บทสรุปผู้บริหาร

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและจลนพลศาสตร์ของการหมักผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมัก ศึกษาโดยทำการจำลองการผลิตน้ำถั่วเหลือง (Soybean broth; SB) โดยไม่เติมหัวเชื้อเปรียบเทียบกับน้ำถั่วเหลืองหมักที่เติมหัวเชื้อ (Fermented soybean broth; FSB) และติดตามการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18, 24 และวันที่ 2, 3, 4, 7, 10, 14, 17 และ 21ของการหมัก เพื่อตรวจสอบการมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและตรวจหาสาร isoflavone ในผลิตภัณฑ์ รวมทั้งตรวจหาปริมาณโปรตีน ไขมัน ความชื้น ชนิดและจำนวนจุลินทรีย์ และประเมินประสาทสัมผัสต่อการบริโภคผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ซึ่งผลการศึกษาสามารถสรุปได้ดังนี้

1. ถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่างๆในประเทศไทย ทั้ง 6 สายพันธุ์ที่นำมาศึกษาวิจัยนี้มีปริมาณ Phytoestrogen ต่างกันโดย ถั่วเหลืองสายพันธุ์ตาแดง (สจ.2) มีปริมาณ daidzin, daidzein และ genistein มากที่สุด โดยมีปริมาณ 948.6 $\pm$ 19.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 5.2 $\pm$ 1.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 27.5 $\pm$ 4.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และ genistin พบมากที่สุดในสายพันธุ์ราชมงคล โดยมีปริมาณ 949.2 $\pm$ 31.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อนำมาประกอบกับผลการวิเคราะห์ Proximate ซึ่งพบปริมาณโปรตีนที่มากที่สุดในสายพันธุ์ สจ.2 ดังนั้น สายพันธุ์ที่เหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและมีคุณสมบัติของ Phytoestrogen จึงน่าจะเป็นสายพันธุ์ สจ.2 แต่ในศึกษาการทดลองนี้ได้เลือกถั่วเหลืองสายพันธุ์เชียงใหม่ 60 เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่มีเก็บไว้ตลอดในกรมวิชาการเกษตรของจังหวัดเชียงใหม่ และพบว่าถั่วสายพันธุ์นี้มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด และปริมาณ Diazein และ Genistein สูง

2. หัวเชื้อในการผลิตน้ำถั่วเหลืองหมัก คือ แบคทีเรีย *Lactobacillus casei* โดยได้จากโครงการวิจัยเรื่อง "ส่วนประกอบ คุณสมบัติทางเคมี และชีวภาพของผลิตภัณฑ์น้ำหมักชีวภาพที่ได้จากพืชเพื่อการบริโภค" โดย ผศ.ดร.ไชยวัฒน์ ไชยสุต และคณะ (2546) นำมาใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการหมักถั่วเหลือง ซึ่งผลการศึกษาและวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลือง และน้ำถั่วเหลืองหมัก พบว่าน้ำถั่วเหลืองมีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว และมีฟองแก๊ส มีค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์สุดท้ายเท่ากับ 4.13 ปริมาณกรดโดยรวมเทียบเป็นกรดแลกติกเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.06 เป็นร้อยละ 0.21 (ปริมาตร/ปริมาตร) มีปริมาณโปรตีนที่ละลายเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับร้อยละ 5.86 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในวันที่ 17 ของการหมัก และมีปริมาณไขมันเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับร้อยละ 0.24 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในวันที่ 21 ของการหมัก และความชื้นสูงสุดร้อยละ 97.45 ในวันที่ 17 ของการหมัก และตรวจพบจุลินทรีย์ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สุดท้ายเท่ากับ 4.9×10^4 โคโลนี/มิลลิลิตรตัวอย่าง ซึ่งเป็นแบคทีเรียโคลิฟอร์มและ แบคทีเรีย *Bacillus* sp. แต่ตรวจไม่พบจุลินทรีย์ปนเปื้อนชนิดที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร *Escherichia coli*,

Staphylococcus aureus, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonela* และ *Shigella* spp. และจากการประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS, FRAP, Superoxide scavenging และ Nitric oxide scavenging พบว่ามีฤทธิ์สูงสุดในวันแรกของการหมัก และมีค่าลดลงหลังจากนั้น และเมื่อพิจารณาจากการวิเคราะห์ปริมาณ Genistin, Daidzin, Genistein และ Daidzein มีปริมาณเริ่มต้นใกล้เคียงกับน้ำถั่วเหลืองหมัก และมีค่าคงที่ ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ส่วนน้ำถั่วเหลืองหมักมีกลิ่นหอม และรสเปรี้ยว และมีสีน้ำตาลอ่อน ไม่มีแก๊ส น้ำถั่วเหลืองหมักมีค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์สุดท้ายเท่ากับ 3.05 ปริมาณกรดโดยรวมเทียบเป็นกรดแลกติกเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.06 เป็นร้อยละ 0.47 (ปริมาตร/ปริมาตร) มีปริมาณโปรตีนที่ละลายเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับร้อยละ 19.97 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในวันที่ 3 ของการหมัก และมีปริมาณไขมันเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับร้อยละ 0.67 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในวันที่ 17 ของการหมัก และความชื้นสูงสุดร้อยละ 98.31 ในวันที่ 21 ของการหมัก และตรวจไม่พบจุลินทรีย์ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สุดท้าย แต่พบปริมาณแบคทีเรียแลกติกสูงสุดเท่ากับ 2.2×10^6 โคโลนี/มิลลิลิตรตัวอย่าง แต่ตรวจไม่พบจุลินทรีย์ปนเปื้อนชนิดที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonela* และ *Shigella* spp.

การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

3. การประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมักโดยวิธีต่างๆ ได้ผลการศึกษาดังนี้

- จากการประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี ABTS (2,2 azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid radical)) free radical decolorization assay ซึ่งประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยอาศัยความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระโดยเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox (Trolox Equivalent Antioxidative Capacity) หรือ TEAC พบว่าน้ำถั่วเหลืองหมักมีค่า TEAC สูงกว่าน้ำถั่วเหลือง แสดงว่าน้ำถั่วเหลืองหมักฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่าน้ำเหลือง และมีฤทธิ์สูงสุดในวันที่ 2 ของการหมัก

- จากการประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี Reducing power on ferric assay (Ferric reducing antioxidant power assay; FRAP) ซึ่งประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยอาศัยความสามารถในการเปลี่ยน Fe^{3+} ให้อยู่ในรูป Fe^{2+} หรือความสามารถในการให้อิเลคตรอนของตัวอย่าง ซึ่งแปลผลเป็นค่า FRAP value ซึ่งพบว่าน้ำหมักถั่วเหลืองมีค่า FRAP value สูงกว่าน้ำถั่วเหลือง แสดงว่าน้ำถั่วเหลืองหมักฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่าน้ำเหลือง และมีฤทธิ์สูงสุดในวันที่ 2 ของการหมักเช่นเดียวกัน

- จากการประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี Superoxide scavenging เป็นการศึกษาถึงฤทธิ์การขจัดอนุมูลอิสระ Superoxide โดยใช้ระบบ Niconinamide adenine dinucleotide (NADH) และ Phenazine methosulfate (PMS) เป็นตัวกำเนิดอนุมูลอิสระ Superoxide พบว่าในน้ำถั่วเหลืองหมักนั้นมีค่าแนวโน้ม Superoxide scavenging สูงกว่าฤทธิ์ Superoxide scavenging ในน้ำถั่วเหลือง (SB) และทั้งในน้ำถั่วเหลืองหมัก (FSB) และน้ำถั่วเหลือง (SB) นั้น มีแนวโน้มฤทธิ์ในการทำหน้าที่ Superoxide scavenging เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ จากการทดสอบฤทธิ์ Superoxide scavenging พบว่า

น้ำถั่วเหลืองมีฤทธิ์สูงสุด เมื่อเริ่มต้นการทดลอง ณ เวลาที่ 0 ส่วนน้ำถั่วเหลืองหมัก พบว่ามีฤทธิ์สูงสุด ณ วันที่ 7 ของการหมัก ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 75.48

- จากการประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี Nitric oxide scavenging เป็นการศึกษาฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ Nitric oxide โดยใช้ Sodium nitroprusside เป็นตัวกำเนิดอนุมูลอิสระ Nitric oxide พบว่าในน้ำถั่วเหลืองหมักนั้นมีค่าแนวโน้ม Nitric oxide scavenging สูงกว่าฤทธิ์ Nitric oxide scavenging ในน้ำถั่วเหลือง (SB) และทั้งใน น้ำถั่วเหลืองหมัก (FSB) และน้ำถั่วเหลือง (SB) นั้น มีแนวโน้มฤทธิ์ในการทำหน้าที่ Nitric oxide scavenging เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ จากการทดสอบฤทธิ์ Nitric oxide scavenging พบว่าน้ำถั่วเหลืองมีฤทธิ์สูงสุด เมื่อเริ่มต้นการทดลอง ณ เวลาที่ 0 ส่วนน้ำถั่วเหลืองหมัก พบว่ามีฤทธิ์สูงสุด ณ วันที่ 7 ของการหมัก ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 61.30

4. การศึกษาปริมาณสาร Daidzin Genistin Daizein และ Genistein ในน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมัก

พบว่าน้ำหมักถั่วเหลืองมีปริมาณ daidzin และ genistin ค่อนข้างคงที่ตั้งแต่เริ่มหมัก ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก ซึ่งปริมาณ daidzin และ genistin ที่ลดลงนี้มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณ daidzein และ genistein ในช่วงวันที่ 4 ถึงวันที่ 21 ของการหมัก ซึ่งพบ daidzein มีปริมาณสูงสุด ในวันที่ 17 ของการหมัก มีค่าเท่ากับ 91.13 และพบ genistein มีปริมาณสูงสุด ในวันที่ 10 ของการหมัก มีค่าเท่ากับ 79.18 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนักถั่วเหลือง ซึ่งปริมาณ daidzin genistin daidzein และ genistein ที่พบในน้ำถั่วเหลืองเมื่อเริ่มทดลอง ณ ชั่วโมงที่ 0 นั้น มีปริมาณใกล้เคียงกับในน้ำถั่วเหลืองหมัก โดยพบมีปริมาณเท่ากับ 56.188 37.066 13.284 และ 5.726 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนักถั่วเหลือง ตามลำดับ และเมื่อผ่านระยะเวลาต่างๆ ของการทดลอง พบว่าปริมาณ isoflavones ทั้ง 4 ชนิดนี้ ของน้ำถั่วเหลืองไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งแตกต่างจากในน้ำถั่วเหลืองหมักที่พบการเปลี่ยนแปลงของสารดังกล่าว ดังนั้นจึงทำให้พบปริมาณสาร daidzein และ genistein ของน้ำถั่วเหลือง มีปริมาณสูงกว่าในน้ำถั่วเหลืองหมัก ซึ่งสารสำคัญ 2 ชนิดนี้มีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังจากเกิดการหมักในช่วงวันที่ 7 ถึงวันที่ 21 ของการหมัก ซึ่งสารดังกล่าวนั้น มีบทบาทต่อการมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากถั่วเหลือง สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ทดสอบโดยวิธี ABTS และ FRAP ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเมื่อทดสอบด้วยวิธีนี้สูงในช่วงวันที่วันที่ 2 ถึงวันที่ 14 ของการหมัก และทดสอบโดยวิธี Superoxide scavenging และ Nitric oxide scavenging ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเมื่อทดสอบด้วยวิธีนี้สูงในช่วงวันที่วันที่ 3 ถึงวันที่ 21 ของการหมัก ซึ่งความสำคัญของปริมาณ isoflavones นี้อาจมีผลต่อการมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ซึ่งฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่พบนั้น อาจเกิดจาก 1) สารสำคัญของถั่วเหลือง โดยเฉพาะสารกลุ่ม isoflavones พิจารณาจากการศึกษาปริมาณสารดังกล่าว ซึ่งพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ Daiazin Genistin (glycoside) ไปเป็น Daiazein และ Genistein (aglycone) ตามลำดับ โดยสารดังกล่าวนี้จะจับกับน้ำตาลเป็น isoflavoneglucoside ซึ่งจะถูกตัดเอาน้ำตาลออกโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ beta-glucosidase ซึ่งผลิตโดยจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก เป็น

ผลทำให้ปริมาณของ glucoside ลดลง แต่ปริมาณ isoflavone หรือ aglycone จะเพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดีกว่า เนื่องจาก isoflavone จะมีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระหรือเป็น free radical scavenger ได้ 2) ปริมาณสารโพลีฟีนอล ที่พบในน้ำตาลอ้อยที่เป็นส่วนผสมของน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมัก ซึ่งพิจารณาได้จาก ในน้ำถั่วเหลืองนั้นถึงแม้ว่าจะไม่ผ่านกระบวนการหมักโดยหัวเชื้อเริ่มต้น และยังตรวจพบปริมาณ daiazein และ genistein แม้เพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณที่ตรวจพบในน้ำถั่วเหลืองหมัก แต่พบว่าน้ำถั่วเหลืองนั้นยังมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เมื่อทดสอบโดยวิธีต่างๆ ข้างต้น จึงเป็นไปได้ว่าโพลีฟีนอลของน้ำตาลอ้อยมีผลต่อการมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเช่นกัน 3) แบคทีเรียแลกติก *L. casei* ที่เติมเป็นหัวเชื้อในการหมักน้ำถั่วเหลือง จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้น้ำถั่วเหลืองหมักมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่าน้ำถั่วเหลืองที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อเริ่มต้น

5. การทดสอบการยอมรับโดยวิธีทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองหมัก

จากผลการทดสอบการยอมรับโดยการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองโดยใช้วิธี Ratio profile test (RPT) พบว่า ควรมีการลดระดับของสีและรสชาติเปรี้ยวของผลิตภัณฑ์ และเพิ่มระดับของกลิ่น รสชาติหวาน เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวมของผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมัก ยกเว้นลักษณะเนื้อสัมผัสของน้ำถั่วเหลืองหมักที่อยู่ในระดับการยอมรับของผู้บริโภค ซึ่งผลที่ได้จากการทดสอบในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมักนี้จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการพัฒนาปรับปรุงคุณภาพในด้านการยอมรับต่อไป

จากการศึกษาพบว่าในน้ำถั่วเหลืองหมักดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงซึ่งสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และใช้เป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจในการเลือกบริโภคได้ รวมทั้งเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองให้มีคุณภาพ และได้มาตรฐานเพื่อการบริโภคต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่ได้สนับสนุนทุนการวิจัย รวมทั้งเป็นศูนย์ประสานงานและเป็นหัวหน้าชุดโครงการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง

ขอขอบคุณ ภญ.ดร.วันดี รังสีวิจิตรประภา ที่กรุณาให้ข้อมูล ช่วยประสานงาน และให้คำแนะนำเกี่ยวกับข้อมูลของโครงการวิจัย และขอบคุณคณะนักวิจัย และผู้วิจัยที่ร่วมกันทำงานวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงลงได้

ขอขอบคุณอาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านจากมหาวิทยาลัยต่างๆ ที่ได้ร่วมให้คำปรึกษา และแนะนำเทคนิคต่างๆ ตลอดที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งแก่โครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และคณะต่างๆ ในมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ได้ให้คณาจารย์ผู้วิจัยที่สังกัดอยู่ใช้สถานที่ในการทำวิจัยโครงการวิจัยนี้

คณะผู้วิจัย

ตุลาคม 2549