บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ถั่วเหลือง (Soybean)

ถั่วเหลืองมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max* (L) *Merr* เป็นพืชที่อยู่ในตระกูล *Leguminosae*, subfamily *papilionoideae* มีชื่อภาษาอังกฤษว่า Soybean เป็นพืชตระกูลถั่วที่เป็นที่รู้จักกันเป็นอย่างดี โดยเฉพาะเป็นพืชดั้งเดิมในทวีปเอเชีย มีการปลูกครั้งแรกที่ประเทศจีนจากนั้นได้มีการแพร่กระจายพันธุ์ไปยังประเทศใกล้เคียง เช่น ประเทศญี่ปุ่น ไทย และอินเดีย เป็นต้น ทั้งยังเป็นพืชที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของไทย เพราะมีคุณค่าทางอาหาร ให้โปรตีนสูง ประมาณร้อยละ 35-46 และยังเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในอุตสาหกรรมหลายประเภท มีการนำถั่วเหลืองมาใช้บริโภคและนำมาเป็นส่วนผสมที่สำคัญของอาหารพื้นเมืองนานาชนิด องค์ประกอบของถั่วเหลืองแสดงดังตารางที่ 2.1 นอกจากนี้ในถั่วเหลืองจะมีสารอาหารสำคัญ คือ สารไอโซฟลาโวน (Isoflavones) หรือ ไฟโตเอสโตรเจน (Phytoestrogens) และยังพบว่าจมูกถั่วเหลือง (Soy germ) เป็นแหล่งของ ไอโซฟลาโวนเกือบทั้งหมดของเมล็ด

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของถั่วเหลือง

Elements	Volumn (unit/100g of soybean)
Water	11.6
Energy(calories)	320.0
Fat (g)	17.6
Carbohydrate (g)	31.5
Protein (g)	34.5
Calcium (mg)	246.0
Phosphorus (mg)	265.0
Iron (mg)	10.0

ที่มา: กองโภชนาการ (2546)

จากการพยากรณ์ผลผลิตการเกษตร พบว่าในปี 2556 ประมาณความต้องการการใช้ถั่วเหลืองของไทยรวม 2.330 ล้านตัน เพิ่มขึ้นจาก 2.227 ล้านตัน ในปี 2555 หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 4.63 โดยในจำนวนดังกล่าวใช้เพื่อสกัดน้ำมัน 1.676 ล้านตัน ใช้แปรรูป 0.645 ล้านตัน ที่เหลือใช้ทำพันธุ์และส่งออก โดยมีสัดส่วนการใช้ผลผลิตจากในประเทศร้อยละ 3.66 และนำเข้าร้อยละ 96.34 ของ

ความต้องการใช้ทั้งหมด โดยปริมาณการผลผลิตถั่วเหลืองรวมของโลกมีปริมาณ 269.5 ล้านตัน เพิ่มขึ้นจาก 238.7 ล้านตันในปี 2555 หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 12.9 เนื่องจากประเทศบราซิลและอาร์เจนตินาเพิ่มพื้นที่ปลูก และคาดว่าจะส่งออกเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม คาดการณ์ว่าราคาถั่วเหลืองโลกจะเพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากจีนซึ่งเป็นประเทศนำเข้ารายใหญ่มีความต้องการใช้กากถั่วเหลือง และเมล็ดถั่วเหลืองเพื่อสกัดน้ำมันเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และเมื่อราคาถั่วเหลืองโลกเพิ่มขึ้น จะส่งผลให้ราคาถั่วเหลืองในประเทศสูงขึ้น โดยคาดว่าราคาเมล็ดถั่วเหลืองคละเกรดที่เกษตรกรขายได้จะอยู่ระหว่างกิโลกรัมละ 16.00 – 18.50 บาท เพิ่มขึ้นจากปี 2555 ที่ขายได้กิโลกรัมละ 15.75 บาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556)

ไอโซฟลาโวน (Isoflavones) หรือ ไฟโตเอสโตรเจน (Phytoestrogens)

ไอโซฟลาโวนเป็นสารอินทรีย์จำพวก Flavonoids พบได้ในพืชหลายชนิดโดยเฉพาะในถั่วเหลืองซึ่งพบมากในส่วนของจมูกถั่วเหลือง และยังพบได้ในข้าวไรย์ ข้าวสาลี เมล็ดงา เมล็ดดอกทานตะวัน กานพลู แอปเปิล แครอท ข้าวโพด และอาหารอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.2

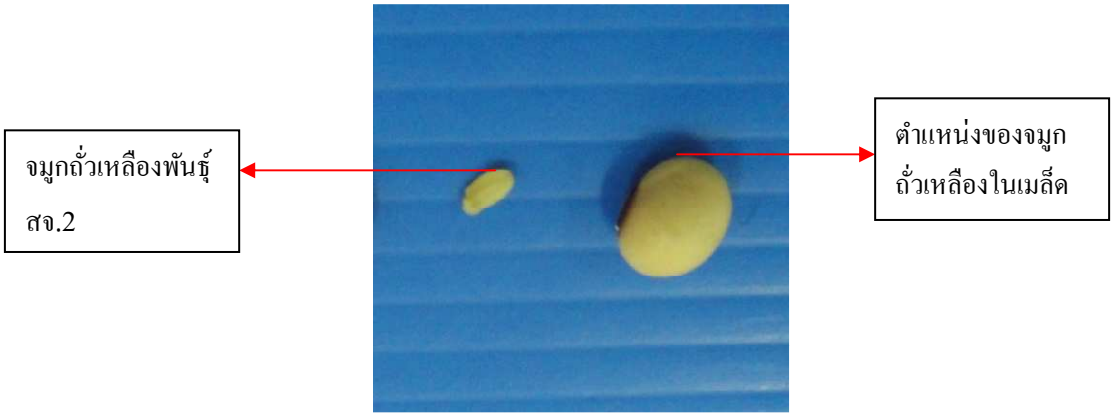
ในเมล็ดถั่วเหลือง ส่วนที่มีปริมาณไอโซฟลาโวนมากที่สุดคือ จมูกถั่วเหลือง (ภาพที่ 2.1) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของถั่วเหลืองประมาณร้อยละ 2 โดยเกือบทั้งหมดของไอโซฟลาโวนที่พบในถั่วเหลืองจะอยู่ในจมูกถั่วเหลืองถึง 5-6 เท่า เมื่อเทียบกับส่วนอื่นๆ ในเมล็ดถั่วเหลือง เช่น เปลือกและเนื้อถั่วเหลือง (Nahas *et al.* 2004) โดยพบปริมาณ ไดซิอินร้อยละ 25-40 ไกลซิทิอินร้อยละ 25-40 และเจนิสทิอินร้อยละ 5-20 และพบว่าปริมาณไอโซฟลาโวนทั้งหมด จะอยู่ในจมูกถั่วเหลืองถึงร้อยละ 45-60 เช่นเดียวกับรายงานของ Yue *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณไอโซฟลาโวนและค่าแอนตี้ออกซิแดนซ์ของส่วนต่างๆของถั่วเหลือง คือ Cotyledon เปลือก และ จมูกถั่วเหลือง พบว่า ถั่วเหลืองทั้ง 4 พันธุ์มีช่วงของปริมาณไอโซฟลาโวนรวม ที่ Cotyledon เปลือก และจมูกถั่วเหลือง เท่ากับ 2.73-9.71, 5.56-16.94 และ 27.76-81.43 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าในจมูกถั่วเหลืองเป็นส่วนที่มีปริมาณไอโซฟลาโวนรวมมากกว่าในทุกๆส่วนที่กล่าวข้างต้นโดยคุณสมบัติทางเคมีของทั้ง 3 ส่วน คือ Cotyledon เปลือก และจมูกถั่วเหลืองนั้น

ตารางที่ 2.2 ปริมาณของไอโซฟลาโวนในอาหารตามธรรมชาติ (มิลลิกรัม/100กรัม)

อาหาร	**Isoflavone (mg/100g of food)**
ถั่วดำ (ดิบ) น้ำมันคาโนลาและน้ำมันถั่วเหลือง	0.00
ถั่วแดง (ดิบ)	0.01
ซุปมิโซะ	42.55
ถั่วลิสง (ดิบ)	0.26
ถั่วลันเตา (ดิบ)	2.42
เนยถั่วเหลือง (ไม่ระบุยี่ห้อ)	31.32
เนยแข็งถั่วเหลือง (cheddar)	7.15
เครื่องดื่มถั่วเหลือง (soy drink)	7.01
แป้งถั่วเหลืองดิบ (soy flour)	177.89
นมถั่วเหลือง (soy milk)	0.56
ฟองเต้าหู้ (ดิบ)	193.88
ฟองเต้าหู้ (สุก)	50.70
โปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นจากการใช้น้ำสกัด (Soy protein concentrate, aqueous wash)	102.07
โปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นจากการใช้แอลกอฮอล์สกัด (Soy protein concentrate produced by alcohol extraction)	12.47
โปรตีนถั่วเหลืองสกัด(Soy protein isolate)	97.43
ซอสถั่วเหลือง (จากไฮโดรไลซ์ โปรตีนจากผัก)	0.10
ซอสถั่วเหลือง (โชยุ)	1.64
ถั่วเขียว (ดิบ)	151.71
ถั่วงอก	4.71
ชาเขียวญี่ปุ่น	0.05
จมูกถั่วเหลือง	2,000.00 – 2,500.00

ที่มา: USDA (2007)

Liu (1997) รายงานว่าใน Cotyledon จะมีส่วนประกอบหลักเป็นโปรตีน ขณะที่จมูกถั่วเหลืองจะอุดมไปด้วยคาร์โบไฮเดรต ซึ่งในปัจจุบันในอุตสาหกรรมน้ำนมถั่วเหลืองยังไม่นิยมนำจมูกถั่วเหลืองมาใช้มากนักเนื่องจากในจมูกถั่วเหลืองมีคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลายน้ำอยู่ (Schryver, 2002) แต่ก็ยังมีการนำจมูกถั่วเหลืองไปแปรรูปในอาหาร เช่น คุกกี้ และยังทำเป็นแคปซูลในรูปแบบอาหารเสริม (Bae *et al.* 2005) จากการศึกษาของ Song *et al.* (1998) พบว่า จมูกถั่ว 60 กรัม มีปริมาณไอโซฟลาโวนรวม 1,392 มิลลิกรัม โดยแยกเป็น ไดซิอิน 672 มิลลิกรัม เจนิสทิอิน 185 มิลลิกรัม และ ไกลซิทิอิน 534 มิลลิกรัม

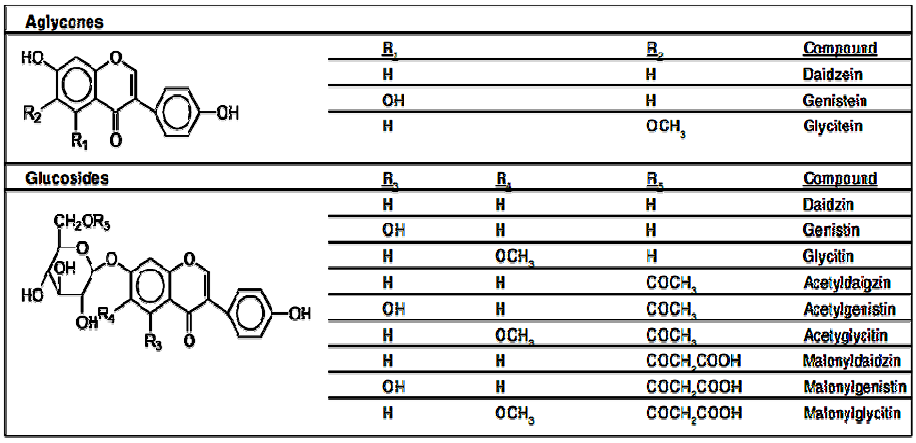


ภาพที่ 2.1 จมูกถั่วพันธุ์ สจ.2

ไอโซฟลาโวน เป็นสารที่มีโครงสร้างและบทบาทคล้ายเอสโตรเจนซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศหญิง มีผลในการลดอาการร้อนวูบวาบ เนื่องจากภาวะหมดประจำเดือน และมีคุณสมบัติในการช่วยป้องกันโรคมะเร็งบางชนิด โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคกระดูกพรุน (Murphy *et al.* 2002 ; Messina, 1999) สารไอโซฟลาโวน มีโครงสร้างทางเคมีหลายรูปแบบโดยมีโครงสร้างหลักแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ กลุ่มของกลูโคไซด์ ได้แก่ ไดซิน เจนิสทิน ไกลซิทิน อะซิทิลไดซิน อะซิทิลเจนิสทิน อะซิทิลไกลซิทิน มาโลนิลไดซิน มาโลนิลเจนิสทิน และมาโลนิลไกลซิทิน ในส่วนของอะไกลโคน ได้แก่ ไดซิอิน เจนิสทิอิน และ ไกลซิทิอิน ดังแสดงตามภาพที่ 2.2

จากการศึกษาพบว่าโครงสร้างชนิดอะไกลโคน โดยเฉพาะ เจนิสทิอิน (4, 5, 7-trihydroxyisoflavone) และ ไดซิอิน (4, 5 , 7-dihydroxyisoflavone) สามารถถูกดูดซึม (passive) ผ่านทางระบบทางเดินอาหารได้อย่างรวดเร็วและมีปริมาณของสารในร่างกายมากกว่าในโครงสร้างกลูโคไซด์ (Setchelle, 2000) ทำให้มีการศึกษาไอโซฟลาโวนทั้งสองชนิดอย่างกว้างขวางเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในด้านการแพทย์ และเพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริม โดยส่วนใหญ่แล้ว

ไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองจะอยู่ในรูปเบต้ากลูโคไซด์ (β-glucoside conjugates) (Kudou *et al*., 1991) จากการวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองพบว่า ในถั่วเหลืองหมักและผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักจะมีองค์ประกอบของไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน ในปริมาณมากกว่าผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของไอโซฟลาโวน
ที่มา Liggins *et al*. (1998)

บทบาทของไอโซฟลาโวนต่อสุขภาพ

โรคหลอดเลือดหัวใจ

หญิงวัยเจริญพันธุ์มีความเสี่ยงต่อโรคหัวใจน้อยกว่าผู้ชาย แต่หลังจากหมดประจำเดือนความเสี่ยงของทั้งสองเพศนั้นในอายุใกล้เคียงกันเท่าๆกัน (American Heart Association, 1997) การใช้ฮอร์โมนทดแทน (Hormone replacement therapy = HRT) ช่วยหญิงวัยสูงอายุควบคุมระดับแอลดีแอลคอเลสเทอรอลและลดความเสี่ยงโรคหลอดเลือดหัวใจได้ และมีงานวิจัยสนับสนุนว่าการบริโภคโปรตีนถั่วเหลืองมีผลในการลดคอเลสเทอรอลและให้ประโยชน์ต่อสุขภาพหัวใจ (Anderson and Johnstone, 1995) ซึ่งเป็นผลมาจากสารเจนิสทีอิน ในถั่วเหลือง (Anthony *et al*., 1996)

การป้องกันโรคหัวใจ

ไอโซฟลาโวนมีฤทธิ์เป็นสารแอนตี้ออกซิแดนซ์จึงป้องกันหลอดเลือดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอลดีแอลคอเลสเทอรอล จึงช่วยลดปริมาณคอเลสเทอรอล ขณะเดียวกันยังเพิ่มปริมาณเอชดีแอล (HDL ; High density lipo protein) ซึ่งเป็นคอเลสเทอรอลตัวที่ดี สารไฟโตเอสโตรเจนในถั่วเหลืองยับยั้งปฏิกิริยาไฟโตออกซิเดชันของแอลดีแอลคอเลสเทอรอล

ป้องกันการแข็งตัวของเลือดตามผนังหลอดเลือดซึ่งเป็นสาเหตุของโรคหัวใจ นอกจากนี้สารสำคัญในถั่วเหลืองยังช่วยในการทำให้หลอดเลือดยืดหยุ่นด้วย

ช่วยควบคุม หรือจัดการระบบฮอร์โมนในวัยทอง

ในช่วงก่อนหมดประจำเดือนผู้หญิงจะมีระดับเอสโตรเจนในเลือดแปรปรวน ซึ่งนอกจากจะเพิ่มความเสี่ยงโรคหัวใจและกระดูกพรุนในผู้หญิง (American Heart Association. 1997) และยังทำให้เกิดอาการวัยทอง เช่น ร้อนวูบวาบ เหงื่อออกกลางคืน นอนไม่หลับ ช่องคลอดแห้ง หรือปวดศีรษะ การเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนมีผลไปทั่วร่างกาย เนื่องจากอวัยวะทั่วไปในร่างกายมีตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptors) 2 ชนิด คือ ชนิดแอลฟา (ER-A) และเบต้า (ER-B) (Kuiper *et al*., 1997) ผู้ชายเองก็มีตัวรับเอสโตรเจนเช่นกัน ER-A พบมากในไต มดลูก ต่อมพิทูอิทารี (pituitary) และ epididymis อวัยวะส่วนอื่นมี ER-B ในปริมาณเท่าๆกัน หรือมากกว่า เช่น รังไข่ ต่อมลูกหมาก และสมอง นอกจากนี้ยังมีตัวรับเอสโตรเจนในระบบหลอดเลือดและกระดูก เอสโตรเจนจึงมีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพและเนื้อเยื่อเหล่านี้ ฉะนั้นระดับเอสโตรเจนที่ลดลงในวัยหมดประจำเดือนจึงมีผลในการเพิ่มความเสี่ยงโรคหลอดเลือด และกระดูกพรุน (National Osteoporosis Foundation,1997)

สารไฟโตเอสโตรเจนในถั่วเหลืองในรูปไอโซฟลาโวน เจนนิสทินและไดซินมีฤทธิ์เป็นเอสโตรเจนอ่อนๆ ต่อสัตว์และมนุษย์ (Knight *et al.* 1996) จึงเป็นที่สนใจต่อนักวิจัยในการมองหาทางเลือกที่จะช่วยลดปัญหาสุขภาพในหญิงวัยหมดประจำเดือน มีงานวิจัยกล่าวว่า การบริโภคไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองในหญิงก่อนหมดประจำเดือน ช่วยชะลอการมีประจำเดือนและมีผลต้านฤทธิ์เอสโตรเจน การวิจัยเปรียบเทียบในหญิงวัยทองพบว่าไอโซฟลาโวนในอาหารสามารถทำตัวเสริมและต่อต้านฤทธิ์ของเอสโตรเจนได้อย่างอ่อนๆ ขึ้นอยู่กับปริมาณตัวรับเอสโตรเจนในเซลล์

Dalais *et al.* (1998) ศึกษาเกี่ยวกับการใช้ไฟโตเอสโตรเจนจากจมูกถั่วเหลืองโดยแบ่งกลุ่มผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนที่มักมีอาการร้อนวูบวาบ (Hot flushes) เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกให้ได้รับจมูกถั่วเหลือง และอีกกลุ่มไม่ได้รับจมูกถั่วเหลือง (กลุ่มควบคุม) พบว่า กลุ่มที่ได้รับจมูกถั่วเหลืองมีอาการร้อนวูบวาบหายไปร้อยละ 44 แต่ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอาการร้อนวูบวาบ หายไปแค่ร้อยละ 10 เท่านั้น สอดคล้องกับ Han *et al.* (2002) รายงานว่า ของผู้หญิง วัยหมดประจำเดือนที่ได้รับไอโซฟลาโวนชนิดแคปซูลปริมาณ 100 มิลลิกรัมประจำทุกวัน มีอาการร้อนวูบวาบลดลงภายในเวลา 4 เดือน

โรคกระดูกพรุน

ภาวะกระดูกพรุนพบมากในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน หญิงวัยหมดประจำเดือนที่อายุ 50 ปีขึ้นไปมีความเสี่ยงต่อโรคกระดูกพรุน เนื่องจากขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน ทำให้เนื้อกระดูกลดลงอย่างรวดเร็ว และลดลงเรื่อยๆ ตามอายุ ผู้หญิงบางคนที่ประจำเดือนหมดเร็วกว่าปกติ อาจจะสูญเสียเนื้อกระดูกเร็วขึ้นประมาณร้อยละ 1-3 ต่อปี โดยเฉพาะในช่วงปีแรกของการหมดประจำเดือน และเมื่ออายุมากขึ้นปริมาณการสูญเสียเนื้อกระดูกเท่ากับร้อยละ 0.7-1.0 ต่อปี การใช้ฮอร์โมนเอสโตรเจน เป็นวิธีที่ดีที่ให้ผลในการป้องกันการสูญเสียเนื้อกระดูกซึ่งทำให้เกิด กระดูกพรุนในหญิง และป้องกันกระดูกสันหลังหัก รวมทั้งในหญิงหลังหมดประจำเดือน จะช่วยลดการสูญเสียเนื้อกระดูกประมาณร้อยละ 50 ไอโซฟลาโวนชนิด ไดซิอิน มีฤทธิ์คล้ายยาที่ใช้ในการรักษาโรคกระดูกพรุนในหญิงหลังหมดประจำเดือนคือ ipriflavones ซึ่งจะถูกเมทาบอไลซ์ไปเป็นไดซิอิน ในร่างกาย และ ไดซิอิน มีผลช่วยยับยั้งการสลายของเนื้อกระดูกพรุน

การป้องกันมะเร็ง

การศึกษาในประชากรชาวเอเชียซึ่งมีการบริโภคผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองมากกว่าชาวตะวันตก พบว่าหญิงเอเชียเป็นโรคมะเร็งเต้านมน้อยกว่าหญิงชาวตะวันตกถึง 5 เท่า ในทำนองเดียวกันพบว่าชายชาวเอเชียเป็นมะเร็งในต่อมลูกหมากน้อยกว่าชาวตะวันตก 20 เท่า นักวิจัยเชื่อว่าสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองอาจจะลดอัตราเสี่ยงการเกิดมะเร็งในต่อมลูกหมาก โดยการแทรกแซงการทำงานของฮอร์โมนเทสโทสเทอโรน (Testosterone) ในชาย หรืออาจจะยับยั้งการเจริญของเซลมะเร็งโดยการลดปริมาณการผลิตฮอร์โมนเทสโทสเทอโรน

การบริโภคถั่วเหลืองหมักได้รับความนิยมในกลุ่มผู้บริโภคในแถบเอเชียจึงมีความกังวลในกลุ่มของนักวิชาการว่า การบริโภคผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักเป็นปริมาณมากอาจส่งผลทำให้ร่างกายได้รับปริมาณของไอโซฟลาโวนเกินขนาดหรือส่งผลข้างเคียงต่อร่างกาย จึงมีการศึกษาถึงความปลอดภัยในการบริโภคไอโซฟลาโวน ดังจะเห็นได้จากผลการทดลองในผู้หญิงที่อยู่ในช่วงวัยเจริญพันธุ์ 28 คน ที่ได้รับไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน ที่ความเข้มข้น 45 มิลลิกรัม ต่อวัน เป็นเวลา 14 วันติดต่อกัน โดยการรับประทานโปรตีนถั่วเหลืองไม่พบว่ามีผลข้างเคียงอย่างมีนัยสำคัญ (Hargreaves *et al*., 1999) นอกจากนี้พบว่าในผู้ที่หายจากการป่วยด้วยโรคมะเร็งเต้านมจำนวน 177 คน ที่มีการบริโภคไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองชนิดเม็ดที่มีความเข้มข้น 150 มิลลิกรัม ต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ไม่มีผลข้างเคียงต่อการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อและเนื้อเยื่อบริเวณต่อมน้ำนมแต่อย่างใด (Quella *et al*., 2000) และยังมีการศึกษาของ Takehito *et al* (2002) ได้ทำการศึกษา

เกี่ยวกับการผลิตไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนจากสารสกัดที่ได้จากผลิตภัณฑ์ถั่วหมักพื้นบ้านเพื่อต่อต้านการสร้างหลอดเลือดฝอยในถุงน้ำคร่ำ พบว่า เมื่อใช้เจนิสทิอินร่วมกับโพลีแซคคาไรด์จะมีฤทธิ์ต่อต้านการสร้างหลอดเลือดฝอยได้ดีกว่าการใช้สารสกัดจากถั่วเพียงอย่างเดียวจากการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการรับประทานผลิตภัณฑ์ที่มีไอโซฟลาโวนจึงมีคุณประโยชน์และปลอดภัยต่อผู้บริโภคทุกประเภทที่สามารถบริโภคถั่วเหลืองได้ นอกจากนี้แล้วการบริโภคผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองชนิดที่เป็นอะไกลโคนแล้วจะเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น ลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดอุดตัน และยังช่วยให้กระดูกแข็งแรงมากในผู้สูงอายุ อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่มีมาตรฐานปริมาณการบริโภค (dietary reference intakes: DRI) ที่ควรบริโภคสำหรับไอโซฟลาโวน แต่อย่างไรก็ตามจากการวิจัยของนักวิจัยได้แนะนำว่าควรบริโภคไอโซฟลาโวน 20-50 มิลลิกรัมต่อวัน (Setchel and Cassidy, 1999)

แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการหมัก

แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในการหมักส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกรัมบวก รูปแท่ง มีการสร้างเอนโดสปอร์ (คนึงกานต์ และอัญชลี, 2543) ซึ่ง เอนโดสปอร์ เป็นโครงสร้างที่เกิดขึ้นเมื่อแบคทีเรียในกลุ่มนี้อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ เช่น ในสภาวะที่ขาดแคลนอาหาร ความแห้งแล้ง ความร้อนสูง เป็นต้น อีกทั้งเอนโดสปอร์มีความทนทานต่อรังสี และสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ปกติ โครงสร้างชนิดนี้มีชีวิตรอดได้เนื่องจากเป็นโครงสร้างที่ปราศจากการสร้างกลไกเมตาบอลิซึม หรือ Cryptobiosis แต่เมื่อโครงสร้างดังกล่าวไปตกอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ เอนโดสปอร์จะได้รับการกระตุ้นและจะงอกเป็นเซลล์ปกติ (Vegetative cell) มีการดำรงชีวิตต่อไปตามวงจรการเจริญเติบโตปกติ

Bacillus sp. เป็นสายพันธุ์ที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค เป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรคต่อมนุษย์ อีกทั้งยังมีประโยชน์ต่อสุขภาพอีกด้วย จัดอยู่ใน Super Kingdom *Prokaryota*, Kingdom *Eubacteria*, Family *Bacillaceae*, Genus *Bacillus* รูปร่างลักษณะทั่วไป เป็นเซลล์รูปแท่งเรียงตัวกันแบบเดี่ยว หรือบางครั้งอาจต่อกันเป็นเส้นสาย และมีขนาด 0.6 - 0.7 x 2.0 - 3.0 ไมโครเมตร (ศุภยางค์, 2547) มีเอนโดสปอร์รูปไข่ อยู่กลางเซลล์หรือค่อนไปทางปลายเซลล์ ส่วนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีลักษณะกลม ขอบไม่เรียบ ผิวหน้าทึบแสง ผิวหน้าอาจจะย่น สีครีมหรือสีน้ำตาล แต่ถ้าในจานอาหารที่มีความชื้นมากจะทำให้โคโลนีแผ่ลามออกมาก ส่วนเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสร้อยละ 10 เป็นองค์ประกอบ โคโลนีจะมีลักษณะหนาสีน้ำตาล ส่วนการเจริญบนอาหารเหลว เชื้อจะอยู่บนผิวหน้าอาหาร มีความขุ่นเล็กน้อยถึงไม่มีความขุ่น เป็น Aerobic หรือ Facultative anaerobic bacteria สร้าง Catalase ติดสีกรัมบวก เจริญได้ในสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 5.5-8.5 สร้างเอนไซม์ในกลุ่ม Hydrolytic enzyme ที่สลาย Polysaccharide,

Nucleic acid และ Lipid โดยใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอน และมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็คตรอน บทบาทสำคัญของชนิดนี้ในการหมักคือ การปล่อยเอนไซม์โปรติเอสออกมาย่อยโปรตีน (นงนุช, 2547) ทำให้ถั่วเน่ามีลักษณะด้านกลิ่นรสและเนื้อสัมผัสจำเพาะ

ในกระบวนการหมักถั่วเหลืองด้วยวิธีดั้งเดิมตามภูมิปัญญาของไทย (ถั่วเน่า) นั้นพบว่าผลิตภัณฑ์เกิดจากการหมักโดยเชื้อหลากหลายสายพันธุ์ซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนตามธรรมชาติ เมื่อทำการคัดแยกและการจำแนกจากตัวอย่างถั่วเหลืองหมักพื้นบ้านของไทยพบว่าในแต่ละช่วงเวลาที่ทำการหมัก จะมีปริมาณและชนิดของเชื้อแตกต่างกัน โดยสามารถตรวจพบแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* spp. เป็นเชื้อซึ่งมีจำนวนประชากรสูงที่สุด และถือว่าเป็นเชื้อที่มีบทบาทในการหมักได้ในทุกช่วงเวลา (ตารางที่ 2.3) นอกจากนี้ยังสามารถพบแบคทีเรียแลกติกหลังจากทำการหมักไปแล้ว 24 ชั่วโมง (Leejeerajumnean *et al*. 2001)

ตารางที่ 2.3 เชื้อ *Bacillus* spp. ที่ตรวจพบในถั่วเหลืองหมักพื้นบ้านของไทย

Fermentation time (Hours)	Strain
0	*B. subtilis*, *B. megaterium*
24	*B. subtilis*, *B. megaterium*
48	*B. subtilis*, *B. megaterium*
72	*B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus*
Final product	*B. subtilis*, *B. megaterium*

ที่มา : Leejeerajumnean *et al*. (2001)

Bacillus coagulans

Bacillus coagulans หรือเรียกว่า *Bacillus thermoacidurans* เป็นแบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างสปอร์ เจริญได้ในอุณหภูมิสูง (Thermophilic bacteria) และสปอร์ของแบคทีเรีย *Bacillus coagulans* อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเจริญเติบโตคือ 35-50 องศาเซลเซียส และ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ในช่วง 5.5 และ 6.5 (Vecchi and Drago, 2006) เป็นจุลินทรีย์ที่จัดเป็นจำพวกโพรไบโอติกและปลอดภัยต่อมนุษย์ (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2551)

การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในระหว่างการหมัก

ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักจากเชื้อ *Bacillus* spp. ซึ่งจะมีการสร้างเอนไซม์โปรติเอสออกมาย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองให้โมเลกุลที่มีขนาดเล็กลงจนกระทั่งได้เป็นกรดอะมิโน จากนั้นแบคทีเรียจะใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน และแหล่งพลังงานโดยปฏิกิริยา Deamination โดยจะมีการ

ปลดปล่อยแอมโมเนียออกมา (Macko and Estep, 1984) ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของถั่วเหลืองสูงขึ้น สภาวะที่เป็นด่างส่งผลให้จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในถั่วเหลืองไม่สามารถเจริญได้

ปริมาณของกรดอะมิโนในระหว่างการหมักจะสูงขึ้น เนื่องจากมีการปลดปล่อยกรดอะมิโนออกมานอกเซลล์ของเชื้อที่ทำการหมักถั่วเหลือง ชนิดของกรดอะมิโนที่ปลดปล่อยออกมาจากผลิตภัณฑ์นัตโต ได้แก่ กรดกลูตามิค แวลีน และอะลานีนโดยจะมีปริมาณสูงขึ้นจากถั่วเหลืองก่อนการหมัก (Sakurai, 1960)

สารระเหยได้ง่ายในถั่วเหลืองหมักซึ่งพบในนัตโตประกอบด้วย 3-Hydroxybutanone butanedione, 2,3-Butanediol acetic acid, Propanoic acid, 2-Methyl-propanoic acid, 2-Methyl-butanoic acid, 3-Methyl- butanoic acid และ Pyrazines (Kanno *et al*. 1982) สำหรับในถั่วเน่าจะมีสารระเหยง่ายมากกว่าในนัตโตโดยมีการพบสารประกอบจำพวก Aldehydes, Aliphatic acid, Ester และสารประกอบจำพวกกำมะถันเป็นสารระเหยง่ายเฉพาะในถั่วเน่า ทำให้มีกลิ่นรสคล้ายกลิ่นเนื้อในขณะที่นัตโตมีกลิ่นคล้ายผลไม้ออกมาจากผลิตภัณฑ์ (Leerajumnean *et al*. 2001)

การหมักถั่วเหลืองจะเกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยในระหว่างการหมักจะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งถั่วเหลืองที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นสูงจะมีปริมาณค่าความเป็นกรด-ด่างสูงไปด้วย เนื่องจากปริมาณเชื้อเริ่มต้นมากกว่าจะส่งผลให้เชื้อเกิดปฏิกิริยา Deamination ขึ้นมาก เกิดการย่อยโปรตีนเป็นกรดอะมิโนทำให้ปลดปล่อยแอมโมเนียซึ่งมีฤทธิ์เป็นด่างอ่อน ในปริมาณสูงทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้น (Visessanguan, 2004)

จมูกถั่วเหลืองหมัก (จมูกถั่วเหลืองชีวภาพ)

คุณสมบัติทางเคมีของจมูกถั่วเหลืองระหว่างการหมักโดยการชักนำจากเชื้อแบคทีเรียแลกติก (Pyo *et al.*, 2005) และเปลี่ยนโครงสร้างของไอโซฟลาโวนจากชนิด กลูโคไซด์ ให้เป็นชนิด อะไกลโคน โดยกระบวนการของเอนไซม์ β-glucosidase (Tsangalis *et al.,* 2002) เช่นเดียวกับการทดลองของ Hubert *et al.* (2007) ศึกษาเกี่ยวกับการหมักจมูกถั่วเหลืองจากเชื้อแบคทีเรียแลกติก พบว่าการหมักจมูกถั่วเหลืองทำให้โครงสร้างของ ไอโซฟลาโวนชนิดกลูโคไซด์ลดลง และชนิดอะไกลโคน เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นถึง 48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามจมูกถั่วเหลืองหรือผลิตภัณฑ์ที่ทำจากจมูกถั่วเหลืองโดยมากแล้วจะมีรสขมและฝาด (Okubo *et al.,* 1992)

หลังจากการหมักจมูกถั่วเหลืองแล้วพบว่าปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน มีทั้งหมดร้อยละ 62.7-75.3 ของปริมาณไอโซฟลาโวนทั้งหมดและปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด Malonyl, acetyl และ β- glucoside ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีเท่ากับร้อยละ 22, 15 และ 2 ตามลำดับ Hubert *et al*. (2007) และ Tsangalis *et al.* (2002) ยังได้ทำการศึกษาการใช้โปรตีนไอโซเลตจากถั่ว

เหลืองร่วมกับจมูกถั่วเหลืองในการหมักโดยใช้ *Bifidobacterium animalis* Bb-12 เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการหมัก และให้อัตราส่วนระหว่างโปรตีนไอโซเลตจากถั่วเหลืองกับจมูกถั่วเหลืองเป็น 9:1, 6:4 และ 3:7 ตามลำดับ พบว่า ที่อัตราส่วนของโปรตีนไอโซเลตจากถั่วเหลืองกับจมูกถั่วเหลือง 6:4 ให้ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนมากที่สุด

Dimitri *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาการพัฒนาการผลิตน้ำนมถั่วเหลืองที่อุดมไปด้วยไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนโดยใช้จมูกถั่วเหลืองและโปรตีนถั่วเหลืองร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งทำการทดลองโดยผลิตน้ำนมถั่วเหลืองที่ประกอบไปด้วย โปรตีนถั่วเหลืองและ จมูกถั่วเหลือง อัตราส่วน 9:1, 6:4 และ 3:7 นำไปหมักด้วย *Bifidobacterium animalis* Bb-12 และทำการนับเชื้อ วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณไอโซฟลาโวนที่เวลาหมัก 12 และ 24 ชั่วโมง ที่เวลาการเก็บในตู้เย็น 1, 7 และ 14 วัน พบว่าทั้ง 3 อัตราส่วนมีปริมาณไอโซฟลาโวนมากกว่าที่ผลิตจากโปรตีนถั่วเหลืองเพียงอย่างเดียวถึง 3, 7 และ 12 เท่า ตามลำดับ และจำนวนเชื้อก็เพิ่มขึ้นเป็น 1.2, 1.3 และ 0.9 log CFU ต่อมิลลิลิตร หลังจากบ่ม 24 ชั่วโมง โดยพบว่าที่อัตราส่วนของโปรตีนถั่วเหลือง:จมูกถั่วเหลืองเท่ากับ 9:1 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของกลูโคไซด์ส่งผลให้ปริมาณอะไกลโคนเพิ่มขึ้นจาก 0.819 เป็น 5.654 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 47 ของปริมาณไอโซฟลาโวนทั้งหมด หลังจากการบ่ม 24 ชั่วโมง และพบว่าที่อัตราส่วน 3:7 มีการเปลี่ยนรูปจากกลูโคไซด์เป็นอะไกลโคนน้อยที่สุด และอัตราส่วน 6:4 มีปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนมากที่สุด ที่ 7.801 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 26 ของทั้งหมด

นอกจากนี้ Eliana *et al.* (2004) ยังได้ศึกษาเกี่ยวกับประโยชน์ของไอโซฟลาโวนจากจมูกถั่วกับผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน พบว่า ในหญิงที่ได้รับไอโซฟลาโวน ปริมาณ 60 มิลลิกรัมต่อวัน สามารถทดแทนปริมาณฮอร์โมนในร่างกายของผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนได้เป็นอย่างดี

การสกัดไอโซฟลาโวน

Sang-Moon *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาการสกัดไอโซฟลาโวนจากจมูกถั่วเหลือง โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ที่ปริมาณ ร้อยละ 80 ของปริมาณถั่วทั้งหมด พบว่าไอโซฟลาโวนที่ได้จะมีมากที่สุดเมื่อทำการสกัดที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และยังมีการศึกษาของผ่องศรี และคณะ (2544) ได้ทำการสกัดไอโซฟลาโวนจากกากถั่วเหลืองด้วยเอทานอล พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดไอโซฟลาโวนมากที่สุดคือ ใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 64 ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส นาน 110 นาที ซึ่งจะให้ปริมาณไอโซฟลาโวนรวม 62.23 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ Gustavo *et al.* (2006) ที่ทำการศึกษา ตัวทำละลายต่างกัน คือ เมทานอล เอทานอล และ อะซิโตไนไตรล์ ในการสกัดไอโซฟลาโวนจากแคปซูลจมูกถั่วเหลือง พบว่าเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 และ อะซิโตไนไตรล์ ความเข้มข้นร้อยละ 60 ให้ปริมาณ

ไอโซฟลาโวนรวมมากที่สุดจากรายงานของ Patricia *et al.* (2002) ที่ได้ทำการศึกษาตัวทำละลายในการสกัดไอโซฟลาโวนในผลิตภัณฑ์อาหารจากถั่วเหลือง โดยใช้อะซิโตไนไตรล์ อะซิโตนเอทานอล และ เมทานอล เป็นตัวทำละลาย พบว่า อะซิโตไนไตรล์ เป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดไอโซฟลาโวนจากผลิตภัณฑ์อาหารจากถั่วเหลือง

การผลิตไอโซฟลาโวนบริสุทธิ์

โดยปกติแล้วการทำให้ ไอโซฟลาโวนมีความบริสุทธิ์มีอยู่ 2 วิธีด้วยกัน คือ Liquid-liquid extraction และ คอลัมน์โครมาโตรกราฟี ซึ่งการทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโตรกราฟี จะใช้ตัวดูดซับชนิด Polystyrene-dinylbenzene ยกตัวอย่างเช่น Amberlite XAD-4 resins, XAD-16HP resins เป็นต้น และชนิด Polylmethacrylate ยกตัวอย่างเช่น Amberlite XAD-7HP resins (Wu and Lai, 2007) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้

Amberltie XAD-4 เป็นเรซิ่นชนิด macroporous styrene-divinylbenzenecopolymer ซึ่งพบว่าเป็นเรซิ่นที่ดีที่สุดสำหรับการกำจัดสาร phenolic compounds จากสารละลายที่ละลายได้ด้วยน้ำแต่จะไม่สามารถกำจัดสารที่ไม่สามารถละลายได้ด้วยน้ำ (Li *et al.,* 2001) ซึ่งมีลักษณะเฉพาะดังนี้

- โครงสร้างเป็นแบบ polystyrene
- ไม่มีความสามารถเป็นขั้วไฟฟ้า
- พื้นที่ผิวสัมผัส 880.2 ตารางเมตรต่อกรัม
- ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ย 5.83 นาโนเมตร
- ขนาดอนุภาค 0.5 นาโนเมตร

Amberlite XAD-2 เป็นเรซิ่นที่นิยมใช้ในการสกัดสารระเหยในรูปไกลโคไซด์ (Crouzet and Chassagne, 1999) เนื่องจากเรซิ่น Amberlite XAD-2 มีลักษณะเป็นสารไฮโดรโฟบิก โดยจะดูดซับส่วนที่ไม่มีขั้วของสารไกลโคไซด์ไว้

Cho *et al*., (2009) ทำการศึกษาเกี่ยวกับการทำให้ถั่วเหลืองแบบงอกมีความบริสุทธิ์ โดยใช้ Amberlite XAD-2 และ Diaion HP-20 เป็นตัวดูดซับไอโซฟลาโวน พบว่า ปริมาณไอโซฟลาโวนจะถูกดูดซับโดย Diaion HP-20 ได้ดีกว่า Amberlite XAD-2 และมีรายงานการศึกษาของ Chang *et al.* (2004) โดยทำการศึกษาเกี่ยวกับการสกัดและการทำให้ไอโซฟลาโวนบริสุทธิ์จากถั่วเหลืองโดยใช้ Amberlite XAD 16-HP resins พบว่า สามารถผลิตไอโซฟลาโวนบริสุทธิ์ได้ร้อยละ 37 และพบค่าร้อยละ 48.9 ของปริมาณไอโซฟลาโวนทั้งหมด ที่ไม่สามารถดูดซับไว้ได้