00
	ครั้งที่ 2	38.08
หมักเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	36.75 45.73± 8.98
	ครั้งที่ 2	54.71
หมักเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	40.03 55.21±15.17
	ครั้งที่ 2	70.38
หมักเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	45.95 46.55± 0.59
	ครั้งที่ 2	47.14
หมักเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	36.69 47.68±10.99
	ครั้งที่ 2	58.67
หมักเป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	47.49 44.56± 2.94
	ครั้งที่ 2	41.62
หมักเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	50.95 49.39± 1.56
	ครั้งที่ 2	47.83

หมายเหตุ : ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

ตารางที่ 9 ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด genistein ในถั่วเหลืองดิบ น้านมถั่วเหลือง และโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* และเชื้อ *Bifidobacterium bifidum*

ตัวอย่าง		ปริมาณ genistein (ไมโครกรัมต่อ กรัมน้ำหนักแห้ง)	Range
ถั่วเหลืองดิบ	ครั้งที่ 1	3.52	17.00±13.48
	ครั้งที่ 2	30.48	
น้านมถั่วเหลือง	ครั้งที่ 1	45.50	66.75±21.25
	ครั้งที่ 2	88.00	
หมักเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	75.34	103.65±28.31
	ครั้งที่ 2	131.95	
หมักเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	88.74	131.42±42.68
	ครั้งที่ 2	174.09	
หมักเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	107.49	115.88± 8.39
	ครั้งที่ 2	124.27	
หมักเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	88.17	122.63±34.46
	ครั้งที่ 2	157.08	
หมักเป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	122.61	120.39± 2.23
	ครั้งที่ 2	118.16	
หมักเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	133.37	130.51± 2.86
	ครั้งที่ 2	127.65	

หมายเหตุ : ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

จากตารางที่ 8 และ 9 พบว่าโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* และ *Bifidobacterium bifidum* มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein สูงกว่าในถั่วเหลืองดิบ และในน้านมถั่วเหลือง ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ มีปริมาณสูงที่สุดเมื่อหมักเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง คือมีปริมาณไอโซฟลาโวนส์

ชนิด daidzein และ genistein อยู่ในช่วง 40.03 ถึง 70.38 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 88.74 ถึง 174.09 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ยังพบว่าไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ในโยเกิร์ตที่หมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* ร่วมกับเชื้อ *Bifidobacterium bifidum* ปริมาณสูงกว่าในโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* ซึ่งการทดลองนี้พบปริมาณ daidzein และ genistein ในถั่วเหลืองคิบน้อยกว่ารายงานของนักวิจัยอื่น เช่น Hutabarat และคณะ (2001) พบว่าปริมาณ daidzein และ genistein ในถั่วคิบบจากอเมริกา เท่ากับ 30.8 และ 72.3 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม ปริมาณ daidzein และ genistein ในถั่วคิบบจากอินโดนีเซีย เท่ากับ 127.7 และ 83.4 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม และพบปริมาณ daidzein และ genistein ในถั่วคิบบจากออสเตรเลีย เท่ากับ 96.4 และ 61.4 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณไอโซฟลาโวนส์ในถั่วเหลืองจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพื้นที่เพาะปลูก สถานที่ปลูก อายุการเก็บเกี่ยว และลักษณะภูมิประเทศ (Wang และ Murphy, 1994b; Mazur และคณะ, 1998; Hoeck และคณะ, 2000) และสภาพภูมิอากาศ (Tsukamoto และคณะ, 1995) ถั่วเหลืองจากหลายพื้นที่เพาะปลูกของประเทศญี่ปุ่น มีอัตราส่วนของ malonyl -isoflavones ต่อ glucosides สูงกว่าถั่วเหลืองที่ปลูกในอเมริกา (Wang และ Murphy, 1994b) การเก็บเกี่ยวเมล็ดถั่วเหลืองหลังจากการเพาะปลูกในอุณหภูมิสูงจะทำให้ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Tsukamoto และคณะ, 1995) Tsangalis และคณะ (2004) รายงานว่าเชื้อ *Bifidobacterium* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในลำไส้ของมนุษย์ ซึ่งสามารถเจริญเติบโตในนมถั่วเหลืองได้และจะย่อย glucosides isoflavones ให้เปลี่ยนรูปเป็น aglycones isoflavones และจากการทดลองนี้ พบว่า ไอโซฟลาโวนส์ชนิด genistein มีปริมาณสูงกว่า ไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein ซึ่งการทดลองนี้ได้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Pyo และคณะ (2005), Murphy และคณะ (1999) และ Tsangalis และคณะ (2003) แต่ในการทดลองนี้พบว่าปริมาณไอโซฟลาโวนส์ในโยเกิร์ตถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus* มีปริมาณน้อยกว่ารายงานของ Chien และคณะ (2006) ซึ่งกล่าวไว้ว่าในโยเกิร์ตถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus* มีปริมาณ daidzein และ genistein สูงที่สุดเมื่อเทียบกับเชื้อ *Bifidobacterium infantis* และเชื้อ *Streptococcus thermophilus* ผสมกับเชื้อ *Bifidobacterium infantis* คือมีปริมาณเท่ากับ 29.65 ± 2.08 และ 22.79 ± 1.05 $\mu\text{g/ml}$ และเมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมงพบว่ามีปริมาณ daidzein และ genistein เท่ากับ 13.86 ± 0.91 $\mu\text{g/ml}$ และ 6.34 ± 0.59 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

สรุป

โยเกิร์ตที่หมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์สูงสุดเมื่อหมักเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง คือ มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein อยู่ในช่วง 20.20 ถึง 41.30 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 47.75 ถึง 94.00 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ

Streptococcus thermophilus, *Lactobacillus bulgaricus* และ *Bifidobacterium bifidum* มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein สูงที่สุดเมื่อหมักเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง คือ มีปริมาณอยู่ในช่วง 40.03 ถึง 70.38 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 88.74 ถึง 174.09 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* และ *Bifidobacterium bifidum* มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein สูงกว่าโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus*

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ในโยเกิร์ตถั่วเหลืองกับนมเป้ พบว่า โยเกิร์ตถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* และ *Bifidobacterium bifidum* มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein สูงกว่าในนมเป้ ในขณะที่โยเกิร์ตถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ใกล้เคียงกับนมเป้ ดังนั้น การทดลองขั้นต่อไปจึงนำโยเกิร์ตถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* และ *Bifidobacterium bifidum* ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ

เอกสารอ้างอิง

- เรณู ปั่นทอง. “การพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตจากถั่วเหลือง.” วารสารอาหาร 12, 2(2523): 230-247.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16 th edition, vol. 2. Virginia, 1995.
- Ariyama, H. “Process for the manufacture of synthetic yoghurt from soybean.” U.S. Patent. 3,096,177, (2 July 1963).
- Chien, H.L., Huang, H.Y., and Chou, C.C. “Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria.” Food Microbiology, 23(2006): 772-778.
- Choi, Y., Woo, J.G., and Noh, W.S. “Hydrolysis of β -glucosidase bonds of isoflavone conjugates in the lactic acid fermentation of soymilk.” Korean Journal of Food Science and Technology, 31(1999): 189-195.
- Hoeck, J.A., Fehr, W.R., Murphy, P.A., and Welke, G.A. “Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean.” Crop Science, 40(2000): 48-51.
- Hutabarat, L.S., Greenfield, H., and Mulholland, M. “Isoflavones and Coumestrol in Soybeans and Soybean Products from Australia and Indonesia.” Journal of Food Composition and Analysis, 14(2001): 43-58.
- Jeon, K.S., Ji, G.E., and Hwang, I.K. “Assay of β -glucosidase activity of bifidobacteria and hydrolysis of isoflavone glycosidase by Bifidobacterium sp. Int-57 in soymilk fermentation.” Journal of Microbiology and Biotechnology, 12(2002): 8-13.
- Matsuda, S., Norimoto, F., Matsumoto, Y., Ohba, R., Teramoto, Y., and Ohta, N. “Solubilization of novel isoflavone glycoside hydrolyzing β -glucosidase from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*.” Journal of Fermentation and Bioengineering, (1994): 77439-77441.
- Mazur, W.M., Duke, J.A., Wahala, K., Rasku, S., and Adlercreutz, H. “Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans.” The Journal of Nutritional Biochemistry, 9(1998): 193-200.

- Murphy, P.A., Song, T., Buseman, G., Baru, K., Beecher, G.R., Trainer, D., and Holden, J. "Isoflavones in retail and institutional soy foods." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(1999): 2697-2704.
- Murphy, P.A., Barua, K., and Hauck, C.C. "Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods." Journal of Chromatography B, 777(2002): 129-138.
- Pyo, Y.H., Lee, T.C., and Lee, Y.C. "Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria." Food Research International, 38(2005): 551-559.
- Wang, H.J., and Murphy, P.A. "Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year and location." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42(1994b): 1674-1677.
- Wang, Y.C., Yu, R.C., Yang, H.Y., and Chou, C.C. "Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with probiotic." Food Microbiology, 20(2003):333-338.
- Tsangalis, D., Ashton, J.F., Magill, A.E.J., and Shah, N.P. "Biotransformation of isoflavones by bifidobacteria in fermented soymilk supplemented with D-glucose and L- cysteine." Journal of Food Science, 68(2003): 623-631.
- Tsangalis,D., Ashton, J.F., Stojanovska, L., Wilcox, G., and Shah, N.P. "Development of an isoflavone aglycone-enriched soymilk using soy germ, soy protein isolate and bifidobacteria." Food Research International, 37(2004): 301-312.
- Tsukamoto, C., Shimada, S., Igita, K., Kudou, S., Kokubun, M., Okubo, K., and Kitamura, K. "Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins and composition of fatty acids at different temperatures during seed development." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43(1995): 1184-1192.

บทที่ 5

การผลิตผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลืองและการหาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลือง

บทคัดย่อ

ทำการผลิตและพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลือง จากสูตรคือ โยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* ร่วมกับเชื้อ *Bifidobacterium bifidum* เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมงและระเหยนํ้าออกด้วย vacuum oven ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จำนวน 37.5%(w/w) ของนํ้าหนักเยลลี่ นํ้าจากการหมักโยเกิร์ตจำนวน 23%(w/w) นํ้าตาลทรายจำนวน 35 %(w/w) กลูโคสไซรัปจำนวน 35%(w/w) และเจลาติน จำนวน 7%(w/w) จากการทดลองพบว่าผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพที่ได้มีค่า A_w เท่ากับ 0.711 และ ผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ 1 ชิ้น นํ้าหนักประมาณ 4 กรัม มีปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด daidzein ประมาณ 4.71 ไมโครกรัม(นํ้าหนักแห้ง) และชนิด genistein เท่ากับ 5.94 ไมโครกรัม(นํ้าหนักแห้ง) เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลืองเป็นระยะเวลา 1 เดือน ที่อุณหภูมิ 8 และ 35 องศาเซลเซียส (ค่าความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศอยู่ในช่วงร้อยละ 85 ถึง 86) พบว่าสามารถเก็บได้นาน 1 เดือน และ 10 วันตามลำดับ

บทนำ

ปัจจุบันตลาดอาหารเพื่อสุขภาพมีแนวโน้มสูงมากไม่ว่าจะเป็นตลาดต่างประเทศและในประเทศ เนื่องจากผู้บริโภคเอาใจใส่สุขภาพมากขึ้น ในประเทศไทยมีการขยายตัวค่อนข้างสูง มีการพัฒนารูปแบบและรสชาติแปลกใหม่อยู่เสมอ ถั่วเหลืองสามารถนำมาผลิตเป็นอาหารเพื่อสุขภาพได้หลายรูปแบบ เช่น มาร์ชมาลโลว์ (Marshmallows) ที่มีการเติมสารไอโซฟลาโวนส์ เครื่องดื่มไอโซฟลาโวนส์ผง soy bars พาสต้าเสริมไอโซฟลาโวนส์ ขนมปังเสริมไอโซฟลาโวนส์ เป็นต้น อาหารเพื่อสุขภาพส่วนใหญ่จะเน้นเพื่อเด็ก ผู้สูงอายุ และวัยรุ่น มีน้อยชนิดที่มุ่งเน้นเพื่อผู้หญิงวัยทอง ผู้หญิงวัยทองจะมีการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนโดยเฉพาะเอสโตรเจน ซึ่งส่งผลต่อความแข็งแรงของกระดูก สุขภาพของหลอดเลือดหัวใจ และมักเกิดอาการร้อนวูบวาบ ซึ่งเป็นอาการที่พบบ่อยในผู้หญิงวัยนี้ แพทย์จึงต้องบำบัดโดยวิธีให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนทดแทน

มีงานวิจัยหลายชิ้นได้แสดงให้เห็นว่าการบำบัดโดยวิธีให้ฮอร์โมนทดแทนมีผลร้ายมากกว่าผลดีที่อาจจะได้รับ (Messina, 2003) งานวิจัยนี้จึงต้องการที่จะพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากถั่วเหลืองสำหรับผู้หญิงวัยทอง เพื่อเพิ่มปริมาณไอโซฟลาโวนส์ในอาหารขบเคี้ยวแทนการบำบัดด้วยฮอร์โมน

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลือง
2. เพื่อหาปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ในอาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตจากถั่วเหลือง
3. เพื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตจากถั่วเหลือง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การผลิตอาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลือง

ทำการระเหยนํ้าออกจากโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* และ *Bifidobacterium bifidum* เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสด้วยเครื่อง vacuum oven ให้มีความชื้นประมาณ 60-66% ทำการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลือง โดยดัดแปลงจากสูตรเยลลี่กล้วยตาก ซึ่งมีสูตรดังนี้ จากสูตรเยลลี่กล้วยตาก 100%(w/w) คิดเป็น

เจลาติน	7%
น้ำตาลทราย	35%
กลูโคสไซรัป	35%
นํ้า	22.5%
กรดซิตริก	0.5%
โซเดียมเบนโซเอต	500 ppm ของนํ้าหนักกัมมี่เยลลี่
กล้วยตากบด	37.5% ของนํ้าหนักกัมมี่เยลลี่

เนื่องจากต้องการให้มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์สูงที่สุดดังนั้นจากสูตรข้างต้นผู้วิจัยได้ทำการ
ดัดแปลงโดยเปลี่ยนส่วนผสม (%w/w) เป็นดังนี้

เจลาติน	7%
น้ำตาลทราย	35%
กลูโคสไซรัป	35%
น้ำที่ได้จากการหมักโยเกิร์ต	23%
โยเกิร์ตระเหยนํ้าออกให้มีความชื้น 60-66%	37.5% ของน้ำหนักกัมมี่เยลลี่

หมายเหตุ: ไม่ใส่กรดซิตริกและโซเดียมเบนโซเอต

วิธีการทำกัมมี่เยลลี่ (ขนาดรวม 825 กรัม ; โยเกิร์ตอบแห้ง 225 กรัม+ เยลลี่ 600 กรัม) ดังรูปที่ 14

ใส่นํ้าโยเกิร์ต 70 กรัม ในชามแก้ว (แยกต่างหากจาก 22.5%จากสูตรข้างบน)

↓

ใส่เจลาติน 49 กรัม ลงในนํ้าโยเกิร์ต คนให้เจลาตินดูดนํ้าแล้วพักไว้

↓

เทนํ้าโยเกิร์ต 157.5 กรัม ลงในหม้อตุ๋น นำไปให้ความร้อน

↓

ใส่เจลาตินลงในหม้อตุ๋น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

↓

ใส่นํ้าตาลทราย 245 กรัม ลงในหม้อตุ๋น คนให้ละลาย

↓

เติมกลูโคสไซรัป 245 กรัม ลงในหม้อตุ๋น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

↓

เคี่ยวในหม้อตุ๋นด้วยไฟปานกลางจนมี Total Soluble Solid เท่ากับ 78 °Brix

↓

เติมโยเกิร์ตที่ระเหยนํ้าแล้ว 225 กรัม ลงไปคนให้เป็นเนื้อเดียวกัน

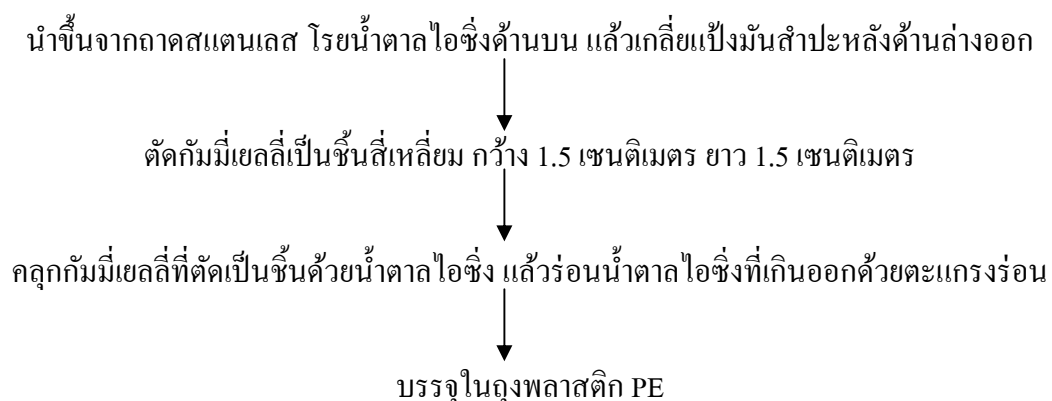
↓

เทกัมมี่เยลลี่ลงในถาดสแตนเลสที่รองด้วยแป้งมันสำปะหลังที่อบแห้งแล้ว*

↓

วางทิ้งไว้ให้กัมมี่เยลลี่แข็งตัว ประมาณ 6-8 ชั่วโมง





* ใช้แป้งมันสำปะหลังเทลงในถาดสแตนเลส นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เกลี่ยแป้งให้กระจายทั่วถาดแล้วใช้ถาดสแตนเลสอีกถาดกดให้เรียบและแน่น

รูปที่ 14 วิธีการทำกัมมี่เยลลี่

นำผลิตภัณฑ์กัมมี่เยลลี่ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และชนิด genistein

2. การศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตตัวเหลือง

ศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โดยเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในถุงพลาสติก PE ที่ปิดสนิท แยกเก็บผลิตภัณฑ์ 1 ชิ้นต่อถุง นำไปศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โดยเก็บที่อุณหภูมิ 8 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน สุ่มตรวจทุก 5 วัน ประเมินคุณภาพด้าน A_w โดยใช้เครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ และปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด(AOAC,1995) เพื่อหาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การผลิตอาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลือง

จากการศึกษาพบว่าระเหยนํ้าออกจากโยเกิร์ตถั่วเหลืองด้วยเครื่อง vacuum oven ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสจนโยเกิร์ตมีความชื้นประมาณ 60-66% (มีค่าความเป็นกรดต่าง จะทำให้เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลือง ที่ได้มีลักษณะเนียนเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่สากลิ้น ดังแสดงในรูปที่ 15



รูปที่ 15 ผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลือง

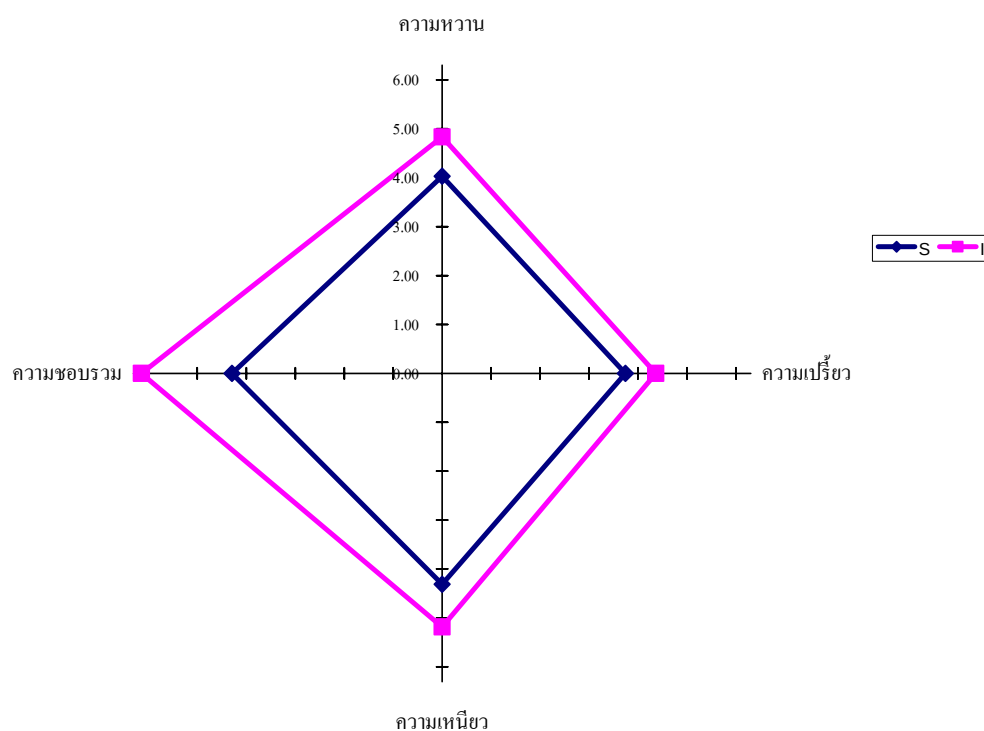
พบว่าผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลืองมีค่า A_w เท่ากับ 0.711 เมื่อนำผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลืองไปทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยผู้บริโภคนเพศหญิง อายุระหว่าง 35 ถึง 45 ปี ที่ไม่ผ่านการฝึกฝน จำนวน 23 คน โดยใช้วิธี ratio profile พบว่าผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลือง มีค่าความเปรี้ยว ความหวาน ความเหนียว และความชอบโดยรวมใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลืองในอุดมคติ ดังตารางที่ 10 และรูปที่ 16

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยผู้บริโภคที่ไม่ผ่านการฝึกฝนโดยใช้วิธี ratio profile

	ความหวาน	ความเปรี้ยว	ความเหนียว	ความชอบรวม
S	4.03	3.74	4.31	4.29
I	4.83	4.36	5.18	6.14

หมายเหตุ: = 23

นำค่าที่ได้จากตารางที่ 10 มาเขียนเป็นกราฟใยแมงมุมได้ดังรูปที่ 16



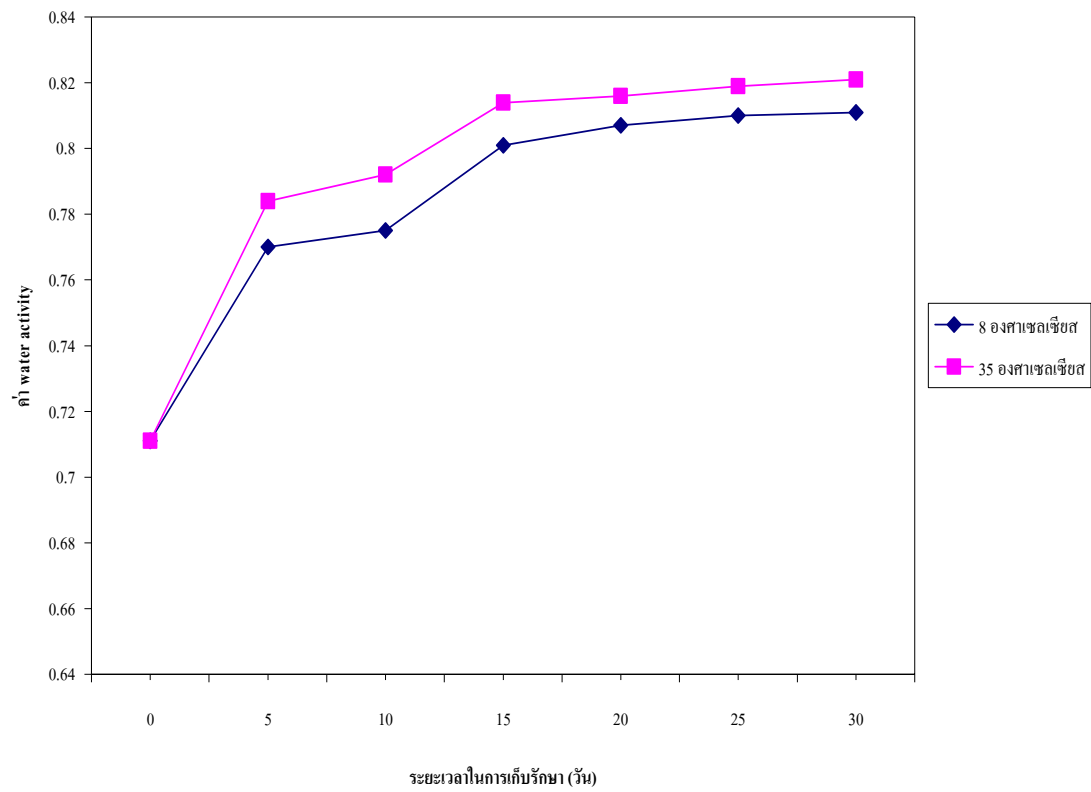
รูปที่ 16 กราฟใยแมงมุมแสดงลักษณะของผลิตภัณฑ์ตัวอย่างและผลิตภัณฑ์ในอุดมคติ

ผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ 1 ชิ้น ที่มีน้ำหนักประมาณ 4 กรัม มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์ ชนิด daidzein ประมาณ 4.71 ไมโครกรัม(น้ำหนักแห้ง) หรือประมาณ 471 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม ถั่วเหลือง(น้ำหนักแห้ง) และชนิด genistein เท่ากับ 5.94 ไมโครกรัม(น้ำหนักแห้ง) หรือประมาณ

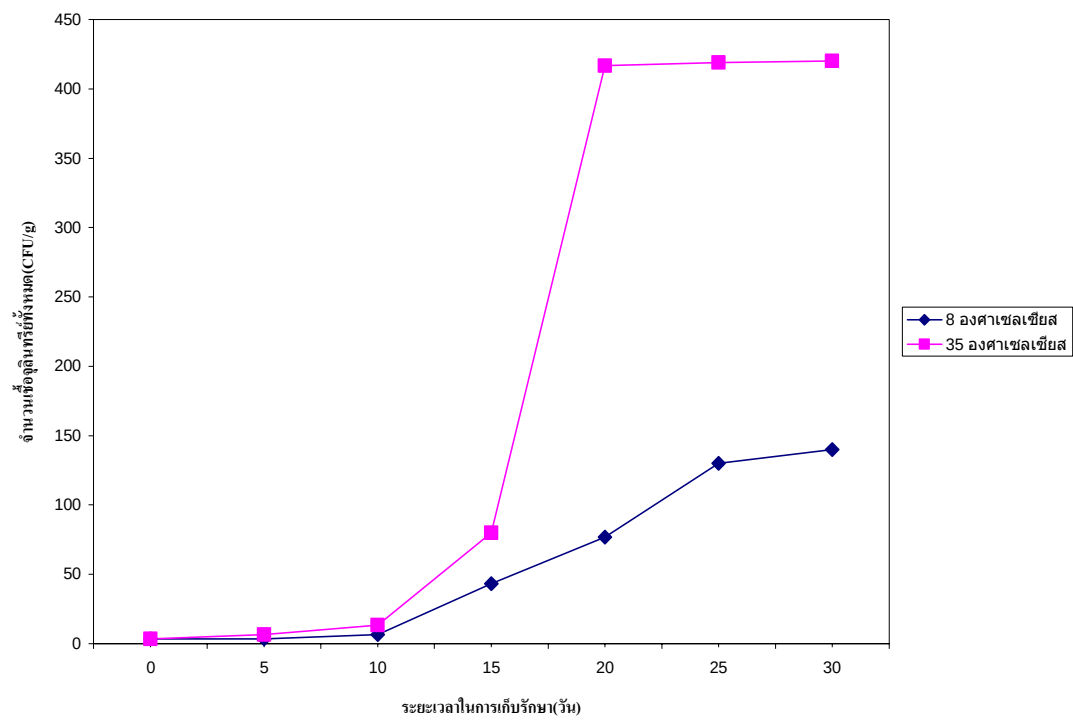
471 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัมถั่วเหลือง(น้ำหนักแห้ง) ซึ่งปริมาณปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ลดลงเมื่อเทียบกับปริมาณที่มีในโยเกิร์ตถั่วเหลือง ทั้งนี้เนื่องจาก การผลิตผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลืองต้องใช้อุณหภูมิในการเคี่ยวประมาณ 100 องศาเซลเซียสและใช้ระยะเวลาประมาณ 30 นาที จึงจะได้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 78 °Brix แม้ว่าในการผลิตผลิตภัณฑ์ไม่ได้มีการเติมกรดซิตริกลงไปแต่ในโยเกิร์ตถั่วเหลืองมีการคั่วอยู่แล้ว การใช้ความร้อนสูง เป็นเวลานานและยังมีการคั่วในผลิตภัณฑ์จึงอาจทำให้ไอโซฟลาโวนส์เปลี่ยนรูป หรือถูกทำลาย วัตถุประสงค์ของการระเหยน้ำออกจากโยเกิร์ตถั่วเหลืองบางส่วนก่อนนำมาผลิตผลิตภัณฑ์ เพื่อช่วยให้ใช้เวลาในการเคี่ยวให้น้อยลง นอกจากนี้ในการผลิตได้เติมโยเกิร์ตถั่วเหลืองที่ระเหยน้ำ ออกเป็นบางส่วนแล้วในขั้นตอนสุดท้ายก่อนยกลงจากเตา เพื่อป้องกันการสูญเสีย ไอโซฟลาโวนส์ ทั้งนี้ส่วนผสมที่เป็นโยเกิร์ตถั่วเหลืองในสูตรที่ใช้ มีอยู่น้อยมาก จึงทำให้มีปริมาณ ไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein น้อยด้วย

2. การศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลือง

ศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โดยเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในถุงพลาสติก PE ถุงละ 1 ชิ้น ที่อุณหภูมิ 8 และ 35 องศาเซลเซียส (ค่าความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศอยู่ในช่วงร้อยละ 85 ถึง 86) เป็นระยะเวลา 1 เดือน สุ่มตรวจทุก 5 วัน ประเมินคุณภาพด้าน A_w โดยใช้เครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ พบว่าค่า A_w มีการเปลี่ยนแปลงดังรูปที่ 17 และปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดดังรูปที่ 18 ส่วน ลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผลิตภัณฑ์แสดงในตารางที่ 11



รูปที่ 17 การเปลี่ยนแปลงค่า A_w ของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลือง



รูปที่ 18 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ต ถั่วเหลือง

ตารางที่ 11 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษา

ระยะเวลาในการเก็บรักษา (วัน)	ลักษณะของผลิตภัณฑ์เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส			ลักษณะของผลิตภัณฑ์เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส		
	ความนุ่ม	ความแข็งของสี	การคงรูปร่างเดิม	ความนุ่ม	ความแข็งของสี	การคงรูปร่างเดิม
0	++	+	++++	++	+	++++
5	++	+	++++	++	+	++++
10	++	+	++++	+++	+	+++
15	++	+	++++	++++	++	+++
20	++	+	++++	++++	+++	++
25	++	++	++++	++++	+++	+
30	++	++	++++	++++	+++	+

หมายเหตุ: + คือ น้อยมาก, ++ คือ น้อย, +++ คือ ปานกลาง, ++++ คือ มาก

จากการทดลองพบว่าผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตตัวเหลืองมีค่า A_w และปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นเมื่อเก็บนานขึ้น เมื่อพิจารณาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด พบว่าเมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดยังอยู่ในปริมาณที่ปลอดภัย คือมีจำนวนน้อยกว่า 250 cfu ต่อกรัม และผลิตภัณฑ์ยังมีลักษณะปกติ ไม่มี การเจริญของเชื้อยีสต์และรา ดังนั้นการหาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จึงพิจารณาจากการเสื่อมเสียทางกายภาพ คือ ที่ผิวหน้าของผลิตภัณฑ์จะเริ่มมีลักษณะเยิ้ม ซึ่งทำให้ผลิตภัณฑ์ไม่น่ารับประทาน ดังแสดงในรูปที่ 19 และเมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตตัวเหลืองเริ่มเพิ่มมากขึ้น และมีจำนวนมากกว่า 250 cfu ต่อกรัม เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานกว่า 15 วัน นอกจากนี้ ผลิตภัณฑ์ยังมีลักษณะเยิ้มที่ผิวหน้า ดังแสดงในรูปที่ 20 และค่า A_w ของผลิตภัณฑ์ที่เก็บที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสมีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าค่า A_w ของผลิตภัณฑ์ที่เก็บที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส



รูปที่ 19 ลักษณะของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลืองเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 วัน(ขวา) ผลิตภัณฑ์เริ่มมีลักษณะเยิ้ม สีเข้มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม(ซ้าย)



รูปที่ 20 ลักษณะของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลืองเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน(ขวา) ผลิตภัณฑ์มีลักษณะแฉะเล็กน้อยและมีสีเข้มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม(ซ้าย)

จากรูปที่ 19 และ 20 พบว่าการเก็บผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำให้ผลิตภัณฑ์มีผิวหน้าเยิ้ม เนื้อสัมผัสนุ่มกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ เนื่องจากเจลาคินมีคุณสมบัติที่เปลี่ยนกลับได้(reversible) และความแข็งของเจล(rigidity) ของเจลาคินจะมีความ

ยืดหยุ่น (elastic) โดยความแข็งของเจลจะมีความสัมพันธ์ผกผันกับอุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ความแข็งของเจลก็จะลดลง และเจลลาตินมีจุดหลอมละลาย(melting point) ต่ำประมาณ 27-34 องศาเซลเซียส ดังนั้น การเก็บที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิเฉลี่ยของประเทศไทยจึงทำให้ความแข็งของเจลเจลลาตินลดลง น้ำที่อยู่ภายในผลิตภัณฑ์จึงมีการแพร่ออกมาที่ผิวหน้า การเก็บผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิสูง เป็นระยะเวลานาน จึงเป็นผลทำให้ผลิตภัณฑ์มีลักษณะนิ่มและไม่สามารถคงรูปเดิมได้ การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถ้วยเหลืองที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสจึงสามารถเก็บได้นานกว่า เนื่องจากเป็นอุณหภูมิต่ำ เกลียังคงความแข็งแรง และจะแข็งแรงเพิ่มขึ้นเมื่อเก็บนานขึ้น น้ำที่อยู่ภายในผลิตภัณฑ์ไม่สามารถแพร่ออกมาภายนอกได้ง่ายนัก แต่การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถ้วยเหลืองที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลานานจะทำให้เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์แข็ง และเหนียว อาจไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค เนื่องจากผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถ้วยเหลืองไม่ได้ใส่สารกันเสีย จึงสามารถเก็บที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ได้นานประมาณ 1 เดือน แต่ถ้าเก็บที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสจะสามารถเก็บได้นานประมาณ 10 วัน โดยที่ผลิตภัณฑ์ไม่เปลี่ยนแปลงจนส่งผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค

เอกสารอ้างอิง

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16 th edition, vol. 2. Virginia, 1995.

Messina, M., and Hughes, C. “Efficacy of soyfoods and soybean isoflavone supplements for alleviating menopausal symptoms is positively related to initial hot flush frequency.” Journal of Medical Food, 6(2003): 1-11.

ข้อเสนอแนะ

1. ในการเปลี่ยนรูปไอโซฟลาโวนส์ให้อยู่ในรูป aglycones อาจใช้เอนไซม์ β -glucosidase ย่อยถั่วเหลืองโดยตรง ซึ่งน่าจะช่วยประหยัดเวลา และอาจทำให้มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด aglycones สูงกว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์หมัก
2. เนื่องจากการอบไล่ความชื้นออกจากโยเกิร์ตถั่วเหลืองก่อนนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ ต้องใช้เวลาค่อนข้างนาน ดังนั้นควรมีการหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด รวมถึงเชื้อจุลินทรีย์แลคติกในระหว่างการอบไล่ความชื้นออกจากโยเกิร์ตถั่วเหลือง เพื่อให้มั่นใจว่ากระบวนการหมักไม่ได้ดำเนินต่อไป เพราะอาจส่งผลให้ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ที่ได้ไม่ใช่ค่าที่แท้จริงที่ได้จากการหมักในระยะเวลาที่กำหนดในการศึกษา และหลังจากอบไล่ความชื้นออกจากโยเกิร์ตถั่วเหลืองแล้ว ควรหาปริมาณกรดในรูปกรดแลคติก และปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่าที่ได้หลังจากผ่านกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ
3. เนื่องจากสูตรในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลือง มีปริมาณน้ำตาลเป็นจำนวนมาก จึงควรมีการพัฒนาสูตรโดยใช้สารทดแทนความหวานและสารให้ความหนืดชนิดอื่นแทนการใช้น้ำตาล หรือผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นที่ใช้ความร้อนไม่มากนักและใช้เวลาไม่นาน และ ควรมีการสำรวจตลาดก่อนการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถั่วเหลือง
4. การพัฒนาสูตรโยเกิร์ตถั่วเหลือง ให้ปราศจากกลิ่นถั่ว และมีรสชาติและคุณสมบัติเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ถือเป็นทางเลือกที่ดีทางหนึ่งในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ เนื่องจากใช้ความร้อนไม่สูงมากนักจึงทำให้มีปริมาณไอโซฟลาโวนส์ชนิด aglycones สูง ทั้งยังมีกระบวนการผลิตที่ไม่ยุ่งยากอีกด้วย

ภาคผนวก ก
แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

แบบรายงานการทดสอบ

วิธี ratio profile

ผู้ทดสอบ..... วันที่.....
 ผลิตภัณฑ์.....

คำแนะนำ

กรุณาทดสอบผลิตภัณฑ์จากซ้ายไปขวา โดยทดสอบความหวาน, ความเปรี้ยว, ความเหนียว, ความชอบโดยรวม และทำเครื่องหมาย (I) สำหรับลักษณะที่ต้องการในอุดมคติ และ (S) สำหรับลักษณะตัวอย่างที่ชิม ลงบนเส้นให้ตรงกับความรู้สึกที่กำหนดในแต่ละลักษณะ

1. ความหวาน		
	น้อย	มาก
2. ความเปรี้ยว		
	น้อย	มาก
3. ความเหนียว		
	น้อย	มาก
4. ความชอบโดยรวม		
	น้อย	มาก

ข้อเสนอแนะ.....

แบบสอบถามการทดสอบผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถ้วยเหลือง

เรียน ผู้ตอบแบบสอบถาม

เรื่อง การทดสอบเค้าโครงลักษณะผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถ้วยเหลือง

คำชี้แจง

แบบสอบถามนี้เป็นการวิจัยเพื่อประกอบวิทยานิพนธ์ของ นางสาวสุภาภรณ์ วงศ์พิพันธ์ นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยศิลปากร ในหัวข้อเรื่องการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโยเกิร์ตถ้วยเหลือง จึงใคร่ขอความร่วมมือจากท่าน กรุณาทดสอบผลิตภัณฑ์และตอบแบบสอบถามให้สมบูรณ์ ขอรับรองว่า ผลิตภัณฑ์ที่ท่านทดสอบได้ผ่านกรรมวิธีการผลิตที่ถูกสุขลักษณะ จึงมีความปลอดภัยในการบริโภค ข้อมูลทั้งหมดที่ท่านตอบจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับงานวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณทุกท่านที่ให้ความร่วมมืออย่างดีมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณในความร่วมมือ

ผู้ทำวิจัย

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

1. การหาปริมาณความชื้น(AOAC, 1995)

วัสดุอุปกรณ์

1. ภาชนะใส่ตัวอย่าง(moisture can)
2. ตู้อบลมร้อน(hot air oven)
3. โถกั้นความชื้น(desicator)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการวิเคราะห์

1. อบภาชนะใส่ตัวอย่างพร้อมฝาในตู้อบลมร้อน 130°C นาน 2-3 ชั่วโมง นำออกจากตู้ใส่ไว้ในโถกั้นความชื้นจนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก
2. ทำเช่นเดียวกับข้อ 1 จนกระทั่งน้ำหนักของภาชนะใส่ตัวอย่างคงที่ (ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้ง 2 ครั้ง ที่ติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม)
3. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1-3 กรัม ใส่ในภาชนะความชื้นที่ทราบน้ำหนักแล้ว
4. นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 130°C นาน 5-6 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบลมร้อนไว้ในโถกั้นความชื้น จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะถึงอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนัก
5. อบซ้ำอีก 30 นาที ชั่งจนกระทั่งน้ำหนักที่ได้คงที่แล้วนำมาคำนวณปริมาณความชื้นจากน้ำหนักที่หายไป

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักรวม)} = (A/B) \times 100$$

เมื่อ A = น้ำหนักที่หายไป (กรัม)

B = เป็นน้ำหนักของตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

2. ปริมาณของแข็งทั้งหมด(AOAC, 1995)

วิธีการวิเคราะห์ อบกระดาษกรองที่หุ้มด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง นำมาใส่เคสิคเคเตอร์ ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเมื่อเย็นนำไปชั่งน้ำหนักที่แน่นอน ชั่งตัวอย่างหรือปิเปตตัวอย่างลงบนกระดาษกรองในปริมาณที่แน่นอน นำไปอบในตู้อบ

ไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำมาใส่โถกั้นความชื้นทิ้งไว้ให้เย็นชั่งน้ำหนักแล้วนำไปอบซ้ำจน น้ำหนักคงที่

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณของแข็งทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(W_2 - W) \times 100}{W_1 - W}$$

กำหนดให้ W = น้ำหนักของจานอลูมิเนียม (กรัม)
 W_1 = น้ำหนักของจานอลูมิเนียมและตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)
 W_2 = น้ำหนักของจานอลูมิเนียมและตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

3. ปริมาณกรดทั้งหมด (Total Titratable Acidity) (AOAC, 1995)

วิธีวิเคราะห์ ชั่งตัวอย่างจำนวน 10 กรัมใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่ต้มไล่คาร์บอนไดออกไซด์จำนวน 30 มิลลิลิตร หยดสารละลายฟีนอล์ฟธาไลน์ประมาณ 3 หยด เขย่าให้เข้ากัน ไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนกระทั่งถึงจุดยุติได้เป็นสารละลายสีชมพูอ่อน

การคำนวณ คำนวณปริมาตรกรดในรูปของกรดแลคติกในสารละลายตัวอย่างจำนวน 100 มิลลิลิตร

$$\text{กรดทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{N \times V_1 \times 90.08 \times 100}{1000 \times V_2}$$

กำหนดให้ N = ความเข้มข้นมาตรฐาน 0.1 นอร์มัลของโซเดียมไฮดรอกไซด์
 V_1 = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต (มิลลิลิตร)
 V_2 = ปริมาณของสารตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตรต่อกรัม)

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์คุณสมบัติทางจุลินทรีย์

1. จำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกทั้งหมด

อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

วิธีวิเคราะห์ เตรียมความเจือจาง 10^{-1} โดยชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ขวดที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำมาเตรียมจนได้ความเจือจางที่เหมาะสม ปิเปตสารละลายที่ระดับความเจือจางที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ทำการหलอมอาหารแข็ง MRS ที่เตรียมไว้และทิ้งให้มีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส นำมาทำ pour plate technique ปุ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยเลือกนับเฉพาะที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี

การคำนวณ

$$\text{จำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก} = \text{จำนวนโคโลนีที่นับได้} \times \text{dilution factor} \\ (\text{โคโลนีต่อกรัม})$$

2. จำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด

อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Ager (PCA)

วิธีวิเคราะห์ เตรียมความเจือจาง 10^{-1} โดยชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ขวดที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำมาเตรียมจนได้ความเจือจางที่เหมาะสม ปิเปตสารละลายที่ระดับความเจือจางที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ทำการหलอมอาหารแข็ง PCA ที่เตรียมไว้และทิ้งให้มีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส นำมาทำ pour plate technique ปุ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยเลือกนับเฉพาะที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี

การคำนวณ

$$\text{จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด} = \text{จำนวนโคโลนีที่นับได้} \times \text{dilution factor} \\ (\text{โคโลนีต่อกรัม})$$

4. จำนวนยีสต์และรา

อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Ager (PDA)

วิธีวิเคราะห์ เตรียมความเจือจาง 10^{-1} โดยชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ขวดที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำมาเตรียมจนได้ความเจือจางที่เหมาะสม ปิเปตสารละลายที่ระดับความเจือจางที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ทำการหลอมอาหารแข็ง PDA ที่เตรียมไว้และทิ้งให้มีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส นำมาทำ pour plate technique ปุ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยเลือกนับเฉพาะที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี

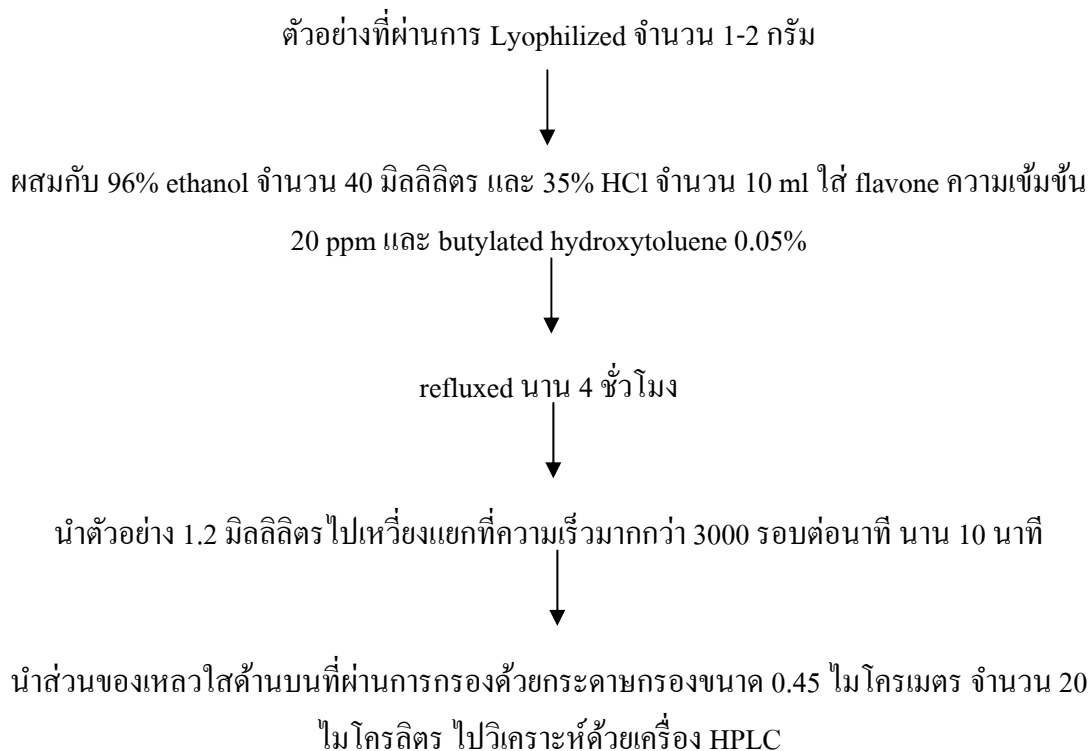
การคำนวณ

จำนวนยีสต์และรา (โคโลนีต่อกรัม) = จำนวนโคโลนีที่นับได้

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ด้วยเครื่อง HPLC

1. วิธีการสกัดไอโซฟลาโวนส์

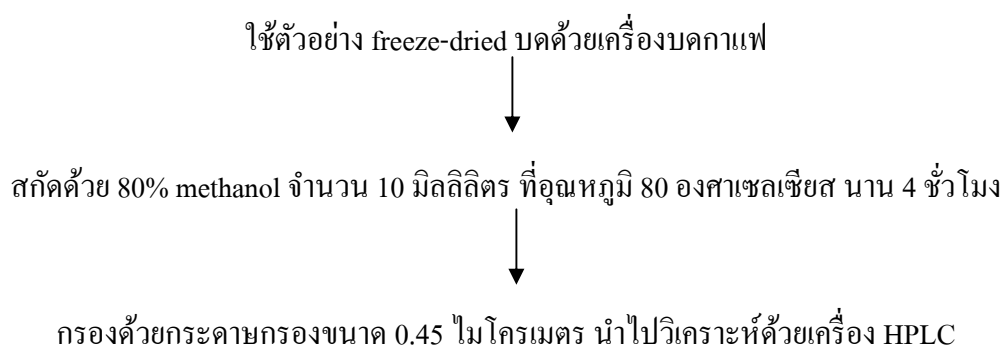
1.1 การสกัดไอโซฟลาโวนส์ชนิด Daidzein และ Genistein ตามวิธีของ Hui และคณะ(2001)



สภาวะของเครื่อง:

คอลัมน์ Water NovaPak C₁₈ (150×3.9 mm, 4 μm), เฟสเคลื่อนที่ Acetonitrile และ 0.1% acetic acid, flow rate 0.8 ml/min ที่อุณหภูมิห้อง, ความยาวคลื่น 260 nm

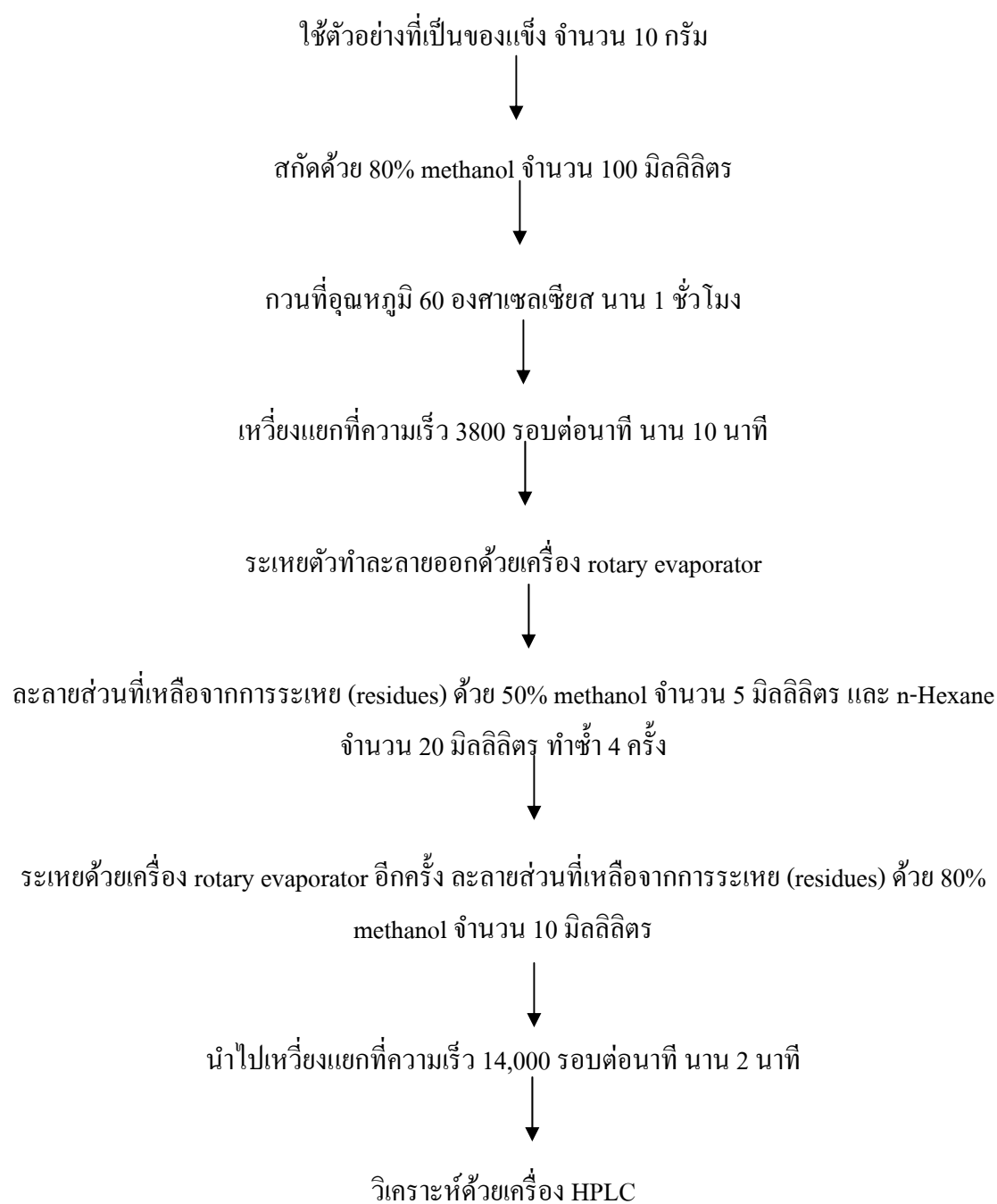
1.2 การสกัดไอโซฟลาโวนส์ชนิด Daidzein และ Genistein ตามวิธีของ Li-Jun และคณะ(2004)



สภาวะของเครื่อง:

คอลัมน์ Dikma Diamonsil C₁₈ (250×4.6 mm, 5 μm), เฟสเคลื่อนที่ 0.1%(v/v) acetic acid, flow rate 1.0 ml/min ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส , ความยาวคลื่น 254 nm

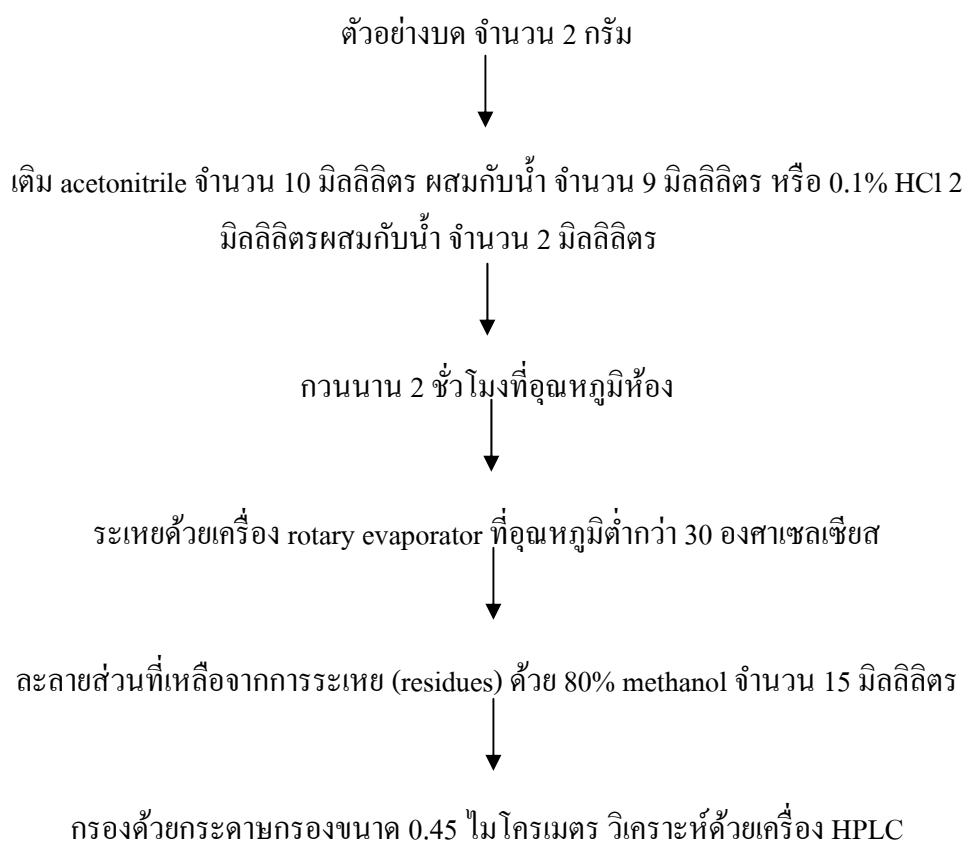
1.3 การสกัดไอโซฟลาโวนส์ชนิด Daidzein และ Genistein ตามวิธีของ Fukutake และคณะ (1996)



สภาวะของเครื่อง:

คอลัมน์ ODS (250×4.6 mm, 5 μ m), เฟสเคลื่อนที่ acetonitrile ใน 0.1% trifluoroacetic acid, flow rate 1.5 ml/min ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส , ความยาวคลื่น 262 nm

1.4 การสกัดไอโซฟลาโวนส์ชนิด Daidzein และ Genistein ตามวิธีของ Murphy และคณะ (2002)



2. การคำนวณ % recovery

$$\% \text{ recovery} = \frac{C_{sp} - C_s}{C_a} \times 100$$

เมื่อ C_{sp} = ความเข้มข้นของไอโซฟลาโวนส์ที่วัดได้จากสารละลายตัวอย่างที่มีการเติม
สารละลายมาตรฐานไอโซฟลาโวนส์ (ไมโครกรัม/กรัม หรือ ไมโครกรัม/
มิลลิลิตร)
 C_s = ความเข้มข้นของไอโซฟลาโวนส์ ที่วัดได้จากสารละลายตัวอย่าง (ไมโครกรัม/
กรัม หรือ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
 C_a = ความเข้มข้นของไอโซฟลาโวนส์ที่เติมลงในตัวอย่าง (ไมโครกรัม/กรัม หรือ
ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

โดยที่ในการคำนวณ C_{sp} , C_s และ C_a ต้องเป็นหน่วยเดียวกัน

สารละลายมาตรฐานไอโซฟลาโวนส์ 1000 ppm

มีความเข้มข้นของ daidzein 999.60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ

มีความเข้มข้นของ genistein 1146.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ดังนั้น สารละลายมาตรฐานไอโซฟลาโวนส์ 200 ppm ที่เติมในตัวอย่าง

มีความเข้มข้นของ daidzein 199.92 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ

มีความเข้มข้นของ genistein 229.32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

จากการวิเคราะห์ปริมาณ daidzein และ genistein ในตัวอย่างโยเกิร์ตถั่วเหลือง ด้วยเครื่อง HPLC

พบว่า ในตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานลงไป

มีความเข้มข้นของ daidzein 184.74 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ

มีความเข้มข้นของ genistein 334.76 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารละลายมาตรฐานลงไป

มีความเข้มข้นของ daidzein 26.79 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ

มีความเข้มข้นของ genistein 59.22 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

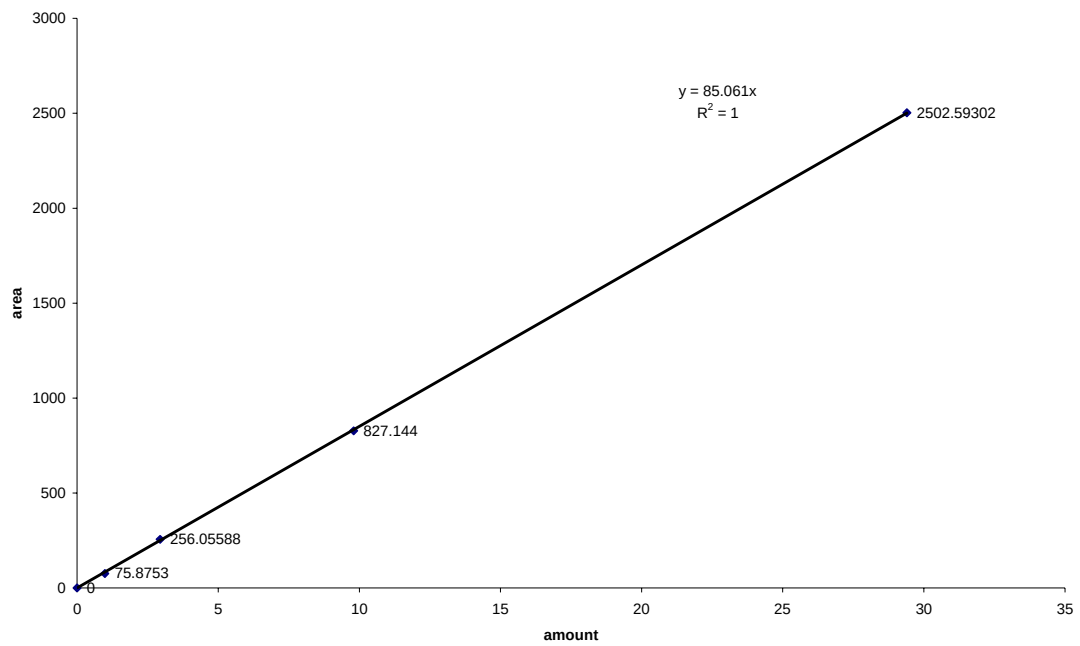
ดังนั้น จากสูตรด้านบนคำนวณหา % recovery จะได้

$$\begin{aligned}\% \text{ recovery ของ daidzein} &= \frac{184.74-26.79}{199.92} \times 100 \\ &= 79.01 \%\end{aligned}$$

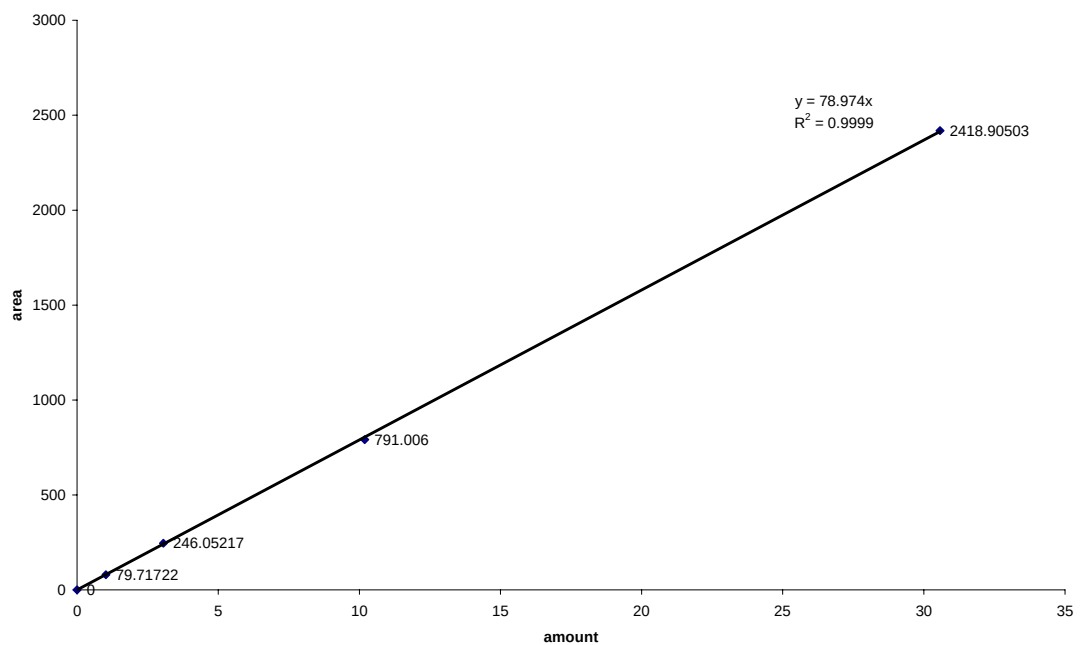
$$\begin{aligned}\% \text{ recovery ของ genistein} &= \frac{334.76-59.22}{229.32} \times 100 \\ &= 120.16 \%\end{aligned}$$

ภาคผนวก จ

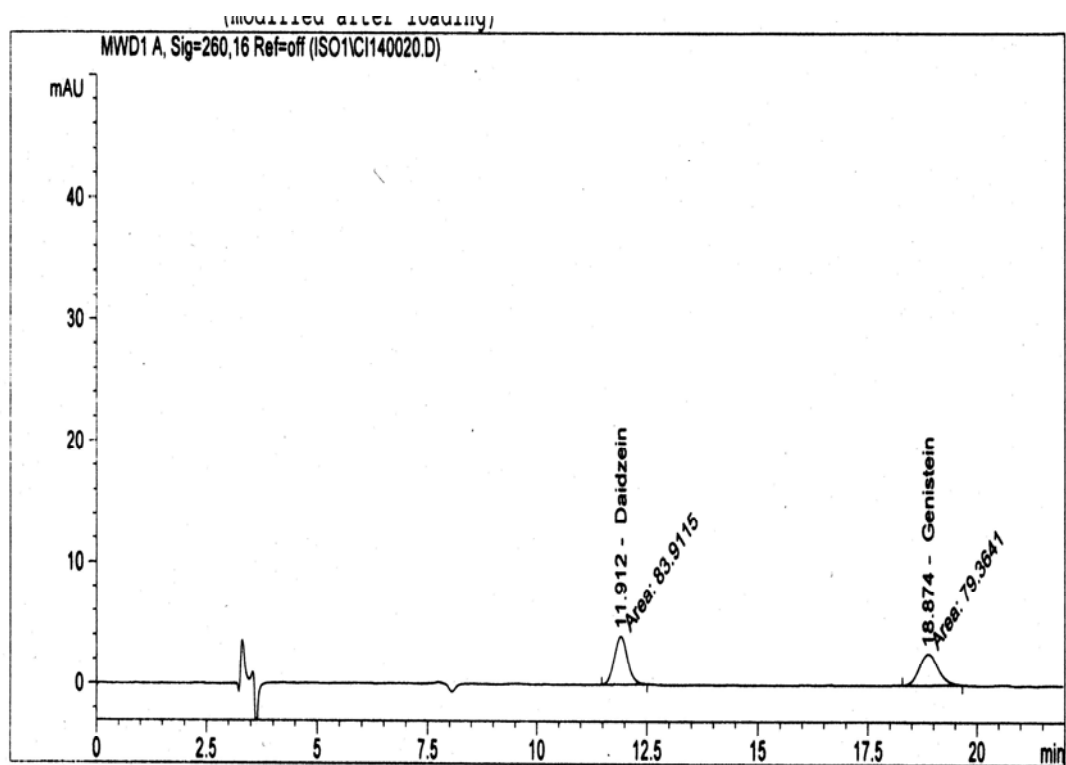
กราฟมาตรฐานและโครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนส์ด้วยเครื่อง HPLC



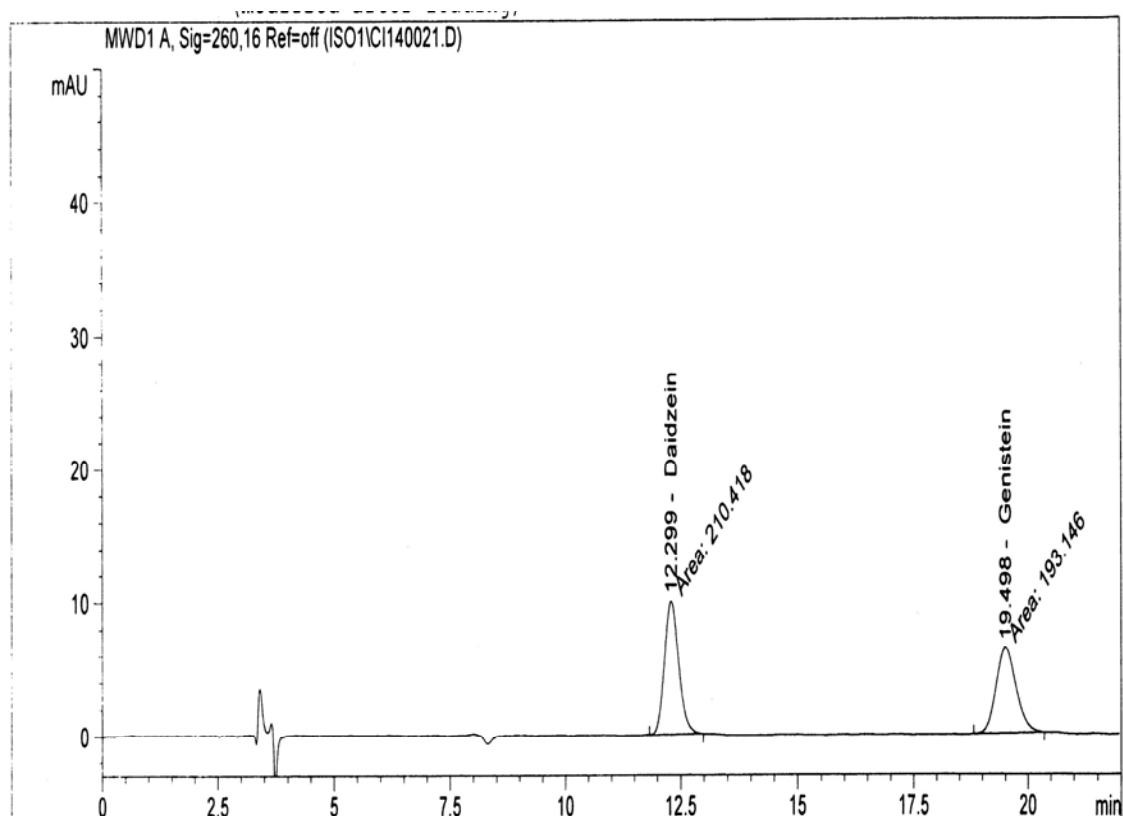
รูปที่ 21 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein



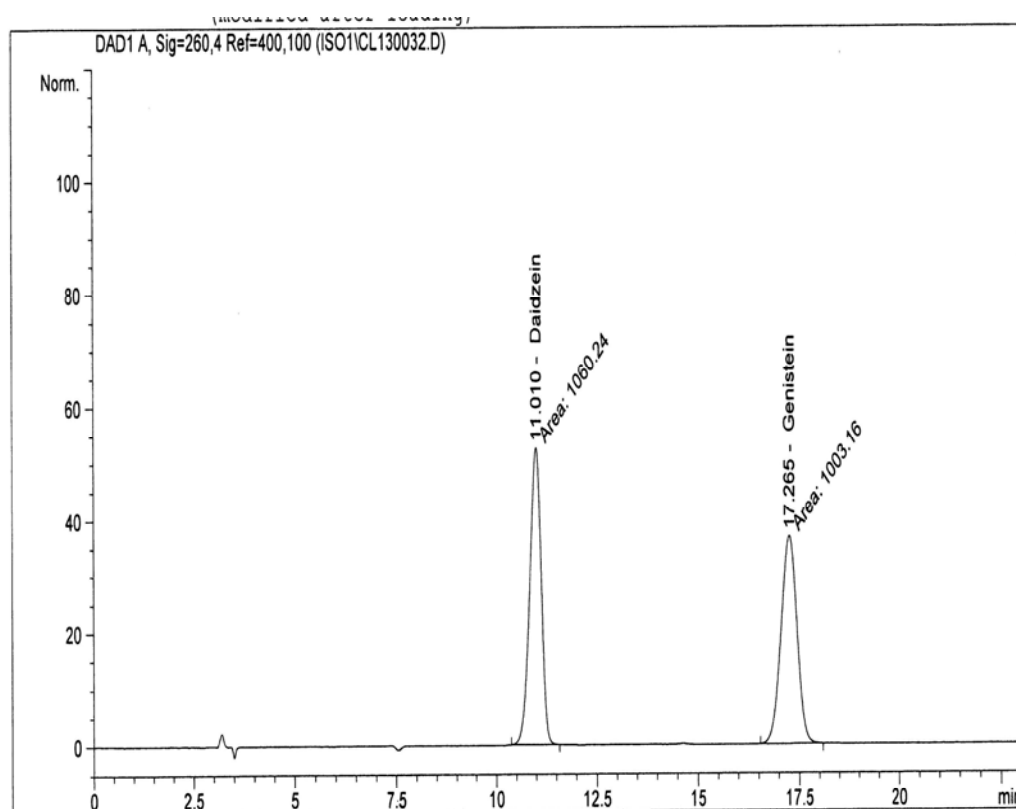
รูปที่ 22 กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ไอโซฟลาโวนส์ชนิด genistein



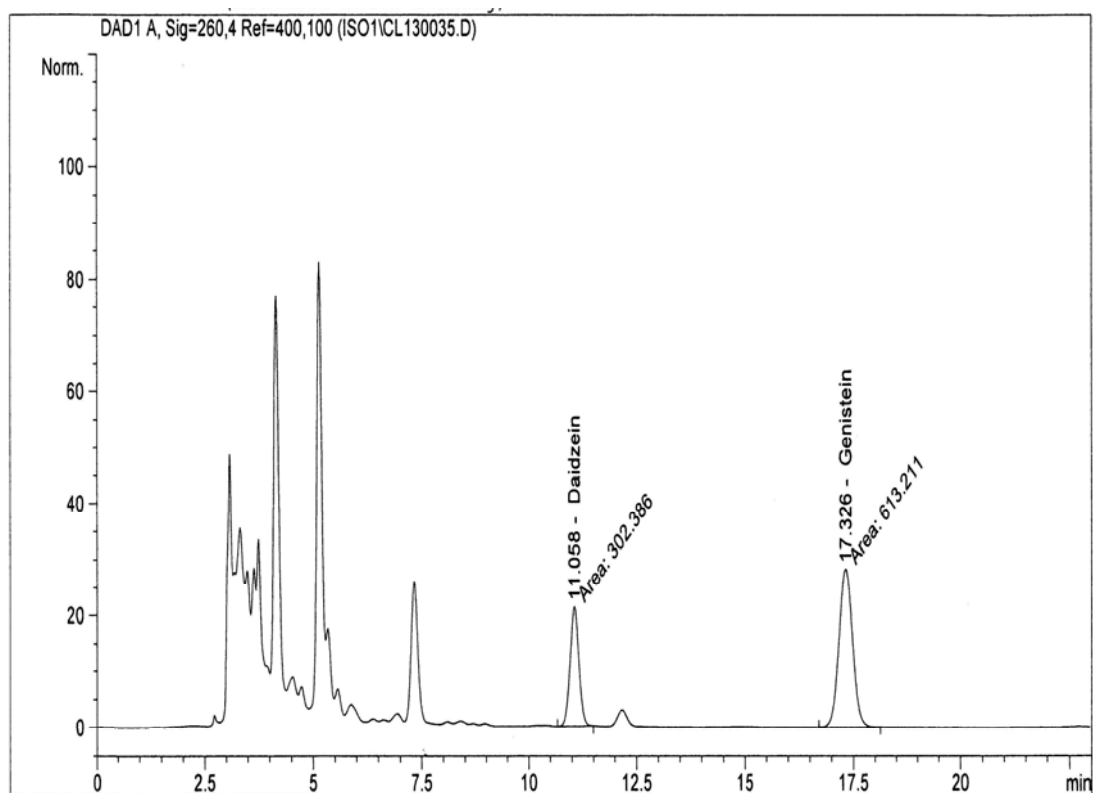
รูปที่ 23 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



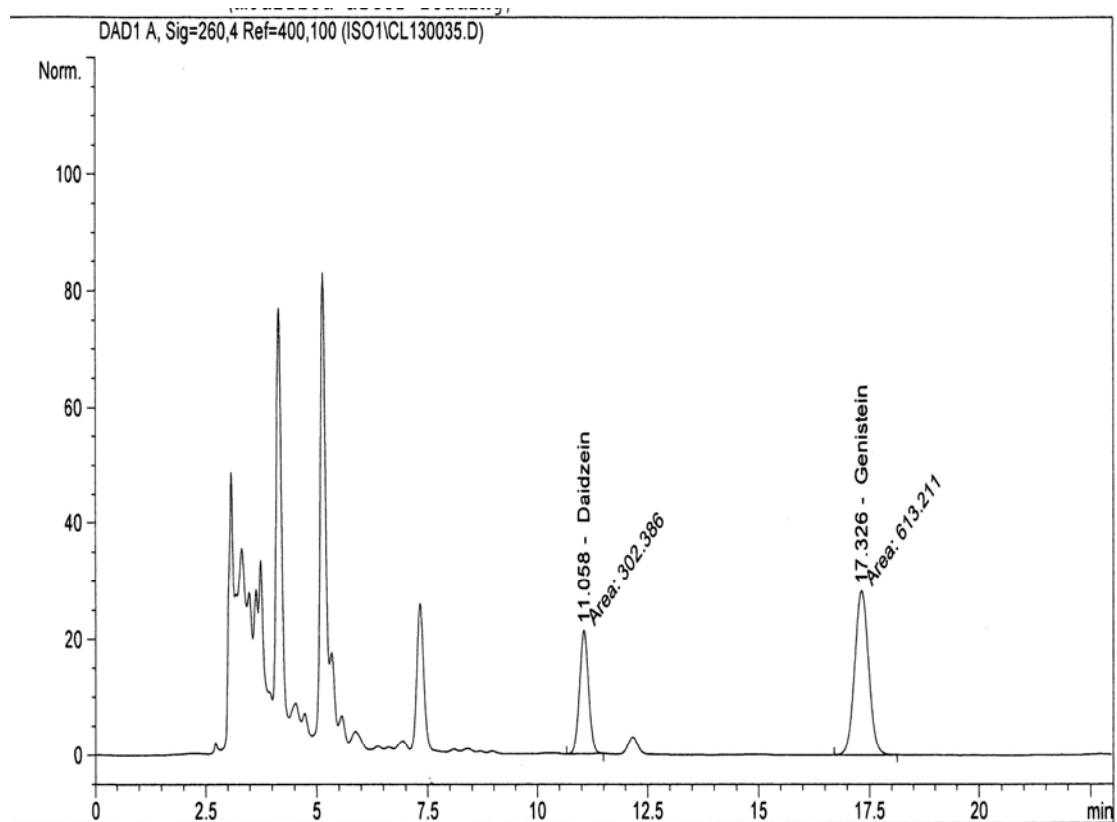
รูปที่ 24 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ที่ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 25 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 26 โครมาโทแกรมของไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ในตัวอย่าง



รูปที่ 27 โครมาโทแกรมของไอโซฟลาโวนส์ชนิด daidzein และ genistein ในตัวอย่างโยเกิร์ตที่หมักด้วยเชื้อ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* และเชื้อ *Bifidobacterium bifidum* เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – สกุล (นาย, นาง, นางสาว)

(ภาษาไทย) สุภาภรณ์ วงศ์พิพันธ์

(ภาษาอังกฤษ) Supaporn Vongpiphan

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2544 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

ประสบการณ์การทำงาน

พ.ศ. 2545-2546 เจ้าหน้าที่จัดยาแผนกจ่ายยาผู้ป่วยใน โรงพยาบาลยันฮี

พ.ศ. 2546-2547 เจ้าหน้าที่ประกันคุณภาพ บริษัท เบลูฟูดส์ จำกัด