

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. คัดเลือกวัตถุดิบถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่างๆ เตรียมจุลินทรีย์เพื่อเป็นต้นเชื้อสำหรับการจำลองการผลิตน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมัก

1.1 การคัดเลือกถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทย

ได้ถั่วเหลืองที่ผ่านการคัดเลือกทั้งหมดจำนวน 6 สายพันธุ์ ดังนี้ คือ สจ.2 สจ.4 สจ.5 เชียงใหม่60 ราชมงคล1 เชียงใหม่1 โดยมีเกณฑ์การคัดเลือกดังต่อไปนี้

- เป็นพันธุ์ที่ผ่านการรับรองจากกรมวิชาการเกษตรเป็นที่เรียบร้อยแล้ว
- เป็นพันธุ์ที่แพร่หลายและนิยมปลูกในประเทศไทย
- ให้ผลผลิตต่อไร่สูง มีความทนทานต่อสภาพดินฟ้าอากาศ และทนต่อโรคต่างๆ สูง

1.1.1 ศึกษาปริมาณ โปรตีนไขมัน คาร์โบไฮเดรต ของถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่าง ๆ

ตารางที่ 7 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลืองทั้ง 6 สายพันธุ์ที่นิยมปลูกในประเทศไทย สำหรับถั่วเหลืองที่นำมาวิเคราะห์ในการทดลองนี้ พบว่า มีค่าความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 8-11.5 โดยน้ำหนัก เนื่องจากค่าความชื้นแปรเปลี่ยนตามสภาวะที่ใช้ในการเก็บ การรายงานปริมาณองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ จึงคิดเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้ง ซึ่งจะเห็นได้ว่า ถั่วเหลืองพันธุ์ต่างๆ มีปริมาณโปรตีนไขมัน คาร์โบไฮเดรต และ ปริมาณเยื่อใยแตกต่างกัน ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.2 มีปริมาณโปรตีนสูงมากกว่าพันธุ์อื่นๆ ถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ Cai and Chang (1999) พบว่า Glycinin และ β -conglycinin เป็นโปรตีนหลักที่พบในถั่วเหลือง นอกจากนี้ ถั่วเหลืองยังประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ที่สามารถนำมาใช้บริโภคเป็นอาหารเสริมสุขภาพ (Potter, 1995) โดยเฉพาะไอโซฟลาโวน (isoflavones) คนโดยส่วนใหญ่ได้รับไอโซฟลาโวนจากการบริโภคถั่วเหลืองและอาหารที่แปรรูปมาจากถั่วเหลือง ซึ่งปริมาณที่ได้รับจะขึ้นอยู่กับพันธุ์ถั่วเหลืองและกระบวนการแปรรูปที่ใช้ มีรายงานว่า ไอโซฟลาโวนที่คงเหลืออยู่ในระหว่างการแปรรูปโดยส่วนใหญ่อยู่ในส่วนของโปรตีน ซึ่งอาจจะมีได้มากถึง 4-5 มิลลิกรัมต่อโปรตีน 1 กรัม (Hodgeson, 2003) ถั่วเหลืองพันธุ์ต่างๆ มีปริมาณไขมันเป็นองค์ประกอบ ประมาณร้อยละ 18-20 โดยน้ำหนัก ยกเว้นถั่วเหลืองพันธุ์ราชมงคล ซึ่งมีไขมันค่อนข้างต่ำ ไขมันที่พบในถั่วเหลืองโดยส่วนใหญ่อยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ ฟอสโฟลิปิด กลุ่มของ unsaponifiables กรดไขมันอิสระ และ รังควัตถุพวกคาโรทีนอยด์ อย่างไรก็ตาม พบว่าถั่วเหลืองพันธุ์ราชมงคล มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมากที่สุด โดยปกติถั่วเหลืองมีคาร์โบไฮเดรตไม่ต่ำกว่าร้อยละ 30 โดย

น้ำหนัก สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มตามคุณสมบัติในการละลายน้ำ ได้แก่ น้ำตาล เช่น sucrose stachyose และ raffinose และ คาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองพันธุ์อื่นๆ ถั่วเหลืองพันธุ์เชิงใหม่ 60 มีปริมาณเยื่อใยมากที่สุด อย่างไรก็ตาม ถั่วเหลืองทุกพันธุ์ที่ทำการทดสอบมีปริมาณเถ้าไม่แตกต่างกัน Berk (1992) รายงานว่า แร่ธาตุที่พบมากถั่วเหลือง ได้แก่ โพแทสเซียม แคลเซียม และ แมกนีเซียม และแร่ธาตุอื่นๆ ที่ต้องการในปริมาณน้อยแต่มีความสำคัญต่อร่างกาย เช่น เหล็ก สังกะสี และทองแดง เป็นต้น

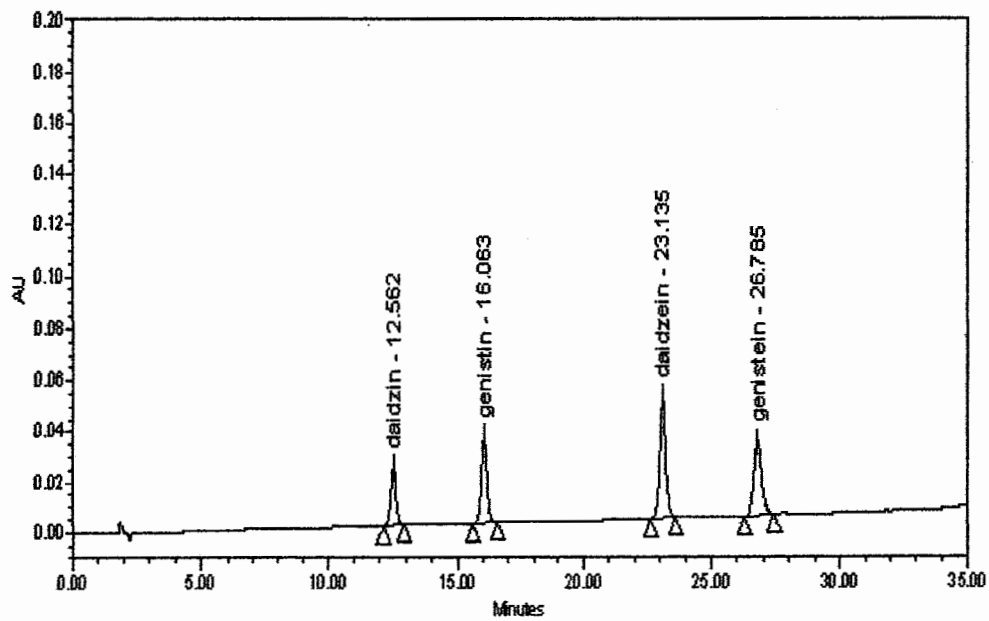
ตารางที่ 7 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลืองพันธุ์ต่างๆ

พันธุ์	ปริมาณ* (คิดเป็นร้อยละ ต่อน้ำหนักแห้ง)				
	โปรตีน	ไขมัน	คาร์โบไฮเดรต	เยื่อใย	เถ้า
เชิงใหม่1	37.59 ± 0.30c	20.82 ± 0.28a	36.28 ± 0.56c	4.90 ± 0.21c	5.31 ± 0.01
เชิงใหม่ 60	37.62 ± 0.04c	18.00 ± 0.62d	38.90 ± 0.77b	8.02 ± 0.44a	5.49 ± 0.09
ราชมงคล	37.61 ± 0.36c	14.71 ± 0.10e	42.24 ± 0.17a	6.11 ± 0.40b	5.44 ± 0.10
สจ 4	38.54 ± 0.35b	20.34 ± 0.06b	35.79 ± 0.41c	5.91 ± 0.61b	5.34 ± 0.09
สจ 2	39.45 ± 0.18a	19.19 ± 0.19c	35.91 ± 0.25c	5.09 ± 0.50c	5.46 ± 0.01
สจ 5	39.49 ± 0.33a	18.54 ± 0.12d	36.48 ± 0.46c	5.32 ± 0.18c	5.49 ± 0.12

*ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

1.1.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร Phytoestrogen (Daidzein/Genistein)

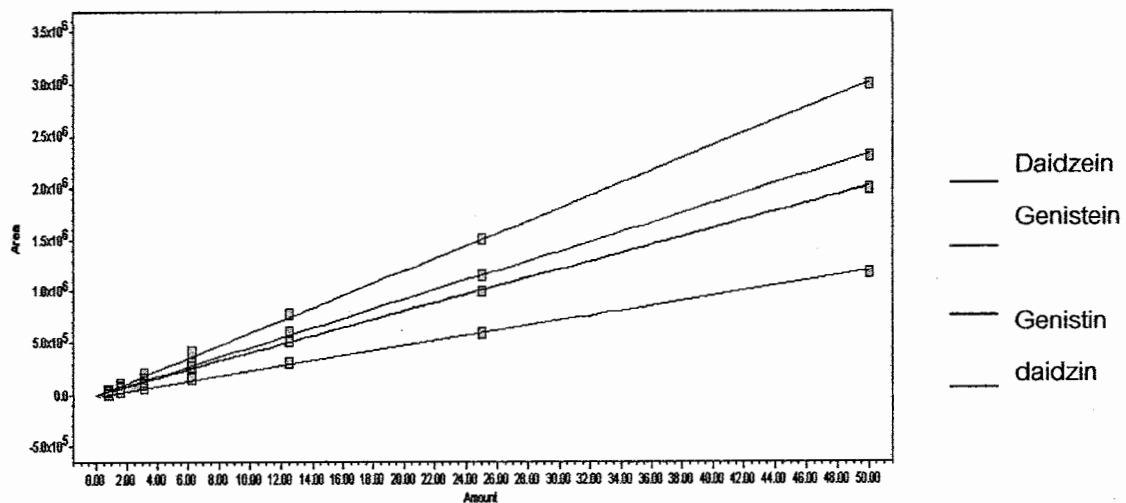
ผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC ด้วยสภาวะดังกล่าวนี้จะทำให้ได้โครมาโทแกรมของ daidzin, genistin, daidzein และ genistein ดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 แสดงโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานกลุ่ม Isoflavones calibration curve

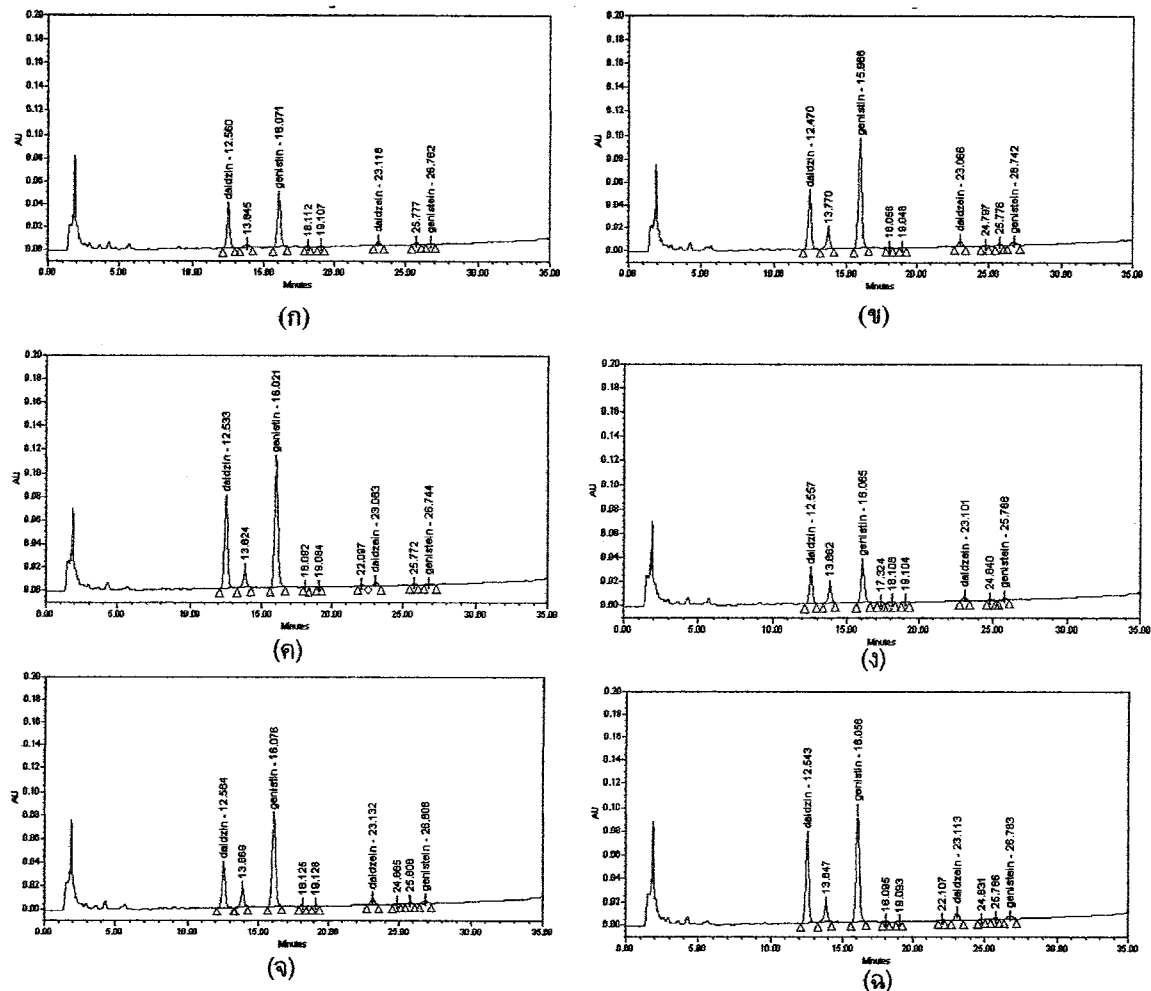
ในการวิเคราะห์ครั้งนี้ใช้สารมาตรฐานในการทำปริมาณวิเคราะห์ทั้งหมด 7 ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.7 ppm ถึง 50 ppm ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมปริมาณของ Isoflavones ใน ถั่วเหลืองน้ำหนักไม่เกิน 2 กรัม จะทำให้ได้ calibration curve ดังแสดงในรูปที่ 11 จากรูปพบว่า calibration curve ให้ค่า linearity ที่แสดงเป็นค่า R^2 เป็นดังต่อไปนี้

Daidzin $R^2 = 0.9978$, Genistin $R^2 = 0.9978$, Daidzein $R^2 = 0.9979$ และ Genistein $R^2 = 0.9981$



รูปที่ 11 แสดง calibration curves ของ isoflavones 4 ชนิด

ปริมาณ Isoflavones ในถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่างๆ
เมื่อทำการวิเคราะห์สารสกัดของตัวอย่างของถั่วเหลืองทั้ง 6 สายพันธุ์ จะได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในรูปที่ 12



รูปที่ 12 แสดงโครมาโทแกรมของตัวอย่างถั่วสายพันธุ์ต่างๆในประเทศไทย (ก) เชียงใหม่ 1, (ข) เชียงใหม่ 60, (ค) ราชมงคล, (ง) สจ.5, (จ) สจ.4 และ (ฉ) สจ.2

เมื่อทำการเทียบสัญญาณที่วัดได้ของ isoflavones ในตัวอย่างกับ calibration curves พบว่า สารกลุ่ม isoflavones ทั้ง 4 ชนิด ในถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่างๆในประเทศไทย ซึ่งใช้ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ได้แก่ สจ.5, สจ.9(4), ตาแดง, ราชมงคล, เชียงใหม่ 1 และ เชียงใหม่ 60 มีปริมาณที่แตกต่างกันออกไป ดังแสดงในตารางที่ 8 จากตารางจะเห็นว่าถั่วเหลืองสายพันธุ์ตาแดงมีปริมาณ daidzin, daidzein และ genistein มากที่สุด โดยมีปริมาณ 948.6 ± 19.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 5.2 ± 1.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 27.5 ± 4.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และ genistin พบมากที่สุดในสายพันธุ์ราชมงคล โดยมีปริมาณ 949.2 ± 31.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ 8 แสดงปริมาณ isoflavones ในถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทยที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนพฤษภาคม

สายพันธุ์ถั่ว เหลือง	ปริมาณ isoflavones (mg/kg) $\pm$ S.D. (n=4)			
	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein
เชียงใหม่ 60	588.5 $\pm$ 68.4	825.6 $\pm$ 8.9	3.8 $\pm$ 0.7	26.0 $\pm$ 2.1
เชียงใหม่ 1	446.3 $\pm$ 104.7	360.2 $\pm$ 25.7	2.8 $\pm$ 0.6	10.0 $\pm$ 2.8
สจ.5	303.2 $\pm$ 18.0	281.1 $\pm$ 11.0	2.9 $\pm$ 0.9	9.4 $\pm$ 3.5
สจ.9(4)	408.4 $\pm$ 65.3	610.3 $\pm$ 95.0	3.9 $\pm$ 0.6	18.9 $\pm$ 2.2
สจ.2	948.6 $\pm$ 19.0	834.5 $\pm$ 14.0	5.2 $\pm$ 1.2	27.5 $\pm$ 4.5
ราชมงคล	927.1 $\pm$ 63.5	949.2 $\pm$ 31.5	3.1 $\pm$ 0.9	7.1 $\pm$ 1.0

ในการวิเคราะห์ปริมาณ isoflavones ในถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่างๆในประเทศไทย ได้อาศัยวิธีที่ประยุกต์มาจากวิธีมาตรฐาน AACC Method 20-20 “Determination of Isoflavones in Soy and Selected Foods Containing Soy by Extraction, Saponification, and Liquid Chromatography” ก่อนทำการวิเคราะห์ได้หาความแม่นยำ (Accuracy) ของการสกัดตัวอย่าง ซึ่งแสดงด้วยค่า %Recovery ของการวิเคราะห์ โดยเติมสารมาตรฐานเข้มข้น 5 ppm ในตัวอย่างแล้วทำการสกัดตามขั้นตอน ซึ่งทำการสกัดทั้งหมด 4 ซ้ำ พบว่า %Recovery อยู่ในช่วง 89.71 - 136.66 % ดังแสดงไว้ในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงค่า %Recovery ของวิธีวิเคราะห์

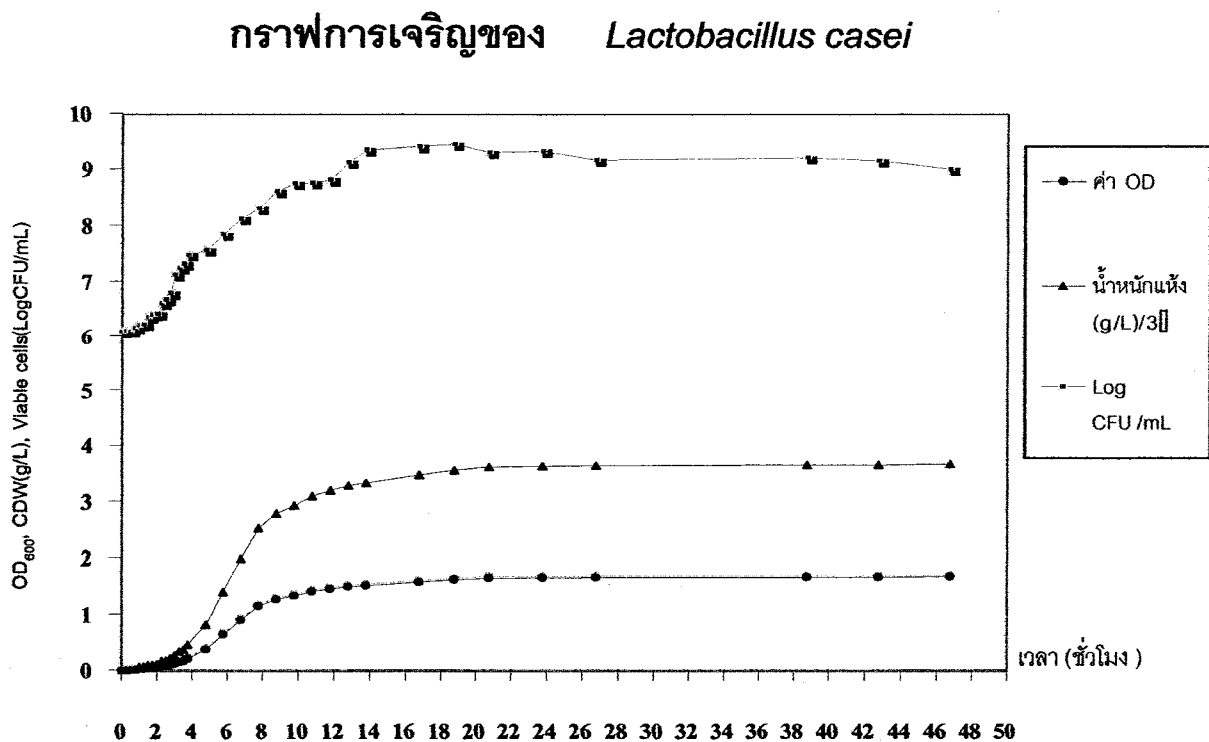
Isoflavones	ปริมาณของ isoflavones (ppm) $\pm$ S.D. (n=4)			% Recovery
	ตัวอย่าง	ตัวอย่าง+สารมาตรฐาน	สารมาตรฐาน 5 ppm	
Daidzin	26.35 $\pm$ 1.57	33.18 $\pm$ 0.60	6.83 $\pm$ 0.79	136.66
Genistin	22.25 $\pm$ 0.98	26.91 $\pm$ 0.89	4.66 $\pm$ 0.07	93.26
Daidzein	1.05 $\pm$ 0.18	6.60 $\pm$ 0.14	5.54 $\pm$ 0.12	110.85
Genistein	0.52 $\pm$ 0.04	5.00 $\pm$ 0.41	4.48 $\pm$ 0.31	89.71

เมื่อพิจารณาจากปริมาณ isoflavones ในถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่างๆในประเทศไทย แล้ว พบว่าสายพันธุ์เชียงใหม่ 60 มีปริมาณ Daidzein และ Genistein สูงรองจากพันธุ์ สจ.2 และมีปริมาณโปรตีนสูง

ที่สุด อีกทั้งเป็นสายพันธุ์ที่หาได้ง่าย โดยเฉพาะที่กรมวิชาการเกษตร จ.เชียงใหม่ มีถั่วเหลืองสายพันธุ์นี้เก็บไว้ด้วยเช่นกัน จึงเลือกสายพันธุ์เชียงใหม่ 60 นี้มาทำการศึกษา

1.2 การเตรียมจุลินทรีย์เพื่อเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับการจำลองการผลิตน้ำอ้วเหลืองหมัก

หัวเชื้อเริ่มต้นได้จากการแยกจากตัวอย่างน้ำหมักพืชในโครงการวิจัยเรื่อง “ส่วนประกอบคุณสมบัติทางเคมี และชีวภาพของผลิตภัณฑ์น้ำหมักชีวภาพที่ได้จากพืชเพื่อการบริโภค” โดย ผศ.ดร.ไชยวัฒน์ ไชยสุด และคณะ (2546) แล้วทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเป็น *Lactobacillus casei* ซึ่งสามารถนำมาหมักถั่วเหลืองได้ นำมาศึกษาเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น โดยได้ศึกษากราฟการเจริญแสดงความสัมพันธ์ของค่าความขุ่นของเซลล์ที่วัดได้ คำนวณหนักแห้งของเซลล์ และปริมาณของเชื้อเมื่อตรวจนับปริมาณโดยวิธี pour plate ด้วยอาหาร MRS agar ที่เติมอินดิเคเตอร์ (หาค่าเป็น log CFU/ml) ซึ่งการศึกษากราฟการเจริญนี้ เพื่อให้ทราบถึงระยะเวลาในการเจริญของเชื้อที่จะสามารถนำมาเป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักถั่วเหลืองได้ ดังแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 13 แสดงกราฟการเจริญของ *Lactobacillus casei*

จากการศึกษากราฟการเจริญของแบคทีเรีย *L. casei* ซึ่งเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการหมักถั่วเหลือง พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีการเจริญอย่างรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อช่วงเวลาประมาณชั่วโมงที่ 6-20 และเริ่มมีการเจริญคงที่ในช่วง 1-2 วันของการเจริญ และเมื่อศึกษาการเจริญในน้ำถั่วเหลือง พบว่า *L. casei* เริ่มเจริญอย่างรวดเร็วที่ประมาณชั่วโมงที่ 18 -30 ซึ่งมีช่วงการเจริญช้ากว่าเมื่อเทียบกับเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่พบว่าเมื่อเลี้ยงในน้ำถั่วเหลือง เชื้อจะมีช่วงระยะเวลาในการเจริญคงที่นานกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการศึกษาดังกล่าว ทำให้ทราบระยะเวลาของการเจริญของเชื้อในการเตรียมเชื้อ เริ่มต้นทั้งในขั้นตอนการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเลี้ยงในน้ำถั่วเหลือง สามารถใช้พิจารณาเพื่อเป็นแนวทางในการกำหนดระยะเวลาในการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับजनพลศาสตร์ของการหมักถั่วเหลืองต่อไป

2. การศึกษาลักษณะ คุณสมบัติของน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมัก

เมื่อทำการจำลองการหมักถั่วเหลืองสายพันธุ์เชียงใหม่ 60 (ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 1) ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ (หัวเชื้อเริ่มต้น) จากนั้นได้ทำการศึกษาลักษณะคุณสมบัติต่างๆ ดังนี้

2.1 ลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองและถั่วเหลืองหมักที่ได้ โดยคุณลักษณะทางกายภาพได้ทำการสังเกต สี กลิ่น รส ความขุ่น และการเกิดฟองแก๊สได้ผลดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงลักษณะของน้ำฉ่ำเหลืองและน้ำฉ่ำเหลืองหมัก ณ ระยะเวลาต่างๆ

เวลาของการหมัก	ตัวอย่าง	ลักษณะทางกายภาพ				
		สี	กลิ่น	รสชาติ	ความขุ่น	การเกิดฟอง/แก๊ส
ชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18	SB	น้ำตาลอ่อน	หอม	หวานเล็กน้อย	ขุ่นเล็กน้อย	มีฟองที่ผิวหน้า
	FSB	น้ำตาลอ่อน	หอม	หวานเล็กน้อย	ขุ่นเล็กน้อย	มีฟองที่ผิวหน้า
ชั่วโมงที่ 24	SB	น้ำตาลอ่อน	หอม	หวานเล็กน้อย	ขุ่นเล็กน้อย และมีการแยกชั้นของตะกอน	มีฟองที่ผิวหน้า
	FSB	น้ำตาลอ่อน	หอม	เปรี้ยวเล็กน้อย	ขุ่นเล็กน้อย	-
วันที่ 2, 3, 4	SB	น้ำตาลอ่อน	หอม	หวานเล็กน้อย	มีการแยกชั้นของตะกอน	มีฟองที่ผิวหน้า
	FSB	น้ำตาลอ่อน	หอมและมีกลิ่นเปรี้ยวเล็กน้อย	เปรี้ยว	ขุ่นเล็กน้อย	-
วันที่ 7	SB	น้ำตาลอ่อน	เหม็นเปรี้ยว	-	มีการแยกชั้นของตะกอน	มีฟองที่ผิวหน้า และมีแก๊สเล็กน้อย
	FSB	น้ำตาลอ่อน	หอมและมีกลิ่นเปรี้ยว	เปรี้ยว	ขุ่นเล็กน้อย	-
วันที่ 10	SB	น้ำตาลอ่อน	เหม็นเปรี้ยว	-	มีการแยกชั้นของตะกอน	มีฟองที่ผิวหน้า และมีแก๊สเล็กน้อย
	FSB	น้ำตาลอ่อน	หอมและมีกลิ่นเปรี้ยว	เปรี้ยว	ขุ่นเล็กน้อย	-

วันที่ 14	SB	น้ำตาลอ่อน	เหมีนเปรี้ยว	-	มีการแยกชั้น ของตะกอน	มีฟองที่ ผิวหน้า และมี แก๊สเล็กน้อย
	FSB	น้ำตาลอ่อน	หอมและมี กลิ่นเปรี้ยว	เปรี้ยว	ขุ่นเล็กน้อย	-
วันที่ 17	SB	น้ำตาลอ่อน	เหมีนเปรี้ยว	-	มีการแยกชั้น ของตะกอน	มีฟองที่ ผิวหน้า และมี แก๊สเล็กน้อย
	FSB	น้ำตาลอ่อน	หอมและมี กลิ่นเปรี้ยว	เปรี้ยว	ขุ่นเล็กน้อย	-
วันที่ 21	SB	น้ำตาลอ่อน	เหมีนเปรี้ยว	-	มีการแยกชั้น ของตะกอน	มีฟองที่ ผิวหน้า และมี แก๊สเล็กน้อย
	FSB	น้ำตาลอ่อน	หอมและมี กลิ่นเปรี้ยว	เปรี้ยว	ขุ่นเล็กน้อย	-

หมายเหตุ SB = Soybean broth (น้ำถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักโดยหัวเชื้อเริ่มต้น)

FSB = Fermented soybean broth (น้ำถั่วเหลืองหมักโดยหัวเชื้อเริ่มต้น)

เมื่อนำถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำและผ่านความร้อนโดยการนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที และหมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *L. casei* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน และศึกษาลักษณะทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ พบว่าจากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของน้ำถั่วเหลือง และน้ำถั่วเหลืองหมัก เมื่อเริ่มการทดลองนั้น น้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมักมีกลิ่นหอมเฉพาะของถั่วเหลือง และกลิ่นหอมของน้ำตาลแดงหรือน้ำตาลอ้อยปน สีของผลิตภัณฑ์มีสีน้ำตาลของน้ำตาลแดงที่เป็นส่วนผสม และที่ชั่วโมงที่ 24 น้ำหมักถั่วเหลือง สีของน้ำถั่วเหลืองเข้มขึ้น เกิดการหมักแล้วทำให้มีรสเปรี้ยว และมีกลิ่นหอมปนกลิ่นเปรี้ยวเล็กน้อย และบริเวณผิวหน้าของน้ำถั่วเหลืองหมัก มีคราบมันคล้ายฟิล์มบางๆลอยบนผิวหน้า ส่วนน้ำถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมักยังไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง และในวันที่ 2 จนถึงวันที่ 21 ของการทดลอง น้ำถั่วเหลืองหมักมีรส และกลิ่นเปรี้ยวของกรดอินทรีย์ที่เกิดจากกระบวนการหมัก และไม่พบการเกิดฟองแก๊ส และฟองที่ผิวหน้า ส่วนน้ำถั่วเหลืองนั้น ตั้งแต่ วันที่ 7 จนถึงวันที่ 21 ของการทดลองมีกลิ่นเหมีนเปรี้ยว และเกิดฟองเล็กน้อยที่ผิวหน้า นอกจากนี้ น้ำถั่ว

เกลือมีลักษณะขุ่น และมีสีเข้มขึ้น ซึ่งลักษณะดังกล่าวของน้ำถั่วเหลืองอาจเกิดจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ต้องการที่อาจเกิดขึ้นในกระบวนการหมัก หรือเกิดจากขั้นตอนการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนเมื่อเริ่มต้น ซึ่งใช้วิธีการพาสเจอไรซ์นั้น อาจทำให้จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถถูกกำจัด เช่น กลุ่มที่มีการสร้างสปอร์ ซึ่งทนความร้อนสูง เป็นต้น ซึ่งเมื่อจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถปรับตัวได้แล้วจะเจริญเพิ่มจำนวนได้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์หรือสร้างสารเมตาบอไลต์ที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นได้

2.2 คุณสมบัติและลักษณะทางเคมีและชีวภาพของผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมัก

ผลจากการเก็บตัวอย่างน้ำถั่วเหลือง และน้ำถั่วเหลืองหมักมาทดสอบคุณสมบัติทางเคมี คือ ค่าพีเอช ปริมาณกรดโดยรวม ความชื้น ปริมาณโปรตีนที่ละลาย และปริมาณไขมัน แสดงผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกรดโดยรวม ความชื้น ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ และปริมาณไขมันของน้ำถั่วเหลือง และน้ำถั่วเหลืองหมัก

เวลา	พีเอช		กรดโดยรวม (%)		ความชื้น (%)		โปรตีนที่ละลาย (%)		ไขมัน (%)	
	SB	FSB	SB	FSB	SB	FSB	SB	FSB	SB	FSB
H0	4.76	4.59	0.06	0.06	95.14	95.09	4.58	4.79	0.22	0.19
H6	4.70	4.53	0.06	0.08	95.02	94.49	4.50	5.01	0.21	0.22
H12	4.69	4.34	0.07	0.10	94.63	94.52	4.53	7.87	0.20	0.17
H18	4.68	3.73	0.07	0.13	94.66	94.88	4.24	10.60	0.21	0.52
D1	4.49	3.68	0.07	0.14	94.82	95.17	4.21	17.88	0.23	0.56
D2	4.39	3.42	0.07	0.21	95.06	94.89	3.93	19.42	0.19	0.55
D3	4.41	3.46	0.08	0.21	95.12	94.94	3.40	19.97	0.22	0.57
D4	4.37	3.32	0.28	0.25	95.14	94.96	4.29	16.23	0.21	0.56
D7	4.17	3.12	0.09	0.31	95.88	97.81	4.53	18.43	0.18	0.55
D10	4.12	3.03	0.21	0.43	96.63	97.78	5.56	16.23	0.20	0.55
D14	4.10	3.03	0.26	0.44	96.87	98.20	5.81	18.13	0.20	0.61
D17	4.12	3.11	0.21	0.44	97.45	98.24	5.86	13.64	0.21	0.67
D21	4.13	3.05	0.21	0.47	96.92	98.31	5.76	14.06	0.24	0.64

หมายเหตุ ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ

% คือ เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรของน้ำถั่วเหลือง

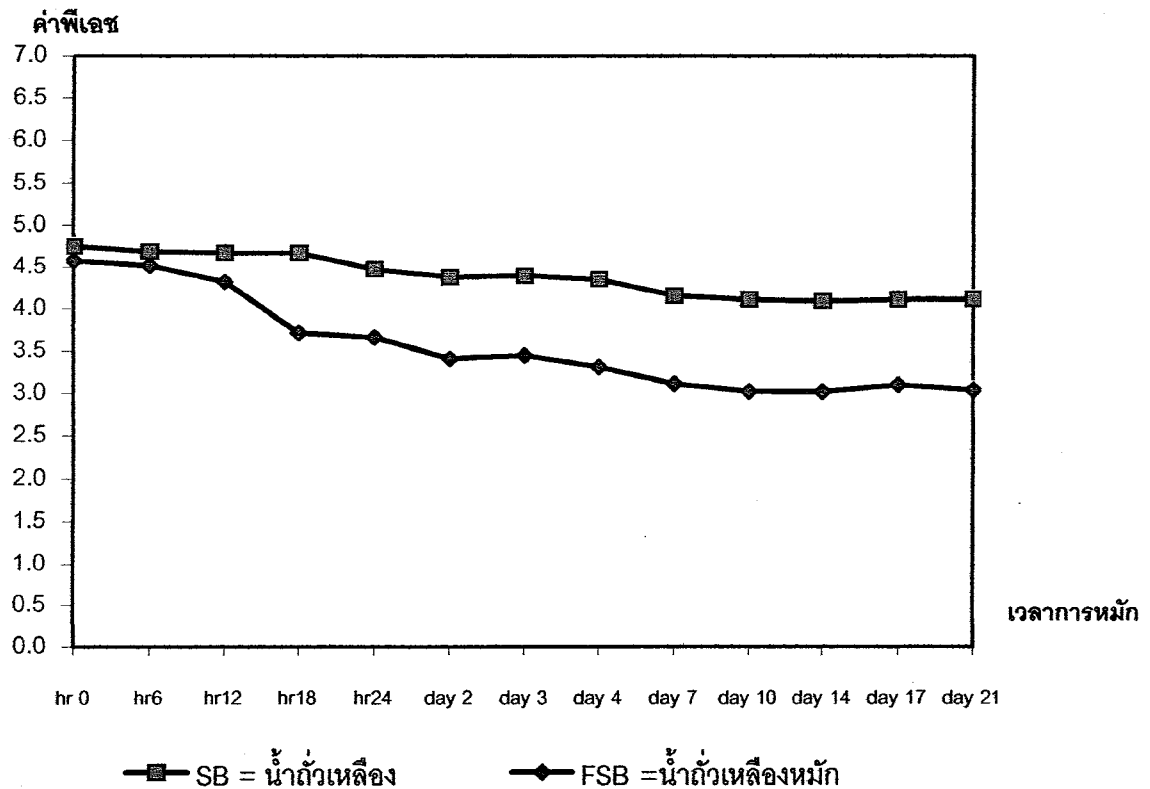
SB (Soybean broth) = น้ำถั่วเหลืองที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อ หรือน้ำถั่วเหลือง

FSB (Fermented soybean broth) = น้ำถั่วเหลืองที่เติมหัวเชื้อในการหมัก หรือน้ำถั่วเหลืองหมัก

เวลา H = ชั่วโมงที่เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์

D = วันที่เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์

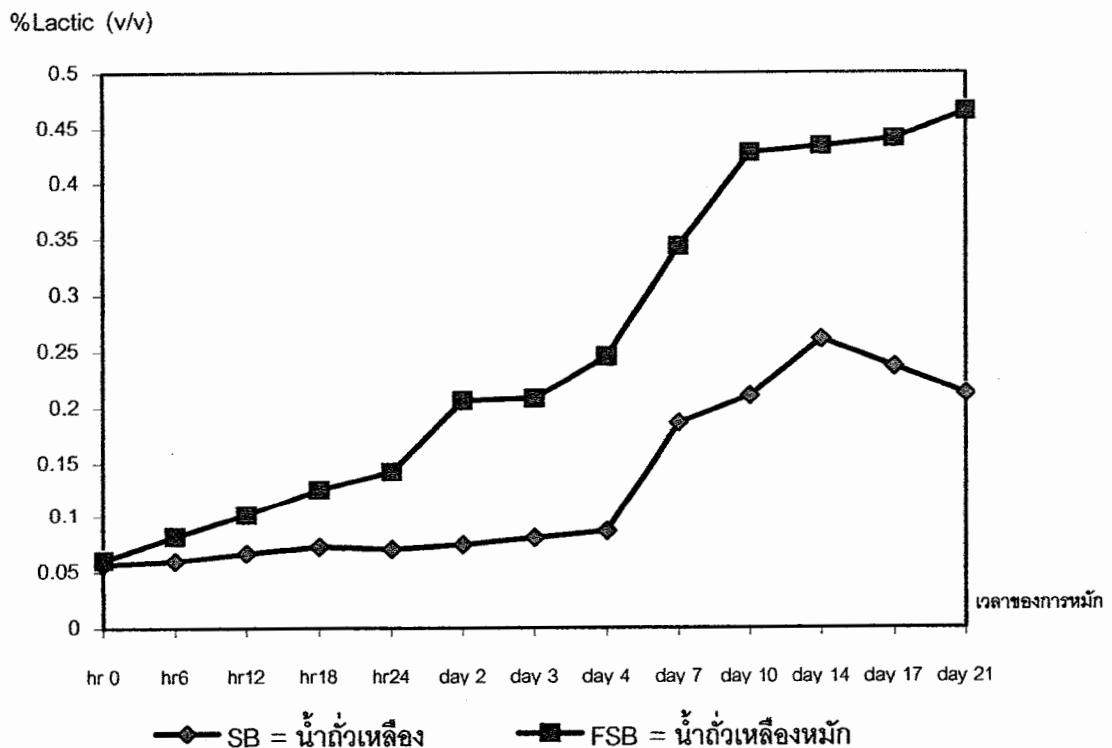
2.2.1 ค่าพีเอช และความเป็นกรดโคจรวม (Total acidity)



รูปที่ 14 แสดงค่าพีเอชโดยเฉลี่ยของน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมัก

จากการวัดค่าพีเอช และวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจรวมด้วยการไทเทรต พบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมักมีค่าค่อนข้างต่ำ อาจเนื่องมาจากส่วนผสมที่เป็นน้ำตาลแดง หรือน้ำอ้อยปน และเมื่อผ่านกระบวนการหมัก ค่าพีเอชของน้ำถั่วเหลืองหมัก (FSB) ลดลงอย่างรวดเร็วจากค่าพีเอชเริ่มต้น 4.6 ลดเหลือ 3.2 ในวันที่ 21 ของการหมัก ซึ่งค่าพีเอช ลดลง อย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่

18 ของการหมัก สัมพันธ์กับค่าความเป็นกรดที่เพิ่มสูงขึ้น ในช่วงเวลาที่ 18-24 ซึ่งเกิดจากกระบวนการหมัก โดยมีค่าความเป็นกรดของ FSB อยู่ในช่วง 0.05-0.45 % (v/v) และค่าพีเอชของ SB เริ่มต้น 4.7 และมีค่าคงที่ และลดลงเพียงเล็กน้อยถึง 4.5 ส่วนค่าความเป็นกรดของน้ำถั่วเหลือง (SB) มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 7 ของการหมัก สัมพันธ์กับลักษณะทางกายภาพ แต่ค่าความเป็นกรดสูงสุดของ SB มีค่าประมาณ 0.25 % (v/v) ซึ่งมีค่าพีเอชต่ำกว่าพีเอชของน้ำถั่วเหลืองหมัก ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชและค่าความเป็นกรดของน้ำถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมักในการทดลองนั้น อาจเกิดจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ หรือจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตจากการฆ่าเชื้อมีการเจริญเพิ่มจำนวน และสามารถผลิตกรดได้ เช่น แบคทีเรียบาซิลลัสบางชนิด เป็นต้น ซึ่งค่าพีเอชและค่าความเป็นกรดของผลิตภัณฑ์นี้มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ คือ มีกลิ่นและรสชาติเปรี้ยวในช่วงที่ค่าความเป็นกรดเพิ่มสูงขึ้น

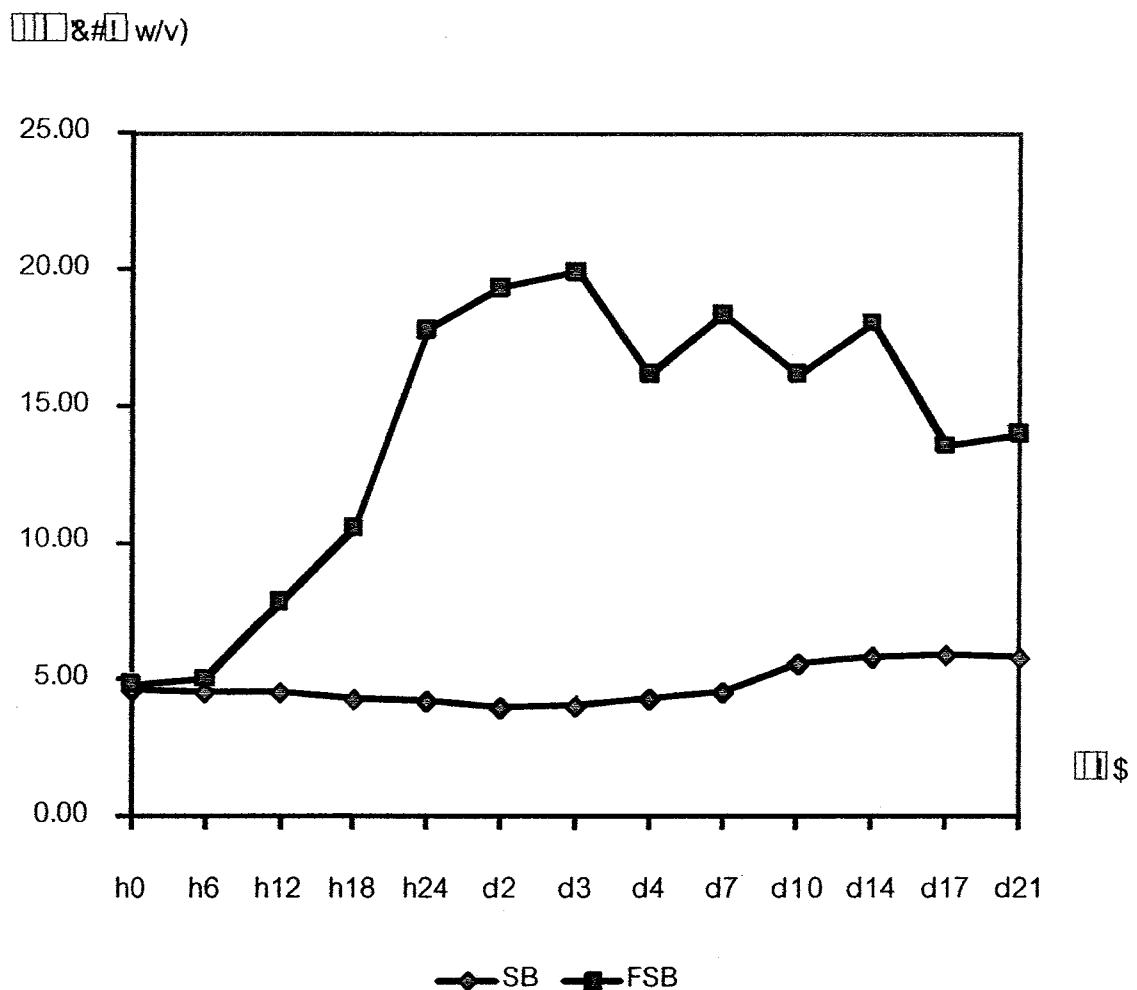


รูปที่ 15 แสดงค่าความเป็นกรดโดยเฉลี่ยของน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมัก

จากการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดเทียบเป็นร้อยละของกรดแลกติกของตัวอย่างน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมัก ณ เวลาต่างๆ พบว่าค่าความเป็นกรดของน้ำถั่วเหลือง (SB) ก่อนข้างคองที่ในช่วงแรก คือ ช่วงเวลาที่ 0 ถึงวันที่ 4 ของการหมัก และหลังจากนั้นมีค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว มีค่าสูงสุดเป็น 0.26 % ณ วันที่ 14 ของการหมัก ซึ่งค่าความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นของน้ำถั่วเหลืองที่ไม่ได้

เดิมหัวเชื้อเริ่มต้นนี้ อาจเกิดจากกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในระหว่างการทดลอง ซึ่งจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนที่สามารถหมักแล้วทำให้เกิดกรดในกระบวนการหมัก เช่น แบคทีเรียแลกติก บาซิลลัส แบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติก เป็นต้น ส่วนค่าความเป็นกรดของน้ำถั่วเหลืองหมัก (FSB) มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีค่าสูงสุดเป็น 0.47 % v/v ณ วันที่ 21 ของการหมัก ซึ่งค่าความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นนี้อาจสัมพันธ์กับปริมาณกรดแลกติกที่เกิดจากกระบวนการหมักของแบคทีเรียแลกติก (เชื้อเริ่มต้น *L. casei*) ที่หมักน้ำถั่วแล้วได้กรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ดังนั้นสรุปได้ว่าค่าความเป็นกรดของน้ำถั่วเหลืองหมักมีค่าสูงกว่าของน้ำถั่วเหลืองที่ไม่ได้เติมเชื้อเริ่มต้น

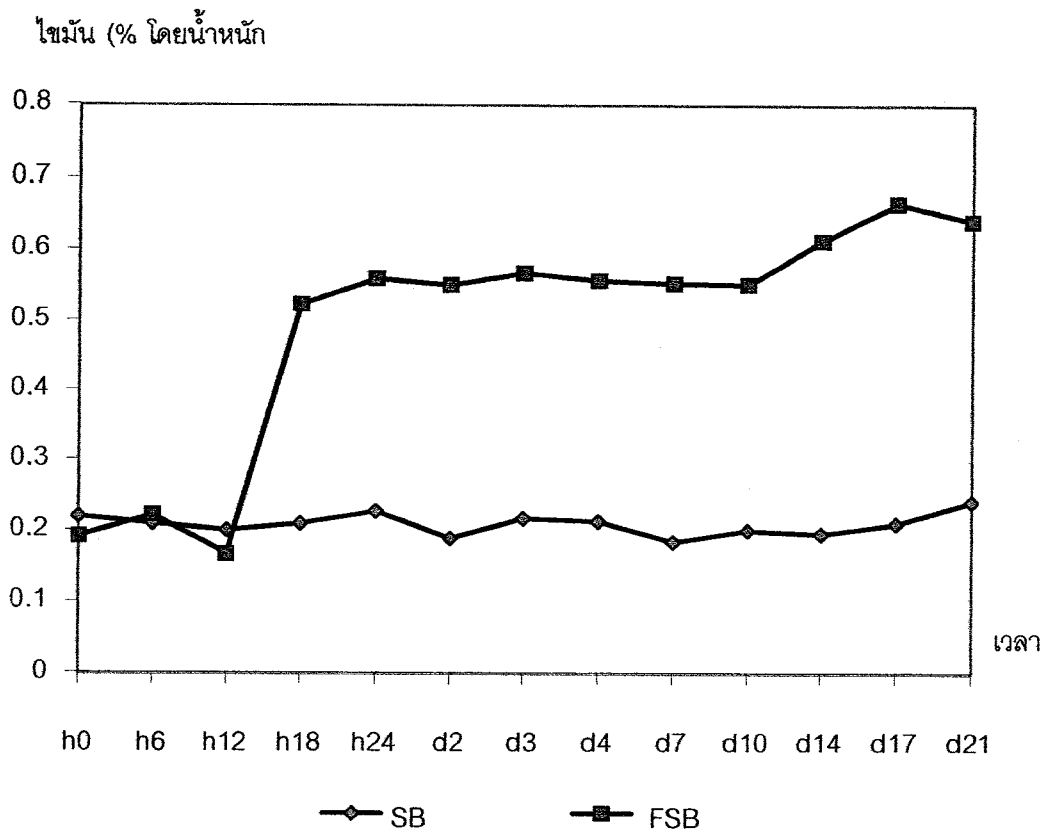
2.2.2 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้



รูปที่ 16 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณ โปรตีนที่ละลายของน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมัก โดยเทียบกับสารมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA)

จากการวิเคราะห์พบว่า ปริมาณโปรตีนละลายน้ำที่มีในน้ำถั่วเหลืองค่อนข้างคงที่ และเริ่มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังจากวันที่ 7 ของการหมัก ทั้งนี้อาจเกิดจากเมทาบอลิต์ของจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่สามารถย่อยสลายโปรตีนจากถั่วเหลืองได้ สัมพันธ์กับรายงานของ Brandsaeter และ Nelson (1995) ว่า *L. casei* สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (Proteolytic enzyme) ได้ จึงทำให้ในน้ำหมักถั่วเหลืองพบว่าเมื่อผ่านการหมักโดยหัวเชื้อเริ่มต้นแล้ว โปรตีนที่ละลายได้มีปริมาณสูงขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับช่วงการหมักที่ทำให้เกิดกรดที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และสัมพันธ์กับช่วงที่เชื้อ *L. casei* สามารถปรับตัวได้ และเจริญอย่างรวดเร็ว และที่ระยะเวลาการหมักในวันที่ 3 ตรวจพบโปรตีนในปริมาณสูงที่สุด คือ ประมาณ 200 กรัม/ลิตร หรือ 20 % (w/v) ของน้ำถั่วเหลือง และหลังจากนั้น ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้จะเริ่มลดลงอย่างช้าๆ ปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นในผลิตภัณฑ์หมักนี้ เมื่อผ่านกระบวนการหมัก ซึ่งเป็นการเพิ่มคุณค่าทางสารอาหารหรือทางโภชนาการต่อการบริโภคผลิตภัณฑ์หมักจากถั่วเหลือง เนื่องจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งของสารอาหาร โปรตีน ไขมัน แร่ธาตุ และวิตามิน แต่ชนิดของโปรตีนในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการหมักจะอยู่ในลักษณะที่ถูกย่อยแล้วเป็นขนาดโมเลกุลที่เล็กลง ซึ่งอยู่ในรูปของกรดอะมิโนมากขึ้น เป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก จึงช่วยเกี่ยวกับการดูดซึมของร่างกายเพื่อนำสารอาหารประเภทโปรตีนดังกล่าวไปใช้เป็นสารอาหารหลัก อีกทั้งปริมาณของกรดอะมิโนบางชนิด จะทำให้รสชาติของผลิตภัณฑ์ดีขึ้น และส่วนที่ถูกย่อยสลาย และเปลี่ยนแปลงเป็นสารทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นหอม และมีสีที่น่าบริโภคมากขึ้น

2.2.3 ปริมาณไขมัน



รูปที่ 17 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณไขมันของน้ำฉ่ำเหลืองและน้ำฉ่ำเหลืองหมัก

จากผลการทดลองวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและไขมันในน้ำฉ่ำเหลือง และน้ำฉ่ำเหลืองหมัก พบว่าในน้ำหมักฉ่ำเหลืองมีปริมาณ โปรตีนและไขมันเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมัก ซึ่งฉ่ำเหลืองที่ผ่านกระบวนการหมักจะมีการเปลี่ยนแปลงของสารอาหารเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์จากการทำงานของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงพบว่าปริมาณไขมันที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำฉ่ำเหลืองที่หมักโดยเชื้อเริ่มต้นที่เดิมลงไปนี้มีปริมาณไขมันสูงกว่าในน้ำฉ่ำเหลือง เช่นเดียวกับกับปริมาณโปรตีน ซึ่งปริมาณไขมันที่เพิ่มขึ้นนี้อาจเป็นไขมันที่มีคุณภาพประโยชน์ต่อร่างกาย เนื่องจากมีรายงานว่าไขมันจากฉ่ำเหลืองนั้นประกอบด้วยกรดไขมันที่มีประโยชน์ คือ เป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวซึ่งมีอยู่มากถึงร้อยละ 55 ในการบริโภคไขมันชนิดที่ไม่อิ่มตัวนี้แทนการบริโภคไขมันชนิดอิ่มตัว พบว่ามีส่วนในการลดโคเลสเตอรอลในเส้นเลือดได้ ซึ่งในผลิตภัณฑ์น้ำฉ่ำเหลืองหมักนั้นตรวจพบปริมาณไขมันเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก และหลังจากนั้นเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ปริมาณไขมันที่ตรวจพบค่อนข้างคงที่ และเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และมีปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 0.67 %w/w ณ วันที่ 17 ของการหมัก ส่วนน้ำฉ่ำเหลืองที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อ พบว่าปริมาณไขมันค่อนข้างคงที่ และเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ณ วันที่ 21 ของการหมัก ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าไขมันที่ตรวจพบในน้ำฉ่ำเหลืองหมักมีปริมาณสูงกว่าในน้ำฉ่ำ

เหลือง ซึ่งอาจเกิดจากการทำงานของแบคทีเรีย *L. casei* ที่เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในระบบหมัก ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายไขมัน (Lipolytic enzyme) ได้ สอดคล้องกับรายงานของ Sharmin และคณะ (2004) จึงทำให้ตรวจพบปริมาณไขมันเพิ่มขึ้น เมื่อมีการเจริญของแบคทีเรียหัวเชื้อดังกล่าวในกระบวนการหมัก ดังนั้นปริมาณไขมันที่ตรวจพบในน้ำถั่วเหลืองหมักจึงมีปริมาณสูงกว่าในน้ำถั่วเหลืองที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อเริ่มต้นดังกล่าว

2.2.4 ปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 12 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมัก

ตัวอย่าง	จำนวน จุลินทรีย์ ทั้งหมด (CFU/ml)	ยีสต์และรา (CFU/ml)	coliform bacteria (MPN/ 100 ml)	<i>E. coli</i> (MPN/ 100 ml)	<i>Salmonella</i> sp. (CFU/ml)	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> (CFU/ml)	<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i> (CFU/ml)	<i>Bacillus</i> <i>cereus</i> (CFU/ml)
SB H0	ไม่พบ	ไม่พบ	0	0	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
SB D21	4.9×10^4	ไม่พบ	2.0	0	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
FSB H0	1.7×10^8	ไม่พบ	0	0	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
FSB D21	2.2×10^6	ไม่พบ	0	0	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

หมายเหตุ ค่าที่ได้ คือ ค่าเฉลี่ยจากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

CFU (Colony forming unit) = จำนวนกลุ่มเซลล์ของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากผลการทดลอง เมื่อเริ่มต้นหมัก ณ ชั่วโมงที่ 0 พบว่าในน้ำถั่วเหลืองที่ไม่ได้เติมเชื้อเริ่มต้น (SB) ตรวจไม่พบจุลินทรีย์ เนื่องจากก่อนทำการหมัก ได้ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ เพื่อกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อน และไม่ได้เติมแบคทีเรียหัวเชื้อลงไป ส่วนน้ำถั่วเหลืองหมัก (FSB) ณ ชั่วโมงที่ 0 ตรวจพบตรวจพบจำนวนจุลินทรีย์โดยรวมทั้งหมด 1.7×10^8 CFU/ml ซึ่งจุลินทรีย์โดยรวมทั้งหมดที่ตรวจพบในน้ำถั่วเหลืองหมัก เมื่อเริ่มต้นหมักนี้ เป็นแบคทีเรีย *L. casei* หัวเชื้อที่เติมลงไป ในน้ำถั่ว

เหลืองหมัก และเมื่อเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ผ่านกระบวนการหมักได้ 21 วัน นำมาตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์อีกครั้ง ตรวจพบจุลินทรีย์โดยรวมทั้งหมด 4.9×10^4 และ 2.2×10^6 CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งจุลินทรีย์โดยรวมทั้งหมดที่ตรวจพบในน้ำถั่วเหลืองหมัก เป็นแบคทีเรีย *L. casei* และ *Lactobacillus* sp. ส่วนจุลินทรีย์โดยรวมทั้งหมดที่ตรวจพบในน้ำถั่วเหลืองที่ไม่ได้เติมเชื้อเริ่มต้น พบว่าเป็นแบคทีเรียโคลิฟอร์ม และ *Bacillus* sp. และในผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 ชนิดตลอดการทดลอง ตรวจไม่พบยีสต์ รา และแบคทีเรียชนิดที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร คือ *E. coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* และ *Bacillus cereus*

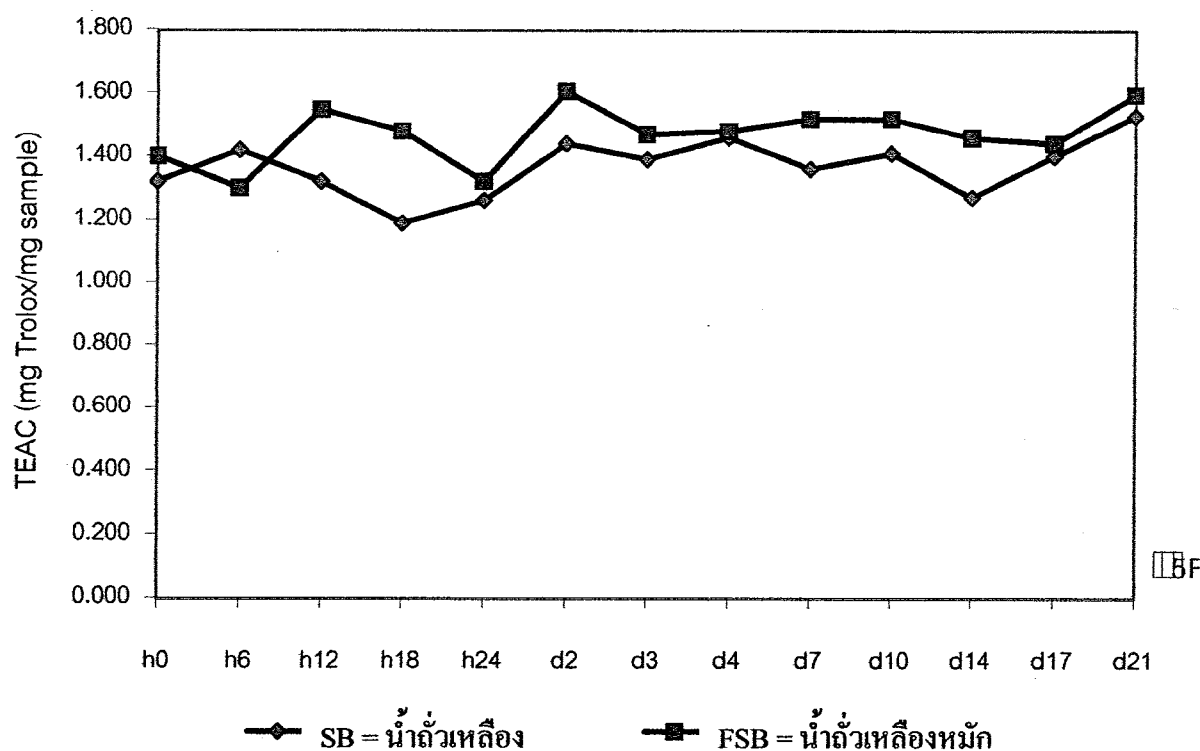
จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าในน้ำถั่วเหลืองหมักตรวจไม่พบแบคทีเรีย *S. aureus*, *Salmonella* sp., *C. perfringens* ตลอดการหมัก ซึ่งเป็นไปได้ว่าไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าวในวัตถุดิบหมัก และกระบวนการหมัก และในกระบวนการหมักผ่านขั้นตอนการพาสเจอร์ไรส์เพื่อกำจัดจุลินทรีย์ปนเปื้อน รวมทั้งค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำถั่วเหลืองหมักมีค่าต่ำ คือ จะอยู่ในช่วง 3.05–4.59 เมื่อเปรียบเทียบกับค่า pH ที่เหมาะสมกับการเจริญของ *C. perfringens* จะอยู่ในช่วง 6.0–7.6 ค่า pH ที่เหมาะสมกับการเจริญของ *Salmonella* spp. อยู่ในช่วง 6.0–7.5 และ ค่า pH ที่เหมาะสมกับการเจริญของ *E. coli* อยู่ในช่วง 6.0–8.0 จึงทำให้ตรวจไม่พบจุลินทรีย์ปนเปื้อน และจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารดังกล่าว นอกจากนี้ยังตรวจพบปริมาณแบคทีเรียแลกติกในปริมาณสูงในผลิตภัณฑ์สุดท้าย สัมพันธ์กับปริมาณของกรดโดยรวม ซึ่งกรดโดยรวมนี้อาจมีทั้งกรดแลกติก และกรดอะซิติกที่เกิดจากกระบวนการหมัก สามารถทำหน้าที่เป็นสารกันเสีย และปรับค่าพีเอช ของน้ำหมัก กรดแลกติกที่พบนั้นเป็นผลิตภัณฑ์หลักของการหมักนี้ ส่วนผลการตรวจวิเคราะห์น้ำถั่วเหลืองที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อเริ่มต้นนั้น ถึงแม้ว่าจะไม่ได้เติมหัวเชื้อลงไป แต่สามารถตรวจพบจำนวนจุลินทรีย์โดยรวมในผลิตภัณฑ์สุดท้าย อาจเนื่องมาจากตลอดระยะเวลาการทดลองได้มีการเก็บตัวอย่างน้ำถั่วเหลืองหมักเพื่อทำการวิเคราะห์ จึงอาจมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ระหว่างการทดลองได้ เนื่องจากไม่มีหัวเชื้อมาควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่เกิดขึ้น อีกทั้งก่อนการหมักนั้น ได้ผ่านขั้นตอนการพาสเจอร์ไรส์ เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนเมื่อเริ่มต้น อาจทำให้จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถถูกกำจัด เช่น กลุ่มที่มีการสร้างสปอร์ ซึ่งทนความร้อนสูง เป็นต้น ซึ่งเมื่อจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถปรับตัวได้แล้วจะเจริญเพิ่มจำนวนได้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์หรือสร้างสารเมตาบอไลต์ที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นได้

ดังนั้นจากข้อมูลเบื้องต้นดังกล่าว จะสามารถทำให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของน้ำถั่วเหลืองหมักที่ผ่านกระบวนการหมักโดยเติมเชื้อเริ่มต้นมีผลต่อความปลอดภัยและผลเบื้องต้นต่อสุขภาพในการบริโภคได้ ว่าในผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการหมักมีความปลอดภัย ทั้งปลอดภัยจากจุลินทรีย์ปนเปื้อนชนิดที่ก่อโรค นอกจากนี้ก็อีกทั้งพบว่าข้อมูลเรื่องปริมาณแบคทีเรียแลกติกที่ตรวจพบยังคงมีปริมาณสูงในผลิตภัณฑ์สุดท้าย ซึ่งจะสามารถใช้เป็นแนวทางช่วยในการเลือกบริโภคในแง่ของการบริโภคเพื่อต้องการ probiotic ซึ่งจะต้องเลือกบริโภคในช่วงที่แบคทีเรียแลกติกมีปริมาณสูงพอเหมาะ

3.ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมัก

จากการศึกษาประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมักที่ได้จากการจำลองผลิต ณ ระยะเวลาต่างๆ 4 วิธี คือ 1. วิธี ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid radical)) free radical decolorization assay 2. วิธี Ferric Reducing Ability Power (FRAP) 3. Superoxide scavenging 4. Nitric oxide scavenging ได้ผลการศึกษาวิจัยดังนี้

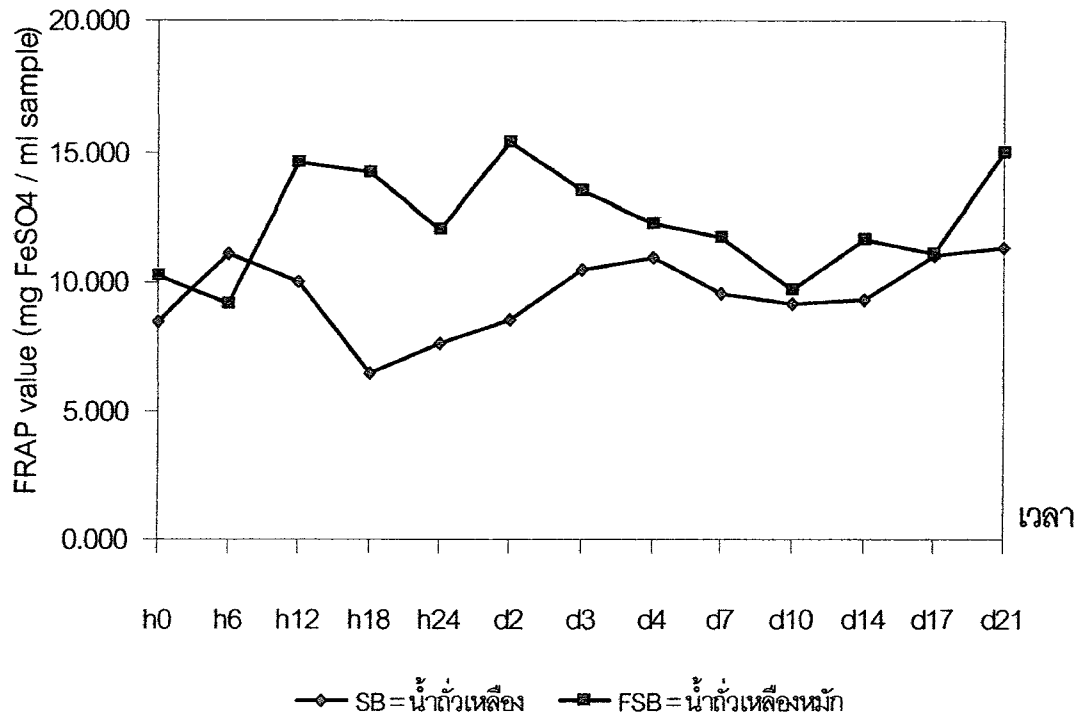
3.1 วิธี ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid radical)) free radical decolorization assay โดยทำการศึกษเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) โดยรายงานฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเป็นค่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidative Capacity) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 13 และวิธี Reducing power on ferric assay ซึ่งคำนวณค่าเป็น Ferric Reducing Ability Power (FRAP value) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 18



รูปที่ 18 แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมักเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมักโดยใช้วิธี ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) free radical decolorization assay ซึ่งเป็นวิธีประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยอาศัยความสามารถในการเข้าไปขจัด ABTS free radical ที่ถูกสร้างขึ้น โดยการที่ ABTS ถูก Oxidized ด้วย Oxidizing agent เกิดเป็น ABTS free radical cation ($ABTS^{\bullet+}$) แล้วทำการติดตามผลการเปลี่ยนแปลงของสี $ABTS^{\bullet+}$ ที่ลดลง แปลผลเป็นค่า % Inhibition นั่นคือตัวอย่างที่มีค่า % Inhibition ที่สูงแสดงว่ามีความสามารถในการเข้าไปขจัด $ABTS^{\bullet+}$ ได้สูง ซึ่งจากค่า % Inhibition ที่ได้นำมาเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox แปลผลเป็นค่า TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) ดังแสดงในรูปที่ 18 พบว่าในน้ำถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการหมักนี้ให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่าน้ำถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักโดยเชื้อเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0 ของการหมัก) โดยจากการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ณ วันที่ต่างๆ ของกระบวนการหมัก พบว่าน้ำถั่วเหลืองหมักนี้ให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในการขจัด $ABTS^{\bullet+}$ สูงสุดในวันที่ 2 ของกระบวนการหมัก หลังจากนั้นจะมีฤทธิ์ลดลงและค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 17 ของกระบวนการหมัก และมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยในวันที่ 21 ของกระบวนการหมัก ซึ่งยังคงมีฤทธิ์สูงกว่าวันที่ 0 ของการหมัก และสูงกว่าน้ำถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก

3.2 วิธี Ferric Reducing Ability Power (FRAP) ซึ่งเป็นวิธีประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยอาศัยความสามารถในการเปลี่ยน Fe^{3+} ให้อยู่ในรูป Fe^{2+} หรือความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของน้ำถั่วเหลืองหมัก ซึ่งแปลผลเป็นค่า FRAP value นั่นคือตัวอย่างที่มีค่า FRAP value ที่สูงแสดงว่ามีความสามารถในการเปลี่ยน Fe^{3+} ให้อยู่ในรูป Fe^{2+} มาก มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนที่ดี หรือมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่สูงนั่นเอง ซึ่งให้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 19



รูปที่ 19 แสดงฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมักเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน FeSO_4

จากการศึกษาฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมักโดยใช้วิธี FRAP พบว่าผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการหมักนี้ ให้ฤทธิ์ด้านออกซิเดชันสูงกว่าที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ของการหมัก และจากน้ำถั่วเหลืองที่ไม่ได้เติมเชื้อเริ่มต้น โดยจากการศึกษาฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน ณ วันที่ต่างๆของกระบวนการหมัก พบว่า น้ำถั่วเหลืองหมักนี้ให้ฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน (FRAP value) สูงสุดในวันที่ 2 ของกระบวนการหมัก หลังจากนั้นจะมีฤทธิ์ลดลงจนถึงวันที่ 17 ของกระบวนการหมัก และในวันที่ 21 ของกระบวนการหมักจึงมีฤทธิ์เพิ่มสูงขึ้นอีกเล็กน้อย แต่ยังคงมีฤทธิ์สูงกว่าน้ำถั่วเหลืองหมักวันที่ 0 ของการหมัก และน้ำถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก โดย ณ วันที่ 2 ของการหมัก มีฤทธิ์ด้านออกซิเดชันในการให้อิเลคตรอนกับ Fe^{3+} ให้อยู่ในรูปของ Fe^{2+} สูงที่สุด เมื่อพิจารณาถึงปริมาณฤทธิ์ด้านออกซิเดชันในน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมักที่ตรวจประเมินโดยวิธี ABTS และ FRAP (รูปที่ 18 และ 19) ซึ่งทั้ง 2 วิธีนี้มีหลักการเดียวกันคือ เป็นการให้อิเลคตรอน (single electron transfer) ดังนั้นผลที่ได้จึงเป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือ น้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมักมีฤทธิ์ด้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านกระบวนการหมัก โดยมีฤทธิ์ด้านออกซิเดชันสูงสุดในวันที่ 2 ของกระบวนการหมัก หลังจากนั้นจะมีฤทธิ์ลดลงจนถึงวันที่ 17 ของกระบวนการหมัก และมีฤทธิ์เพิ่มสูงขึ้นอีกเล็กน้อยในวันที่ 21 ของกระบวนการหมัก ซึ่งยังคงมีฤทธิ์สูงกว่าวันที่ 0 ของการหมัก และสูงกว่าน้ำถั่วเหลือง (SB) ที่ไม่ได้เติมเชื้อเริ่มต้น นั้นแสดงว่ากระบวนการหมักมีส่วนช่วยเพิ่มฤทธิ์

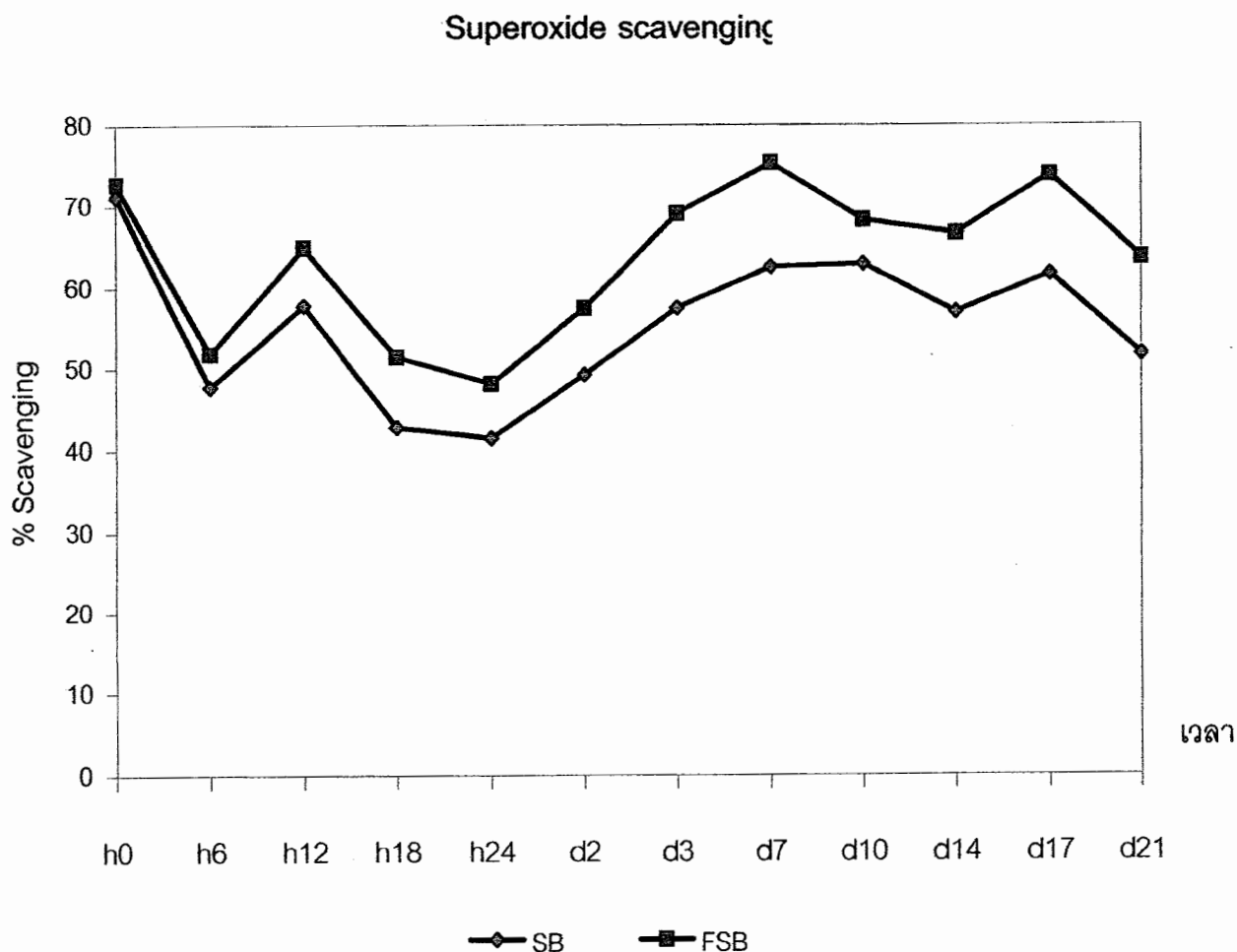
ต้านออกซิเดชัน ซึ่งฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในถั่วเหลืองหมักนี้เองที่ประกอบหลักน่าจะเกิดจากปริมาณ isoflavones ที่มีอยู่เป็นปริมาณสูงในถั่วเหลือง ซึ่งจากการศึกษาจะพบว่าปริมาณ isoflavones (genistein และ daidzein) ซึ่งมีผลต่อการต้านออกซิเดชัน เมื่อพิจารณาโดยรวมจากผลการวิเคราะห์โดยรวมมีค่าแนวโน้มไปในทิศทางใกล้เคียงกันกับกับปริมาณฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ตรวจวิเคราะห์ได้ ดังแสดงในรูปที่ 19 ทั้งนี้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันนอกจากจะเกิดจากสาร isoflavones ในถั่วเหลืองแล้วนั้น ยังอาจเกิดจากส่วนผสมที่เป็นน้ำตาลอ้อยอีกด้วย เนื่องจากน้ำตาลอ้อยมีสารโพลีฟีนอลซึ่งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ สอดคล้องกับรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ของ ไชยวัฒน์ ไชยสุต และคณะ (2549)

3.3 วิธีการทดสอบฤทธิ์ Superoxide scavenging

Superoxide anion scavenging เป็นการศึกษาถึงฤทธิ์การจับอนุมูลอิสระ Superoxide โดยใช้ระบบ Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) และ Phenazine methosulfate (PMS) เป็นตัวกำเนิดอนุมูลอิสระ Superoxide แล้ววิเคราะห์โดยอาศัยการเกิด Reduction ของ Nitroblue tetrazolium (NBT) ทำให้เกิดเป็นสารละลายสีน้ำเงิน-ดำ แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงผล Superoxide anion scavenging ของน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมัก ณ เวลาต่างๆ

% Superoxide scavenging	ตัวอย่าง	
	น้ำถั่วเหลือง (SB)	น้ำถั่วเหลืองหมัก (FSB)
h 0	71.33	72.92
h 6	47.92	52.03
h 12	58.02	65.09
h 18	43.01	51.69
h 24	41.72	48.37
d 2	49.50	57.71
d 3	57.66	69.26
d 7	62.76	75.48
d 10	59.10	68.45
d 14	57.11	66.81
d 17	61.78	74.06
d 21	51.90	63.83



รูปที่ 20 แสดงการเปลี่ยนแปลงของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี Superoxide scavenging ที่เวลาต่างๆ

จากกราฟแสดงผลการทดลองการทดสอบฤทธิ์ Superoxide scavenging ของน้ำถั่วเหลืองหมัก (FSB) ในช่วงเวลาเริ่มต้น (h 0), 6 ชั่วโมง (h 6), 12 ชั่วโมง (h 12), 18 ชั่วโมง (h 18), 24 ชั่วโมง (h 24), 2 วัน (d 2), 3 (d 3), 7 วัน (d 7), 10 วัน (d 10), 14 วัน (d 14), 17 วัน (d 17), และ 21 วัน (d 21) พบว่ามีค่าแนวโน้มสูงกว่าฤทธิ์ Superoxide scavenging ในน้ำถั่วเหลือง (SB) และทั้งใน น้ำถั่วเหลืองหมัก (FSB) และน้ำถั่วเหลือง (SB) นั้น มีแนวโน้มฤทธิ์ในการทำหน้าที Superoxide scavenging เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ จากการทดสอบฤทธิ์ Superoxide scavenging พบว่าน้ำถั่วเหลืองมีฤทธิ์สูงสุด เมื่อเริ่มต้นการทดลอง ณ เวลาที่ 0 มีค่าเท่ากับร้อยละ 71.33 หลังจากนั้นแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วจนถึง ชั่วโมงที่ 6 ของการทดลอง และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยในชั่วโมงที่ 12 และลดลงอีกจนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการทดลอง และหลังจากนั้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 10 ของการทดลอง และหลังจากนั้นมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย ส่วนน้ำถั่วเหลืองหมัก พบว่าจากเริ่มต้นหมักมีฤทธิ์ลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 6 ของ

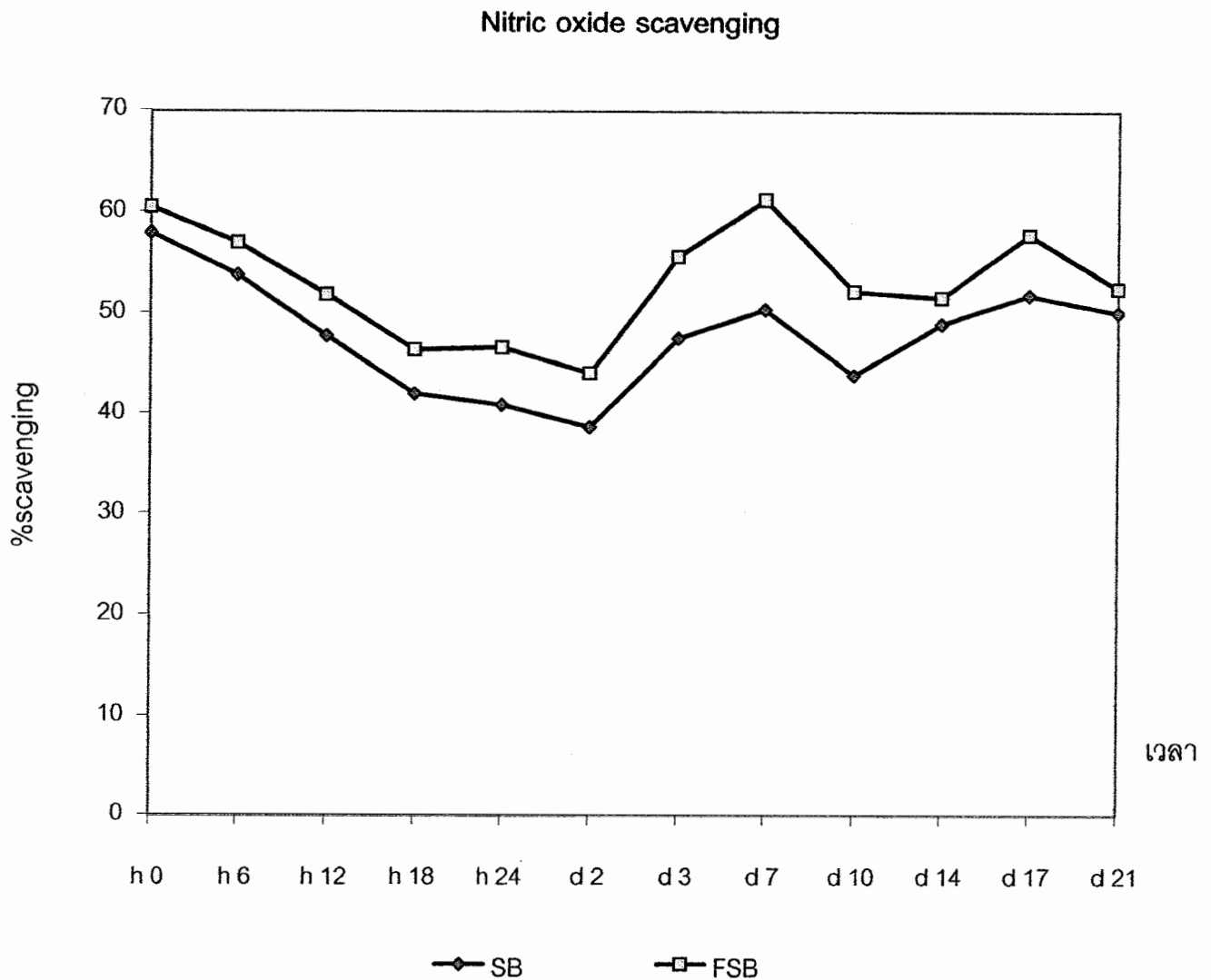
การหมัก และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยในช่วงวันที่ 12 และลดลงอีกจนถึงวันที่ 24 ของการหมัก และหลังจากนั้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนมีฤทธิ์สูงสุด ณ วันที่ 7 ของการหมัก ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 75.48 หลังจากนั้นแนวโน้มลดลงเล็กน้อย และเพิ่มสูงขึ้นอีกในวันที่ 17 ของการหมัก

3.4 วิธีการทดสอบฤทธิ์ Nitric oxide scavenging

Nitric oxide scavenging เป็นการศึกษาฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ Nitric oxide โดยใช้ Sodium nitroprusside เป็นตัวกำเนิดอนุมูลอิสระ Nitric oxide และวิเคราะห์โดยการทำปฏิกิริยากับ Griess reagent แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ได้ผลแสดงดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แสดงผล Nitric oxide scavenging ของน้ำอ้วเหืองและน้ำอ้วเหืองหมัก ณ เวลาต่างๆ

% Nitric oxide scavenging	ตัวอย่าง	
	น้ำอ้วเหือง	น้ำอ้วเหืองหมัก
h0	58.00	60.59
h6	53.88	57.05
h12	47.88	51.94
h18	42.10	46.50
h24	40.99	46.74
d2	38.80	44.19
d3	47.64	55.68
d7	50.48	61.30
d10	43.99	52.28
d14	49.06	51.65
d17	51.90	57.85
d21	50.17	52.57



รูปที่ 21 แสดงการเปลี่ยนแปลงของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Nitric oxide scavenging ที่เวลาต่างๆ

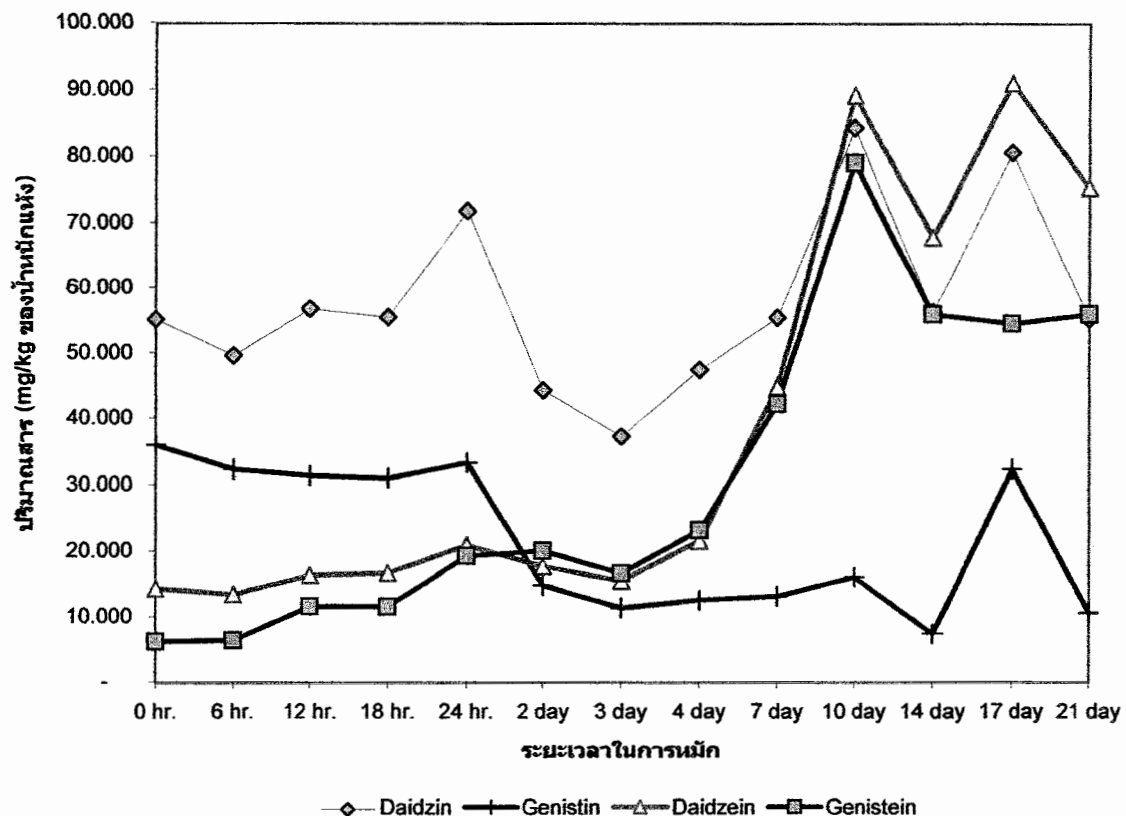
จากกราฟแสดงผลการทดสอบฤทธิ์ NO scavenging ของน้ำถั่วเหลืองหมัก (FSB) ในช่วงเวลาเริ่มต้น (h0), 6 ชั่วโมง (h6), 12 ชั่วโมง (h12), 18 ชั่วโมง (h18), 24 ชั่วโมง (h24), 2 วัน (d2), 3 (d3), 7 วัน (d7), 10 วัน (d10), 14 วัน (d14), 17 วัน (d17), และ 21 วัน (d21) มีค่าแนวโน้มสูงกว่าน้ำถั่วเหลือง (SB) และทั้งในน้ำสารสกัดถั่วเหลืองหมัก (FSB) นั้น มีแนวโน้มฤทธิ์ในการทำหน้าที่ NO scavenging เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ และเมื่อเปรียบเทียบกับการทำงานที่ Superoxide scavenging และ NO scavenging พบว่า ทั้งน้ำถั่วเหลืองหมัก (FSB) และน้ำถั่วเหลือง (SB) มีแนวโน้มการทำงานที่ Superoxide scavenging สัมพันธ์กับ Nitric oxide scavenging จากการทดสอบฤทธิ์ Nitric oxide scavenging พบว่าน้ำถั่วเหลืองมีฤทธิ์สูงสุด เมื่อเริ่มต้นการทดลอง ณ เวลาที่ 0 มีค่าเท่ากับร้อยละ 58.00

หลังจากนั้นมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 2 ของการทดลอง และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อย ตั้งแต่วันที่ 3 ถึงวันที่ 21 ของการทดลอง ส่วนน้ำถั่วเหลืองหมัก พบว่าจากเริ่มต้นหมักมีฤทธิ์ลดลงจนถึงวันที่ 2 ของการหมัก และหลังจากนั้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนมีฤทธิ์สูงสุด ณ วันที่ 7 ของการหมัก ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 61.30 หลังจากนั้นแนวโน้มลดลงเล็กน้อย และเพิ่มสูงขึ้นอีกในวันที่ 17 ของการหมัก

4. ปริมาณสาร daizein และ genistein ในน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมัก

ตารางที่ 15 แสดงปริมาณสาร Isoflavones ของตัวอย่างน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมัก ณ เวลาต่างๆ

ระยะเวลาในการหมัก	ปริมาณ isoflavones (mg/kg)			
	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein
H0	55.316	36.172	14.483	6.366
H6	49.798	32.561	13.606	6.550
H12	56.930	31.634	16.510	11.779
H18	55.651	31.249	16.879	11.726
H24	71.944	33.544	21.102	19.458
D2	44.482	14.943	17.903	20.266
D3	37.466	11.522	15.642	16.827
D4	47.583	12.688	21.715	23.293
D7	55.582	13.313	45.017	42.369
D10	84.383	16.209	89.236	79.178
D14	56.395	7.570	67.921	56.063
D17	80.720	32.586	91.129	54.628
D21	55.386	10.776	75.420	56.044



รูปที่ 22 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Daidzin Genistin Daidzein และ Genistein ในน้ำถั่วเหลืองหมักที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ

เมื่อทำการเทียบสัญญาณที่วัดได้ของ isoflavones ในตัวอย่างกับ calibration curves พบว่า สารกลุ่ม isoflavones ทั้ง 4 ชนิด ในน้ำถั่วเหลือง (SB) และน้ำถั่วเหลืองหมัก (FSB) ณ เวลาต่างๆของการทดลอง พบว่ามีปริมาณของ isoflavones ดังแสดงในตารางที่ 15 และรูปที่ 16 (แสดงเฉพาะปริมาณที่ตรวจพบในน้ำถั่วเหลืองหมัก) จะเห็นว่าน้ำหมักถั่วเหลืองมีปริมาณ daidzin และ genistin ก่อนข้างคงที่ตั้งแต่เริ่มหมัก ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก หลังจากนั้นแนวโน้มลดลงเรื่อยๆจนถึงวันที่ 3 ของการหมัก หลังจากนั้นแนวโน้มเพิ่มขึ้นอีก โดยเฉพาะปริมาณ daidzin มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 10 ถึง 21 ของการหมัก ส่วนปริมาณ genistin นั้นเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในวันที่ 17 ถึงวันที่ 21 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 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนัถั่วเหลือง

ซึ่งปริมาณ daidzin genistin daidzein และ genistein ที่พบในน้ำถั่วเหลืองเมื่อเริ่มทดลอง ณ ชั่วโมงที่ 0 นั้น มีปริมาณใกล้เคียงกับในน้ำถั่วเหลืองหมัก โดยพบมีปริมาณเท่ากับ 56.188 37.066

13.284 และ 5.726 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนักรั่วเหลือง ตามลำดับ และเมื่อผ่านระยะเวลาต่างๆ ของการทดลอง พบว่าปริมาณ isoflavones ทั้ง 4 ชนิดนี้ ของน้ำถั่วเหลืองไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งแตกต่างจากในน้ำถั่วเหลืองหมักที่พบการเปลี่ยนแปลงของสารดังกล่าว ดังนั้นจึงทำให้พบปริมาณสาร daidzein และ genistein ของน้ำถั่วเหลือง มีปริมาณสูงกว่าในน้ำถั่วเหลืองหมักซึ่งสารสำคัญ 2 ชนิดนี้มีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังจากเกิดการหมักในช่วงวันที่ 7 ถึงวันที่ 21 ของการหมัก ซึ่งสารดังกล่าวนี้ มีบทบาทต่อการมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากถั่วเหลือง สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ทดสอบโดยวิธี ABTS และ FRAP ซึ่งพบว่ามียูทรีตี้ต้านออกซิเดชันเมื่อทดสอบด้วยวิธีนี้สูงในช่วงวันที่ วันที่ 2 ถึงวันที่ 14 ของการหมัก และทดสอบโดยวิธี Superoxide scavenging และ Nitric oxide scavenging ซึ่งพบว่ามียูทรีตี้ต้านออกซิเดชันเมื่อทดสอบด้วยวิธีนี้สูงในช่วงวันที่วันที่ 3 ถึงวันที่ 21 ของการหมัก ซึ่งความสำคัญของปริมาณ isoflavones นี้อาจมีผลต่อการมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมักนั้น อาจเกิดจาก 1) สารสำคัญของถั่วเหลือง โดยเฉพาะสารกลุ่ม isoflavones พิจารณาจากการศึกษาปริมาณสารดังกล่าว ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ Daiazin Genistin (glycoside) ไปเป็น Daiazein และ Genistein (aglycone) ตามลำดับ โดยสารดังกล่าวนี้จะจับกับน้ำตาลเป็น isoflavoneglucoside ซึ่งจะถูกตัดเอาน้ำตาลออกโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ beta-glucosidase ซึ่งผลิตโดยจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก เป็นผลทำให้ปริมาณของ glucoside ลดลง แต่ปริมาณ isoflavone หรือ aglycone จะเพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดีกว่า เนื่องจาก isoflavone จะมีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระหรือเป็น free radical scavenger ได้ สอดคล้องกับงานรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ของ ไชยวัฒน์ ไชยสุต และคณะ (2549) เรื่อง “คุณสมบัติต้านออกซิเดชันของพืชและน้ำหมักชีวภาพจากพืช” 2) นอกจากนี้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดังกล่าวยังอาจเกี่ยวข้องกับปริมาณสาร โพลีฟีนอล ที่พบในน้ำตาลอ้อยที่เป็นส่วนผสมของน้ำถั่วเหลือง และน้ำถั่วเหลืองหมัก ดังรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ของ ไชยวัฒน์ ไชยสุต และคณะ (2549) เรื่อง “คุณสมบัติต้านออกซิเดชันของพืชและน้ำหมักชีวภาพจากพืช” ซึ่งพิจารณาได้จาก ในน้ำถั่วเหลืองนั้นถึงแม้ว่าจะไม่ผ่านกระบวนการหมักโดยหัวเชื้อเริ่มต้น และยังคงพบปริมาณ daiazein และ genistein แม้เพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณที่ตรวจพบในน้ำถั่วเหลืองหมัก แต่พบว่าน้ำถั่วเหลืองนั้นยังมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เมื่อทดสอบโดยวิธีต่างๆ ข้างต้น จึงเป็นไปได้ว่าโพลีฟีนอลของน้ำตาลอ้อยมีผลต่อการมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเช่นกัน 3) นอกจากนี้จุลินทรีย์อาจมีบทบาทต่อการมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยเช่นกัน เช่นเดียวกับแบคทีเรียแลคติก *L. casei* ที่เดิมเป็นหัวเชื้อในการหมักน้ำถั่วเหลือง จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ในน้ำถั่วเหลืองหมักมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่าน้ำถั่วเหลืองที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อเริ่มต้น ซึ่งอ้างอิงจากการโครงการวิจัยของ ไชยวัฒน์ ไชยสุต และคณะ (2549) เรื่อง “คุณสมบัติต้านออกซิเดชันของพืชและน้ำหมักชีวภาพจากพืช” โดยได้ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของแบคทีเรียแลคติก โดยวิธี Reducing power on ferric assay (FRAP) และ ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) free radical decolorization assay นั้น ได้ทำการศึกษาจากเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์ของ

แบคทีเรียแลคติก โดยจากการทดสอบโดยวิธี FRAP พบว่า แบคทีเรียแลคติกมีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ทั้งส่วนของเซลล์ (intact cells) และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มาจากอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกแต่แยกเซลล์ออก (medium-cultured) ทั้งนี้ เซลล์ของแบคทีเรียแลคติกที่นำมาทดสอบมีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ Fe^{3+} โดย intact cells แสดง FRAP value ในระดับ 0.001-0.092 และ medium-cultured แสดงในระดับ 0.001-0.133

จากผลการทดลองในการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยอาศัยหลักการ ความสามารถจับอนุมูลอิสระ ABTS^+ ทั้งนี้ โดยวิธี ABTS(2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) free radical decolorization assay (ABTS method) ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระ ABTS^+ ดังกล่าว เพื่อเป็นเสมือนอนุมูลอิสระต่างๆ ซึ่งผลการทดลองโดยวิธี ABTS ได้แสดงให้เห็นคุณสมบัติขจัดอนุมูลอิสระจากเซลล์ (intact cells) ของแบคทีเรียแลคติกที่นำมาทดสอบเท่านั้น แต่ไม่พบจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่แยกเซลล์ของแบคทีเรียแลคติกออกหลังจากการผ่านการเพาะเลี้ยง (medium-cultured) และ การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยอาศัยการศึกษาคุณสมบัติการเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) โดยการเปลี่ยน Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} นั้น ได้พบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันลักษณะดังกล่าว ทั้งจาก intact cells และ medium-cultured ของแบคทีเรียแลคติกดังกล่าว ทั้งนี้ ผลการทดลองได้แสดงให้เห็นข้อสังเกตบางประการทั้งความเหมือนและแตกต่างของการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจาก intact cells และ cultured-medium ของแบคทีเรียแลคติกในครั้งนี้ โดยแนวโน้มผลการทดสอบที่ได้จากทั้ง ABTS method และ FRAP method นั้น จากวิธีการ Reducing power on ferric assay (FRAP) และ ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) free radical decolorization assay นั้น ได้บ่งบอกคุณสมบัติของสารที่สามารถก่อกำเนิดอนุมูลอิสระได้คือ สามารถรีดิวซ์ Fe^{3+} และขจัดอนุมูลอิสระ ABTS^+ โดยควรเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็น reductant หรือสารที่ให้อิเล็กตรอน ทั้งนี้ หากพิจารณากลไกของแบคทีเรียสำหรับใช้ในการป้องกันเซลล์จากภาวะเครียดออกซิเดชัน ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ รวมทั้งแบคทีเรียแลคติกจะพบความแตกต่างกันตามแต่ละสายพันธุ์ แบคทีเรียแลคติกเป็นกลุ่มของแบคทีเรียทนอากาศ (aerotolerant anaerobe) ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศได้ด้วยเช่นกัน ทั้งนี้ จึงมีโอกาสดังกล่าวการเกิดสาร reactive oxygen species (ROS) ออกมาระหว่างการเจริญในสภาวะที่มี oxygen (ภาวะการเจริญปกติของแบคทีเรียแลคติก คือ มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเหมาะสม แต่มีปริมาณออกซิเจนถูกจำกัด (Salminen and others, 2004)) ซึ่ง ROS ดังกล่าวนั้น ประกอบด้วย superoxide (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) และ hydroxyl radical ($\text{HO}^\bullet$) เป็นต้น ทั้งนี้ แบคทีเรียชนิดต่างๆจะมีกระบวนการเมตาบอลิซึมเพื่อป้องกันเซลล์จากสารพิษที่เกิดขึ้นดังกล่าว ด้วยกลไกต่างๆกัน

จากการศึกษาแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิด facultative anaerobe และเป็นแบคทีเรียที่มักถูกใช้เป็นตัวแทนของสิ่งมีชีวิต prokaryote ในการศึกษาสรีรวิทยาต่างๆ พบว่า ในระหว่างการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) จะก่อให้เกิดการทำงานของโปรตีนอย่างน้อย 80 ชนิด ของ *E. coli* จากการเหนี่ยวนำโดย superoxide radical และ hydrogen peroxide ที่เกิดขึ้น โดยเบื้องต้น การ

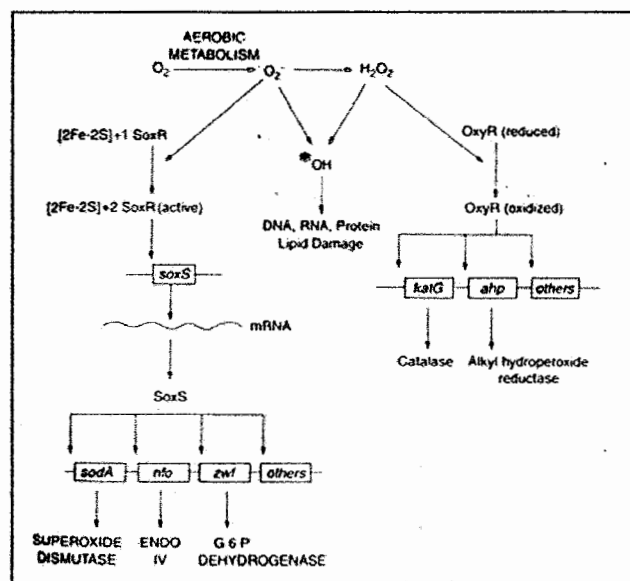
ตอบสนองต่อภาวะเครียดออกซิเดชันดังกล่าวของแบคทีเรีย นั้น ได้พบการทำงานของ 2 ระบบโปรตีน โดยเรียกว่า OxyR และ SoxRS

ระบบ OxyR regulon ประกอบด้วย การทำงานของโปรตีน 9 ชนิด ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้ทำงานจาก hydrogen peroxide จากการเกิดออกซิเดชัน ทำให้เกิดพันธะ disulfide ระหว่างกรดอะมิโนซิสเทอีนที่ C199 และ C208 ส่วนในภาวะที่ไม่ได้รับการกระตุ้นจาก hydrogen peroxide นั้น กรดอะมิโนซิสเทอีนจะถูก reduced โดย glutaredoxin I และ reduced form ของ OxyR regulon นี้โดยมาก มักเข้าไปจับที่บริเวณ operator/promotor โดยไม่ทำให้เกิดการ transcription จนกว่า OxyR จะถูก oxidized ซึ่งเอนไซม์ที่ถูกควบคุมจาก OxyR regulon นี้ ประกอบด้วย catalase (katG), glutathione reductase (gorA), glutaredoxin I (grxA), และ alkyl hydroperoxide reductase (ahpC และ ahpF)

และอีกระบบหนึ่ง คือ SoxRS ซึ่งประกอบด้วยการทำงานของโปรตีน 9 ชนิด ซึ่งถูกเหนี่ยวนำการทำงานจากการเกิด superoxide free radical ทั้งนี้เอนไซม์ที่พบในระบบของ SoxRS ประกอบด้วย Mn^{2+} -containing superoxide dismutase (sodA), DAN repair enzyme: endonucleaseIV (nfo), glucose-6-phosphatase dehydrogenase (zwf, production of NADPH), fliA (flavodoxin1), NADPH:flavodoxin oxidoreductase (fpr), and fumarate C (fumC) กระบวนการนั้นเริ่มจากโปรตีน SoxR หลังจากที่ได้รับ การกระตุ้นจากการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน จะไปชักนำให้ยีน SoxS เกิดการทำงานเพื่อสร้าง SoxS product ขึ้นมาเสริมการทำงานในภาวะเครียดออกซิเดชัน โครงสร้างของ SoxR ที่สามารถตอบสนอง เกิดการทำงานในภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดใน cytoplasm ของเซลล์ได้นั้นเนื่องจากมี Fe-sulfur อยู่ในแกนกลางของโครงสร้าง โดยจะมี $2Fe-2S$ ดังรูปที่ 23 และจับอยู่กับกรดอะมิโนซิสเทอีน 4 ตัว ซึ่งเชื่อว่า การมีโครงสร้าง iron-sulfur นี้ มีความสำคัญและถือเป็นความจำเป็นที่ทำให้เกิดความสามารถในการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ จากการกระตุ้น โดย superoxide free radical ได้ ทั้งนี้ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นดังกล่าวจะทำให้โปรตีน SoxR เกิดการเปลี่ยนแปลงให้มี activity เพื่อการตอบสนองภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้น แต่การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้ SoxR ยังคงเกาะอยู่บนสาย DNA ที่มีรหัสพันธุกรรมของยีน SoxS ดังนั้น จะเห็นได้ว่า ทั้งสภาพ oxidized และ reduced form ของโปรตีน SoxR จะยังคงจับอยู่ที่ promoter ของยีน SoxS ทั้งนี้ ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่กระตุ้นให้ SoxR เกิดการเปลี่ยนแปลง conformation นั้น ต้องทำให้ SoxR สามารถเกิดปฏิกิริยากับ เอนไซม์ RNA polymerase ได้ เพื่อให้เกิดการสร้างโปรตีนที่ code อยู่บนยีน SoxS ได้ ดังรูปที่ 23

ทั้งนี้ รายงานการศึกษาแบคทีเรียแลคติกที่เกี่ยวข้องกับ OxyR และ SoxRS นี้ ได้เคยมีการศึกษาโดยอาศัยแบคทีเรียแลคติก *Enterococcus faecalis* (Ross and Caliborne, 1997) ซึ่งเป็นแบคทีเรียรูปร่างกลมชนิดหนึ่ง โดยพบยีนที่เป็น OxyR binding site เช่นเดียวกับที่พบในแบคทีเรีย *E. coli* ในบริเวณยีนส่วน upstream ของ promotor สำหรับเอนไซม์ NADH peroxidase (npr gene) ทั้งนี้ Ross และ Caliborne (1997) ได้แสดงให้เห็นว่า การแสดงออกของ OxyR regulon จากยีนของ *E. coli* นั้นสามารถเกิดได้กับยีนบริเวณ upstream ดังกล่าวของ *Enterococcus faecalis* ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า โปรตีนที่สร้างได้นั้น

สามารถเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้เช่นเดียวกับ โปรตีนจาก OxyR regulon ของ *E. coli* จึงเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียแลคติกอาจมีระบบยีนที่แสดงออกคล้ายคลึงกับระบบ OxyR regulon ก็เป็นไปได้ ทั้งนี้ได้มีการศึกษาในอีกแนวทางหนึ่ง ที่เกี่ยวกับการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์คะตาเลส (KatA) ซึ่งถูกพิสูจน์ว่า การเหนี่ยวนำการแสดงออกนั้นไม่ขึ้นกับ H_2O_2 ในภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีอากาศ (aerobic culture) โดยการทดสอบการนำส่งยีน KatA เข้าไปยังแบคทีเรียที่ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส คือ *Lactobacillus sakei* LTH677 และ *Lactobacillus curvatus* LTH4002 ซึ่งการทดสอบได้ชี้ให้เห็นว่ายีน KatA ที่นำส่งเข้าไปยัง *L. sakei* LTH677 นั้น จะถูกเหนี่ยวนำการแสดงออกได้จากการมีออกซิเจนในระบบ



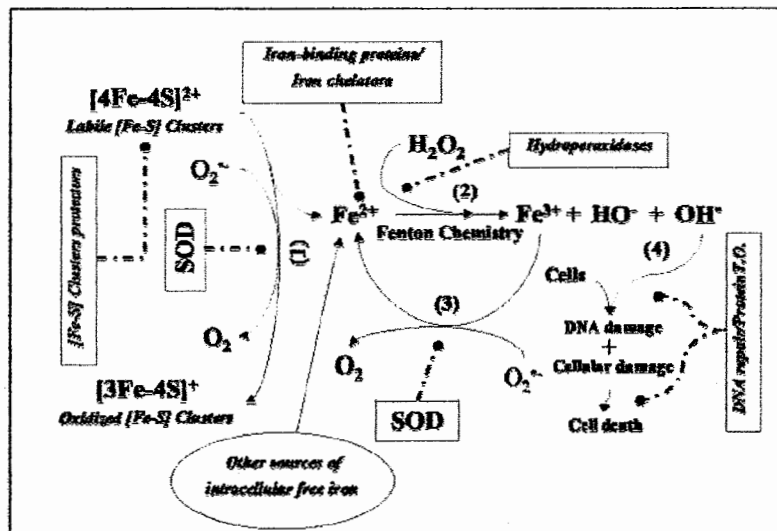
รูปที่ 23 แสดงการทำงานของ OxyR และ SoxRS regulon ในการตอบสนองภาวะเครียด

ออกซิเดชัน ของ *E. coli*

ทั้งนี้ ข้อสังเกตประการหนึ่ง คือ การแสดงออกของเอนไซม์คะตาเลสที่มากขึ้น จะพบได้จากภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีอากาศเท่านั้น ทำให้ได้ข้อสรุปว่า ภาวะการมีอากาศ เป็นปัจจัยที่เหนี่ยวนำให้ oxidative stress enzyme ต่างๆ มีการแสดงออก เช่น oxidase, peroxidase และ superoxide dismutase (Condon, 1987) ทั้งนี้จากการศึกษาข้างต้นได้แสดงให้เห็นถึง การเริ่มแสดงออกของยีน KatA ในการสร้างเอนไซม์คะตาเลส นั้น จะเกิดขึ้นเมื่อนำแบคทีเรียดังกล่าวจากการเพาะเลี้ยงในภาวะไร้อากาศ (anaerobic) มาสู่การเพาะเลี้ยงแบบมีอากาศ (aerobic) ฉะนั้น จากรายงานการศึกษาดังกล่าว ได้เป็นข้อสนับสนุน ภาวะการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกสำหรับการทดลองในครั้งนี้ ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงในภาวะที่มีอากาศเช่นกัน โดยแบคทีเรียแลคติกดังกล่าวถูกเหนี่ยวนำให้สร้าง oxidative stress enzyme แล้ว และได้มีการแสดงให้เห็นจากผลการทดลองโดยวิธี ABTS method และ FRAP method ความสามารถและคุณลักษณะของแบคทีเรียแลคติกในการต้านทานและป้องกันเซลล์จากพิษของ reactive oxygen species

(ROS) นั้น มีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแลคติกแต่ละสายพันธุ์ และนอกจากความเป็นไปได้ของการมีเอ็นที่ทำหน้าที่แบบเดียวกับ OxyR regulon ของ *E. coli* แล้ว ยังมีเอ็นอื่นๆ ที่แสดงความสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้ โดยจากการศึกษาของ Lin และ Chang (2000) ได้แสดงผลการศึกษา intact cells ของ *Lactobacillus acidophilus* ATCC4256 โดยสามารถขจัดสารอนุมูลอิสระ DPPH (α, α -Diphenyl- β -Picrylhydrazyl radical) ได้ นอกจากนี้จากการศึกษาของ Lin and Yen (1999) ได้พบความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus*, *L. bugarius*, *Streptococcus thermophilus* และแบคทีเรียแลคติกดังกล่าวยังสามารถขจัดสารอนุมูลอิสระ hydroxyl radical ($\text{HO}^\bullet$) ได้อีกด้วย ทั้งนี้ ผลการทดลองทั้งสองได้แสดงถึงความหลากหลายของระดับในการขจัด $\text{HO}^\bullet$ และการรีดิวซ์ Fe^{3+} ของแบคทีเรียแลคติกแต่ละ species โดยพบว่าสายพันธุ์ต่างๆ ของแบคทีเรียแลคติกที่ Lin และ Yen คัดเลือกมาทดสอบนั้น แม้เป็น species เดียวกัน แต่มีความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระและการรีดิวซ์ต่างกัน ทั้งนี้ การศึกษาภายในเซลล์นั้น สารที่มีคุณสมบัติ reductant ที่สามารถพบได้เช่น glutathione, thioredoxin, flavoenzymes, NAD(P)H-dependent enzyme, (Petrat and others, 2003) NADH, NADPH และ uric acid เป็นต้น (Halliwell and Gutteridge, 1989)

กลไกการดำเนินของปฏิกิริยาออกซิเดชัน การเกิดอนุมูลอิสระ และการมีอยู่ของสารบางชนิดที่สามารถส่งเสริมซึ่งกันและกันในการทำลายเซลล์นั้น เป็นปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกัน ดังตัวอย่าง ดังรูปที่ 24 จาก *E. coli*



รูปที่ 24 แสดงกลไกการต้านพิษออกซิเดชันของ SOD, hydroperoxidases, iron chelators, iron-binding proteins, การป้องกันการ[Fe-s] clusters และ/หรือ DNA และ cellular repair mechanism ซึ่งสามารถต้านพิษของ hydrogen peroxide ในการเหนี่ยวนำให้เกิด hydroxyl ได้

จากรูปที่ 24 แสดงให้เห็นถึงความเชื่อมโยงของกลไกต่างๆ ที่เป็นสาเหตุให้เซลล์เกิดพิษจากระบบเมแทบอลิซึมในภาวะที่มีออกซิเจน ทั้งนี้จะเห็นได้ คือ สารอนุมูลอิสระ ทั้ง O_2^- , $HO^\cdot$, H_2O_2 และ Ferric(Fe^{3+}), Ferrous(Fe^{2+}) ion มีกลไกที่เชื่อมโยงกันจนเกิดพิษต่อเซลล์โดยอาจกล่าวได้คือ การทำลายสารชีวโมเลกุลต่างๆ โดย hydrogen peroxide ซึ่งส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ ผลกระทบส่วนหนึ่งจะขึ้นอยู่กับเหล็กอิสระ (Fe^{2+}) ภายในเซลล์ที่มาจาก iron-sulfur cluster $[4Fe-4S]^{2+}$ จากการทำปฏิกิริยากับ superoxide radicals หรืออาจมาจากบริเวณอื่นของเซลล์ โดย ferrous ion จะทำปฏิกิริยากับ hydrogen peroxide เกิดเป็น hydroxyl radical ($HO^\cdot$) ซึ่งเป็น ROS มีพิษสูงมากยิ่งขึ้น จากปฏิกิริยา Fenton reaction ทั้งนี้ hydroxyl radical นั้น สามารถเกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่องหากมี Fe^{2+} หรืออาจมาจากการเกิดปฏิกิริยา reduction ของปฏิกิริยาระหว่าง Fe^{3+} และ O_2^- หรือเรียกว่าปฏิกิริยา Haber-Weiss ทั้งนี้ การเกิดปฏิกิริยา reduction ของ Fe^{3+} สามารถเกิดขึ้นได้จากสารที่มีคุณสมบัติ reductant อื่นๆภายในเซลล์ได้ดังที่กล่าวมาแล้ว ซึ่งโดยสรุปของกลวิธีเพื่อยับยั้งกลไกการเกิดพิษจากระบบเมแทบอลิซึมของออกซิเจน นั้นคือ

- 1) การกำจัด superoxide radical โดยเอนไซม์ SOD
- 2) การกำจัด hydrogen peroxide โดยเอนไซม์ hydroperoxidase เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา Fenton reaction
- 3) การเกิดตกตะกอน (chelation) เหล็กอิสระ โดย iron-chelator หรือ โปรตีนบางชนิด (DNA-binding protein) เช่น Dpr และ Dps จากแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ตามลำดับ เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา Fenton
- 4) การมี specific $[Fe-S]$ cluster protector เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาที่ 1 ดังรูปที่ 24 เช่น YggX ซึ่งพบใน *Salmonella enteritica* หรือ
- 5) การมีกลไกในการซ่อมแซม DNA และสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น exonucleaseIII, DNA polymerase, and RecA (DNA repair system), thioredoxin (protein repair system)

รูปที่ 18 ได้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของ Fe^{3+} และ Fe^{2+} ในการนำไปสู่การเกิดพิษต่อเซลล์ ซึ่งแผนภาพได้บ่งชี้ถึงกลไกของเซลล์ในการควบคุมทั้งปฏิกิริยา Fenton และ Haber-Weiss แต่อย่างไรก็ตาม การทดลองในครั้งนี้ได้เลือกการศึกษาการเกิดปฏิกิริยารีดิวซ์ Fe^{3+} เพื่อเป็นแนวทางเบื้องต้น สำหรับการศึกษาด้านออกซิเดชันของแบคทีเรียแลคติก โดยอาจสามารถอธิบายผลการทดลองที่เกิดขึ้นได้คือ กลไกการป้องกันพิษของการเกิดออกซิเดชันนั้น เป็นการทำงานร่วมกันของสารต่างๆ เช่น สารที่มีคุณสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ และ เอนไซม์ต่างๆ ทั้งนี้ โดยทั่วไปคุณสมบัติของเอนไซม์ มักมีกิจกรรมกับ substrate อย่างจำเพาะเจาะจง และจาก FRAP method นั้น กลไกของปฏิกิริยาได้อาศัยปฏิกิริยารีดิวซ์ Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} และจากรูปที่ 24 แสดงให้เห็นถึงความเกี่ยวข้องจากทั้ง ferric และ ferrous ion ภายในเซลล์ ซึ่งสารภายในเซลล์ที่สามารถเข้ามาดำเนินการรีดิวซ์ได้นั้น มีทั้งระบบเอนไซม์และสาร reductant ต่างๆ

ในขณะที่โดยวิธี ABTS นั้น อาศัยการแสดงผลการทดลองโดยกลไกการจับอนุมูลอิสระ $ABTS^+$ ซึ่งสาร reductant น่าจะสามารถเกิดการจับ $ABTS^+$ ได้เช่นกัน ทั้งนี้ แม้ว่าสารที่เป็น reductant พบได้จากเซลล์และน่าจะสามารถเกิดปฏิกิริยาการจับ $ABTS^+$ ในการทดลองครั้งนี้ได้ แต่อย่างไรก็ตามในระบบเอนไซม์นั้น การเกิดปฏิกิริยากับ $ABTS^+$ นั้นอาจลดประสิทธิภาพลงเนื่องจากการขาดความจำเพาะเจาะจงจึงทำให้แนวโน้มผลการทดลองจากวิธี ABTS นั้น แสดงผลเฉพาะ intact cell ในขณะที่กลไกภายในเซลล์นั้น มีสารอนุมูลอิสระเกิดขึ้นหลายชนิดและเซลล์มีการจัดการป้องกันเซลล์จากพิษที่เกิดขึ้นโดยกลไกและสารที่ต่างกันในแต่ละปฏิกิริยาซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเป็นความจำเพาะเจาะจง นอกจากนี้ยังได้มีรายงานการศึกษาพบคุณสมบัติการมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจาก exopolysaccharide ของจุลินทรีย์บางชนิด (Sun and others, 2004; 2005) ซึ่งจุลินทรีย์สามารถสร้างและปล่อยออกมานอกเซลล์ได้ และ NADH oxidase [NADH: (oxygen acceptor) oxidoreductase, EC1.6.99] เป็น flavoprotein ชนิดหนึ่งที่มีรายงานการพบในแบคทีเรียแลคติกหลายชนิด ทั้งนี้ ภาวะที่มีออกซิเจนสามารถเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียแลคติกสร้างเอนไซม์นี้ ซึ่งปฏิกิริยาทั่วไปคือ การทำปฏิกิริยากับออกซิเจน เกิดเป็นน้ำหรือ hydrogen peroxide และ NAD^+ (Salminen and others, 2004; Higuchi and others, 2000) ซึ่ง hydrogen peroxide ที่เกิดขึ้นจะถูกทำให้กลายเป็นน้ำโดยเอนไซม์ NADH peroxidase (EC1.11.1.1) ทั้งนี้ NADH oxidase สามารถพบเอนไซม์นี้ได้จาก *Streptococcus (Enterococcus) faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus plantarum* และ *Leuconostoc mesenteroides*. (Hoskin and others, 1962; Schmidt and others, 1986; Higuchi and others, 1993; Fukui, 1961; Kawai and others, 1971; Koike and others, 1985) นอกจากนี้ Sakamoto และ Komagata (1996) ได้รายงานถึงการพบ NADH oxidase และ NADH peroxidase จากแบคทีเรียแลคติกหลายชนิดเช่นกัน เช่น *L. plantarum*, *L. casei subsp. casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium* เป็นต้น

นอกจากกลไกจากสาร reductant ของแบคทีเรียแลคติกดังกล่าวข้างต้นแล้ว จากรูปที่ 16 ยังได้แสดงให้เห็นถึงเอนไซม์ที่มีบทบาทในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ นั่นคือ SOD (Superoxide dismutase) โดยมีตัวอย่างผลการศึกษาจาก *Lactobacillus plantarum* โดยมีลักษณะของการไม่ใช้ระบบของเอนไซม์ต่างๆ คือ catalase, SOD, peroxidase (Gregory and Fridovich, 1974) เพื่อป้องกันพิษของ ROS แต่พบว่ามีการสะสมแมงกานีส (Mn^{2+}) ไว้ภายในเซลล์ในปริมาณมากและมีบทบาทในการกำจัดอนุมูลอิสระ superoxide anion (O_2^-) ภายในเซลล์ได้ (Archibald and Fridovich, 1981) ทั้งนี้ Archibald และ Fridovich (1981) ได้รายงานการเปรียบเทียบทางสรีรวิทยาของ *E. coli* และ *L. plantarum* ซึ่งพบว่าในภาวะการเจริญที่มีออกซิเจนนั้น แบคทีเรีย *E. coli* จะมีเอนไซม์ SOD อยู่ในเซลล์ โดยเอนไซม์นี้มีคุณสมบัติ heat labile ไม่ว่องไวในการทำปฏิกิริยากับ EDTA ในขณะที่ภายในเซลล์ของ *L. plantarum* นั้น ไม่มี SOD แต่จะพบ Mn^{2+} แต่มีคุณสมบัติ heat stable สามารถถูกยับยั้งได้ด้วย EDTA นอกจากนี้จากการศึกษาของ Bruno-Bárcena และคณะ (2004) โดยใช้ substrate เป็น hydrogen peroxide นั้น ได้

แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ SOD จากแบคทีเรียแลกติก ในการป้องกันเซลล์จากพิษของ hydrogen peroxide ได้ จึงแสดงให้เห็นว่า SOD นั้นสามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้ง hydrogen peroxide และ superoxide และในขณะเดียวกัน Gregory and Fridovich (1974) ได้รายงานไว้ว่า *L. plantarum* นั้นไม่รีดิวซ์ โมเลกุลของ dioxygen กระทั่งถึง การไม่เกิด superoxide radical และ hydrogen peroxide ในภาวะการเจริญปกติ ที่จำกัดออกซิเจนของแบคทีเรียแลกติกอีกด้วย

ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า ปัจจัยที่กระทบต่อการมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำถั่วเหลืองหมัก คือ isoflavones polyphenol และแบคทีเรียแลกติกซึ่งเดิมเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น

5. การทดสอบการยอมรับโดยวิธีทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองหมัก

- Soybean Broth (SB) = ผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก
- Fermented Soybean Broth (FSB) = ผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองหมัก

ตารางที่ 16 แสดงคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมักที่ทำการทดสอบ

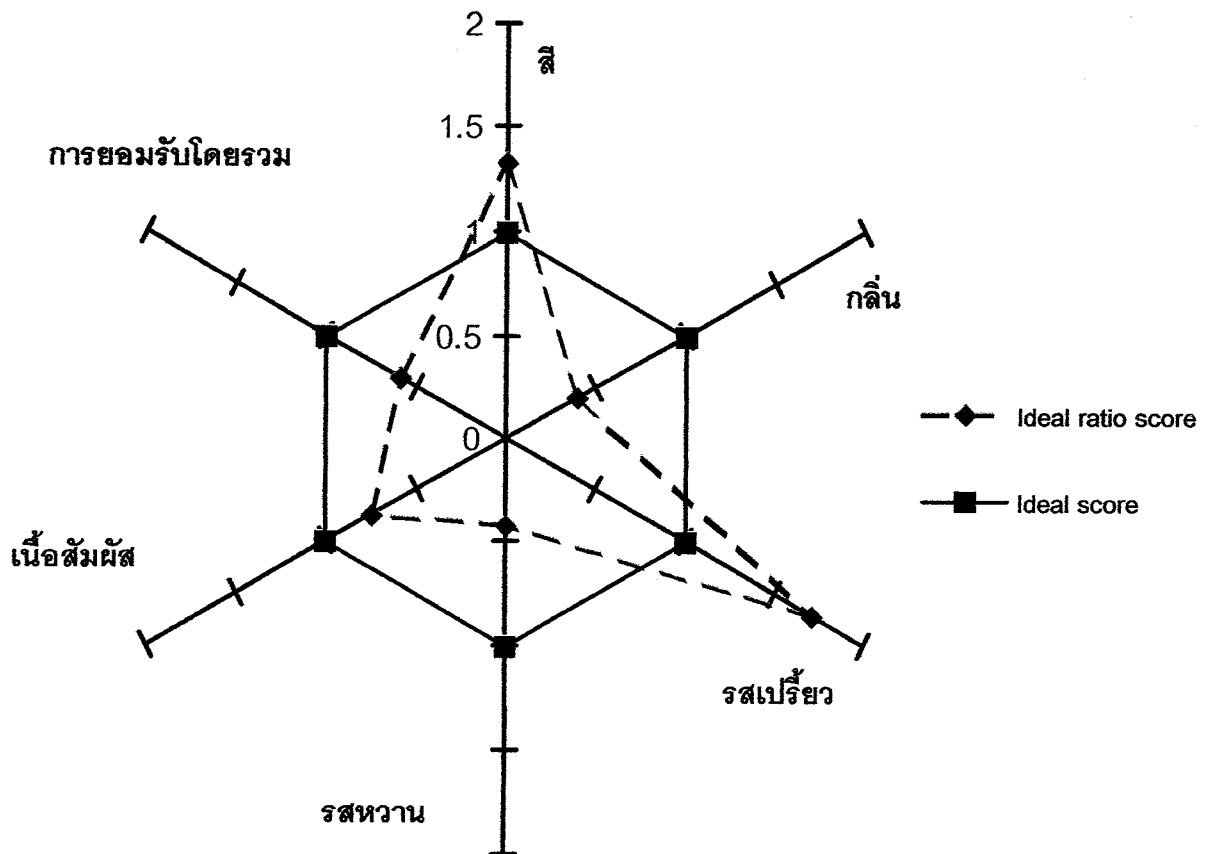
ลำดับที่	คุณลักษณะ
1	สี
2	กลิ่น
3	รสเปรี้ยว
4	รสหวาน
5	เนื้อสัมผัส
6	การยอมรับโดยรวม

ตารางที่ 17 แสดงค่า Sample score (S) และ Ideal score (I) ของผลิตภัณฑ์น้ำฉ่ำเหลืองในคุณลักษณะต่างๆ

ผู้ทดสอบ คนที่	สี		กลิ่น		รสเปรี้ยว		รสหวาน		เนื้อสัมผัส		การยอมรับ โดยรวม	
	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I
1	1.5	1.1	2.3	5.6	6.8	3.3	3.0	4.7	5.7	8.6	2.1	8.4
2	2.5	6.7	2.6	5.4	7.2	5.4	1.2	5.6	4.5	5.6	3.6	5.6
3	2.4	3.4	3.1	9.3	6.7	3.7	2.5	6.7	3.9	8.3	2.8	3.0
4	4.2	4.3	1.1	5.4	9.3	4.1	3.6	5.9	5.9	6.9	4.6	5.8
5	2.9	4.4	4.3	6.6	4.6	2.1	1.7	6.4	6.7	7.7	5.8	5.9
6	7.5	7.5	3.6	4.7	5.2	3.3	2.0	7.8	2.3	6.3	1.3	6.6
7	5.6	5.0	2.0	7.2	4.6	3.4	1.7	6.5	4.6	8.7	6.7	9.9
8	6.6	7.0	1.9	3.9	8.7	6.6	3.2	5.3	5.3	5.9	4.7	6.8
9	7.6	2.4	3.3	7.3	8.3	5.2	3.8	4.9	8.6	8.6	2.3	7.6
10	4.3	3.0	1.4	9.5	7.1	4.7	1.5	7.9	5.2	8.8	2.6	6.4
11	6.7	1.6	1.6	6.8	6.2	5.3	3.6	6.9	6.3	9.1	5.1	6.7
12	6.0	4.9	2.5	5.7	6.2	4.9	1.7	7.7	6.2	5.6	1.1	5.5
13	4.6	4.6	2.9	6.1	8.2	3.2	4.5	8.3	5.7	7.4	3.7	6.9
14	3.2	3.8	1.8	6.3	5.5	2.6	2.3	9.1	3.4	5.7	4.8	5.7
15	2.4	2.9	2.6	7.8	4.3	2.7	2.0	6.5	7.2	6.9	3.8	6.7
16	4.4	3.3	3.4	8.1	6.9	3.3	3.1	4.6	4.3	5.7	6.3	8.8
17	3.2	3.7	2.0	6.7	7.8	6.4	2.4	8.2	4.0	6.9	7.1	7.2
18	5.6	3.4	3.1	7.4	6.8	3.9	2.6	6.6	5.7	8.2	2.8	7.6
19	4.2	2.4	3.9	7.9	9.9	5.2	3.2	4.1	6.9	7.0	2.0	5.9
20	3.4	3.1	3.7	8.5	5.4	3.7	1.4	6.2	4.6	8.3	3.4	6.1
ค่าเฉลี่ย	4.4	3.9	2.7	6.8	6.8	4.1	2.6	6.5	5.4	7.3	3.8	6.7

ตารางที่ 18 แสดงค่า Ideal ratio score ของผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองหมักในคุณลักษณะต่างๆ

ผู้ทดสอบคน ที่	สี	กลิ่น	รสเปรี้ยว	รสหวาน	เนื้อสัมผัส	การยอมรับ โดยรวม
1	1.36	0.41	2.06	0.64	0.66	0.25
2	0.37	0.48	1.33	0.21	0.80	0.64
3	0.71	0.33	1.81	0.37	0.47	0.93
4	0.98	0.20	2.27	0.61	0.86	0.79
5	0.66	0.65	2.19	0.27	0.87	0.98
6	1.00	0.77	1.58	0.26	0.37	0.20
7	1.12	0.28	1.35	0.26	0.53	0.68
8	0.94	0.49	1.32	0.60	0.90	0.69
9	3.17	0.45	1.60	0.78	1.00	0.30
10	1.43	0.15	1.51	0.19	0.59	0.41
11	4.19	0.24	1.17	0.52	0.69	0.76
12	1.22	0.44	1.27	0.22	1.11	0.20
13	1.00	0.48	2.56	0.54	0.77	0.54
14	0.84	0.29	2.12	0.25	0.60	0.84
15	0.83	0.33	1.59	0.31	1.04	0.57
16	1.33	0.42	2.09	0.67	0.75	0.72
17	0.86	0.30	1.22	0.29	0.58	0.99
18	1.65	0.42	1.74	0.39	0.70	0.37
19	1.75	0.49	1.90	0.78	0.99	0.34
20	1.10	0.44	1.46	0.23	0.55	0.56
ค่าเฉลี่ย	1.33	0.40	1.71	0.42	0.74	0.59
SD	0.89	0.15	0.40	0.20	0.20	0.26



รูปที่ 25 แสดง Ratio Profile Test (RPT) ของน้ำฉั่วเหลือง

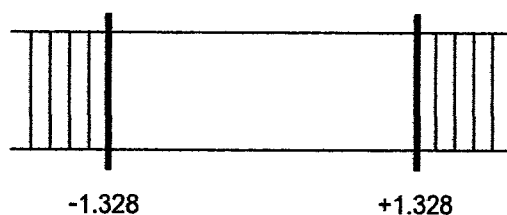
ตารางที่ 19 แสดงค่าทางสถิติโดยใช้วิธี t-test ของผลิตภัณฑ์น้ำฉั่วเหลือง

ค่าทดสอบ	คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์น้ำฉั่วเหลือง					
	รส	กลิ่น	รสเปรี้ยว	รสหวาน	เนื้อสัมผัส	การยอมรับโดยรวม
S/I (เฉลี่ย)	1.33	0.40	1.71	0.42	0.74	0.59
SD	0.89	0.15	0.40	0.20	0.20	0.26
t-value	1.658	-17.647	7.978	-13.182	-5.909	-7.057

$$df = 19 \text{ (df = n-1)}$$

$$\alpha = 0.200 \text{ (}\alpha = \text{level of significance)}$$

$$t_{\text{table}} = \pm 1.328$$



รูปที่ 26 แสดง Critical areas ของการทดสอบ t-test ในการทำ Ratio profile test ของผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลือง

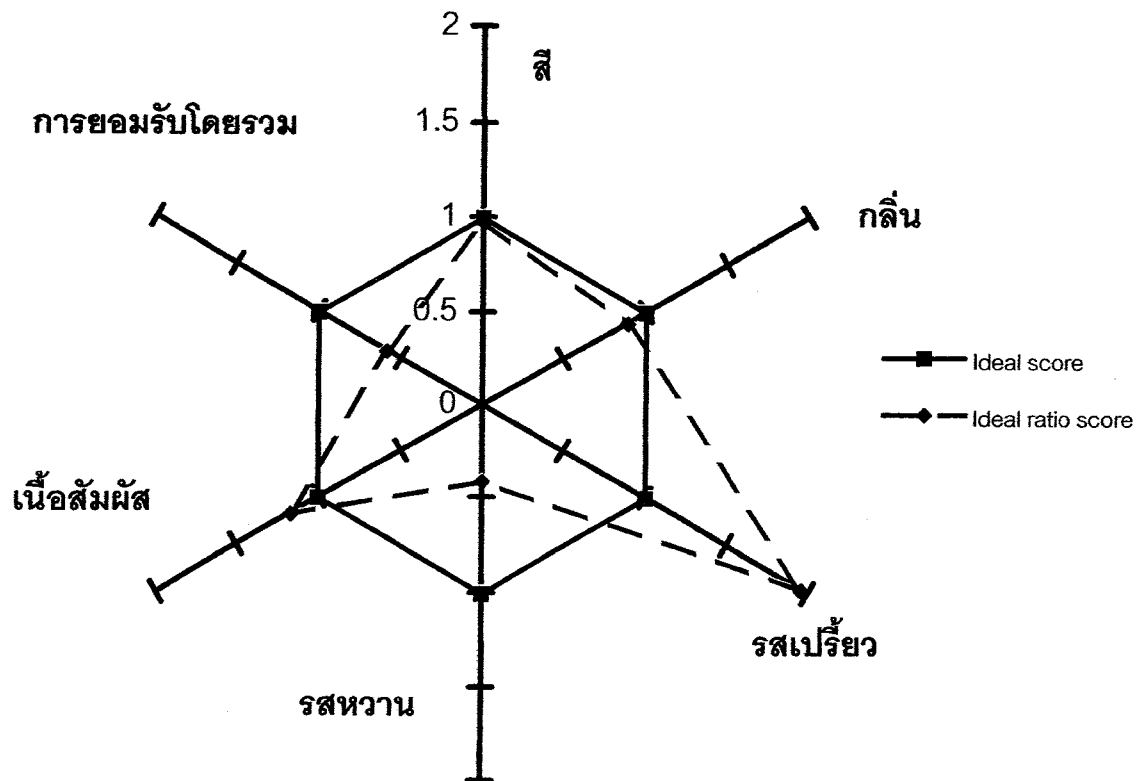
จากผลการทดสอบการยอมรับโดยการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลือง โดยใช้วิธี Ratio profile test (RPT) พบว่า คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ประกอบไปด้วย สี และรสชาติ เปรี้ยวมีค่า Ideal ratio score (S/I) เฉลี่ยสูงกว่า 1 ซึ่งหมายความว่าคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ทั้งสองมีค่าที่สูงกว่าคุณลักษณะในอุดมคติของผู้บริโภค ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการลดระดับคุณลักษณะดังกล่าวลงมา ส่วนคุณลักษณะอื่นๆของผลิตภัณฑ์คือ กลิ่น รสชาติหวาน เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวมนั้นมีค่า Ideal ratio score (S/I) เฉลี่ยต่ำกว่า 1 ซึ่งหมายความว่าคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ทั้งสองมีค่าที่ต่ำกว่าคุณลักษณะในอุดมคติของผู้บริโภค ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเพิ่มระดับคุณลักษณะดังกล่าวขึ้นไป จากนั้นเมื่อนำผลการศึกษาที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Ideal ratio score (S/I) และ ค่า Ideal score แล้วพบว่าคุณลักษณะที่ทำการทดสอบในผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองยังมีค่าการยอมรับที่ต่างจากค่าในอุดมคติของผู้ทดสอบอยู่ค่อนข้างสูงซึ่งยืนยันโดยการทดสอบทางสถิติโดยใช้วิธี t-test (two-tails) ซึ่งพบว่าค่า t-value ในทุกๆคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วงที่ไม่ยอมรับทั้งหมด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการหมักนี้ เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่เป็นที่ต้องการในอาหาร ดังนั้นจึงทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น แล้วทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นมีลักษณะที่ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค และผลที่ได้จากการทดสอบในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองนี้จำเป็นเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการพัฒนาปรับปรุงคุณภาพในด้านการยอมรับต่อไป

ตารางที่ 20 แสดงค่า Sample score (S) และ Ideal score (I) ของผลิตภัณฑ์น้ำอ้วเหลืองหมักใน
คุณลักษณะต่างๆ

ผู้ ทดสอบ คนที่	สี		กลิ่น		รสเปรี้ยว		รสหวาน		เนื้อสัมผัส		การยอมรับ โดยรวม	
	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I
1	2.5	4.3	5.3	6.9	9.8	4.4	3.3	8.6	5.6	3.6	3.7	5.8
2	5.9	9.6	3.4	4.5	8.6	5.6	1.2	7.4	6.3	4.6	4.8	5.9
3	4.2	4.5	6.4	7.2	7.4	3.6	4.3	6.9	4.7	5.2	3.8	6.6
4	2.1	6.8	7.4	6.9	6.8	5.8	3.6	9.0	5.4	3.8	6.3	9.9
5	7.3	4.3	6.3	8.6	8.2	6.7	3.5	7.6	4.6	9.6	7.1	6.8
6	5.5	7.8	4.2	7.5	7.9	4.3	4.1	8.1	2.6	7.1	2.8	7.6
7	6.8	6.3	5.8	6.3	6.8	2.6	3.1	4.9	6.4	2.5	2.0	6.4
8	4.1	6.1	7.6	7.8	7.4	5.4	3.3	9.8	4.2	6.7	3.4	6.7
9	3.8	4.1	6.9	8.2	6.3	4.4	2.1	7.6	8.2	7.3	4.6	5.5
10	7.6	2.8	7.2	9.2	4.7	2.2	1.0	9.0	2.3	2.6	5.8	6.9
11	3.3	3.9	6.4	5.8	7.9	3.9	1.9	8.7	3.6	6.4	1.3	5.7
12	5.6	8.7	5.8	3.4	6.9	4.2	3.8	4.7	4.1	4.8	6.7	6.7
13	5.7	5.7	7.3	8.7	9.5	1.9	1.5	8.5	5.7	7.1	4.7	8.8
14	4.9	4.9	4.7	6.7	7.8	3.7	4.1	6.3	6.8	3.3	2.3	9.9
15	9.6	5.6	6.9	7.3	6.8	4.2	4.0	5.7	2.6	5.7	2.6	6.8
16	4.7	4.3	3.4	4.7	8.0	5.9	2.3	6.8	3.3	4.2	5.1	7.6
17	2.6	3.3	2.5	5.5	9.9	3.4	2.7	9.0	3.7	2.6	1.1	6.4
18	3.6	5.4	6.4	6.3	7.6	6.6	3.1	8.7	4.9	8.9	4.5	6.7
19	4.2	5.7	7.2	8.2	6.7	4.2	3.5	6.4	6.8	4.7	6.3	5.5
20	5.8	6.8	5.9	4.8	8.2	3.9	1.9	6.2	7.1	2.3	2.2	6.9
ค่าเฉลี่ย	4.9	5.5	5.9	6.7	7.7	4.3	2.9	7.5	4.9	5.1	4.1	6.9

ตารางที่ 21 แสดงค่า Ideal ratio score ของผลิตภัณฑ์น้ำแก้วเหลืองหมักในคุณลักษณะต่างๆ

ผู้ทดสอบ คนที่	สี	กลิ่น	รสเปรี้ยว	รสหวาน	เนื้อสัมผัส	การยอมรับ โดยรวม
1	0.58	0.77	2.23	0.38	1.56	0.64
2	0.61	0.76	1.54	0.16	1.37	0.81
3	0.93	0.89	2.06	0.62	0.90	0.58
4	0.31	1.07	1.17	0.40	1.42	0.64
5	1.70	0.73	1.22	0.46	0.48	1.04
6	0.71	0.56	1.84	0.51	0.37	0.37
7	1.08	0.92	2.62	0.63	2.56	0.31
8	0.67	0.97	1.37	0.34	0.63	0.51
9	0.93	0.84	1.43	0.28	1.12	0.84
10	2.71	0.78	2.14	0.11	0.88	0.84
11	0.85	1.10	2.03	0.22	0.56	0.23
12	0.64	1.71	1.64	0.81	0.85	1.00
13	1.00	0.84	5.00	0.18	0.80	0.53
14	1.00	0.70	2.11	0.65	2.06	0.23
15	1.71	0.95	1.62	0.70	0.46	0.38
16	1.09	0.72	1.36	0.34	0.79	0.67
17	0.79	0.45	2.91	0.30	1.42	0.17
18	0.67	1.02	1.15	0.36	0.55	0.67
19	0.74	0.88	1.60	0.55	1.45	1.15
20	0.85	1.23	2.10	0.31	3.09	0.32
ค่าเฉลี่ย	0.98	0.89	1.96	0.41	1.17	0.59
SD	0.53	0.26	0.86	0.20	0.73	0.29



รูปที่ 27 แสดง Ratio Profile Test (RPT) ของน้ำฉ่ำเหืองหมัก

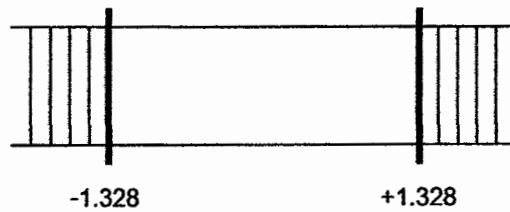
ตารางที่ 22 แสดงค่าทางสถิติโดยใช้วิธี t-test ของผลิตภัณฑ์น้ำฉ่ำเหืองหมัก

ค่าทดสอบ	คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์น้ำฉ่ำเหืองหมัก					
	สี	กลิ่น	รสเปรี้ยว	รสหวาน	เนื้อสัมผัส	การยอมรับโดยรวม
S/I (เฉลี่ย)	0.98	0.89	1.96	0.41	1.17	0.59
SD	0.53	0.26	0.86	0.20	0.73	0.29
t-value	-0.168	-1.893	5.000	-13.111	1.042	-6.307

$$df = 19 \text{ (} df = n-1 \text{)}$$

$$\alpha = 0.200 \text{ (} \alpha = \text{level of significance)}$$

$$t_{\text{table}} = \pm 1.328$$



รูปที่ 28 แสดง Critical areas ของการทดสอบ t-test ในการทำ Ratio profile test ของผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองหมัก

จากผลการทดสอบการยอมรับโดยการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองหมัก โดยใช้วิธี Ratio profile test (RPT) พบว่า คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ประกอบไปด้วย รสชาติเปรี้ยว มีค่า Ideal ratio score (S/I) เฉลี่ยสูงกว่า 1 ซึ่งหมายความว่าคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองหมักมีค่าที่สูงกว่าคุณลักษณะในอุดมคติของผู้บริโภค ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการลดระดับคุณลักษณะดังกล่าวลงมา ส่วนลักษณะเนื้อสัมผัสนั้นมีค่า Ideal ratio score (S/I) เฉลี่ยใกล้เคียง 1 ซึ่ง ซึ่งหมายความว่า คุณลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองหมักมีค่าคุณลักษณะอยู่ในอุดมคติของผู้บริโภคแล้วจึง อาจไม่ต้องปรับปรุงในเรื่องของคุณลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองหมัก ส่วนคุณลักษณะอื่นๆของผลิตภัณฑ์คือ สี กลิ่น รสชาติหวาน และการยอมรับโดยรวมนั้นมีค่า Ideal ratio score (S/I) เฉลี่ยต่ำกว่า 1 ซึ่งหมายความว่าคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ทั้งสองมีค่าที่ต่ำกว่าคุณลักษณะในอุดมคติของผู้บริโภค ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเพิ่มระดับคุณลักษณะดังกล่าวขึ้นไป จากนั้นเมื่อนำผลการศึกษาที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Ideal ratio score (S/I) และ ค่า Ideal score แล้วพบว่า คุณลักษณะที่ทำการทดสอบในผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองยังมีค่าการยอมรับที่ต่างจากค่าในอุดมคติของผู้ทดสอบอยู่ค่อนข้างสูงซึ่งยืนยันโดยการทดสอบทางสถิติโดยใช้วิธี t-test (two-tails) ซึ่งพบว่าค่า t-value ในทุกๆคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วงที่ไม่ยอมรับทั้งหมด ผลที่ได้จากการทดสอบในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองหมักนี้จำเป็นต้องมีการพัฒนาปรับปรุงคุณภาพในด้านการยอมรับต่อไป