บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Yogota และคณะ (1995) ได้ทดสอบฤทธิ์ antioxidant ที่ได้จากสารสกัดจากนัตโตะ (NTX) ซึ่งได้จากการหมักถั่วเหลืองด้วย *Bacillus subtilis* (*natto*) ซึ่งป้องกันการเกิด atherosclerosis ได้ ในกระต่ายที่เลี้ยงด้วยโคเลสเตอรอลเป็นอาหารเสริมโดยให้ทางปาก NTX ถูกพบเมื่อระดับของ thiobarbituric acid reactive substances, total cholesterol, low density lipoprotein (LDL) cholesterol และ triacylglycerol ในซีรัมต่ำ และลดการเกิด atherosclerotic lesions เมื่อสังเกตทาง histological ได้ โดยที่การตอบสนองยังขึ้นกับ dose, NTX แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ยับยั้งการ uptake ของ oxidized ^{125}I-LDL โดย macrophages และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในคน ดังนั้น บทบาทของ NTX ในการกำจัดอนุมูลอิสระ สามารถป้องกันการดำเนินของโรค atherosclerosis ในกระต่าย ในการศึกษา in vivo ได้โดย ลดการเกิด oxidative modification ของ LDL

Kerry และ Abbey (1999) ได้ทดสอบถึงฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของถั่วเหลือง ซึ่งได้แก่สาร isoflavone, genistein เป็นการศึกษาในหลอดทดลอง ในการเกิด LDL oxidation ซึ่ง Genistein ยับยั้งการเกิด LDL Oxidation ที่เหนี่ยวนำโดย copper ได้ ขึ้นกับความเข้มข้น โดยระยะเวลาในการเกิด conjugated diene (54.1±5.1 นาที ในกลุ่มควบคุม LDL และ 107.1±1.8 นาที ใน 5 μmol/l genistein (P<0.001) และลดอัตราการเกิดออกซิเดชัน (14.4±1.9 nmol conjugated diene/mg LDL protein/นาที ในกลุ่มควบคุม LDL และ 7.4±1.1 nmol conjugated diene/mg LDL protein/นาที ใน 5 μmol/l genistein (P<0.001) Peroxy radical (azo-initiated) การเกิด LDL oxidation ถูกยับยั้งโดย genistein 200 μmol/l ซึ่งบอกได้โดย (i) มีการเพิ่มขึ้นของเวลาที่ใช้ในการเกิด malondialdehyde (MDA) 7 h ในการเกิด เมื่อเปรียบเทียบกับ 3 h ในกลุ่มควบคุม LDL (ii) 32, 44 และ 46% ลดความเข้มข้นของ MDA ได้เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างจากกลุ่มควบคุม ที่เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมง และ (iii) มีการลดลงของ relative electrophoretic mobility (REM) ของ LDL ได้ศึกษาการ incorporate เข้าไปใน LDL ของ genistein และฤทธิ์ในการต้าน oxidation เมื่อแยก LDL จากพลาสม่าซึ่งได้เก็บไว้กับ genistein 25, 50 หรือ100 μmol/l ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 h ประมาณ 3–4% ของ genistein ปรากฏในพลาสม่า ซึ่งอยู่ใน LDL อย่างไรก็ตาม การเกิด oxidation ซึ่งเหนี่ยวนำโดย copper ในกลุ่มควบคุม LDL และ LDL ซึ่งแยกได้จากพลาสม่าซึ่งได้เก็บไว้กับ genistein มาก่อน ไม่แตกต่างกัน

Hodgson และคณะ (1999) ได้ทดลองถึงผลของ genistein และ daidzein และ metabolites ของ daidzein ซึ่งก็คือ equol และ O-desmethylangolensin ในการเกิด oxidation ที่เหนี่ยวนำโดย Cu^{2+} ใน lipoprotein ได้ทดสอบด้วยความเข้มข้น 3 ความเข้มข้นในแต่ละสารประกอบ ได้แก่ 0.1 μM, 1 μM, 10 μM นำไปทดสอบ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ซีรัม 6 ตัวอย่าง พบว่า สารประกอบทั้งหมดสามารถลดการเกิด lipoprotein oxidation ได้ โดยความเข้มข้นที่ต่ำสุดในการยับยั้งคือ 1 μM สำหรับ genistein และ daidzein ($P < 0.05$), และเมื่อใช้ equol และ O-desmethylangolensin 0.1 μM ($P < 0.05$) Equol และ O-desmethylangolensin เป็นตัวยับยั้งประสิทธิภาพสูงใน lipoprotein ในซีรัม มากกว่า isoflavonoids ทั้ง 2 ชนิด (in vitro) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า isoflavonoid จากถั่วเหลือง และ metabolic products ของ daidzein จะสามารถยับยั้งการเกิด lipoprotein oxidation ใน in vitro ดังนั้น การศึกษาผลกระทบในมนุษย์จึงเป็นสิ่งจำเป็นถ้าหากสารประกอบเหล่านี้มีผลต่อการเกิด oxidation ใน in vitro

Muster และคณะ (1999) รายงานว่ามะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่เกิดขึ้นมากที่สุดในผู้หญิงอเมริกัน และเป็นสาเหตุอันดับสองในการตายจากมะเร็งในผู้หญิง การศึกษาทาง Epidemiological ได้แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างการรับประทานอาหารที่มีถั่วเหลืองปริมาณสูง และการลดการเกิดมะเร็งเต้านม สมมติฐานข้อหนึ่งในการต้านการเกิดมะเร็งในถั่วเหลืองคือ genistein (4′,5,7-trihydroxysoflavone) ซึ่งพบมากที่สุดในถั่วเหลือง เคยมีการศึกษาถึง genistein ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีววิทยาสูง เช่น การยับยั้งฤทธิ์ของเอนไซม์ kinases หลายชนิด ซึ่งคุณสมบัติการต้าน oxidation และ การเปลี่ยนแปลง cell proliferation และ transformation ในการประเมินคุณสมบัติ genotoxicty ซึ่งเป็นฤทธิ์ที่สำคัญที่สุด และมีความสามารถในการยับยั้ง เอนไซม์ DNA topoisemerase II

Shertzer และคณะ (1999) พบว่า isoflavones คือ genistin และ daidzinและในรูป aglucone forms ทั้ง genistin และ daidzin สามารถป้องกันการเหนี่ยวนำเอนไซม์ CYP1A1 โดย 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD; dioxin) การยับยั้งนี้ สัมพันธ์กับความสามารถของ isoflavones ในการป้องกันการจับระหว่าง metabolites ของ benzo[*a*]pyrene (BaP) กับ DNA ซึ่ง metabolites นี้จะเกิดโดย CYP1A1 เราได้ประเมินกลไกในการยับยั้งของ daidzein และ genistein ซึ่งเชื่อว่าอยู่ในรูป active forms ของ isoflavones ถึงแม้ว่า daidzein และ genistein จะมีโครงสร้างของ aromatic hydrocarbon receptor (AHR) agonists และ antagonists แต่จากการวิเคราะห์ gel mobility shift assays บ่งชี้ว่า isoflavones ไม่ได้ยับยั้งการเหนี่ยวนำ dioxin โดยการกระตุ้น AHR หรือการเพิ่มขึ้นของ CYP1A1 mRNA ซึ่งเป็นการบอกว่า isoflavones ไม่ได้ออกฤทธิ์ในขั้นตอนที่เกิด transcription เราสามารถประเมินฤทธิ์ของ isoflavones ที่มีโดยตรงต่อเอนไซม์ CYP1A1 daidzein และ genistein เป็นสารตั้งต้นแบบ non-competitive กับ BaP ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ CYP1A1 ในการเกิด microsomal BaP hydroxylation ได้ค่า K_i คือ 325 μM and 140 μM การยับยั้งเอนไซม์ CYP1A1

เพิ่มขึ้นเมื่อทำการเก็บไว้ที่ 37°C แต่ไม่พบที่ 4°C และ พบ isoflavones และ NADPH หลังจากเก็บไว้ 60 นาที การยับยั้งยังคงเป็นแบบ non-competitive มีค่า K_i เท่ากับ 55 μM และ 50 μM การยับยั้งไม่สามารถป้องกัน หรือย้อนกลับได้โดย dithiothreitol ซึ่งเป็นสารกลุ่ม thiol ที่มีฤทธิ์ antioxidant หรือ deferoxamine ที่สามารถจับกับเหล็กได้ ซึ่งฤทธิ์ของ isoflavone ในการยับยั้ง CYP1A1 อาจจะเป็นกลไกในการยับยั้งการเกิดมะเร็งของถั่วเหลืองก็เป็นได้

Record และคณะ (2000) ศึกษา Genistein ซึ่งเป็นสาร flavonoid ที่แยกได้จากถั่วเหลือง เนื่องจากคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของมัน เป็นสารที่ได้รับการพิสูจน์ว่ามีประสิทธิภาพในการต้านแสง UVA และ UVB หรือ peroxyl radical ที่เหนี่ยวนำให้เกิด lipid peroxidation ใน liposomes อย่างไรก็ตาม Genistein ไม่มีประสิทธิผลในการป้องกันการเกิด conjugated diene formation ในเซลล์ของกรดไขมันไลโนเลอิก ระบบ peroxidative อื่นๆเกี่ยวข้องกับ hydrogen peroxide เช่น ฤทธิ์ของ metmyoglobin peroxidase และ Fel ascorbate/hydrogen peroxide oxidation ของ ไลโปโซม ซึ่งจะถูกยับยั้งโดย Genistein การประเมินโดยวิธี catechol decolorization พบว่า genistein ไม่พบว่าจับกับเหล็กได้ Genistein สามารถกำจัด hydrogen peroxide ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อ phenol red ถูก couple กับเอนไซม์ peroxidase อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ o-dianisidine เป็น color reagent พบว่า ไม่มีการสูญเสีย hydrogen peroxidase ซึ่งเป็นไปได้ที่ ว่าเกิด oxidation ของสีโดยผลิตภัณฑ์ของ genistein และ hydrogen peroxide การศึกษานี้ช่วยสนับสนุนว่า genistein มีประสิทธิภาพในการขจัด hydrogen peroxide แต่มีประสิทธิผลน้อยกว่าในการต่อต้าน peroxidative

Davis และคณะ (2001) พบว่า genistein แต่ไม่ใช่ daidzein สามารถยับยั้ง TNF-α-induced NF-KB ในเซลล์ cultured human lymphocytes ได้ และได้ทดสอบในหลอดทดลองถึงผลของอาหารเสริมถึง isoflavones ในถั่วเหลืองในการกระตุ้น NF-KB ซึ่งเหนี่ยวนำโดย TNF-α in vitro ใน peripheral blood lymphocytes โดยใช้ชายสุขภาพดี 6 คน ได้ให้ชายสุขภาพดีเหล่านี้ได้รับ isoflavones mixture (Novasoy) เป็นจำนวน 50 มิลลิกรัม สองครั้งต่อวัน เป็นเวลา 3 อาทิตย์ พบว่าได้รับการป้องกันจาก TNF-α ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้น NF-KB นอกจากนี้ เราได้สังเกตการลดลงของ 5-hydroxymethyl-2′-deoxyuridine (5-OHmdU) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าเกิด oxidative เกิดการทำลาย DNA ในผู้ที่ได้รับ isoflavones เป็นอาหารเสริมด้วย ผลของการยับยั้งของ isoflavones ไม่พบเกิน 3 เดือนหลังจากให้อาหารเสริม การศึกษาในเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่า อาหารเสริมที่มี isoflavones จากถั่วเหลือง อาจจะสามารถป้องกันเซลล์จาก สารที่เหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยการยับยั้งการกระตุ้นของ NF-KB และลดจำนวน DNA adduct ได้

Lee และคณะ (2004) ศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ของ genistein และ daidzein ซึ่งเป็น glycosides ที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเหลืองฤทธิ์ antioxidant สามารถประเมินได้ด้วย 3 วิธี ได้แก่human low-density lipoprotein (LDL) oxidation, the ferric reducing-antioxidant power (FRAP) และ anti-DPPH free

radical assays พบว่า ถั่วเหลืองมี genistein และ daidzein ในปริมาณสูง แต่อยู่ในรูป glycosides เป็นส่วนใหญ่ ทั้งวิธี FRAP และ anti-DPPH assays แสดงให้เห็นว่า glycosides เหล่านี้ทั้ง genistin, daidzein, glycitin, malonyl glycitin และ malonyl genistein มีคุณสมบัติ antioxidant เหมือนกันกับ aglycones, genistein และ daidzein ในทางตรงกันข้าม ฤทธิ์ antioxidant ของ glycosides เหล่านี้ อ่อนกว่าฤทธิ์ของ aglycones, genistein และ daidzein เมื่อวิเคราะห์ด้วย LDL oxidation assay ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า genistein และ daidzein มีฤทธิ์อ่อนกว่า (เมื่อใช้วิธีวิเคราะห์ทั้ง 3 วิธี) epicatechin จากชาเขียว และ α-tocopherol สรุปได้ว่า isoflavones จากถั่วเหลือง และ glycosides มีฤทธิ์ antioxidant แต่มีฤทธิ์น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ

Mccue และ Shetty (2004)ได้ศึกษาฤทธิ์ antioxidant ของ phenolics ที่มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลือง โดยใช้ active probiotic Kefir cultures ได้ประเมินฤทธิ์ antioxidantของ ส่วนประกอบ phenolics และ DPPH radical-scavenging ทุกๆ 8 ชม เป็นเวลา 48 ชม ยังมีเอนไซม์หลายชนิด (β-glucosidase, laccase, peroxidase) มีความเกี่ยวข้องกับกับการเกิดการสลาย polymeric phenolics และ lignin โดยจุลินทรีย์ และได้ศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของ phenolics ในขณะที่เกิด solid-state bioprocessing โดยการหมักด้วยเชื้อรา ส่วนประกอบของ phenolics เพิ่มขึ้นใน Kefir culture และมีความสัมพันธ์โดยตรงกับกับฤทธิ์ของ peroxidase และ laccase อย่างไรก็ตาม ปริมาณของ phenolics ลดลงอย่างมากที่ 48 ชั่วโมง ส่วนฤทธิ์antioxidant เพิ่มขึ้นใน Kefir culture และมีความสัมพันธ์อย่างมากกับการลดลงของส่วนประกอบของ phenolics ในเวลาเดียวกัน การวิจัยนี้แสดงความสำคัญของส่วนประกอบทางเคมีในพืชที่เหมาะสมซึ่งจะมีผลต่อการผลิตโยเกิร์ตด้วยนมถั่วเหลืองด้วยวิธีต่างๆ

Posmyk และคณะ (2004) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ของ antioxidant enzymes และระดับของ isoflavonoids ในรากและส่วนของ hypocotyls ของต้นกล้าถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merr. var. Essor) ต่อความเย็น เมื่อให้ความเย็นถึง 1°C เป็นเวลานาน จะยับยั้ง elongation ของราก และ hypocotyls และหยุดการเจริญหลังจากต้นกล้าถูกย้ายไปยังอุณหภูมิ 25 °C รากจะไวต่อความเย็นมากกว่า hypocotyls ที่อุณหภูมิ 1 °C ความเข้มข้นของ MDA ค่อยๆเพิ่มขึ้นในรากแต่ไม่เกิดขึ้นใน hypocotyls ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ catalase (CAT, EC 1.11.1.6) และ superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) ใน hypocotyls พบที่ อุณหภูมิ 1 °C และหลังจากย้ายต้นพืชไปที่ 25 °C ในราก CAT เพิ่มขึ้นหลังจากได้ความเย็น 4 วัน ในขณะที่ SOD จะเพิ่มเมื่อทำการ rewarm เท่านั้น ฤทธิ์ของ Phenylalanine ammonia-lyase (PAL, EC 4.3.1.5) ลดลงในรากเมื่อให้ความเย็นแก่ต้นกล้า แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในส่วน hypocotyls จนฤทธิ์จะเพิ่มหลังย้ายไปที่อุณหภูมิ 25°C ส่วนประกอบของ genistein และ daidzein เพิ่มหลังจาก 24 ชมเมื่อให้อุณหภูมิต่ำแล้วลดเวลาในการทำให้เย็น ในส่วนของ hypocotyls และคงอุณหภูมิเดิมในส่วนของราก อย่างไรก็ตาม ควรระวังเนื่องจากระดับของ genistein

(genistein glucoside) ในความเย็น hypocotyls สูงกว่าในรากถึง 10 เท่า ถึงแม้ว่าจะมีแนวโน้มลดลง ซึ่งในการทดลองนี้ได้ศึกษาบทบาทของ antioxidant enzymes และ isoflavonoids ในการป้องกันความเย็นในการทำลาย hypocotyls และรากต้นกล้าของถั่วเหลือง

จากตัวอย่างรายงานการวิจัยข้างต้นที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาถั่วเหลือง และสารสำคัญของถั่วเหลือง จะเห็นว่าเป็นการศึกษาองค์ประกอบของถั่วเหลือง และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่เป็นองค์ประกอบในถั่วเหลือง เช่น Isoflavones และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากถั่วเหลือง แต่จะพบว่าการศึกษากระบวนการหมักถั่วเหลืองด้วยจุลินทรีย์ที่สามารถเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพได้ รวมทั้งการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการหมักถั่วเหลือง นั้นยังมีน้อย ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญ ความจำเป็นและความคุ้มค่าที่จะพัฒนาผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักชีวภาพโดยทำการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีคุณค่าทางโภชนาการและปริมาณ Phytoestrogen สูงสุดมาทำการหมักด้วยเชื้อรา และ/หรือ เชื้อ Probiotics แล้วทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองหมักโดยการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรด โปรตีน ไขมันและชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้ จากนั้นจึงทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของผลิตภัณฑ์และตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร Daidzein/ Genistein สุดท้ายจึงทำการศึกษากลไกการเกิดของผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในน้ำถั่วเหลืองหมัก เพื่อให้สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตแก่ผู้ประกอบการระดับวิสาหกิจขนาดย่อมและใหญ่ต่อไป