

การเปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพของสารสกัดจากถั่วเหลือง
และถั่วเหลืองหมัก

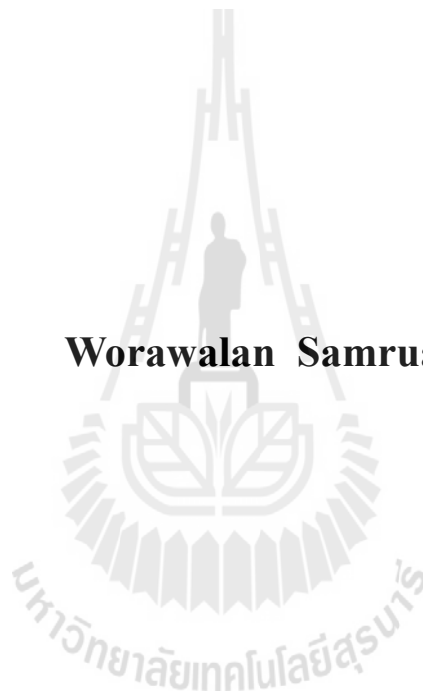


นางสาววรวัลย์ ส้ารวล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2557

**COMPARISONS OF CHEMICAL AND BIOLOGICAL
PROPERTIES OF SOYBEAN AND FERMENTED
SOYBEAN EXTRACTS**

Worawalan Samruan



**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Food Technology
Suranaree University of Technology
Academic Year 2014**

การเปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพของสารสกัดจากถั่วเหลืองและ
ถั่วเหลืองหมัก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็น ส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(รศ. ดร.จิรวัดน์ ขงสวัสดิกุล)

ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร.รัชฎาพร อุ่นศิริไธย์)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(ผศ. ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก)

กรรมการ

(ผศ. ดร.ศิวัม ไทอุดม)

กรรมการ

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิมปิจำนงค์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและนวัตกรรม

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

วรวัลย์ ส้ารวล : การเปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพของสารสกัดจาก
ถั่วเหลืองและถั่วเหลืองหมัก (COMPARISONS OF CHEMICAL AND BIOLOGICAL
PROPERTIES OF SOYBEAN AND FERMENTED SOYBEAN EXTRACTS)

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชฎาพร อุ่นศิริไพลย์, 98 หน้า.

งานวิจัยนี้เพื่อศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพของสารสกัดจากถั่วเหลืองและถั่วเหลืองที่หมักด้วย *Bacillus subtilis* SB-MYP-1 โดยใช้เอทานอลและน้ำ รวมถึงการศึกษาผลของสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมักต่อการสร้างกระดูกโดยใช้เซลล์ไลน์ MC3T3-E1 คุณสมบัติทางเคมีที่ศึกษา ได้แก่ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ ไอโซฟลาโวน ได้แก่ เดิสดิซีนและเจนิสติน ไทอามีนและไรโบฟลาวิน รวมทั้งปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมัก ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดถั่วเหลืองหมักเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ เดิสดิซีน และเจนิสตินสูงสุดตามด้วยสารสกัดถั่วเหลืองเอทานอล สารสกัดถั่วเหลืองหมักน้ำ และสารสกัดถั่วเหลืองน้ำ ตามลำดับ สารสกัดถั่วเหลืองหมักเอทานอล ประกอบด้วย สารประกอบฟีนอลิก 35.02 มิลลิกรัมกาทิก/กรัม-สารสกัด ฟลาโวนอยด์ 14.02 มิลลิกรัมแคทีชิน/กรัมสารสกัด เดิสดิซีน 896.86 มิลลิกรัม/100 กรัมสารสกัด และเจนิสติน 1,641.61 มิลลิกรัม/100 กรัมสารสกัด ประสิทธิภาพของตัวทำละลายที่นำมาใช้สกัดพบว่าเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ดีกว่าน้ำในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ เดิสดิซีน และเจนิสติน และพบว่าสารสกัดถั่วเหลืองหมักเอทานอลมีปริมาณไทอามีน ไรโบฟลาวิน และกรดอะมิโนทั้งหมดสูงสุด

ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมัก เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox และวิตามินซี พบว่าการสกัดด้วยเอทานอลให้สารสกัดที่มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระมากกว่าการสกัดด้วยน้ำ สารสกัดถั่วเหลืองหมักเอทานอล เมื่อทดสอบโดย DPPH assay มีค่า IC_{50} 18.45 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ABTS assay มีค่า IC_{50} 4.52 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ FRAP assay มีค่า 0.258 มิลลิโมล Fe^{2+} /กรัมสารสกัด ซึ่งสูงกว่าสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก และสุดท้ายเมื่อเปรียบเทียบผลของสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมักต่อการเจริญของเซลล์สร้างกระดูก โดยใช้อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นตัวบ่งชี้ในการทดสอบกับเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 พบว่าสารสกัดถั่วเหลืองหมักเอทานอลส่งเสริมการเจริญของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 สูงสุด และมีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงสุด ซึ่งคิดเป็น 135.61 เปอร์เซ็นต์

กล่าวโดยสรุปสารสกัดถั่วเหลืองหมักเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์
เคอสิซิน เจนิสทิน ไทอามีน ไรโบฟลาวิน และกรดอะมิโนทั้งหมดสูงสุด มีความสามารถในการต้าน
อนุมูลอิสระสูงสุด รวมทั้งมีผลต่อการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส



สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

WORAWALAN SAMRUAN : COMPARISONS OF CHEMICAL AND
BIOLOGICAL PROPERTIES OF SOYBEAN AND FERMENTED
SOYBEAN EXTRACTS. THESIS ADVISOR : ASST. PROF.
RATCHADAPORN OONSIVILAI, Ph.D., 98 PP.

FERMENTED SOYBEAN EXTRACT/BIOLOGICAL PROPERTIES/CHEMICAL
PROPERTIES/PROLIFERATION/ALKALINE PHOSPHATASE

Comparisons of chemical and biological properties of soybean (SB) and fermented soybean (FSB) extracts with *Bacillus subtilis* SB-MYP-1 using ethanol and water were studied. In addition, the effect of SB and FSB extracts on bone formation with MC3T3-E1 cells was investigated. The chemical properties such as total phenolics, flavonoids, and isoflavone such as daidzein and genistein, thiamine, and riboflavin including total amino acid content, and the antioxidant activities of SB and FSB extracts were studied. The results showed that the fermented soybean ethanol extract (FSBE) contained the highest level of total phenolics, flavonoids, daidzein, and genistein, following the soybean ethanol extract (SBE), the fermented soybean water extract (FSBW), and the soybean water extract (SBW), respectively. The FSBE composed of total phenolics content of 35.02 mg gallic acid equivalent/g extract, flavonoids content of 14.02 mg catechin equivalent/g extract, daidzein content of 896.86 mg/100 g extract, and genistein contents of 1,641.61 mg/100 g extract. For solvent effectiveness, ethanol gave the higher content of total phenolics, flavonoids, daidzein, and genistein than water. Moreover, the FSBE showed the highest thiamine, riboflavin, and total amino acids contents.

Regarding the antioxidant activity of SB and FSB extracts when compared with the commercial standard such as trolox and ascorbic acid, the results showed that ethanol extraction induced higher antioxidant activity than water extraction. The antioxidant activity of FSBE determined by DPPH assay showed IC_{50} at 18.45 mg/ml, ABTS assay with IC_{50} 4.52 mg/ml, and FRAP assay at 0.258 mmol Fe^{2+} /mg extract, which is higher antioxidant activity than SBE. Finally, comparing the effect of SB and FSB extracts on bone formation using alkaline phosphatase as a marker in MC3T3-E1 cells, showed that the FSBE promoted the highest proliferation of MC3T3-E1 cells and increased alkaline phosphatase activity by 135.61 per cent.

In conclusion, the FSBE contains the highest content of total phenolics, flavonoids, daidzein, genistein, thiamine, riboflavin, and total amino acid with contributing to the highest antioxidant activities and increasing alkaline phosphatase activity.

School of Food Technology

Academic Year 2014

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลืออย่างยิ่ง ทั้งด้านวิชาการและด้านการดำเนินงานวิจัย จากบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ได้แก่

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชฎาพร อุ่ณศิริไฉย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษา ช่วยแก้ปัญหา และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด รวมทั้งช่วยตรวจทาน และแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัดน์ ขงสวัสดิกุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวัม ไทยอุดม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไข วิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน ที่ให้ความรู้ด้านวิชาการ ตลอดระยะเวลาที่ศึกษาอยู่ที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือ 3 และศูนย์เครื่องมือ 1 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทุกท่านที่ตลอดเวลาให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ ที่ร่วมเรียนระดับบัณฑิตศึกษา และผู้ช่วยวิจัยสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหารที่ให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา

ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาและทุกคนในครอบครัวที่ให้การเลี้ยงดู อบรมให้กำลังใจและส่งเสริมการศึกษาอย่างดีตลอดมา

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับบิดา มารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัยตลอดมา จนทำให้ประสบความสำเร็จในชีวิต

วรวัลย์ ส้ารวล

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฐ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 สมมติฐานการวิจัย.....	3
1.4 ขอบเขตการวิจัย.....	4
1.5 วิธีดำเนินการวิจัย.....	4
1.6 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
2 ปรัชญาวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 ถั่วเหลือง.....	6
2.1.1 ถั่วเหลืองหมัก.....	10
2.1.2 บาซิลลัส ซับติลิส.....	11
2.2 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลือง.....	12
2.2.1 ไอโซฟลาโวน.....	13
2.3 คุณสมบัติทางเคมีของถั่วเหลือง.....	15
2.3.1 คุณสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชัน.....	15
2.3.2 อนุมูลอิสระ.....	16
2.3.3 วิธีการตรวจสอบความสามารถในการเป็นตัวต้านออกซิเดชัน.....	17

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3.3.1 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay	18
2.3.3.2 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical-scavenging assay	19
2.3.3.3 Ferric reducing antioxidant power	20
2.3.4 คุณสมบัติทางเคมีของถั่วเหลืองกับการป้องกันโรค	20
2.3.4.1 ถั่วเหลืองกับโรคไต	21
2.3.4.2 ถั่วเหลืองกับโรคเบาหวานและอ้วน	21
2.3.4.3 ถั่วเหลืองกับโรคหลอดเลือดและหัวใจ	21
2.3.4.4 ถั่วเหลืองกับโรคมะเร็ง	22
2.3.4.5 ถั่วเหลืองกับอาการของวัยหมดประจำเดือน	23
2.3.4.6 ถั่วเหลืองกับโรคกระดูกพรุน	23
2.4 วัยหมดประจำเดือน	24
2.4.1 โรคกระดูกพรุน	25
2.4.2 การรักษาโรคกระดูกพรุนในสตรีวัยหมดประจำเดือน	29
2.5 การทดสอบสารทางชีวเคมีของการสร้างกระดูก	30
2.6 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดถั่วเหลืองและถั่วเหลืองหมัก	34
2.6.1 IC ₅₀ (half maximal "Inhibitory Concentration")	35
2.6.2 EC ₅₀ (half maximal "Effective Concentration")	36
2.6.3 LC ₅₀ (Median Lethal Concentration)	36
3 วิธีดำเนินการวิจัย	37
3.1 วัสดุอุปกรณ์	37
3.1.1 การหมักถั่วเหลือง	37
3.1.2 การสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมัก	37
3.1.3 การวิเคราะห์ประมาณของฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์และความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	38
3.1.4 การวิเคราะห์ไอโซฟลาโวน 7-โพรไบโอติกและไรโบฟลาวิน	38

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1.5 การวิเคราะห์กรดอะมิโนทั้งหมด	38
3.1.6 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์และการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส	38
3.2 สารเคมี	39
3.2.1 การหมักถั่วเหลือง	39
3.2.2 การสกัดถั่วเหลืองและถั่วเหลืองหมัก	39
3.2.3 การวิเคราะห์ประมาณของฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ และความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	39
3.2.4 การวิเคราะห์ไอโซฟลาโวน ไทอามินและไรโบฟลาวิน	40
3.2.5 การวิเคราะห์กรดอะมิโนทั้งหมด	40
3.2.6 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์และการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส	41
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย	41
3.3.1 การเตรียมถั่วเหลืองหมัก	41
3.3.1.1 การเตรียมเชื้อ	41
3.3.1.2 เตรียมถั่วเหลืองหมัก	42
3.3.2 การเตรียมการเตรียมสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมัก	42
3.3.2.1 สารสกัดถั่วเหลือง	42
3.3.2.2 สารสกัดถั่วเหลืองหมัก	43
3.3.3 การศึกษาสารพฤกษเคมี	43
3.3.3.1 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยวิธี Folin-ciocalteu method	43
3.3.3.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์	43
3.3.3.3 ปริมาณไอโซฟลาโวน	44
3.3.4 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	44
3.3.4.1 ABTS Assay	44
3.3.4.2 DPPH Assay	45
3.3.4.3 FRAP Assay	45

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.5	ศึกษาปริมาณของธาตุอาหาร โภชนาการ.....	45
3.3.5.1	ไทอามิน และไรโบฟลาวิน.....	45
3.3.5.2	ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด.....	46
3.3.6	การทดสอบความเป็นพิษ.....	47
3.3.6.1	การเพาะเลี้ยงเซลล์	47
3.3.6.2	การทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT Assay	47
3.3.7	ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลือง หมักต่อการสร้างสารทางชีวเคมีของการสร้างกระดูก.....	48
3.3.7.1	การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส	48
3.3.8	สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์.....	48
4	ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	49
4.1	การศึกษาสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และไอโซฟลาโวน	49
4.1.1	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด	49
4.1.2	ปริมาณฟลาโวนอยด์.....	50
4.1.3	ปริมาณไอโซฟลาโวน	51
4.2	การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ.....	53
4.2.1	วิธี 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)	53
4.2.2	วิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity	54
4.2.3	วิธี Ferric-reducing antioxidant power (FRAP)	55
4.3	ศึกษาปริมาณของธาตุอาหาร โภชนา.....	57
4.3.1	ไทอามิน และไรโบฟลาวิน.....	57
4.3.2	ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด.....	58
4.4	ผลของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมักที่มีต่อความเป็นพิษ และการเจริญของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1	61
4.4.1	การทดสอบความเป็นพิษ	61
4.4.2	การเจริญของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1	62

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5	สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	66
5.1	บทสรุป.....	66
5.2	ข้อเสนอแนะ.....	67
	บรรณานุกรม	68
	ภาคผนวก.....	82
	ภาคผนวก ก วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบออกฤทธิ์ ทางชีวภาพ คุณค่าอาหารทางโภชนาและความสามารถในการเป็น สารต้านอนุมูลอิสระ	83
	ภาคผนวก ข การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์และเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์.....	86
	ภาคผนวก ค สารอาหารที่แนะนำให้บริโภคประจำวันสำหรับคนไทยอายุตั้งแต่ 6 ปีขึ้นไป (THAI RECOMMENDED DAILY INTAKES-THAI: RDI) พ.ศ. 2541.....	93
	ประวัติผู้เขียน.....	98

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์ของถั่วเหลือง6
2.2	ข้อมูลวัตถุดิบถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ถั่วเน่า 10
2.3	ปริมาณสารไอโซฟลาโวนในแหล่งอาหารต่าง ๆ 14
2.4	ผลของไอโซฟลาโวนต่อกระบวนการสลายกระดูก32
2.5	ผลของไอโซฟลาโวนต่อกระบวนการสร้างกระดูก33
4.1	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมัก ที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล 49
4.2	ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมัก ที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล51
4.3	ปริมาณไอโซฟลาโวน (เดิซิซีนและเจนิสทิน) ของสารสกัดจากถั่วเหลือง และสารสกัดจากถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล52
4.4	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline- sulfonic acid) ของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วย ตัวทำละลายน้ำและเอทานอล 54
4.5	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ และเอทานอล 55
4.6	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่ว เหลืองหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี FRAP56
4.7	ปริมาณของไทอามิน และไรโบฟลาวินของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจาก ถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล 58
4.8	ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมัก ที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล59
4.9	ความเป็นพิษของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วย ตัวทำละลายน้ำและเอทานอลต่อเซลล์ไลน์ MC3T3-E161

สารบัญรูป

ภาพที่	หน้า
2.1	ลักษณะฟีกั่วเหลืองและเมล็ดั่วเหลือง 8
2.2	โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล..... 12
2.3	โครงสร้างของสารไอโซฟลาโวน 13
2.4	สูตรโครงสร้างของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH radical)..... 18
2.5	สูตรโครงสร้างของ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt 19
2.6	ปฏิกิริยาของ FRAP assay 20
2.7	โครงสร้างภายในของกระดูกปกติ และกระดูกพรุน 27
2.8	ขั้นตอนการสร้างและสลายของกระดูก 28
2.9	การสะสมแร่ธาตุของกระดูก 28
2.10	โครงสร้างของ MTT 34
2.11	ลักษณะของ haemocytometer และภาพของแต่ละ chamber เมื่อภายใต้กล้อง จุลทรรศน์..... 35
4.1	โครมาโตแกรมไอโซฟลาโวน (เดอซิซันและเจนิสทิน) ของสารสกัดจากั่วเหลือง และสารสกัดจากั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำและเอทานอล 53
4.2	โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนทั้งหมดของสารสกัดจากั่วเหลืองและสารสกัดจาก ั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำและเอทานอล 60
4.3	ผลของสารสกัดจากั่วเหลืองและสารสกัดจากั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำและเอทานอลที่มีต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ด้วยวิธี MTT..... 62
4.4	ผลของสารสกัดจากั่วเหลืองและสารสกัดจากั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำและเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตสของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 64

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ABTS	=	2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
ALP	=	alkaline phosphatase enzyme
α -MEM	=	alpha- minimal essential medium
DMSO	=	ไดเมทิลซัลฟอกไซด์
DPPH	=	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity
EC ₅₀	=	half maximal "Effective Concentration"
FBS	=	fetal bovine serum
FRAP	=	ferric reducing antioxidant power
HPLC	=	โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
IC ₅₀	=	half maximal "Inhibitory Concentration"
LC ₅₀	=	Median Lethal Concentration
MC3T3-E1	=	mouse osteoblastic cell line
MTT	=	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
SEM	=	standard error mean

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ถั่วเหลือง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Glycine max* (L.) Merrill อยู่ในตระกูล Leguminosae เป็นพืชที่นิยมนำมาบริโภค เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เช่น วิตามิน เอ บี ซี และเกลือแร่ที่ร่างกายต้องการปริมาณสูง (Jing และ Zhang, 2006) มีรายงานทางการแพทย์ที่เกี่ยวกับประโยชน์ของการรับประทานถั่วเหลืองในการป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ เช่น ช่วยป้องกันโรคอ้วน (Garcia et al., 1997) โรคมะเร็ง (Messina and Barnes, 1991; Hawrylewicz et al., 1995) โรคกระดูกพรุน (Chiechia et al., 2002) โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน (Sumi et al., 1987; Anthony et al., 1996; Anderson et al., 1999) และโรคไต (Brenner et al., 1982) ถั่วเหลืองยังเป็นแหล่งของไอโซฟลาโวน 2 ชนิด คือ เจนิสทินและเดิซิสทิน ซึ่งมีความสำคัญต่อหน้าที่ต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น ช่วยลดคอเลสเตอรอล และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการเกิด LDL-oxidation ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน และนำไปสู่โรคหัวใจขาดเลือด (Nagata et al., 1998; Kenneth et al., 1999)

การบริโภคถั่วเหลืองอาจบริโภคในลักษณะที่เป็นถั่วเหลืองทั้งเมล็ดที่ผ่านการแปรรูปเป็นอาหารชนิดอื่น เช่น นมถั่วเหลือง เต้าเจี้ยว ซีอิ๊ว และถั่วเน่า เป็นต้น ถั่วเหลืองนอกจากจะมีคุณค่าทางโภชนาการเพราะอุดมไปด้วยโปรตีนแล้ว ยังพบว่าในถั่วเหลืองยังมีสารสำคัญอีกมากมาย เช่น ไอโซฟลาโวน, ซาโปนิน, ไฟโตสเตอรอล และโอลิโกแซคคาไรด์ โดยเฉพาะไอโซฟลาโวนนั้นเป็นสารที่พบมากในถั่วเหลือง ซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์ที่ได้จากธรรมชาติและมีคุณสมบัติคล้ายกับ เอสโตรเจน จึงจัดว่าเป็นไฟโตรเอสโตรเจน มีฤทธิ์ลดการสร้างอนุมูลอิสระและช่วยต้านมะเร็ง เนื่องจากไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับฮอร์โมนเอสโตรเจน (Jing and Zhang, 2006) ดังนั้นสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองจึงสามารถทดแทนเอสโตรเจนในร่างกายได้และมีความจำเป็นอย่างยิ่งในหญิงวัยหมดประจำเดือน

ถั่วเน่า คือผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักของไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางภาคเหนือของไทย (Chukeatirote and Thakang, 2006) ถั่วเน่าเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นเมืองที่นิยมใช้เป็นเครื่องปรุงในการประกอบอาหารของประชากรทางภาคเหนือของประเทศไทย ผลิตภัณฑ์นี้ได้จากการหมักถั่วเหลืองที่แช่น้ำค้างคืนแล้วทำให้สุก หลังจากนั้นห่อด้วยใบตองหมักทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-4 วัน หรือจนกระทั่งปรากฏสารเมือกเหนียวเคลือบทั่วผิวของเมล็ดถั่วเหลือง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะอุดมไป

ด้วยเอนไซม์โปรติเอสจากกิจกรรมของบาซิลัสและสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่มไอโซฟลาโวน โดยเฉพาะเจนิสทินซึ่งมีฤทธิ์ด้านการเกิดเนื้องอก (Chantawannakul et al., 2002) รวมทั้งอุดมด้วยคุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ มีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นสูงขึ้นหลังผ่านกระบวนการหมัก ซึ่งจะถูกดูดซึมได้อย่างรวดเร็วในระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยวิตามินไทอามินและไรโบฟลาวินซึ่งเป็นวิตามินหลักที่จำเป็นสำหรับผู้สูงอายุ ไอโซฟลาโวนมีผลต่อระดับฮอร์โมนเพศหญิงเอสโตรเจน ซึ่งจะมีปริมาณลดลงในวัยหมดประจำเดือน (Kerry et al., 2000) ดังนั้นผลิตภัณฑ์อาหารที่ประกอบด้วยสารสกัดถั่วเหลืองหมักจึงเป็นอาหารเชิงหน้าที่มีส่วนช่วยป้องกันโรคไม่ติดต่อเรื้อรังที่สำคัญในกลุ่มผู้สูงอายุ ได้แก่ กลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือด โดยมีผลช่วยลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง ช่วยบรรเทาอาการของหญิงวัยหมดประจำเดือน การหมักจะส่งผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงของไอโซฟลาโวน โดยพบว่าไอโซฟลาโวนในกลุ่มไกลโคไซด์ (glycoside) ที่พบในถั่วเหลืองจะถูกย่อยโดยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก ทำให้ปริมาณ ไอโซฟลาโวนในกลุ่มอะไกลโคน (aglycone) สูงขึ้นในระหว่างการหมัก (Kwak et al., 2007) จากการศึกษาของ Han et al. (2004) ในประเทศจีน สรุปไว้ว่าหลังจากผ่านกระบวนการหมักถั่วเหลืองให้เป็นผลิตภัณฑ์เต้าหู้ (tofu) โดยเชื้อ *Acinomucor elegans* พบว่าเต้าหู้มีปริมาณกรดอะมิโนสูงถึง 26-42 mg/g ในกระบวนการหมักที่ใช้เกลือ 14% และรูปแบบของกรดอะมิโนชนิดจำเป็น (essential amino acids) ที่พบเหมือนกับกรดอะมิโนที่จำเป็นในไข่และนมวัว

ไอโซฟลาโวนเป็นไฟโตเอสโตรเจนชนิดหนึ่งซึ่งพบได้ในพืชต่าง ๆ โดยเฉพาะในถั่วเหลืองมีโครงสร้างและการออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (Setchell, 1998) กล่าวคือ เป็นสารที่สามารถใช้ทดแทนการขาดหรือการลดน้อยลงของปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนได้ซึ่งฮอร์โมนเอสโตรเจนนี้มีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งในหญิงวัยหมดประจำเดือน การให้ฮอร์โมนทดแทนมีความเสี่ยงต่อการเกิดผลข้างเคียงอื่น ๆ เช่น รายงานการวิจัยของ Messina (1999) พบว่าการใช้ฮอร์โมนทดแทนก่อให้เกิดมะเร็ง อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่เสนอแนะว่าการบริโภคสารไอโซฟลาโวน ที่ปริมาณ 40 mg ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน อาจลดภาวะไม่พึงประสงค์ของวัยหมดประจำเดือนได้ (Baird et al., 1995)

มวลกระดูกของสตรีจะมีความสัมพันธ์กับระดับฮอร์โมนเพศหญิงในร่างกายของสตรีวัยหมดประจำเดือน ซึ่งภาวะการขาดฮอร์โมนเพศหญิงมักจะพบว่าร่างกายมีการลดลงของมวลกระดูก (Liu, 1997) ฮอร์โมนเอสโตรเจนเป็นฮอร์โมนที่สำคัญสำหรับการสร้างมวลกระดูก เมื่อฮอร์โมนนี้มีปริมาณลดลงในหญิงวัยหมดประจำเดือน มวลกระดูกจะมีการสลายมากกว่าการสร้างก่อให้เกิดภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis) ซึ่งทำให้สตรีสูงวัยกระดูกเปราะ หักง่าย กระดูกสันหลังอ่อนตัวทำให้หลังโก่ง และอาจมีอาการปวดข้อ กล้ามเนื้ออ่อนเปลี้ย (ณัฐฉาน นุญเย็น, 2551) อาการ

ที่เกิดกับหญิงวัยหมดประจำเดือน มักจะรักษาด้วยการใช้ฮอร์โมนทดแทน (Hormone Replacement Therapy: HRT) เป็นมาตรการรักษาด้วยการผสมผสานฮอร์โมนเอสโตรเจนกับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ซึ่งถึงแม้ว่าการรักษาด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์นี้ จะให้ผลดีในการลดอาการร้อนแดงที่ผิวหนังซึ่งมักเกิดขึ้นบ่อย แต่ก็มีผลข้างเคียงระยะยาว รวมทั้งมีโอกาสเพิ่มปัจจัยเสี่ยงต่อการพัฒนาของโรคมะเร็งบางชนิดได้ จึงเกิดความสนใจวิธีธรรมชาติบำบัดอื่น ๆ ทดแทน โดยเฉพาะการบริโภคสารอาหารธรรมชาติและปรับเปลี่ยนพฤติกรรมในการดำรงชีวิต (Brandi, 1999) ซึ่งมีงานวิจัยที่หลากหลายพบว่าถั่วเหลืองมีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของอาการในหญิงวัยหมดประจำเดือนได้ การรับประทานอาหารที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบอย่างสม่ำเสมอจะได้รับไอโซฟลาโวนซึ่งมีสูตรโครงสร้างคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนด้วย จึงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของผู้หญิงที่ไม่ต้องการลดอาการวัยหมดประจำเดือนด้วยการใช้ฮอร์โมนทดแทน อีกทั้งช่วยป้องกันโรคมะเร็งเต้านมและมะเร็งที่พึ่งฮอร์โมนเอสโตรเจนรวมทั้งลดระดับไขมันในเลือดได้ (Johnson and Williamson, 2003) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารพฤกษเคมีและธาตุอาหารโภชนาการ และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมัก และผลของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมักที่มีต่อการสร้างสารทางชีวเคมีของการสร้างกระดูก (biochemical markers for bone formation)

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารพฤกษเคมีได้แก่สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์และไอโซฟลาโวนของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมัก

1.2.2 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณธาตุอาหารโภชนาการ ได้แก่ กรดอะมิโนทั้งหมด ไทอามิน และไรโบฟลาวินของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมัก

1.2.3 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมัก

1.2.4 ศึกษาผลของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมักที่มีต่อความเป็นพิษและการเจริญของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1

1.2.5 ศึกษาผลของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมักที่มีต่อการสร้างสารทางชีวเคมีของการสร้างกระดูก (biochemical markers for bone formation)

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

สารสกัดจากถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการหมักด้วย *Bacillus subtilis* SB-MYP-1 มีสารพฤกษเคมีที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ, ปริมาณของธาตุอาหารโภชนาการและความสามารถในการ

เป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดจากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก และสารสกัดจากถั่วเหลืองหมักปราศจากความเป็นพิษต่อเซลล์และส่งเสริมการเจริญของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 และเพิ่มการสร้างสารทางชีวเคมีของการสร้างกระดูก (biochemical marker for bone formation)

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 การเตรียมสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ สารสกัดน้ำ และเอทานอล

1.4.2 ศึกษาสารพิษทุกชนิดที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมัก

1.4.3 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมัก

1.4.4 ศึกษาปริมาณของธาตุอาหารโภชนาการของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมัก

1.4.5 ศึกษาผลของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมักที่มีต่อความเป็นพิษและการเจริญของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1

1.4.6 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมักต่อการสร้างสารทางชีวเคมีของการสร้างกระดูกของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1

1.5 วิธีดำเนินการวิจัย

1.5.1 เตรียมถั่วเหลืองหมักคัดแปลงจากวิธีของ Hsu and Chiang (2009)

1.5.2 เตรียมสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมัก (Dajanta et al., 2011)

1.5.3 ศึกษาหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu method (Oonsivilai et al., 2007)

1.5.4 ศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยวิธี (Juan and Chou, 2010)

1.5.5 ศึกษาปริมาณเดอซิซินและเจนิสทินโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Punjaisee et al., 2011)

1.5.6 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (Oonsivilai et al., 2007; Singthong et al., 2011), FRAP (Oonsivilai et al., 2007; Singthong et al., 2011), และ ABTS (Ksouri et al., 2009)

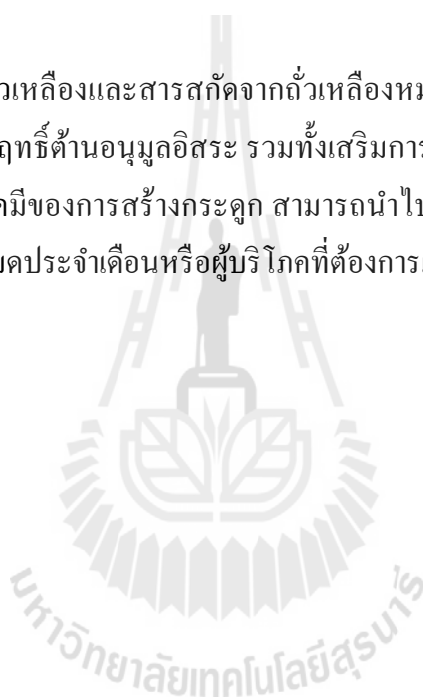
1.5.7 ศึกษาปริมาณของธาตุอาหารโภชนาการ (ไทอามินและไรโบฟลาวิน โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (Sanchez-Machado et al., 2004) และ Total amino acid contents โดยวิธี (Zarkadas et al., 2007)

1.5.8 ศึกษาผลของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมักที่มีต่อความเป็นพิษและการเจริญของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 (Choi et al., 2001)

1.5.9 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมักต่อการสร้างสารทางชีวเคมีของการสร้างกระดูก (ตามวิธีของ Choi et al., 2001)

1.6 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมักที่มีสารไอโซฟลาโวน ลดอาการวัยหมดประจำเดือนและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูกและการสร้างสารทางชีวเคมีของการสร้างกระดูก สามารถนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารกลุ่มสตรีวัยหมดประจำเดือนหรือผู้บริโภคที่ต้องการเสริมการสร้างมวลกระดูก



บทที่ 2

ปรัทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ถั่วเหลือง

ถั่วเหลือง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max* (L.) Merrill อยู่ในวงศ์ (family) Leguminosae, วงศ์ย่อย (sub-family) Papilionoideae พืชในสกุล (genus) นี้ยังแบ่งออกไปอีกหลายชนิด (species) มีถิ่นกำเนิดกระจายอยู่ตั้งแต่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และหมู่เกาะต่าง ๆ ในมหาสมุทรแปซิฟิก ไปจนถึงทวีปออสเตรเลีย ถั่วเหลืองเป็นพืชเขตร้อน มีถิ่นกำเนิดมาจากตอนกลางหรือทางตอนเหนือของประเทศจีน มีพัฒนาการมาจากพันธุ์ป่า *G. ussuriensis* ระยะเวลาตั้งแต่ปลูกถึงระยะสุกแก่ประมาณ 75 ถึง 175 วัน ขึ้นอยู่กับพันธุ์และสิ่งแวดล้อม เราสามารถจัดจำแนกถั่วเหลืองตามขั้นตอนทางพฤกษศาสตร์ได้ ดังนี้

ตารางที่ 2.1 การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์ของถั่วเหลือง

อาณาจักร (Kingdom)	Plant Kingdom
อาณาจักรย่อย (Subkingdom)	Cormobionta
ดิวิชัน (Division)	Spermatophyta
ดิวิชันย่อย (Subdivision)	Angiospermae
ชั้น (Class)	Dicotyledoneae
ชั้นย่อย (Subclass)	Archichlamydae
อันดับ (Order)	Polypetalae
อันดับย่อย (Suborder)	Leguminosinae
วงศ์ (Family)	Leguminosae
วงศ์ย่อย (Subfamily)	Papilionoideae
เผ่า (Tribe)	Phaseoleae
เผ่าย่อย (Subtribe)	Glycininae
สกุล (Genus)	<i>Glycine</i>
สกุลย่อย (Subgenus)	<i>Soja</i>
สปีชีส์ (Species)	<i>Max</i>

แหล่งที่มา: Hymowitz and Singh (1987); Melchior (1964); Shanmugasundaram (1976)

ถั่วเหลืองเป็นพืชล้มลุก (annual) ที่ผสมตัวเอง (self-pollinated crop) ลักษณะต่าง ๆ ของถั่วเหลือง กล่าวโดยสรุปดังนี้

1. รากถั่วเหลือง มีระบบรากแก้ว (tap root system) ตามรากจะพบบวม (nodule) ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียพวก *Rhizobium japonicum* เข้าไปอาศัยอยู่ แบคทีเรียจะได้รับคาร์โบไฮเดรตจากต้นถั่วเหลือง และถั่วเหลืองก็จะได้ในโตรเจนในรูปไนเตรตที่แบคทีเรียตรึงได้จากอากาศไปใช้ประโยชน์

2. ต้นถั่วเหลือง ส่วนมากมีลำต้นตั้งตรง ลักษณะเป็นพุ่ม มีการแตกแขนงค่อนข้างมาก มีขนสีน้ำตาลหรือสีเทา ปกคลุมอยู่ทั่วไป เช่น ตามลำต้น ก้านใบ ใบ กลีบเลี้ยง และผล สูงประมาณ 30-150 เซนติเมตร ความสูงขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ของดิน ความชื้นและฤดูปลูก อาจแบ่งถั่วเหลืองออกได้เป็น 2 พวกตามวิธีการเจริญเติบโตคือ

2.1 ชนิดทอดยอด (Indeterminate type) พวกนี้ช่อดอกไม่เกิดที่ยอดของลำต้น (main stem) แต่เกิดตามมุมใบ จึงทำให้ยืดยาวของยอดถั่วไปได้อีกระยะหนึ่ง ภายหลังจากมีการออกดอกแล้ว พันธุ์พวกนี้จะมีปลายเรียว ยาว ทำให้ต้นหยุดเจริญเติบโตเมื่อเริ่มติดฝัก

2.2 ชนิดไม่ทอดยอด (Determinate type) พวกนี้ช่อดอกเกิดที่ยอดของลำต้นเป็นกลุ่ม

3. ใบถั่วเหลือง ใบประกอบด้วยใบย่อย 3 ใบ รูปร่างคล้ายรูปไข่ปลายแหลม ใบค่อนข้างหนา ผิวมันทั้งด้านบนและด้านล่าง

4. ดอกถั่วเหลือง ออกดอกเป็นช่อ ดอกมีสีขาวหรือสีม่วง ออกดอกเมื่ออายุประมาณ 25-30 วัน

5. ฝักถั่วเหลือง ออกฝักเป็นกลุ่ม ที่ฝักมีขนสีเทาหรือสีน้ำตาลปกคลุมอยู่ทั่วฝัก ในแต่ละฝักจะมีเมล็ดอยู่ประมาณ 1-5 เมล็ด แต่ส่วนใหญ่แล้วจะมีอยู่ 2-3 เมล็ด ฝักอ่อนมีสีเขียว เมื่อสุกแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

6. เมล็ดถั่วเหลือง เมล็ดอาจมีสีเหลือง สีเขียว สีน้ำตาล หรือสีดำก็ได้ โดยเมล็ดจะมีขนาดและรูปร่างต่างกัน ลักษณะของเมล็ดมีตั้งแต่กลมรีจนถึงยาว (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, (2013) และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, คณะทรัพยากรธรรมชาติ (2013))



ภาพที่ 2.1 ลักษณะฝักถั่วเหลืองและเมล็ดถั่วเหลือง

แหล่งที่มา: <http://doa.go.th/fcri/index.html>

ถั่วเหลืองมีแหล่งกำเนิดในเขตอบอุ่น แต่ในปัจจุบันมีการปลูกถั่วเหลืองกันอย่างแพร่หลาย ทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น สำหรับประเทศไทยนั้นมีการปลูกถั่วเหลืองกันมานานแล้ว เริ่มปลูกกันในภาคเหนือ ต่อมาขยายไปยังภาคอื่น ๆ ยกเว้นภาคใต้ ปัจจุบันมีพื้นที่การปลูกถั่วเหลืองทั้งในฤดูฝนและฤดูแล้ง รวมกันประมาณ 1.46 ล้านไร่ ได้ผลผลิตถั่วเหลืองประมาณ 3.2 แสนตัน แต่ก็ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้ในประเทศ แหล่งปลูกในประเทศไทย ได้แก่ ภาคเหนือ และภาคกลาง เช่น สุโขทัย เชียงใหม่ เพชรบูรณ์ พิจิตร พิษณุโลก แพร่ ลำปาง ตาก กำแพงเพชร ลพบุรี สระบุรี ชัยนาท สิงห์บุรี อ่างทอง กาญจนบุรี ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา ซึ่งเป็นแหล่งที่มีสภาพดิน ฟ้า อากาศเหมาะสม สามารถกระจายเนื้อที่ปลูกให้กว้างออกไปได้อีก ส่วนจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดเลย นครราชสีมา ขอนแก่น อุดรธานี อุบลราชธานี มหาสารคาม หนองคาย ซึ่งเป็นแหล่งที่มีน้ำสำหรับปลูกถั่วเหลืองในฤดูแล้งได้ หรือจะปลูกในฤดูฝน โดยใช้เป็นพืชหมุนเวียนกับพืชชนิดอื่น เช่น ปอ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ฯลฯ สำหรับภาคใต้ เนื่องจากมีฝนตกชุก การปลูกถั่วเหลืองเพื่อเก็บฝักแห้งอาจมีปัญหาในระหว่างการเก็บเกี่ยวและนวด แต่ถ้าปลูกเพื่อรับประทานฝักสดก็ได้ผลดี พันธุ์ที่แนะนำให้ปลูกมีหลายพันธุ์ ได้แก่

1. สจ. 2 ลำต้นไม่ทอดยอด ต้นไม่ล้ม เจริญเติบโตได้ดี และให้ผลผลิตสูงในปลายฤดูฝนและฤดูแล้ง ฝักไม่แตกง่าย อายุเก็บเกี่ยว 95 วัน ไม่ต้านทานโรคราสนิม ตามเมล็ดสีน้ำตาลแดง (ชาวบ้านเรียกพันธุ์ตาแดง)

2. สจ. 4 ให้ผลผลิตสูงกว่า สจ. 2 คุณภาพของเมล็ดดี ปลูกได้ผลดีทั้งฤดูแล้งและฤดูฝน ต้านทานต่อโรคราสนิม อายุเก็บเกี่ยว 99 วัน ตามเมล็ดสีน้ำตาลอ่อน

3. สจ. 5 ทนทานต่อโรคราสนิม และโรคใบด่างดีกว่า สจ. 4 ผลผลิตในฤดูแล้งดีกว่า สจ.4 แต่ในฤดูฝนให้ผลผลิตใกล้เคียงกัน อายุเก็บเกี่ยว 98 วัน ตามเมล็ดสีน้ำตาลอ่อน เป็นที่ต้องการของตลาด

4. เชียงใหม่ 60 ทนทานต่อโรคราสนิมได้ดีกว่า สจ. 4 และ สจ. 5 เป็นพันธุ์ที่มีกึ่งน้อย แต่ให้จำนวนฝักมาก สามารถเพิ่มจำนวนต้นต่อไร่ได้อีกและผลผลิตจะเพิ่มสูงขึ้นด้วย ตอบสนองต่อปุ๋ยอัตราต่ำได้ดีกว่า สจ. 5 ปลูกได้ทั้งฤดูแล้งและฤดูฝน โดยให้ผลผลิตใกล้เคียงกับ สจ. 4 และ สจ. 5 อายุเก็บเกี่ยว 97 วัน

5. นครสวรรค์ 1 (โอซีบี) เป็นพันธุ์อายุสั้นประมาณ 75 วัน เมล็ดโตกว่าทุกพันธุ์ที่กล่าวมา ตามเมล็ดสีเหลืองอ่อน เป็นที่ต้องการของตลาด แต่ต้องหลีกเลี่ยงการปลูกในแหล่งที่มีโรคราสนิม ราน้ำค้าง และแอนแทรกซ์ เหมาะสำหรับปลูกในฤดูฝนในเขตภาคกลางก่อน หรือตามหลังพืชไร่อื่น ๆ แต่สามารถปลูกได้ทั้งฤดูฝนและฤดูแล้ง

6. สุโขทัย 1 เป็นพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับปลูกในภาคเหนือตอนล่าง เช่น สุโขทัย กำแพงเพชร เป็นต้น ให้ผลผลิตสูงเมื่อปลูกในฤดูฝน อายุเก็บเกี่ยว 96 วัน ตามเมล็ดสีเหลืองฟางข้าว เป็นพันธุ์ที่เกิดโรคเมล็ดสีม่วงค่อนข้างมากกว่าพันธุ์อื่น ๆ แต่ต้านทานต่อโรคใบด่างและใบจุดนูน (ชาวบ้านเรียกว่าพันธุ์ผักบั้งเพราะมีใบคล้ายผักบั้ง และต้นทอดยอด) (กรมพัฒนาที่ดิน, กลุ่มวิจัยและพัฒนาการอนุรักษ์ดินและน้ำ, 2014)

ถั่วเหลืองสามารถแปรรูปให้ได้ผลิตภัณฑ์อาหารที่หลากหลายขึ้นและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค แบ่งได้เป็น ผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมักและผ่านการหมักก่อน ผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก เช่น น้านมถั่วเหลือง เต้าหู้ ถั่วอกที่เพาะจากถั่วเหลือง เป็นต้น ส่วนผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักถั่วเหลือง เช่น ถั่วเน่า เตมเป้ ซอสถั่วเหลือง เต้าเจี้ยว เป็นต้น หลังจากการสกัดน้ำมันถั่วเหลืองด้วยตัวทำละลายแล้ว ส่วนที่เหลือจะเป็นเนื้อถั่วที่อุดมด้วยโปรตีน สามารถแปรรูปเป็นอาหารหลายชนิด เช่น เนื้อเทียม (โปรตีนเกษตร) แป้ง เบเกอร์ ทำโปรตีนเข้มข้น หรือผ่านกรรมวิธีเพื่อแยกเอาโปรตีนบริสุทธิ์ ปัจจุบันได้มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ ๆ ขึ้นเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคในหลาย ๆ ประเทศ เพื่อเป็นการขยายตลาดและเพิ่มค่านิยมในการบริโภคถั่วเหลือง ผลิตภัณฑ์ที่มีการพัฒนาขึ้นใหม่ เช่น ไอศกรีม โยเกิร์ตถั่วเหลือง เนยถั่วเหลือง อาหารเสริมจากถั่วเหลือง เป็นต้น เนื่องจากถั่วเหลืองมีสารเคมีที่เป็นประโยชน์หลายชนิด เช่น เลซิทิน โอลิโกแซคคาไรด์ วิตามินอี สเตอรอล ไฟเตท เป็นต้น สามารถใช้ถั่วเหลืองเพื่อช่วยเพิ่มใยอาหารและคุณค่าทางอาหาร

ถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบที่มีอยู่แล้ว และหาได้ง่ายในท้องถิ่น ดังนั้นการนำวัตถุดิบถั่วเหลืองมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จึงเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบ ดังจะเห็นได้จากข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ข้อมูลวัตถุดิบถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ถั่วเน่า

ข้อมูล	จำนวน
ผลผลิตถั่วเหลืองต่อไร่	275-380 (กก./ไร่)
ราคาถั่วเหลืองที่เกษตรกรขายได้ปี 2540/41	11.00 (บาท/กก.)
ผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าสดที่ได้ต่อวัตถุดิบถั่วเหลืองที่ใช้	220/100 (กรัม/กรัม)
ผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าแผ่นต่อวัตถุดิบถั่วเหลืองที่ใช้	ไม่มีข้อมูลแต่คาดว่าไม่ต่ำกว่า 100 กรัม/ 100 กรัม ^a
ราคาผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าแผ่น	5 กรัม/บาท

แหล่งที่มา: สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร (2543) และ กรมส่งเสริมการเกษตร (2543)

^a พิจารณาจาก % ความชื้นของผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าแผ่นเทียบกับวัตถุดิบถั่วเหลือง

และหากนำเทคโนโลยีที่เหมาะสม เช่น เทคโนโลยีการหมัก และเทคโนโลยีการทำแห้ง มาประสานกับภูมิปัญญาชาวบ้านในการผลิตและแปรรูปถั่วเหลืองเป็นผลิตภัณฑ์ถั่วเน่า ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์อาหารพื้นบ้าน ให้มีคุณภาพและเหมาะสมแก่ผู้บริโภคมากขึ้น จะช่วยให้ผู้บริโภคหันมาสนใจบริโภคอาหารพื้นเมืองของประเทศไทยมากขึ้น ด้วยเหตุผลที่ถั่วเน่าเป็นอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ ราคาไม่แพง และสามารถใช้เป็นแหล่งโปรตีน ทดแทนอาหารจากเนื้อสัตว์ ใช้ประกอบอาหารมังสวิรัต เป็นการขยายกลุ่มผู้บริโภคให้กว้างขึ้น

2.1.1 ถั่วเหลืองหมัก

ถั่วเน่า เป็นผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก เป็นอาหารพื้นบ้านล้านนาที่นิยมบริโภคในเขตภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งแปรรูปเพื่อการถนอมอาหาร (food preservation) ด้วยการหมัก (fermentation) โดยใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติจนได้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่น สี และรสที่เป็นเอกลักษณ์ เป็นแหล่งของอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง อุดมไปด้วยโปรตีน กรดไขมันไม่อิ่มตัว วิตามิน สารอาหารที่มีประโยชน์จากถั่วเหลือง ถั่วเน่านำมาใช้ประกอบอาหาร หรือใช้เป็นเครื่องปรุงรส เช่นเดียวกับกะปิ น้ำปลาของภาคกลาง น้ำบูดูของภาคใต้ หรือปลาร้าของภาคอีสาน กระบวนการผลิตถั่วเน่าคล้ายคลึงกับถั่วเหลืองหมักพื้นเมืองที่พบในประเทศอื่น เช่น เทมเป้ ซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองของประเทศอินโดนีเซียที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus oligosporus*. ส่วนถั่วหมักของแอฟริกาจะเรียกว่า ดาว่าด๊าว่า (Dawadawa), นัตโตะ (natto) ซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองของประเทศญี่ปุ่น คินามา (kenema) ซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองของชาวเนปาลและอินเดีย และซุงคูกแจง (chungkookjang) ซึ่งใช้เป็นเครื่องปรุงรสของประเทศเกาหลี

การหมักถั่วเน่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. ที่มาจากธรรมชาติ จากสิ่งแวดล้อมและวัตถุดิบ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองให้มีโมเลกุลเล็กลง มีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านกายภาพ และชีวเคมีของผลิตภัณฑ์ เช่น เนื้อสัมผัสนุ่ม และกลิ่นของสารไพราซีน (Pyrazine) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดกลิ่นเฉพาะตัวของถั่วเน่า (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนานนท์, 2014) ในระหว่างการหมักถั่วเน่ามีการเพิ่มขึ้นของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา ผลิตภัณฑ์มีค่า pH สูงขึ้น แบคทีเรียที่พบมากจะอยู่ในจีนัส *Bacillus* และยังพบเชื้อในกลุ่ม *Lactobacillus* ด้วย สำหรับกิจกรรมทางชีวเคมีพบว่า การทำงานของเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลส มีค่าเพิ่มขึ้นในช่วง 60 และ 72 ของการหมัก (Chukeatirote et al., 2005) *Bacillus subtilis* เจริญได้ดีในช่วงพีเอชที่กว้าง (5.5-8.5) ซึ่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสและสร้างสารประกอบทางชีวเคมีที่มีประโยชน์ (Chantawannakul et al., 2002) Chukeatirote and Thakang (2006) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในถั่วเน่า พบว่าปริมาณโปรตีน ไขมัน และน้ำตาลรีดิวซ์ สูงขึ้นเล็กน้อย ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส ไลเปส และอะไมเลส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ในระหว่างการหมัก การทำงานของเอนไซม์จะค่อย ๆ สูงขึ้นและสูงที่สุดเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก โดยโปรติเอสจะย่อยโปรตีนละลายปล่อยแอมโมเนียออกมาระหว่างการหมัก การหมักจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของไอโซฟลาโวน โดยพบว่าไอโซฟลาโวนในกลุ่มไกลโคไซด์ ที่พบในถั่วเหลือง จะถูกย่อยโดยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากจุลินทรีย์ ทำให้ได้ไอโซฟลาโวนในกลุ่มอะไกลโคโคน เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมัก (Kwak et al., 2007)

2.1.2 บาซิลลัส ซับติลิส

กล้ำเชื้อ *B. subtilis* มีบทบาทสำคัญในการทำผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก เป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในกลุ่มแกรมบวก รูปแท่งตรง มี flagella แบบ peritrichous เจริญได้ดีที่ pH 5.5-8.5 ในสภาวะที่มีอากาศ (aerobes) หรือมีอากาศเล็กน้อย (facultative anaerobes) สร้าง catalase มี endospore ที่ทำให้มีคุณสมบัติในการทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่ดีได้ ไม่ทำให้เกิดโรค สร้าง Hydrolytic enzyme ที่ย่อยสลาย polysaccharide, nucleic acid และ lipid โดยใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนและตัวให้อิเล็กตรอน มีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน บทบาทสำคัญของเชื้อตัวนี้ในการหมัก คือการปล่อยเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสออกมาย่อยโปรตีน ช่วยปรับปรุงองค์ประกอบที่ย่อยได้ยากให้อยู่ในรูปที่ย่อยได้ง่ายและเป็นประโยชน์มากขึ้น (Feng et al., 2007; Inatsu et al., 2006)

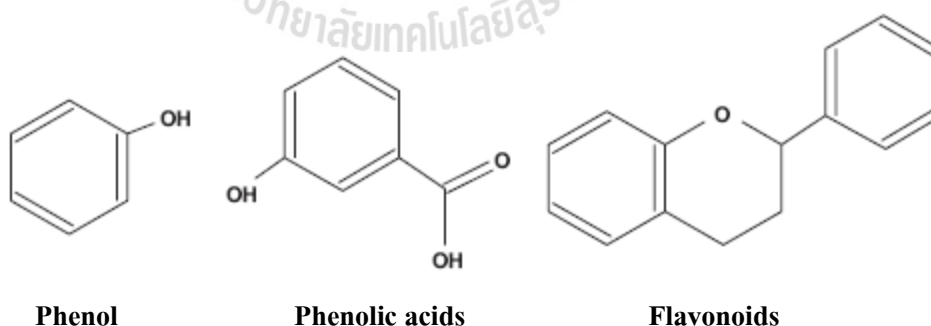
จากรายงานวิจัยเรื่องการลดกลิ่นไม่พึงประสงค์และการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก โดยการใช้ *Bacillus subtilis* เป็นกล้ำเชื้อในการหมัก (ปิยะวรรณ และรัชฎาพร, 2011) ศึกษาคัดแยกแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* จากถั่วเหลืองหมัก พบว่ากล้ำเชื้อ *Bacillus subtilis* SB-MYP 1 เมื่อจำแนกคุณสมบัติของเชื้อที่แยกได้ตามคุณลักษณะทางชีวเคมี ได้แก่ Catalase test และศึกษาคุณสมบัติการผลิตเอนไซม์ พบว่าคุณสมบัติของกล้ำเชื้อ รหัส SB-MYP-1 สามารถผลิต

เอนไซม์อะไมเลสและสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งเกิดขึ้นในช่วง Stationary phase โดยเมื่อเกิดกระบวนการหมัก กล้าเชื้อสามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ซึ่งเป็นผลผลิตจากกระบวนการเมตาบอลิซึมปฐมภูมิ ซึ่งพบในช่วง Stationary phase ของการเจริญ ซึ่งการผลิตช่วงนี้มีความสำคัญ เช่น สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *Bacillus cereus* TISTR NO.687, *E. coli* TISTR NO.780, *Salmonella* sp. และ *Staphylococcus aureus* TISTR NO.118

2.2 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองเป็นอาหารที่อุดมไปด้วยสารอาหารที่มีคุณค่า เพราะเป็นแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพ มีเกลือแร่และวิตามินที่สำคัญ ได้แก่ แคลเซียม เหล็ก ฟอสฟอรัส ไทอามิน ไรโบฟลาวิน ไนอาซิน และกรดโฟลิกสูง ถั่วเหลืองยังเป็นแหล่งอาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว และมีใยอาหารสูง นอกจากนี้ในถั่วเหลืองยังพบสารประกอบฟีนอล

สารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) เป็นสารที่พบตามธรรมชาติในพืชหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ สมุนไพร ถั่วเมล็ดแห้ง เมล็ดธัญพืช ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในการเจริญเติบโต สารประกอบฟีนอล มีโภชนเภสัช ซึ่งสรรพคุณที่ดีต่อสุขภาพ คือ มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สามารถละลายได้ในน้ำ สารประกอบฟีนอล มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่เป็นอนุพันธ์ของวงแหวนเบนซีน มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) อย่างน้อยหนึ่งหมู่ต่ออยู่ สารประกอบฟีนอลพื้นฐาน คือ สารฟีนอล (phenol) ในโมเลกุลประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน 1 วง และหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล

แหล่งที่มา: ทรงพล รติศพงษ์, กรรณิการ์ บุตรเอก และชนนิษฐา อัสวชัยณรงค์

(2546)

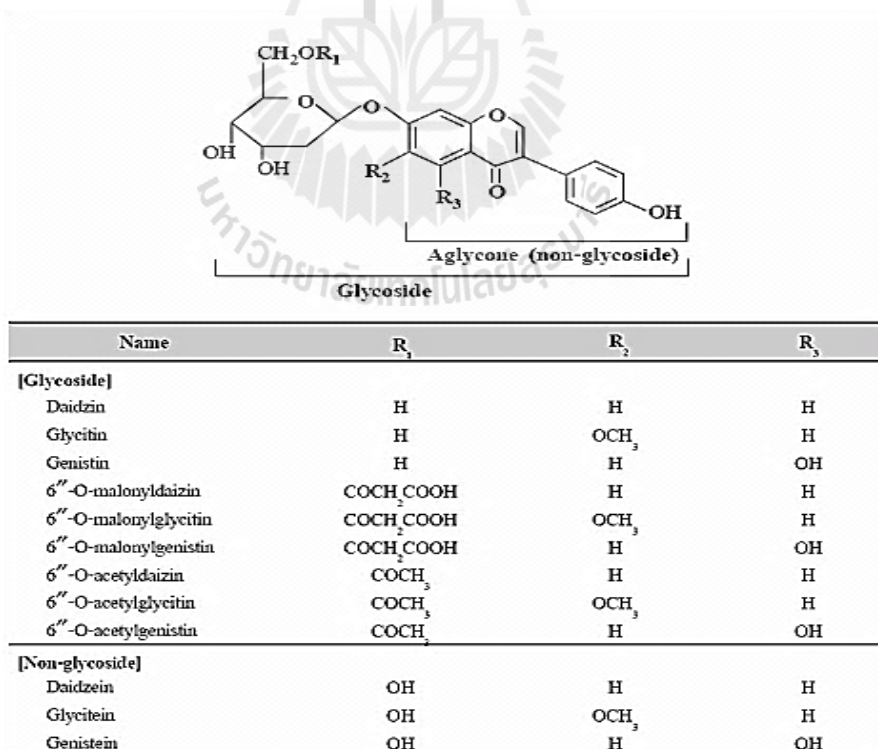
สารประกอบฟีนอลที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด และมีลักษณะสูตร โครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ตั้งแต่กลุ่มที่มีโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก (phenolic acids) ไปจนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ เช่น ลิกนิน (lignin) กลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบคือ สารประกอบพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoid)

2.2.1 ไอโซฟลาโวน

ไอโซฟลาโวน (Isoflavone) คือ กลุ่มของสารประเภท ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ซึ่งเป็นสารรงควัตถุไม่จัดเป็นสารอาหาร เพราะไม่ให้พลังงาน และไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของร่างกาย พบตามธรรมชาติในอาหาร เช่น ถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง เช่น เต้าหู้ เต้าเจี้ยว ถั่วเน่า น้ำเต้าหู้ นอกจากนี้ยังพบในถั่วเมล็ดแห้ง (legume) ชนิดอื่น เช่น ถั่วเขียว ถั่วลันเตา สารไอโซฟลาโวนมีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2.3 และมีอนุพันธ์ 4 กลุ่ม คือ

1. Acetyl glycoside (acetyldaizin, acetylgenistin และ acetylglycintin)
2. Aglycone (daidzein, genistein และ glycitein)
3. Glycoside (daidzin, genistin และ glycitin)
4. Malonyl glycoside (malonyl daidzin, malonyl genistin และ malonyl glycitin)

(Kim et al., 2005)



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของสารไอโซฟลาโวน

แหล่งที่มา: Anon (2001)

ไอโซฟลาโวนสามารถพบได้ในอาหารหลายชนิด ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 2.3 สารไอโซฟลาโวนที่พบมากในถั่วเหลือง คือ เดอิดซีน (daidzein) และเจนิสทิน (genistein) เป็นสารพฤกษเคมี (phytochemicals) ที่มีสรรพคุณดีต่อสุขภาพ เป็นสารโกลโคไซด์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และเป็นไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogen) ซึ่งทำงานคล้ายกับฮอร์โมนเพศหญิง (Estrogen, 17 β -estradiol E2 isoflavones) เนื่องจากมีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกัน ทำให้เดอิดซีนสามารถจับกับโปรตีนตัวรับของเอสโตรเจน (estrogen receptor) ในร่างกายได้ สามารถใช้สารนี้ลดปัญหาที่เกี่ยวข้องกับอาการหมดประจำเดือน (menopausal symptoms) หรืออาจมีผลป้องกันหรือปรับเปลี่ยนภาวะความผิดปกติของร่างกายหรือการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น มะเร็งบางชนิด โรคหัวใจและหลอดเลือด

ตารางที่ 2.3 ปริมาณสารไอโซฟลาโวน ในแหล่งอาหารต่าง ๆ

ชนิดอาหาร	Daidzein (mg/100g.)	Genistein (mg/100g.)	Glycetein (mg/100g.)	Total (mg/100g.)
Roasted soybeans	56.3	86.9	19.3	162.5
Textured vegetable protein	47.3	70.7	20.2	138.2
Green soybean	54.6	72.9	7.9	135.4
Soyflour	22.6	81.0	8.8	112.4
เทมเป้ (Tempeh)	27.3	32.0	3.2	62.5
เต้าหู้ (Tofu)	14.6	16.2	2.9	33.7
Tofu yogurt	5.7	9.4	1.2	16.4
Soy hot dog	3.4	8.2	3.4	15.0
Soy noodle (dry)	0.9	3.7	3.9	8.5

แหล่งที่มา: <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/3170.html>

สารกลุ่มไอโซฟลาโวนที่พบมากในเมล็ดถั่วเหลืองประกอบด้วยสารกลุ่มที่มีน้ำตาลในโมเลกุลที่เรียกว่า สารกลุ่มไกลโคไซด์ (glycoside) คือ เจนิสทิน เดอิดซีน และไกลซิทิน และสารประกอบที่ปราศจากน้ำตาลในโมเลกุลที่เรียกว่า สารกลุ่มอะไกลโคน คือ เจนิสทิน เดอิดซีน และไกลซิทิน โดยมีสัดส่วนของเจนิสทินเป็นปริมาณสูงสุด สารในกลุ่มกลูโคไซด์นี้ เมื่อรับประทานเข้าไปในร่างกายจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยแบคทีเรียในลำไส้ได้เป็นสารในกลุ่มอะไกลโคน (Heinonen, 2002)

Kim et al. (2008) รายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของถั่วเหลืองหมักเกาหลีซึ่งภาษาท้องถิ่นเรียกว่า Chungkookjang และสรุปว่าอาจจะเป็นฤทธิ์ของสารสำคัญหลักในถั่วหมักคือ ไอโซฟลาโวน โดยเฉพาะเจนิสทีน และเดออิสทีน Kwak et al. (2007) พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ Chungkookjang เกิดเนื่องจากการเพิ่มปริมาณของไอโซฟลาโวนในรูปอะไกลโคนระหว่างกระบวนการหมัก ข้อสรุปนี้มีความสัมพันธ์กับงานวิจัยของ Nakajima et al. (2005) ที่ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์ Isoflavone-Enrich Tempeh โดยการเติม soybean germ (hypocotyls) ในกระบวนการหมัก และสามารถวิเคราะห์พบปริมาณของไอโซฟลาโวนในปริมาณที่สูงขึ้นในเทมเป้

2.3 คุณสมบัติทางเคมีของถั่วเหลือง

คุณสมบัติที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันของสารประกอบฟีนอล คือการเป็นสารต้านออกซิเดชัน และสารต้านการกลายพันธุ์ (antimutagens) ซึ่งเกิดจากอนุมูลอิสระ (free radical) และสารประกอบฟีนอลมีสรรพคุณที่ดีต่อสุขภาพในการป้องกันโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะโรคหัวใจขาดเลือด และมะเร็ง

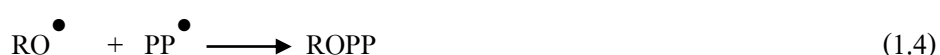
2.3.1 คุณสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชัน

โดยสารประกอบฟีนอลจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่น ๆ โดยใช้ตัวเองเป็นตัวรับอนุมูลอิสระด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็วทำให้ยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ที่มีอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุตั้งปฏิกิริยาต่อไป (Hussain et al., 1987; Rice-Evans et al., 1996)



เมื่อ ROO^\bullet , RO^\bullet คือ free radicals, PPH คือ polyphenolic compound

เมื่อสารประกอบฟีนอลให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลจะค่อนข้างมีเสถียรภาพ ดังนั้นจึงไม่ทำปฏิกิริยาอื่นต่อไป ยิ่งไปกว่านั้นอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลบางชนิดยังคงสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้อีกด้วย จึงทำให้สารประกอบฟีนอลเหล่านั้นลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้ถึง 2 เท่า ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้



สารประกอบฟีนอลที่ถูกรับว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันนั้น สามารถพบได้ในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น เมล็ด (ได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วลิสง เมล็ดฝ้าย ข้าว และงา) ผล (ได้แก่ องุ่น

ส้ม และพริกไทยดำ) ใบ (ได้แก่ ชา และเครื่องเทศต่าง ๆ) และส่วนอื่น ๆ (ได้แก่ มันเทศ และ หัวหอม) และหนึ่งในสารประกอบฟีนอลที่เป็นที่รู้จักกันดีก็คือ flavonoids (ได้แก่ flavones, flavonols, isoflavones, catechins, flavonones และ chalcones) และ cinnamic acid derivatives (caffeic acid, ferulic acid, chlorogenic acid และ อื่น ๆ) โดยสามารถพบได้ในเกือบทุกส่วนของพืช แต่จะมีความแตกต่างกันออกไปในด้านของชนิดและปริมาณ

2.3.2 อนุมูลอิสระ

เป็นสารที่มีอิเล็กตรอนอิสระ (Unpaired electron) อยู่วงนอกของอะตอมหรือโมเลกุล โดยอาจมีจำนวนอิเล็กตรอนอิสระ 1 ตัวหรือมากกว่า 1 ตัว ทำให้ไม่มีความเสถียร มีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยา โดยอนุมูลอิสระจะรับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารอื่น ๆ ใกล้เคียง เพื่อให้ตัวมันเองเสถียรมากขึ้น ในขณะที่เดียวกันก็ชักนำให้สารที่ให้อิเล็กตรอนไปนั้น มีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ และเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นใหม่นี้จะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไปเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ต่อกันไปเรื่อย ๆ (Chapple and Matthews, 2007) ซึ่งหากมีจำนวนอนุมูลอิสระมากเกินกว่าที่กลไกของร่างกายจะกำจัดได้หมด อาจก่อให้เกิดความผิดปกติขึ้นในเซลล์ ผนังเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะต่าง ๆ และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด มะเร็งในบางอวัยวะ โรคข้ออักเสบ เป็นต้น (Eskin and Przybylski, 2001) อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกายปกติมีหลายชนิด เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (Superoxide radical, O_2^{\bullet}) อนุมูลไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical, HO^{\bullet}) อนุมูลไนตริกออกไซด์ (Nitricoxide radical, NO^{\bullet}) อนุมูลเพอร์ออกไซด์ (Peroxyl radical, ROO^{\bullet}) อนุมูลไฮโดรเพอร์ออกไซด์ (Hydroperoxyl radical, HOO^{\bullet}) เป็นต้น (Punchard and Kelly, 1996)

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น แบ่งได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

1. อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย ซึ่งเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมตามปกติในร่างกาย หรือเกิดจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่มีการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมา เพื่อสู้กับเชื้อโรคบางชนิด

2. อนุมูลอิสระที่มาจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ซึ่งได้แก่ สารเคมีและสิ่งปนเปื้อนที่มากับอากาศที่เราหายใจเข้าไป สารเติมแต่งอาหาร สีผสมอาหาร สารเคมีปนเปื้อนในอาหาร สารกันบูด หรือสารเคมี ต่าง ๆ ที่ใช้ในการเกษตร ฯลฯ

จากที่กล่าวมาแล้วว่า อนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกายเอง และในภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรค หรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษ โดยภาวะที่ผิดปกติ จะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจำเป็นที่ร่างกายต้องหาทางป้องกัน สิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตัวเองก็คือ ระบบต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งประกอบไปด้วยสารหรือเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ก็สามารถชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยา

ออกซิเดชันของสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา แต่อย่างไรก็ตามมีบางภาวะที่ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินไปที่ระบบต้านอนุมูลอิสระจะจัดการได้ จะเกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ขึ้นมา ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต และรุนแรงไปถึงการเกิดโรค

ด้วยเหตุนี้มนุษย์เราจึงจำเป็นต้องรับประทานอาหารที่เป็นแหล่งของสารต้านออกซิเดชัน ได้แก่ วิตามินเอ วิตามินซี วิตามินอี สารสกัดจากพืชบางชนิด คุณสมบัติของสารประกอบฟีนอลทางเคมีที่ใช้มีความหมายว่า เป็นตัวกำจัดอนุมูลอิสระ (radical) ซึ่งนั่นคือความสามารถในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอล สำหรับสารประกอบฟีนอล สามารถนิยามความหมายของคำว่า สารต้านออกซิเดชันได้ โดยอาศัยหลักพื้นฐาน 2 ข้อ ดังนี้คือ

1. ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ สารตั้งต้นก็จะสามารถถูกชะลอ หรือสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาได้

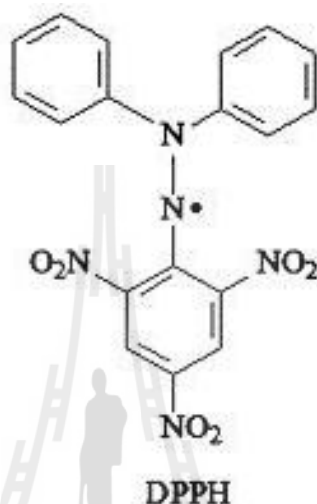
2. อนุมูลอิสระ (radical) ที่ถูกกำจัดออกไปแล้วจะต้องมีความเสถียร (stable)

2.3.3 วิธีการตรวจสอบความสามารถในการเป็นตัวต้านออกซิเดชัน

ปัจจุบันมีวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นตัวต้านออกซิเดชันหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีมีหลักการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันออกไป เช่น การวัดความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ ได้แก่ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH) และ 2, 2-azobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical-scavenging assay (ABTS), การวัดความสามารถในการรีดิวซ์โลหะ ได้แก่ Ferric reducing antioxidant power (FRAP), การวัดความสามารถในการดักจับอนุมูลเพอร์ออกซิด ได้แก่ Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) และ Total radical-trapping antioxidant parameter assay (TRAP) และการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ได้แก่ Thio barbituric acid reactive substances (TBARs) และ Oxidation of low-density lipoprotein (LDLs oxidation) โดยวิธีการวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ ได้แก่ DPPH, ABTS และ FRAP assay ซึ่งวิธีการดังกล่าวใช้หลักการวิเคราะห์บนพื้นฐานเดียวกัน คือการให้อิเล็กตรอนหรืออะตอมของไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ ดังนั้นผลที่ได้จากการวิเคราะห์ดังกล่าวจึงมีความสัมพันธ์กันสูง และเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระในผัก ผลไม้ รวมทั้งสารสกัดจากพืช (Perez-Jimenez and Saura-Calixto, 2006; Huang et al., 2005)

2.3.3.1. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay)

DPPH assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (ภาพที่ 2.4) เป็น stable radical ในตัวทำละลายเมทานอล ซึ่งสารละลายนี้มีสีม่วง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515 nm



ภาพที่ 2.4 สูตร โครงสร้างของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH radical)
แหล่งที่มา: Osman (2011)

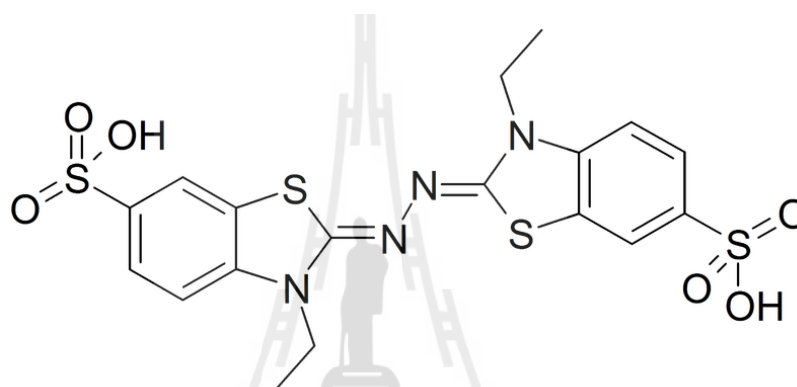
โดย DPPH[•] จะเกิดปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) หรือกับ radical species (R[•]) ได้ ดังสมการที่ (1.5) และ (1.6)



ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงก็จะลดลง ซึ่งจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% effective concentration (EC₅₀) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH[•] เหลืออยู่ 50% หรือรายงานผลเป็น 50% inhibition concentration (IC₅₀) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH[•] ลดลง 50% (Brand- William et al., 1995; Gil et al., 2002)

2.3.3.2. วิธี 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical-scavenging assay (ABTS assay)

ABTS assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (antioxidant capacity) ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ภาพที่ 2.5) เป็น stable radical ใน aqueous solution สารละลายนี้มีสีเขียว ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 734 nm



ภาพที่ 2.5 สูตร โครงสร้างของ 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt

แหล่งที่มา: <http://th.wikipedia.org/wiki/ABTS>

การทำให้เกิด ABTS cation radical ทำได้หลายวิธี ดังนี้

1. ใช้ enzyme reaction คือ ใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันให้เกิด ABTS cation radical เช่น peroxidase, myoglobin เป็นต้น
2. ใช้ chemical reaction โดยใช้สารเคมี เช่น manganese dioxide, potassium persulfate, 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) (ABAP) เป็นต้น



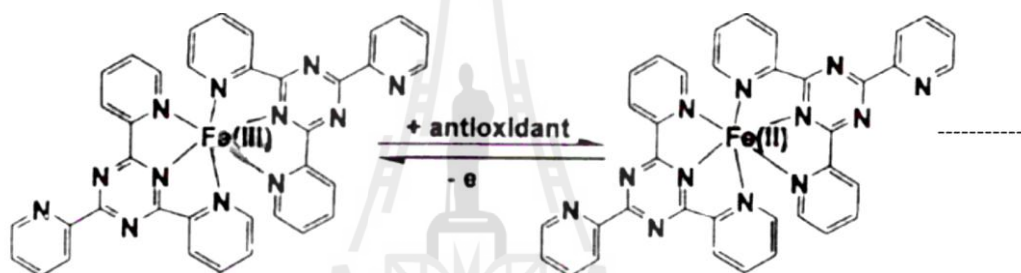
antioxidant (AH) จะทำปฏิกิริยากับ ABTS⁺ ดังนี้



มีผลให้ความเข้มข้นของสารละลายสีเขียวลดลงด้วย โดยจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% effective concentration (EC_{50}) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ $ABTS^+$ เหลืออยู่ 50% หรือรายงานผลเป็น 50% inhibition concentration (IC_{50}) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ $ABTS^+$ ลดลง 50%

2.3.3.3. Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay)

FRAP assay เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยอาศัย ปฏิกิริยารีดอกซ์ และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบเชิงซ้อน คือ เมื่อสารประกอบเชิงซ้อน ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชันแล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ) ที่มีสีม่วงน้ำเงิน ดังสมการ



ภาพที่ 2.6 ปฏิกิริยาของ FRAP assay

วิธี FRAP สามารถติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยวัดค่า absorbance ที่ 593 nm จากนั้นศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันในสารตัวอย่าง โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Ferrous sulfate แล้วรายงานเป็นค่า FRAP value ข้อดีของวิธีนี้ก็คือ เสียค่าใช้จ่ายน้อย สะดวก รวดเร็ว มีขั้นตอนในการทดลองไม่ยุ่งยาก ซ้ำซ้อนและมี reproducibility ดี (Benzie and Strain, 1999; Perez-Jimenez and Saura-Calixto, 2006)

2.3.4 คุณสมบัติทางเคมีของถั่วเหลืองกับการป้องกันโรค

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา ถั่วเหลืองได้รับความสนใจจากวงการแพทย์มากขึ้น เนื่องจากพบว่ามียาที่สำคัญในการป้องกันและรักษาโรคเรื้อรังบางโรคได้ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (U.S. Food and Drug Administration: FDA) ได้อนุญาตให้อ้างผลกระทบต่อสุขภาพของโปรตีนจากถั่วเหลืองในการลดโอกาสเสี่ยงการเกิดโรคหัวใจบนฉลากอาหารซึ่งมีโปรตีนจากถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบได้ อีกบทบาทหนึ่งของถั่วเหลืองที่เพิ่งจะเป็นที่ยอมรับกันมากขึ้น คือ การเป็นอาหารเสริมสำหรับสตรี โดยเฉพาะวัยใกล้หมดประจำเดือนหรือหญิงที่มีอายุ

ตั้งแต่ 40 ปีขึ้นไป เนื่องจากพบว่าในถั่วเหลืองนั้นมีสารธรรมชาติกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่ประกอบด้วยสารสำคัญที่มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเพศหญิงหรือที่เรียกกันว่า ไฟโตเอสโตรเจน ได้แก่ ไอโซฟลาโวน ซึ่งจะพบมากในพืชตระกูลถั่ว โดยเฉพาะถั่วเหลือง ไอโซฟลาโวนที่พบในถั่วเหลืองนั้น เป็นสารกลุ่มที่มีโครงสร้างคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน จึงสามารถไปจับกับตัวรับเอสโตรเจนในร่างกายได้ สารในกลุ่มนี้ที่พบมากคือ เจนิสทิน เดอเอสซิน และคูเมสโตรล coumestrol (Johnson and Williamson, 2003) ซึ่งปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยกันมากถึงคุณสมบัติของสารเหล่านี้ต่อร่างกาย

2.3.4.1 ถั่วเหลืองกับโรคไต

สำหรับผู้ที่เป็นโรคไต ที่ต้องจำกัดการรับประทานโปรตีนและคอเลสเตอรอล แต่โปรตีนจากถั่วเหลืองเป็นอาหารที่ผู้ป่วยโรคไตสามารถรับประทานทดแทนโปรตีนจากเนื้อสัตว์ได้ โดยพบว่าการทำงานของไตดีขึ้น และยังช่วยลดการเกิดโรคนิ่วในไตได้อีกด้วย (Johnson and Williamson, 2003) และถั่วเหลืองทำให้โปรตีนในปัสสาวะลดลงและลดความเสียหายของโครงสร้างและการทำงานของไตทั้งในสัตว์ทดลองและคน (Ranich et al., 2001) ยังไม่มีการการศึกษาระยะยาวเพื่อยืนยันว่าอาหารที่ใช้โปรตีนถั่วเหลืองมีผลทำให้การทำงานของไตดีขึ้น แต่พบว่าอาหารที่ใช้โปรตีนถั่วเหลือง พบการไหลเวียนของเลือดในไตลดลง อัตราการกรองของไตลดลง และการกำจัดโปรตีนอัลบูมินลดลง เมื่อเทียบกับอาหารที่ใช้โปรตีนจากสัตว์ ซึ่งการเกิดเหล่านี้เกิดขึ้นในระยะเวลาสั้น ๆ (Kontessis et al., 1990)

2.3.4.2 ถั่วเหลืองกับโรคเบาหวานและอ้วน

การบริโภคโปรตีนจากพืชตระกูลถั่วอาจมีประโยชน์ต่อการลดน้ำหนักสำหรับคนอ้วนเพราะโปรตีนช่วยเพิ่มความอิ่ม (Rolls, 1995) โยอาหารจากถั่วเหลือง สามารถช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวานได้ และถั่วเหลืองเป็นพืชที่ช่วยรักษาระดับน้ำตาลในเลือดได้ดีที่สุด (Johnson and Williamson, 2003) อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Polkowski and Mazurek (2000) พบว่าไฟโตเอสโตรเจนช่วยลดน้ำหนักสำหรับคนอ้วนเกิดจากกลไกของ neuroendocrine ซึ่งควบคุมโดยการส่งสัญญาณของเลปติน (leptin) และอินซูลิน (insulin)

2.3.4.3 ถั่วเหลืองกับโรคหลอดเลือดและหัวใจ

เนื่องจากระดับคอเลสเตอรอลในเลือดนั้น มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด ซึ่งพบว่าในสตรีที่มีภาวะการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนนั้น มีโอกาสเสี่ยงต่อภาวะระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูง เนื่องจากคอเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นตัวหนึ่งในการสร้างฮอร์โมนและเมื่อรังไข่หยุดสร้างฮอร์โมนจะมีผลทำให้มีคอเลสเตอรอลเหลือ จึงส่งผลให้มีระดับคอเลสเตอรอลสูงได้ (Johnson and Williamson, 2003) นอกจากนี้ยังพบว่าสารกลุ่มไอโซฟลาโวน เช่น เจนิสทิน เป็นสารสำคัญในถั่วเหลืองที่มีผลต่อการลด LDL และเพิ่ม HDL ช่วยป้องกันภาวะ-

หลอดเลือดแข็งตัวและลดการจับตัวของเกล็ดเลือดที่เป็นเหตุให้เกิดภาวะการอุดตันของหลอดเลือดได้ (Merz-Demlow et al., 2000)

กรดไขมันไม่อิ่มตัวในถั่วเหลืองสามารถช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลได้ (Ransley et al., 2001) และจากการศึกษาพบว่าถั่วเหลืองมีฤทธิ์ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้ถึง 15-20% โดยได้ทำการทดลองในคนไข้ที่มีระดับคอเลสเตอรอลมากกว่า 300 เนื่องจากพันธุกรรม และจากการศึกษาพบว่า ผู้ที่รับประทานอาหารที่มีโปรตีนจากถั่วเหลือง 25 กรัมต่อวัน เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มตัวอย่างมีระดับไขมันเลว (LDL) ลดลงร้อยละ 18 และมีระดับไขมันดี (HDL) ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 20 (Greaves et al., 1997)

โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาและสมาคมแพทย์โรคหัวใจในสหรัฐให้คำแนะนำว่าให้รับประทานโปรตีนจากถั่วเหลืองวันละ 25 กรัม จะช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด และช่วยป้องกันโรคหัวใจขาดเลือด (Johnson and Williamson, 2003)

2.3.4.4 ถั่วเหลืองกับโรคมะเร็ง

เนื่องจากสารกลุ่มไอโซฟลาโวนนี้มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นจึงเชื่อว่าจะมีผลในการป้องกันความเสี่ยงของร่างกาย ชะลอความแก่ และมีการป้องกันการเกิดมะเร็งหรือเนื้องอกต่าง ๆ ได้ (Johnson and Williamson, 2003) โดยได้มีผู้ทำการทดลองเกี่ยวกับเรื่องนี้ไว้มากมาย จากการศึกษพบว่าสารเจนิสทิน ซึ่งเป็นสารกลุ่มไอโซฟลาโวนที่พบในถั่วเหลืองนั้น จะช่วยลดความเสี่ยงในการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ และมะเร็งต่อมลูกหมากได้ นอกจากนี้พบว่าสารกลุ่มไอโซฟลาโวนนั้น ยังออกฤทธิ์ยับยั้งเอสโตรเจนในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์มะเร็ง ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดไปเลี้ยงเซลล์มะเร็งได้ (Messina et al., 1994; Messina, 1999; Messina and Bennink, 1998) จากการศึกษพบว่า ไอโซฟลาโวนสามารถช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งในสัตว์ทดลองได้ (Adlercreutz et al., 1992)

สารไฟโตเอสโตรเจนช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ ป้องกันการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูก และมะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมลูกหมาก และพบว่าผู้ที่กินซูปเปอร์เจียวมากจะมีอัตราเสี่ยงต่อโรคมะเร็งต่ำ มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งเพียง 1 ใน 3 ของผู้ที่ไม่ได้รับประทาน ผู้ที่กินเต้าหู้มากจะมีอัตราเสี่ยงต่อโรคมะเร็งกระเพาะอาหารต่ำ ผู้ที่กินถั่วเหลืองมากกว่า 5 กิโลกรัมต่อปี จะมีอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหารลด 40% และผู้ชายที่กินเต้าหู้มากกว่า 5 ครั้งต่อสัปดาห์ จะมีอัตราเสี่ยงต่อโรคมะเร็งต่อมลูกหมากเป็นครึ่งหนึ่งของผู้ชายที่กินเต้าหู้น้อยกว่า 1 ครั้งต่อสัปดาห์ ผู้ที่รับประทานอาหารที่ประกอบด้วยถั่วเหลืองน้อยกว่า 1 ครั้งต่อสัปดาห์จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งเต้านม 2 เท่า และมะเร็งปอดเป็น 3.5 เท่าของผู้ที่กินอาหารที่ประกอบด้วย

ถั่วเหลืองทุกวัน การบริโภคอาหารที่มีโปรตีนจากถั่วเหลืองจะช่วยลดความเสี่ยงของโรคมะเร็งได้ถึง 30% (Johnson and Williamson, 2003; Ransley et al., 2001)

2.3.4.5 ถั่วเหลืองกับอาการของวัยหมดประจำเดือน

ไอโซฟลาโวนช่วยปรับสภาพของฮอร์โมนในสตรีให้สมดุล ช่วยลดความรู้สึกไม่สบายตัว อาการร้อนวูบวาบในระยะหมดประจำเดือนของสตรี รวมไปถึงอาการหงุดหงิด เหงื่อแตก ช่องคลอดแห้ง อารมณ์แปรปรวน หรือมีอาการทางผิวหนังและเยื่อบุบริเวณช่องคลอดแห้งหรืออักเสบ และช่วยลดอาการผิดปกติของหญิงวัยหมดประจำเดือนได้ (Ransley et al., 2001) มีการศึกษาในสตรีชาวญี่ปุ่นที่บริโภคผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการหมัก (นัตโตะ) พบว่ามีอาการร้อนวูบวาบต่ำกว่าสตรีที่ไม่ได้บริโภค นัตโตะ (Nagata et al., 1999) และได้มีการศึกษาในสตรีวัยหมดประจำเดือน 58 คนที่บริโภคถั่วเหลืองเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์พบว่าอาการความผิดปกติของสตรีวัยหมดประจำเดือน โดยเฉพาะอาการร้อนวูบวาบ ลดลง 40 % เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้บริโภคถั่วเหลือง (Murkies et al., 1995)

2.3.4.6 ถั่วเหลืองกับโรคกระดูกพรุน

มีการศึกษาพบว่าถั่วเหลืองช่วยป้องกันการขาดแคลเซียม ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของกระดูก (Anderson, 1990) ช่วยลดความรุนแรงของโรคกระดูกพรุน (Kao and P'eng, 1995) ช่วยลดการสลายของกระดูกและป้องกันโรคกระดูกพรุน (Arjmandi et al., 1996) และมีการศึกษาของ Potter et al. (1998) ในหญิงวัยหมดประจำเดือนที่ได้รับโปรตีนถั่วเหลืองมีไอโซฟลาโวนในปริมาณ 2.25 มิลลิกรัม/กรัมของโปรตีนถั่วเหลือง เป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่าความหนาแน่นของกระดูกสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมของหญิงวัยหมดประจำเดือนที่ไม่ได้รับโปรตีนถั่วเหลืองซึ่งมีไอโซฟลาโวนในปริมาณสูง

ในสตรีวัยหมดประจำเดือนที่ได้รับถั่วเหลืองที่มีไอโซฟลาโวน พบว่าความหนาแน่นของกระดูกสูงขึ้นทั้งกระดูกสันหลังและสะโพก (Mei et al., 2001) เป็นไปได้ว่าอาหารที่มีไอโซฟลาโวนสูงอาจช่วยให้อัตราการลดลงของฮอร์โมนเอสโตรเจนลดลง ซึ่งส่งผลให้อัตราการหมุนเวียนกระดูกลดลงจึงลดความเสี่ยงในการเกิดโรคกระดูกพรุน (Valtuna et al., 2003) ไฟโตรเอสโตรเจนสามารถใช้เป็นยาซึ่งออกฤทธิ์จับกับ estrogen receptor ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์คล้ายกับยาในกลุ่ม selective estrogen receptor modulators (SERM) (Brezezinski and Debi, 1999) และยังมีงานวิจัยพบว่าไฟโตรเอสโตรเจนมีกลไกการออกฤทธิ์คล้ายกับยาในกลุ่ม biphosphonate ซึ่งยากลุ่มนี้จะไปยับยั้งการสูญเสียแคลเซียมของกระดูก (Setchell, 2001)

ทั้งนี้กลไกการทำงานของไฟโตรเอสโตรเจนต่อกระดูกยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน แต่พบว่ามีผลต่อกลไกการยับยั้งการสลายกระดูกและส่งเสริมการสร้างกระดูก (Fanti et al., 1998; Ishimi et al., 1999; Picherit et al., 2000)

2.4 วัยหมดประจำเดือน (Menopause)

วงจรการมีประจำเดือนเกิดจากอิทธิพลของ gonadotropin releasing hormone (GnRH) จาก hypothalamus มีผลกระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้าให้สร้าง follicle-stimulating hormone (FSH) และ luteinizing hormone (LH) ออกมา ทำให้ ovarian follicle ภายในรังไข่ มีการเจริญเติบโตและสร้าง estrogen และ progesterone ออกมา ซึ่ง hormone จากรังไข่ทั้งสองชนิดจะไปออกฤทธิ์ที่ผนังชั้นในสุดของมดลูก (endometrium) ให้มีการเปลี่ยนแปลงเตรียมพร้อมเพื่อรับการฝังตัวของตัวอ่อน หรือถ้าหากไม่ได้รับการฝังตัวผนังชั้น endometrium ก็จะหลุดลอกออกมากลายเป็นเลือดประจำเดือน (Shawky, 1999) การกระตุ้นของฮอร์โมน FSH จากต่อมใต้สมองส่วนหน้าเข้าสู่กระแสเลือด โดยฮอร์โมน FSH มีผลทำให้ไข่สุกและกระตุ้นให้รังไข่สร้างฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อมดลูก โดยกระตุ้นให้ผนังชั้นในสุดของมดลูก (endometrium) ค่อย ๆ หนาตัวขึ้นและมีการขยายตัวของต่อมเล็ก ๆ และเส้นเลือด ฮอร์โมนเอสโตรเจนจะมีปฏิกริยาย้อนกลับไปกระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้า ถ้าระดับของเอสโตรเจนในเลือดเพิ่มขึ้น การผลิตฮอร์โมน FSH ก็จะลดลง (Anne et al., 2010)

เมื่อความเข้มข้นของฮอร์โมนเอสโตรเจนสูงขึ้น ต่อมส่วนไฮโปทาลามัสจะกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองส่วนหน้าหลั่งฮอร์โมน LH ซึ่งกระตุ้นให้มีการตกไข่ ทำให้ไข่ที่สุกเต็มที่แล้วหลุดออกมาจากรังไข่ หลังจากไข่หลุดออกมาจากรังไข่แล้ว บริเวณที่ไข่หลุดออกมาจะประกอบด้วยเซลล์เล็ก ๆ จำนวนมาก เรียกว่า คอปัสลูเทียม (corpus luteum) ซึ่งจะกลายเป็นต่อมเล็ก ๆ ทำหน้าที่ในการสร้างฮอร์โมน เมื่อถูกกระตุ้นจากฮอร์โมน LH แล้ว คอปัสลูเทียมจะเริ่มหลั่งฮอร์โมนที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ โปรเจสเตอโรน (progesterone) ออกมาพร้อมกับเอสโตรเจน (estrogen) ซึ่งฮอร์โมนเหล่านี้จะกระตุ้นให้ผนังมดลูกหนาตัวขึ้น เพื่อให้อาหารไปเลี้ยงตัวอ่อน ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะส่งผลย้อนกลับไปให้ไฮโปทาลามัสให้ยับยั้งการผลิตฮอร์โมน GnRH อันจะมีผลทำให้ปริมาณของ FSH และ LH ลดลง (Yewade et al., 2009) ถ้าไข่ไม่ได้รับการผสม คอปัสลูเทียม (corpus luteum) จะฝ่อและหยุดการผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และระดับของเอสโตรเจนในกระแสเลือดจะลดต่ำลง ทำให้ผนังมดลูกด้านในที่หนาขึ้นจะหลุดลอกซึ่งมีทั้งเซลล์เนื้อเยื่อ ของเหลว และเลือดจะไหลออกมาทางช่องคลอด ในช่วงนี้ระดับของ เอสโตรเจนจะยังคงลดลงเรื่อย ๆ และจะมีระดับต่ำมากเมื่อจะมีประจำเดือนรอบใหม่เกิดขึ้น โดยระดับของเอสโตรเจนที่ต่ำลงจะไปกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองส่วนหน้าผลิต FSH

สตรีวัยหมดประจำเดือนจะมีอายุอยู่ในช่วง 45-59 ปี จะมีการเปลี่ยนแปลงของทางร่างกาย และจิตใจ ที่เป็นไปตามธรรมชาติจากการลดลงของฮอร์โมนเอสโตรเจน ในสตรีวัยทองมีจำนวนถุงไข่ลดลง ทำให้ระดับเอสโตรเจนลดลงอย่างไม่สม่ำเสมอเป็นผลให้ประจำเดือนในช่วงก่อนหมดประจำเดือน 2 ปี เริ่มไม่สม่ำเสมอ มาบ้าง-ขาดบ้าง มาบ่อย-มามาก และไม่มีการตกไข่ ดังนั้นเมื่อจำนวนถุงไข่ลดลง ฮอร์โมนเอสโตรเจนลดลงส่งผลให้โปรเจสเตอโรน ลดลงด้วย อาการต่าง ๆ ที่

ตามมาอย่างชัดเจนก็คือ เมื่อผู้หญิงผ่านเลยวัย 30 ปีแล้ว ความเจริญพันธุ์จะเริ่มลดลงเพราะว่ามีไข่ที่ยังเหลืออยู่ในรังไข่น้อยลง ปริมาณการผลิตฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนก็ลดลงทำให้ไข่มีโอกาสปฏิสนธิได้น้อยลง (Heidi, 2008) ช่วงเวลาที่ประจำเดือนจะหยุดมาอย่างถาวรจะเริ่มมาไม่เป็นเวลาแน่นอน ตามกระแสการขึ้นลงของฮอร์โมนเพศ เราเรียกระยะนี้ว่า ระยะก่อนประจำเดือนหมด (perimenopause) (Shawky, 1999) การที่ฮอร์โมนเพศมีการผลิตที่ไม่คงที่แน่นอน ก่อให้เกิดอาการตามมาหลายอย่าง โดยอาการที่พบในระยะแรกคือ เช่น ประจำเดือนมาไม่เป็นเวลา นอนไม่ค่อยหลับ อารมณ์แปรปรวน จากนั้นเอสโตรเจนจากรังไข่ลดลงมาก จนไม่เพียงพอที่จะกระตุ้น เยื่อบุโพรงมดลูกให้เจริญเติบโตจึงทำให้หมดประจำเดือน อาการที่เกิดขึ้นคือ อาการร้อนวูบวาบที่เกิดขึ้นอย่างกะทันหัน ผิวหนังบริเวณส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย โดยเฉพาะแก้ม ศีรษะ คอ และหน้าอกจะมีเหงื่อออก รู้สึกร้อนขึ้น และเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะสืบพันธุ์และทางเดินปัสสาวะส่วนล่าง ทำให้เกิดการท่อเหี่ยวของอวัยวะต่าง ๆ มดลูกและผนังช่องคลอดจะหย่อนมากขึ้น เยื่อบุช่องคลอดแห้งเนื่องจากผนังช่องคลอดบางตัวลง ความชุ่มชื้นน้อยลง ปัจจัยนี้ทำให้เกิดอาการเจ็บขณะร่วมเพศ และอาจทำให้ช่องคลอดติดเชื้ออักเสบง่ายขึ้น เยื่อบุท่อนำไข่จะบางทำให้รู้สึกแสบเวลาปัสสาวะ อาการปัสสาวะขัด (Andrea, 2007) ในผู้สูงอายุซึ่งหมดประจำเดือนมานานจะมีปัญหาสุขภาพที่สำคัญคือ โรคกระดูกพรุนและโรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด (Brandi, 1999) หญิงวัยหมดประจำเดือนมีกระดูกพรุนมากขึ้นก็เพราะฮอร์โมนเพศเอสโตรเจนมีระดับลดลง เอสโตรเจนตามปกติจะช่วยในกระบวนการสร้างกระดูกใหม่ทดแทนกระดูกเก่าที่สลายต่อไป โดยกระบวนการดังกล่าวจะถึงจุดสูงสุดเมื่อผู้หญิงมีอายุ 25-30 ปี หลังจากนั้นระดับเอสโตรเจนเริ่มลดลง ร่างกายสูญเสียกระดูกเร็วขึ้นกว่าการสร้างทดแทน เมื่ออายุมากขึ้นจะพบว่ามวลกระดูกสูญเสียไป 30-50% (Shawky, 1999)

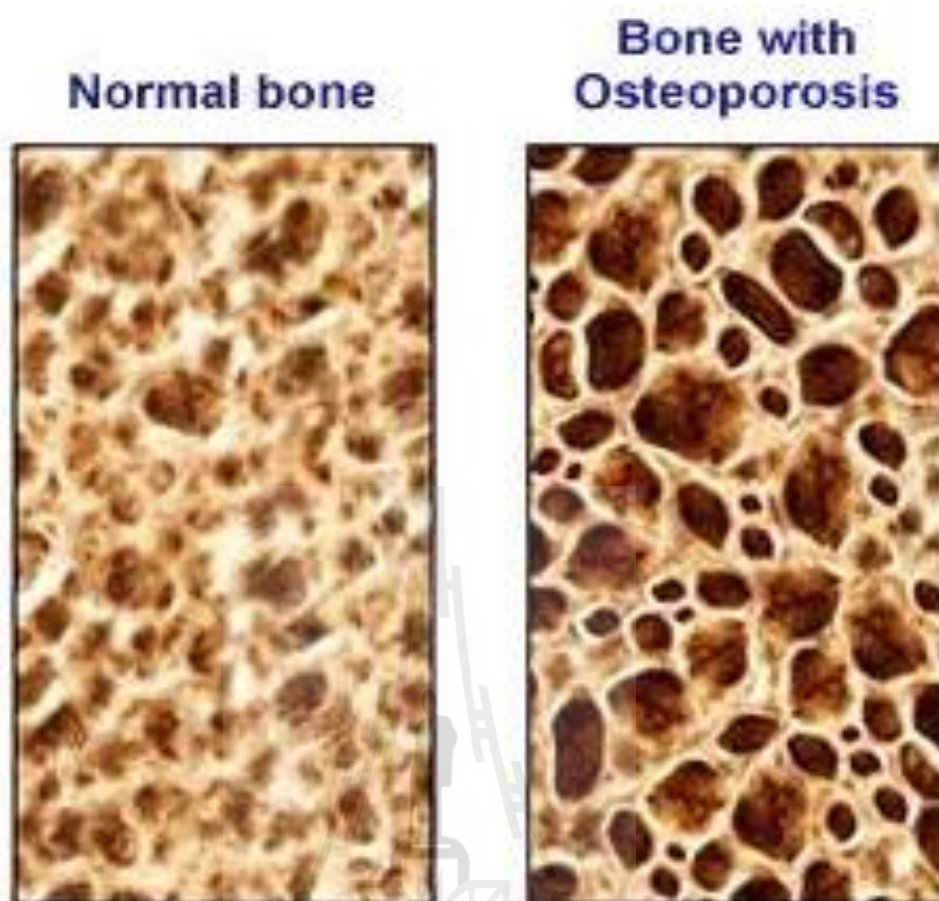
2.4.1 โรคกระดูกพรุน (Osteoporosis)

กระดูกประกอบด้วยโครงข่ายของคอลลาเจน ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความยืดหยุ่น และมีส่วนของเกลือแร่ (mineral) แคลเซียมฟอสเฟต และแคลเซียมคาบอโรเนต เข้าไปยึดเกาะกับคอลลาเจน ทำให้เกิดความแข็งแรงของโครงข่ายเนื้อกระดูกซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่สามารถเติบโต มีการหมุนเวียนซ่อมสร้าง มีการสลาย (bone resorption) และการสร้างใหม่ (bone formation) ทดแทนกันตลอดเวลา ภาวะทุรอนของกระดูกเกิดเนื่องจากกระดูกมีการสลายมากกว่าการสร้างใหม่ กระดูกจะมีการสร้างอย่างรวดเร็วในวัยเด็กและวัยรุ่น ผลก็คือกระดูกจะใหญ่และแข็งแรงขึ้นจนกระทั่งถึงจุดสูงสุด เรียกว่า peak bone mass จากนั้นกระดูกจะมีการสลายอย่างช้า ๆ โดยมีอัตราการสลายมากกว่าอัตราการสร้างกระดูกและภาวะนี้จะเกิดอย่างมีอัตราเร่งที่เร็วขึ้นเมื่อเข้าสู่วัยหมดประจำเดือนในช่วงปีแรก ๆ และนำไปสู่ภาวะกระดูกบาง (osteopenia) และโรคกระดูกพรุน (osteoporosis) ตามมา (NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, 2001) จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (WHO) โรคกระดูกพรุนเป็นโรคที่เป็นปัญหาด้านสุขภาพอันดับที่ 2

รองจากโรคของระบบหัวใจและหลอดเลือด ข้อมูลทั่วโลกระบุว่า ประชากร 1 ใน 3 ของผู้หญิง และ 1 ใน 8 ของผู้ชาย ที่มีอายุ 50 ปีขึ้นไปมีความเสี่ยงที่จะเกิดภาวะกระดูกหักจากโรคกระดูกพรุน (Osteoporotic fracture) ยิ่งไปกว่านั้นมีการคาดการณ์ว่าจำนวนผู้ป่วยที่มีการหักของกระดูกสะโพก (Hip fracture) จะเพิ่มขึ้นจาก 1.7 ล้านคน ในปี ค.ศ. 1990 เป็น 6.3 ล้านคนในปี ค.ศ. 2050 เนื่องจากประชากรโลกมีอายุยืนมากขึ้น

โรคกระดูกพรุนเป็นปัญหาสุขภาพหลักในสตรีหลังวัยหมดประจำเดือน เนื่องจากจะมีการลดลงของระดับเอสโตรเจน ซึ่งเอสโตรเจนมีส่วนสำคัญทำให้กระดูกแข็งแรง เมื่อระดับเอสโตรเจนลดลง เนื้อกระดูกจะมีการสลายมากกว่าการสร้าง (Nielsen et al., 2004) เมื่อเนื้อกระดูกมีการสลายมากกว่าการสร้าง ส่งผลให้ความหนาแน่นของมวลกระดูกลดลงและความเสี่ยงต่อการแตกหักของกระดูกสูงขึ้น (Garnero et al., 2000) โรคกระดูกพรุน เป็นโรคที่มีลักษณะมวลกระดูกต่ำ ทำให้เกิดการสึกหรอของเนื้อเยื่อของกระดูกทำให้ความแข็งแรงของกระดูกลดลง ทำให้ผู้นั้นเสี่ยงต่อการเกิดกระดูกหักเพิ่มขึ้น โดยตำแหน่งของ กระดูกหักที่พบบ่อยที่สุด คือ ข้อมือ กระดูกสันหลัง และกระดูกสะโพก (Legrand, 2001) โดยความแข็งแรงของกระดูกนี้เกิดจากสองปัจจัยรวมกัน คือ ความหนาแน่นของกระดูก และคุณภาพของกระดูก ซึ่งองค์การอนามัยโลกได้กำหนดหลักเกณฑ์การวินิจฉัยโรคกระดูกพรุนโดยอาศัยการวัดค่าความหนาแน่นของมวลกระดูก (Bone mineral density: BMD) ซึ่งตรวจโดยใช้เครื่อง Dual Energy X-ray Absorptiometer การวัด BMD สามารถวัดได้ที่ตำแหน่งต่าง ๆ เช่น กระดูกบริเวณสะโพก กระดูกสันหลัง เป็นต้น โดยถ้าตรวจพบความหนาแน่นกระดูกลดลงกว่าความหนาแน่นกระดูกปกติที่สูงที่สุด มากกว่า 2.5 เท่าของค่าแปรปรวน ถือว่าเป็นโรคกระดูกพรุน (Shawky, 1999) ส่วนคุณภาพของกระดูกนั้นประกอบด้วยคุณลักษณะใหญ่ ๆ 4 ประการคือ โครงสร้างภายในของกระดูก การหมุนเวียนของกระดูก การสะสมการสลายของกระดูก และการสะสมแร่ธาตุของกระดูก

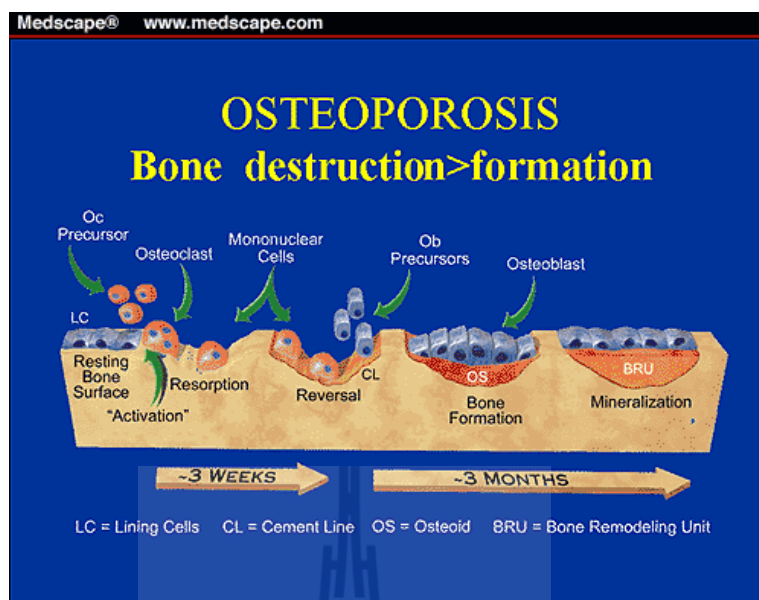
โครงสร้างภายในของกระดูก (bone microarchitecture) มีลักษณะสานต่อกันเป็นร่างแหจากการสานต่อกันเช่นนี้ทำให้มีความสามารถรับแรงกดอัดได้อย่างมาก จากการทดลองของ Silva et al. (1997) ได้ศึกษาถึงความสามารถรับแรงอัดของกระดูก พบว่าหากกระดูกมีค่ามวลกระดูกลดลงเท่า ๆ กัน คือ ร้อยละ 10 โดยขึ้นหนึ่งไปลดที่ความหนาของเสี้ยนกระดูก (decrease trabecular thickness) ขณะอีกขึ้นหนึ่งไปลดจำนวนเสี้ยนกระดูกที่เชื่อมขวาง (decrease cross - trabeculae or decrease trabecular number) พบว่าความสามารถในการรับแรงอัดของกระดูกที่ลดความหนาจะลดลงร้อยละ 20 ในขณะที่กระดูกที่ลดจำนวนเสี้ยนกระดูกที่เชื่อมขวางความสามารถในการรับแรงอัดลดลงถึงร้อยละ 70 ดังนั้นเสี้ยนกระดูกเชื่อมขวางมีความสำคัญอย่างมากต่อความแข็งแรงของกระดูก



ภาพที่ 2.7 โครงสร้างภายในของกระดูกปกติ และกระดูกพรุน

แหล่งที่มา: <http://lymediseaseguide.org/lyme-disease-osteoporosis>

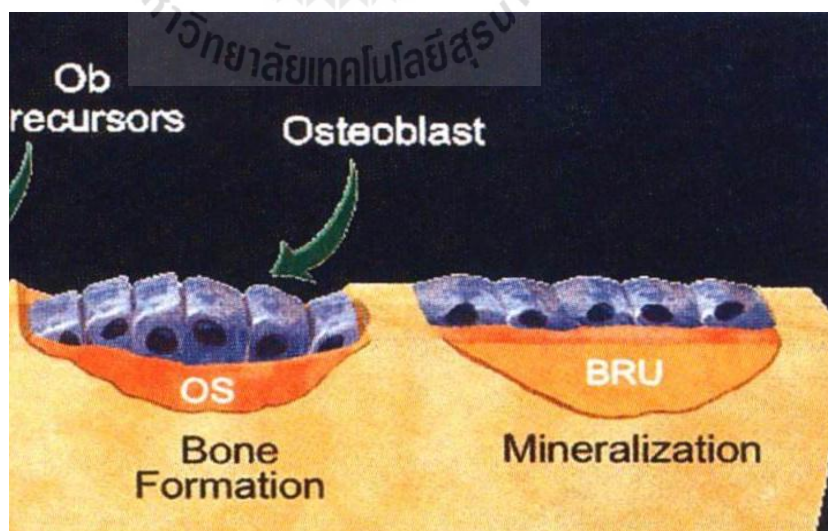
การหมุนเวียนของกระดูก (bone turnover) แสดงดังภาพที่ 2.8 โดยการหมุนเวียนของกระดูกเกิดจากเซลล์สร้างกระดูกที่อยู่บริเวณผิวกระดูกจะปล่อยสารเคมีออกมากระตุ้นให้เซลล์สลายกระดูก (osteoclast) ชนิดที่ไม่มีฤทธิ์กลายเป็นเซลล์สลายกระดูกที่มีฤทธิ์ เกิดการย่อยสลายกระดูกจนกลายเป็นแอ่งเว้าลงของกระดูก จากนั้นเซลล์สลายกระดูกจะหายไป จะมีเซลล์ใหม่เข้ามาในแอ่งเว้าของกระดูกแทน และทำการปรับแต่งกระดูกที่ถูกเซลล์สลายกระดูกกินให้มีผิวเรียบขึ้น เซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) จะเข้ามาในบริเวณแอ่งเว้าที่ถูกตกแต่งให้เรียบแล้วและทำการสร้างกระดูก โดยมีแร่ธาตุเข้ามาสะสมในบริเวณที่มีการสร้างกระดูก จากนั้นจะไม่มีทั้งการสร้างและการสลายกระดูก กระดูกจะอยู่ในภาวะสงบนิ่ง (Chrischilles et al., 1991)



ภาพที่ 2.8 ขั้นตอนการสร้างและสลายของกระดูก

แหล่งที่มา: <http://www.medscape.org/viewarticle>

การสะสมการสลายของกระดูก (Damage accumulation or micro fracture) กระดูกใดที่ยังมีการสลายกระดูกมาก หลุมบ่อของกระดูกจะพบอยู่ทั่วไปตามผิวของกระดูก ทำให้ความเครียดต่อกระดูกเพิ่มขึ้น (increase stress riser) และทำให้กระดูกมีความเสี่ยงต่อการหักเพิ่มขึ้น (Lu et al., 2004)



ภาพที่ 2.9 การสะสมแร่ธาตุของกระดูก

แหล่งที่มา: <http://www.health2click.com>

การสะสมแร่ธาตุของกระดูก (Bone mineralization) แสดงดังภาพที่ 2.9 ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายของการสร้างกระดูก ในขั้นตอนนี้จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยพบว่า 3 ใน 4 ของการสะสมแร่ธาตุในกระดูก จะเกิดขึ้นภายในเวลา 2-3 วัน แต่พบว่าอีก 1 ใน 3 ต้องใช้เวลาหลายเดือนกว่าจะเสร็จสมบูรณ์ หลังจากสามเดือนจะไม่พบ osteoid ในลักษณะที่ไม่มี การสะสมแร่ธาตุอีกต่อไป แต่จะพบการสะสมของแร่ธาตุเพิ่มเติมและการปรับสภาวะของผลึกให้สมบูรณ์ ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของค่าความหนาแน่นของแร่ธาตุในกระดูกอีกประมาณร้อยละ 10-20 ภายใน 1 หรือ 2 ปี (Michael, 2003)

การสลายกระดูกจะใช้เวลาประมาณ 3-4 สัปดาห์ ในขณะที่การสร้างกระดูกใช้เวลาประมาณ 3-4 เดือน ดังนั้นหากมีอัตราการหมุนเวียนของกระดูกสูงจะทำให้มีหลุมและบ่อของกระดูกเพิ่มขึ้น ทำให้กระดูกมีความเครียดเพิ่มขึ้น และนำไปสู่ภาวะของ microfracture และมีความเสี่ยงต่อกระดูกหัก (Silva et al., 1997)

2.4.2 การรักษาโรคกระดูกพรุนในสตรีวัยหมดประจำเดือน

ถึงแม้ว่าฮอร์โมนจะมีผลลดอัตราการหักของกระดูกได้ดี แต่ก็พบว่าฮอร์โมนมีผลข้างเคียงหลายอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งอันตรายของการใช้ในระยะยาว เนื่องจากที่ผ่านมามีการใช้ฮอร์โมนในระยะยาวค่อนข้างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการใช้เพื่อหวังผลในการป้องกันและรักษาโรคกระดูกพรุน จำเป็นต้องให้การรักษาหลายปี เพื่อที่จะเพิ่มมวลกระดูกและป้องกันกระดูกหักและพบว่าเมื่อหยุดยาความหนาแน่นของกระดูกจะลดลงอย่างรวดเร็วเท่ากับก่อนได้รับการรักษาด้วยฮอร์โมนทดแทน (Rossouw et al., 2002) ในการรักษาในระยะยาวนี้จากการศึกษาของ WHI พบว่าการให้ยาฮอร์โมนในระยะยาวมีผลเสียโดยรวมมากกว่าผลดี ผลเสียนั้นได้แก่ จากการศึกษาในกลุ่มที่ใช้ฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสโตรเจน (conjugated equine estrogen 0.625 mg และ medroxy progesterone acetate 2.5 mg ต่อวัน) พบการเพิ่มความถี่ของการเกิดมะเร็งเต้านมในอัตรา 8 รายต่อ 10,000 รายของสตรีที่ใช้ฮอร์โมนในระยะเวลา 1 ปี และเพิ่มความถี่ในการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ ในอัตรา 7 รายต่อ 10,000 รายของสตรีที่ใช้ฮอร์โมนในระยะเวลา 1 ปี ซึ่งเป็นอัตราเสี่ยงที่ไม่มากนัก ส่วนในกลุ่มที่ได้รับการตัดมดลูกแล้วได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนอย่างเดียวในระยะเวลา 8 ปี ไม่เพิ่มความถี่ในการเกิดมะเร็งเต้านม แต่ความเสี่ยงในการเกิดโรคหลอดเลือดและหัวใจยังคงอยู่ (Lindsay et al., 2000)

จากการศึกษาของ WHI สรุปว่าเพิ่มความถี่การเกิดต่อมะเร็งเต้านมเล็กน้อย และความเสี่ยงจะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้มากกว่า 5 ปี และการใช้ฮอร์โมนในระยะยาวเพิ่มความถี่ในการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ ได้แก่ ภาวะที่สมองขาดเลือดไปเลี้ยง เนื่องจากหลอดเลือดตีบอุดตัน (stroke), โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน (heart attack) และเกล็ดเลือดจับตัวเป็นลิ่มหรือก้อน (blood clots) โดยเพิ่มความถี่มากกว่าผู้ที่ไม่ได้รับประทานฮอร์โมน 7 รายต่อ 10,000 รายของสตรีที่ใช้

ฮอร์โมนในระยะเวลา 1 ปี ตามการศึกษาของ WHI ในการใช้ฮอร์โมนเอสโตรเจนร่วมกับโปรเจสโตรเจนพบความเสี่ยงต่อโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน และเกิดเลือดจับตัวเป็นลิ่มหรือก้อนเพิ่มขึ้นตั้งแต่ปีแรกที่ได้รับฮอร์โมน ในขณะที่ความเสี่ยงของต่อการเกิดภาวะที่สมองขาดเลือดไปเลี้ยงเนื่องจากหลอดเลือดตีบอุดตันเพิ่มขึ้นหลังการรักษาไปแล้ว 2 ปี (Delmas et al., 2002)

เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนมีบทบาทในการเสริมสร้างความแข็งแรงของกระดูกในสตรีวัยหมดประจำเดือน แต่จากข้อมูลเกี่ยวกับผลข้างเคียงและความเสี่ยงต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นหากใช้ในระยะเวลาสั้น ควรใช้ในกรณีที่ต้องการรักษาอาการวัยหมดประจำเดือนเท่านั้น เพราะหากใช้ในการรักษากระดูกพรุนต้องให้เป็นระยะเวลานานอาจมีความเสี่ยงต่าง ๆ เกิดขึ้น (Lindsay et al., 1976)

2.5 การทดสอบสารทางชีวเคมีของเซลล์กระดูก

กระดูกเป็นเนื้อเยื่อที่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ทั้งในรูปแบบการสร้างใหม่และการสลายทดแทนกัน ซึ่งเป็นการตอบสนองต่อการกระตุ้นที่กระทำต่อเซลล์กระดูกเอง ได้แก่ ฮอร์โมน โดยทั่วไปเซลล์กระดูกจะทำงานประสานกันเพื่อให้การสร้างและการสลายทดแทนกันเป็นไปอย่างสมดุล (Nam and Kampa, 2013) เซลล์กระดูกมี 3 ชนิด

1. ออสติโอ بلاสท์ (Osteoblast) เป็นเซลล์สร้างเนื้อกระดูกที่เจริญพัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์กระดูก (osteoprogenitor cells) เซลล์นี้จะอยู่ตามขอบของเนื้อกระดูก และสร้างโปรตีนที่เรียกว่า ออสติออยด์ (osteoid) ซึ่งโปรตีนดังกล่าวนี้จะมีสารอนินทรีย์มาสะสมและกลายเป็นเนื้อกระดูก นอกจากนี้ออสติโอ بلاสท์ยังสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อกระดูก รวมทั้งสารนอกเซลล์อื่น ๆ อีกด้วย

2. ออสติโอไซต์ (Osteocyte) เป็นเซลล์ที่เจริญต่อมาจากออสติโอ بلاสท์ที่ได้สร้างเนื้อกระดูกจนล้อมรอบตัวเซลล์ และเป็นเซลล์กระดูกที่เจริญเต็มที่แล้ว รอบ ๆ เซลล์จะเป็นช่องที่เรียกว่า ลากูนา (lacuna) และแต่ละลากูนาจะติดต่อกันด้วยช่องทางผ่านเล็ก ๆ ที่เรียกว่า คานาlikuไล (canaliculi) ซึ่งทำให้แต่ละออสติโอไซต์มีการติดต่อสื่อสารกันได้ ออกซิเจนและสารอาหารก็จะถูกส่งจากหลอดเลือดภายในช่องฮาวอร์เซียนเข้ามาในแต่ละเซลล์ผ่านทางช่องดังกล่าวนี้ แต่ออสติโอไซต์จะเป็นเซลล์กระดูกที่โตเต็มที่ แต่มันยังมีหน้าที่ในการควบคุมระดับแคลเซียมและสารนอกเซลล์อื่น ๆ ด้วย

3. ออสติโอคลาสต์ (Osteoclast) เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส และเจริญมาจากเซลล์ต้นกำเนิดโมโนไซต์ (monocyte stem cells) เซลล์นี้มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการก่อรูปกระดูก (bone remodeling) โดยอาศัยการผลิตเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตส (acid phosphatase) ในการ

ก่อนเนื้อกระดูก และทำให้กระดูกมีลักษณะที่เหมาะสม นอกจากนี้ กระบวนการดังกล่าวยังทำให้มีการนำแคลเซียมออกสู่กระแสเลือดอีกด้วย (Louis and Stephen, 1998; Marieb, 1998)

อัตราการสร้างและการสลายของกระดูกสามารถประเมินในเลือดและปัสสาวะโดยการวัดการทำงานของเอนไซม์ของกระดูกที่ถูกสร้างในการหมุนเวียนของกระดูก พารามิเตอร์ที่ชี้วัดแบ่งได้เป็น สารทางชีวเคมีของกระบวนการสร้างกระดูกและสารทางชีวเคมีของการสลายกระดูก

1. สารทางชีวเคมีของกระบวนการสร้างกระดูก (Biochemical of bone formation)

- Alkaline phosphatase
- Osteocalcin
- Carboxyl-terminal propeptide of type I procollagen (PICP)

2. สารทางชีวเคมีของกระบวนการสลายกระดูก (Biochemical of bone resorption)

- Calcium
- Plasma tartrate-resistant acid phosphatase
- Degradation products of type I collagen (Crosslaps)
- Carboxy terminal cross linked telopeptide of type I collagen (CTX)

ประสิทธิภาพของกระดูกขึ้นอยู่กับความสมดุลระหว่างการสร้างกระดูกโดยเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) และการสลายกระดูกโดยเซลล์สลายกระดูก (osteoclast) การสูญเสียของกระดูกโดยปัจจัยที่เกี่ยวกับอายุจะเกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์สลายกระดูกที่สูงขึ้น ซึ่งสูงกว่าการทำงานของเซลล์สร้างกระดูก ได้มีการศึกษามากมายเกี่ยวกับไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองต่อการทำงานของเซลล์สลายกระดูกดังตารางที่ 2.4 และเซลล์สร้างกระดูกดังตารางที่ 2.5

มีการศึกษาผลของเจนิสทินและเดอิสซิน พบว่าที่ความเข้มข้นของเจนิสทินและเดอิสซินเท่ากับ 10^{-5} - 10^{-7} โมลาร์ สามารถยับยั้งทั้งการทำงานของเซลล์สลายกระดูกและกระบวนการสลายกระดูก (Gao and Yamaguchi, 1999a,b, 2000; Kajiya et al., 2000; Rassi et al., 2002; Yamagishi et al., 200; Yamaguchi and Gao, 1998;)

ตารางที่ 2.4 ผลของไอโซฟลาโวนต่อกระบวนการสลายกระดูก

Authors	Cell model of bone resorption	Effect of Isoflavones
Yamaguchi and Gao, 1998	Rat femoral-metaphyseal tissues cultured for 48 h with bone resorbing factor PTH, PGE2 or LPS)+/- genistein:measured bone calcium content, acid and alkaline phosphatases	Genistein (10^{-5} - 10^{-7} M) inhibited bone resorption. Effect reversed by anti-estrogen, tomoxifen
Gao and Yamaguchi, 1999b	Mouse bone marrow cells cultured for 7 days with bone resorbing factors PTH, PGE2 or LPS)+/-genistein:osteoclast formation assessed by TRAP enzyme	Genistein (10^{-5} - 10^{-7} M) inhibited osteoclast formation. Mechanism may involve cAMP signaling.
Gao and Yamaguchi, 1999c; Gao and Yamaguchi, 2000; Kajiya et al., 2000; Yamagishi et al., 2001	Bone marrow cells or isolated osteoclasts	Suppression of osteoclast formation by genistein is partly due to Ca^{2+} signaling mechanism and partly due to inhibition of tyrosine kinase activity.
Rassi et al., 2002	Porcine bone marrow cells: measure osteoclast formation (TRAP staining) and activity (pit assay)	Daidzein, at the same concentration as estradiol, inhibits osteoclast formation and activity via caspase-3
Tobe et al., 1997	Pit assay with mouse bone marrow cells and dentine slices	Daidzein (10^{-8} - 10^{-10} M) stimulated pit formation while genistein had no effect at this concentration.

ผลของไอโซฟลาโวนต่อการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกและกระบวนการสร้างกระดูก ศึกษาโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกของหนู (MC3T3) จากการศึกษพบว่าที่ความเข้มข้นของเดอิด-

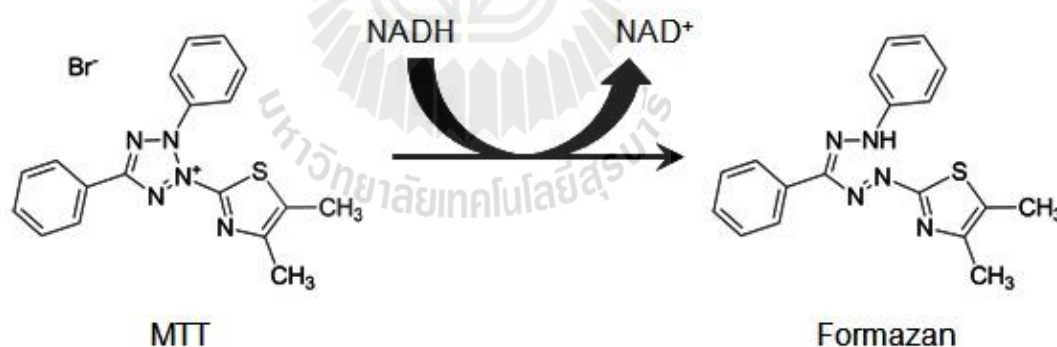
ซึ้นและเจนิสทินเท่ากับ 10^{-6} , 10^{-5} โมลาร์ ตามลำดับ สามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์สร้างกระดูก โดยการเพิ่มจำนวนเซลล์ กระตุ้นการหลั่งเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP), การสังเคราะห์คอลลาเจนและปริมาณแคลเซียม (Choi et al, 2001; Gao and Yamaguchi, 1999c; Sugimoto and Yamaguchi, 2000a,b; Yamaguchi and Ma, 2001)

ตารางที่ 2.5 ผลของไอโซฟลาโวนต่อกระบวนการสร้างกระดูก

Authors	Cell model of bone resorption	Effect of Isoflavones
Gao and Yamaguchi, 1999a; Yamaguchi and Ma, 2001	Femoral-diaphyseal tissues from elderly female rats cultured for 24 h	Daidzien or genistein (10^{-6} , 10^{-5} M) induced calcium content and alkaline phosphatase (ALP) activity indicating stimulation of bone formation.
Sugimoto and Yamaguchi, 2000a,b; Yamaguchi and Sugimoto, 2000	Murine osteoblastic MC3T3 cells	Daidzien or genistein (10^{-6} , 10^{-5} M) induced DNA and protein synthesis and ALP activity; effect reversed by estrogen antagonist, tamoxifen. Possible mechanisms via activation of aminoacyl-tRNA synthelase.
Yoshida et al., 2001	Murine osteoblastic MC3T3 cells	Glycitein (10^{-7} M) suppresses the proliferation and stimulates the differentiation of osteoblasts.
Lee et al., 2001	Murine osteoblastic MC3T3 cells	Genistein at physiological concentrations stimulates cell proliferation and prevent oxidative damage.
Choi et al., 2001	Murine osteoblastic MC3T3 cells	Soybean ethanol extract (0.05 g/l) stimulated osteoblastic function (DNA synthesis, collagen synthesis)

2.6 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหัวเห็ดและหัวเห็ดหมัก

การวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ได้ถูกนำไปใช้ในการศึกษาผลการตอบสนองของเซลล์ที่มีต่อสารทดสอบ ซึ่งส่วนใหญ่จะดูความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์ (Cell Cytotoxicity) การทดสอบการความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity Test) มีวิธีการตรวจนับเซลล์มีชีวิตหลายวิธี เช่น การนับเซลล์ด้วย haemocytometer chamber, electronic particle counters, colony counting, radionuclide incorporation assay และ colorimetric assay (Twentyman and Luscombe, 1987) colorimetric MTT assay ค้นพบโดย Mossmann ในปี ค.ศ. 1983 (Mossmann, 1983) เป็นวิธีการตรวจสอบการมีชีวิตและการเจริญของเซลล์ โดยดูผลการใช้เอนไซม์ succinate-dehydrogenase ใน cytochrome b และ c จากไมโทคอนเดรียย่อยสลายสาร tetrazolium salt MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, diphenyltetrazolium bromide] ซึ่งเป็นสารที่ละลายในน้ำ ทำให้เกิดสาร formazan ซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกสีม่วง (De Robertis, 1975) สารนี้จะละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ตรวจวัดสีด้วยเครื่อง spectrophotometer แบบอต์ โนมัตติ ปริมาณของสีม่วงที่เพิ่มขึ้นจะหมายถึงปริมาณของเซลล์มีชีวิตที่เพิ่มขึ้นด้วย colorimetric MTT assay เป็นวิธีการที่สะดวก ถูกต้อง รวดเร็ว เสียค่าใช้จ่ายน้อย และหลีกเลี่ยงการใช้สารรังสี



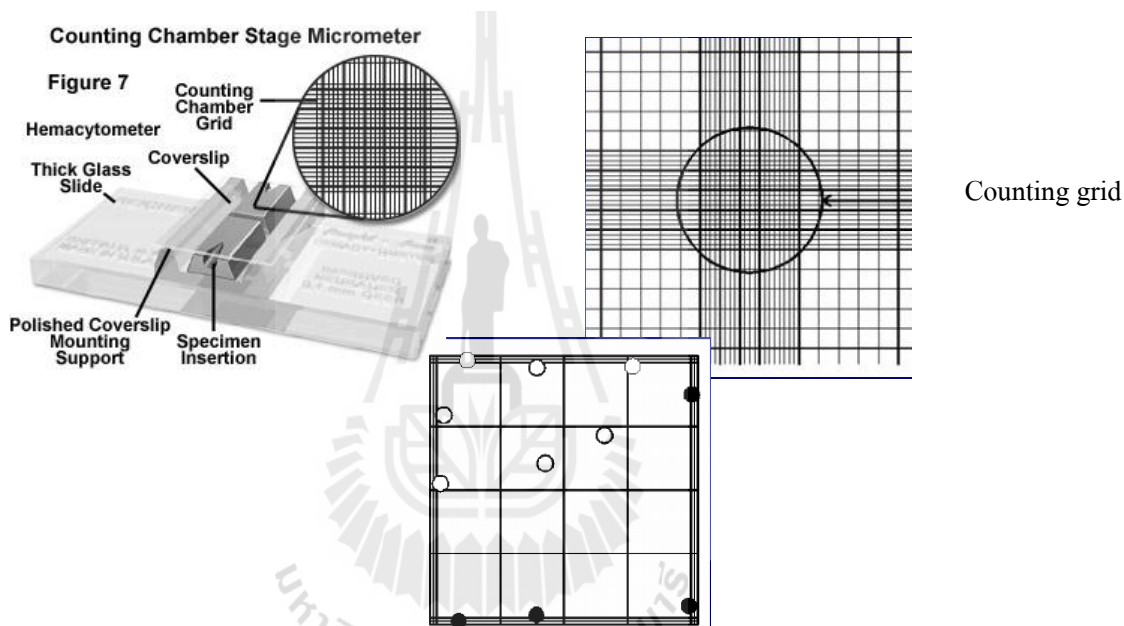
ภาพที่ 2.10 โครงสร้างของ MTT

แหล่งที่มา: Marshall et al. (1995)

ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ MTT colorimetric assay มีมากมายเช่นใช้ในการวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต โดยการใช้ haemocytometer และกล้องจุลทรรศน์ (Nomura et al., 1996)

การนับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemocytometer

วิธีการที่นิยมใช้ในการนับจำนวนเซลล์นั้น มีหลายวิธี เช่น การใช้ haemocytometer หรือ counting chamber มีลักษณะดังภาพที่ 2.11 แบ่งเป็น 2 chamber บนและล่าง แต่ละ chamber มีขนาดกว้าง x ยาว = 3 มิลลิเมตร x 3 มิลลิเมตร แต่ละ chamber แบ่งเป็น 9 ช่องใหญ่ เมื่อปิดด้วย cover slip แต่ละช่องมีปริมาตรเท่ากับความกว้าง x ยาว x ลึก = 1 มิลลิเมตร x 1 มิลลิเมตร x 0.1 มิลลิเมตร = 0.1 ตารางมิลลิเมตร หรือ 1×10^{-4} มิลลิลิตร โดย cover glass ที่ใช้จะถูกออกแบบเป็นพิเศษซึ่งจะมีลักษณะที่บางมากกว่า cover glass แบบธรรมดา



ภาพที่ 2.11 ลักษณะของ haemocytometer (A), ภาพของแต่ละ chamber เมื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (B)

ในการรายงานความเป็นพิษ มีดัชนีบ่งชี้ความเป็นพิษจากตัวทดสอบดังต่อไปนี้

2.6.1 IC₅₀ (half maximal "Inhibitory Concentration")

คือหน่วยวัดปริมาณและความเข้มข้นของสารหรือตัวยาที่ต้องใช้เพื่อชะลอปฏิกิริยาทางเคมี หรือชีวเคมีของร่างกาย เชื้อโรค หรืออนุโมลอิสระลงเหลือ 50% ระหว่างระดับสูงสุดกับระดับที่ต่ำสุด ตัวอย่างของการหาค่า IC₅₀ เช่น เริ่มต้นไม่ใช้ตัวยาใด ๆ ปฏิกิริยาของอนุโมลอิสระอยู่ที่ระดับ 100% เมื่อเริ่มใช้ตัวยาปฏิกิริยาของอนุโมลอิสระมีการลดลง เมื่อเพิ่มปริมาณหรือความเข้มข้นของสารมากขึ้นไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งปฏิกิริยาของอนุโมลอิสระที่วัดได้เหลืออยู่เพียงแค่ 50% คือ ค่า IC₅₀

2.6.2 EC₅₀ (half maximal "Effective Concentration")

คือค่าความเข้มข้นของสารหรือตัวยาที่ต้องใช้ เพื่อป้องกันหรือรักษาโรคให้ได้ผล 50% ระหว่างระดับฐานต่ำสุดคือไม่ได้ใช้ตัวยานเลย (0%) จนถึงระดับอิ่มตัวสูงสุดที่ใช้ตัวยามากที่สุดในระยะเวลายาวนาน ตามความจำเป็นที่วัดได้ ตัวอย่างของการหาค่า EC₅₀ เช่น การไม่ได้ใช้ตัวยานเลย (0%) ท่ามกลางผู้ป่วย 100 คน เมื่อเริ่มให้ยาก็มีผลรักษาที่ดีขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยาไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งมี 50 คนที่หายจากโรคนั้น ความเข้มข้นและปริมาณของตัวยาที่ใช้ในกรณีนั้น คือ ค่า EC₅₀

2.6.3 LC₅₀ (Median Lethal Concentration)

คือค่าความเข้มข้นของสารหรือตัวยาที่ทำให้เซลล์หรือสัตว์ทดลองตายเป็นจำนวนครึ่งหนึ่ง (50%) ของจำนวนเริ่มต้น มีหน่วยเป็น ppm (part per million) หรือมิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งถ้าค่า LC₅₀ มีค่าสูง แสดงว่าสารหรือตัวยานั้นมีอันตรายหรือความเป็นพิษต่ำ เนื่องจากต้องได้รับสารในปริมาณมากจึงจะทำให้สัตว์ทดลองตายไปครึ่งหนึ่ง ในขณะที่ค่าตัวเลขต่ำบ่งบอกว่าสารหรือตัวยานั้นมีความเป็นพิษรุนแรง คือได้รับเพียงเล็กน้อยก็สามารถทำให้สัตว์ทดลองตายไปครึ่งหนึ่งได้ (วสกร บัลลังก์โพธิ์, ม.ป.ป)

IC₅₀ และ EC₅₀ มีสิ่งที่คล้ายกันคือ ทั้งสองค่าคือค่าของความเข้มข้นของตัวยาที่ต้องใช้ เพื่อให้ได้ผลครึ่งทางระหว่างการไม่ได้ใช้ตัวยาน และการใช้ตัวยานจนถึงจุดอิ่มตัว ที่แตกต่างกันคือ IC₅₀ วัดจากปฏิกิริยาระดับสูงสุด ลดลงมาเหลือครึ่งระดับคือ 50% ของปฏิกิริยาเดิม ส่วน EC₅₀ วัดจากปฏิกิริยาระดับต่ำสุดขึ้นไปเรื่อย ๆ จนได้ผล 50%

IC₅₀ และ LC₅₀ มีสิ่งที่คล้ายกันคือ ทั้งสองค่าคือค่าของความเข้มข้นของสารหรือตัวยาที่ต้องใช้เพื่อให้ได้ผลครึ่งทางระหว่างการไม่ได้ใช้ตัวยาน และการใช้ตัวยานจนถึงจุดอิ่มตัว และวัดจากปฏิกิริยาระดับสูงสุด ลดลงมาเหลือครึ่งระดับ คือ 50% ของปฏิกิริยาเดิม ที่แตกต่างกันคือ IC₅₀ จะใช้กับปฏิกิริยาทางเคมีหรือชีวเคมี ส่วน LC₅₀ จะใช้กับการดูการตายหรือการมีชีวิตรอดของเซลล์หรือสัตว์ทดลอง

EC₅₀ และ LC₅₀ มีสิ่งที่คล้ายกันคือ ทั้งสองค่าคือค่าของความเข้มข้นของสารหรือตัวยาที่ต้องใช้เพื่อให้ได้ผลครึ่งทางระหว่างการไม่ได้ใช้ตัวยาน และการใช้ตัวยานจนถึงจุดอิ่มตัวที่แตกต่างกันคือ EC₅₀ จะใช้กับปฏิกิริยาทางเคมีหรือชีวเคมี และวัดจากปฏิกิริยาระดับต่ำสุดขึ้นไปเรื่อย ๆ จนได้ผล 50% ส่วน LC₅₀ จะใช้กับการดูการตายหรือการมีชีวิตรอดของเซลล์หรือสัตว์ทดลองและวัดจากปฏิกิริยาระดับสูงสุด ลดลงมาเหลือครึ่งระดับคือ 50% ของปฏิกิริยาเดิม

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 การหมักถั่วเหลือง

- 3.1.1.1 ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 จากศูนย์วิจัยพืชไร่จังหวัดเลยในช่วงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2554 อายุการเก็บเกี่ยว 97-100 วัน
- 3.1.1.2 เชื้อบาซิลลัส ซับติลิส (*Bacillus subtilis* SB-MYP-1) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก
- 3.1.1.3 ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ (Medium bottle)
- 3.1.1.4 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโรต (Automatic Autoclave)
- 3.1.1.5 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Clean Bench)
- 3.1.1.6 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- 3.1.1.7 หลอดทดลองฝาเกลียว
- 3.1.1.8 ตู้บ่มเพาะเชื้อควบคุมอุณหภูมิ
- 3.1.1.9 เข็มเขี่ยเชื้อปลายกลม (Inoculating Loop)
- 3.1.1.10 แท่งแก้วเกลียวเชื้อ (Spreader)
- 3.1.1.11 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)

3.1.2 การสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมัก

- 3.1.2.1 กระดาษกรอง (Whatman No.4)
- 3.1.2.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Sorvall Legend Mach 1.6R, Germany)
- 3.1.2.3 Conical tube 50 มิลลิลิตร
- 3.1.2.4 พาราฟิล์ม
- 3.1.2.5 หลอดทดลอง
- 3.1.2.6 ซ้อนดักสาร
- 3.1.2.7 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
- 3.1.2.8 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer)
- 3.1.2.9 เครื่องเขย่าแบบใช้ความถี่ (Sonicator)
- 3.1.2.10 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Dry)

3.1.2.11 เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Buchi R-114, Switzerland)

3.1.2.12 Therbovap (Caliper, USA)

3.1.2.13 เครื่องบดตัวอย่างแห้ง (Retsch Ultra, ZM 1000, Germany)

3.1.3 การวิเคราะห์ประมาณของฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์และความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

3.1.3.1 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง spectrophotometer (Biochrom Libra S22, UK)

3.1.3.2 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (JULABO, SW22, USA)

3.1.3.3 หลอดทดลอง

3.1.3.4 เครื่อง Vortex

3.1.3.5 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.1.4 การวิเคราะห์ไอโซฟลาโวน (เดิสิกซินและเจนิสทิน) ไทอามีนและไรโบฟลาวิน

3.1.4.1 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography)

3.1.4.2 Conical tube 50 มิลลิลิตร

3.1.4.3 เครื่องเขย่าแบบใช้ความถี่ (Sonicator)

3.1.4.4 เครื่อง Vortex

3.1.4.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Sorvall Legend Mach 1.6R, Germany)

3.1.4.6 กระดาษกรองเบอร์ 541

3.1.5 การวิเคราะห์กรดอะมิโนทั้งหมด (Total amino Acids)

3.1.5.1 Amino acid analyzer (Model Biochrom 30, Pharmacia-Biotech, UK)

3.1.5.2 เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Buchi R-114, Switzerland)

3.1.5.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Sorvall Legend Mach 1.6R, Germany)

3.1.5.4 Microcentrifuge tube

3.1.5.5 หลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร

3.1.5.6 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Automatic Autoclave)

3.1.6 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์และการทดสอบการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส

3.1.6.1 เซลล์สร้างกระดูกของหนู MC3T3-E1 (Subclone 4, ATCC® CRL-2593™)

3.1.6.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Sorvall Legend Mach 1.6R, Germany)

- 3.1.6.3 Inverted microscope
- 3.1.6.4 Light microscope
- 3.1.6.5 เครื่องชั่งแบบสองแขน
- 3.1.6.6 ตู้ปลอดเชื้อ
- 3.1.6.7 ตู้บ่มเชื้อภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
- 3.1.6.8 96 well plate (Corning)
- 3.1.6.9 T75 cm² (Corning)
- 3.1.6.10 T25 cm² (TPP)
- 3.1.6.11 Pipette aid (Corning)
- 3.1.6.12 Pasteur pipette ขนาด 10 มิลลิลิตร (Corning)
- 3.1.6.13 Pasteur pipette ขนาด 5 มิลลิลิตร (Corning)
- 3.1.6.14 Microcentrifuge tube
- 3.1.6.15 Cryovial (TPP)
- 3.1.6.16 Haematocytometer และ cover slip
- 3.1.6.17 Microplate reader (Bio-Rad Benchmark Plus, USA)

3.2 สารเคมี

3.2.1 การหมักถั่วเหลือง

- 3.2.1.1 Nutrient Broth
- 3.2.1.2 Nutrient Agar
- 3.2.1.3 0.85% NaCl

3.2.2 การสกัดถั่วเหลืองและถั่วเหลืองหมัก

- 3.2.2.1 เอทานอล
- 3.2.2.2 น้ำกลั่น

3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ และความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

- 3.2.3.1 น้ำกลั่น
- 3.2.3.2 เอทานอล
- 3.2.3.3 เมทานอล (methanol)
- 3.2.3.4 โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO₃)
- 3.2.3.5 กรดกาแล็ก (Gallic acid) (Sigma)

- 3.2.3.6 โซเดียมไนไตรท์ (NaNO_2)
- 3.2.3.7 อลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl_3)
- 3.2.3.8 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- 3.2.3.9 Catechin (sigma)
- 3.2.3.10 Folin-Ciocalteu
- 3.2.3.11 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
- 3.2.3.12 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
- 3.2.3.13 โพแทสเซียมเพอร์ซัลเฟต ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)
- 3.2.3.14 Trolox (Sigma)
- 3.2.3.15 Ascorbic acid (Sigma)
- 3.2.3.16 Glacial acetic acid
- 3.2.3.17 2,4,6 Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)
- 3.2.3.18 Ferric chloride (FeCl_3)
- 3.2.3.19 Ferrous sulphate (FeSO_4)
- 3.2.4 การวิเคราะห์ไอโซฟลาโวน (เดอัสซิงและเจนิสทิน) ไทอามีนและไรโบฟลาวิน**
- 3.2.4.1 น้ำกลั่น
- 3.2.4.2 เมทานอล (methanol)
- 3.2.4.3 Formic acid
- 3.2.4.4 Daidzein (Sigma)
- 3.2.4.5 Genistein (Sigma)
- 3.2.4.6 กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- 3.2.4.7 โซเดียมอะซิเตท ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
- 3.2.4.8 เอนไซม์ Takadiastase
- 3.2.4.9 Riboflavin (Sigma)
- 3.2.4.10 Thiamine chloride (Sigma)
- 3.2.4.11 แอมโมเนียมอะซิเตท ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)
- 3.2.4.12 โพแทสเซียมเฟอร์ริไซยาไนด์ ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)
- 3.2.4.13 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- 3.2.5 การวิเคราะห์กรดอะมิโนทั้งหมด (Total amino Acids)**
- 3.2.5.1 กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- 3.2.5.2 ฟีนอล ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$)

3.2.5.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3.2.5.4 L-octanol

3.2.5.5 Toluene (C₆H₅CH₃)

3.2.5.6 Tri-sodium citrate dehydrate (Na₃C₆H₅O₇·2H₂O)

3.2.5.7 น้ำกลั่น

3.2.5.8 เอทานอล

3.2.6 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์และการทดสอบการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์

ฟอสฟาเตส

3.2.6.1 น้ำสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

3.2.6.2 เอทานอล

3.2.6.3 เมทานอล (methanol)

3.2.6.4 High glucose DMEM

3.2.6.5 Fetal bovine serum (Gibco)

3.2.6.6 แอล กลูตามีน (L-glutamine)

3.2.6.7 Non-essential amino acid (Gibco)

3.2.6.8 เจนตาไมซิน (gentamicin) (Gibco)

3.2.6.9 แอมโฟเทอริซินบี (amphotericin B) (Gibco)

3.2.6.10 HEPES

3.2.6.11 โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO₃)

3.2.6.12 0.25% Trypsin/ EDTA

3.2.6.13 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate buffer saline)

3.2.6.14 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide)

3.2.6.15 Trypan blue

3.2.6.16 MTT

3.2.6.17 Abcam's Alkaline Phosphatase Assay Kit (Colorimetric)

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเตรียมตัวเหลืองหมัก

3.3.1.1 การเตรียมเชื้อ

นำ *Bacillus subtilis* SB-MYP-1 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก) ซึ่งอยู่ในสารละลายกลีเซอรอลเข้มข้น 20% มาทำให้ละลาย แล้วทำให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม

สารละลาย จากนั้นเปิดมา 100 μ l ใส่ลงใน Nutrient Broth 25 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อ *Bacillus subtilis* SB-MYP-1 ที่บ่มครบ 24 ชั่วโมง ทำการแยกจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ด้วย Streak plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และเลือกเก็บโคโลนีเดี่ยว ๆ ของเชื้อใส่ลงใน Nutrient Broth 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นนำเฉพาะส่วนขุ่นที่ตกตะกอน (เซลล์ของบациลลัส) มาเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% โดยเทียบกับ Mac No.1 จากอาคารเครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (3×10^8 cfu/มิลลิลิตร)

3.3.1.2 เตรียมถั่วเหลืองหมัก

การหมักถั่วเหลืองคัดแปลงจากวิธีของ Hsu and Chiang (2009) นำถั่วเหลืองมาล้างทำความสะอาดและแช่น้ำไว้ประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างทำความสะอาดอีกครั้ง นำถั่วเหลืองไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นนำถั่วเหลืองที่ฆ่าเชื้อแล้วมาผึ่งให้แห้งโดยต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) จากนั้นผสมเชื้อ *Bacillus subtilis* SB-MYP-1 กับถั่วเหลืองในอัตราส่วน ถั่วเหลือง 500 กรัม ต่อเชื้อ *Bacillus subtilis* SB-MYP-1 (3×10^8 cfu/มิลลิลิตร) 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในถาดที่ห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ จากนั้นปิดด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

3.3.2 การเตรียมสารสกัด

3.3.2.1 สารสกัดถั่วเหลือง

เตรียมสารสกัดถั่วเหลือง 2 ชนิด คือสารสกัดน้ำ และเอทานอล (Dajanta et al., 2011) โดยนำถั่วเหลืองมาบดด้วยเครื่องบดตัวอย่างแห้ง (Retsch Ultra, ZM 1000, Germany) จากนั้นชั่งถั่วเหลือง 2 กรัม ละลายใน 10 มิลลิลิตร ของแต่ละตัวทำละลาย ทำให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลายเป็นระยะเวลา 1 นาที แล้วทำการสกัดด้วยเครื่องเขย่าแบบใช้ความถี่ (Sonicator) เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Sorvall Legend Mach 1.6R, Germany) ที่ความเร็ว 3200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสไว้ จากนั้นนำไปสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายเดิม 10 มิลลิลิตร ที่สภาวะเดิม นำส่วนใสทั้ง 2 ครั้งรวมกัน และกรองด้วยกระดาษกรอง ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรทำให้แห้งตามวิธีของรัชฎาพร (2010) เฉพาะสารสกัดน้ำนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไปทำให้แห้งโดยเครื่อง Freeze dryer (GEA, LYOVAC GT2-S, Germany) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนสารสกัดเอทานอล นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Therbo vap (Caliper, USA) จัดเก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.2.2 สารสกัดถั่วเหลืองหมัก

เตรียมสารสกัดถั่วเหลืองหมัก 2 ชนิด คือสารสกัดน้ำ และเอทานอลตามวิธีของ Dajanta et al. (2011) โดยนำถั่วหมักไปทำแห้งโดยเครื่อง Freeze dryer (GEA, LYOVAC GT2-S, Germany) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาบดด้วยบดตัวอย่างแห้ง (Retsch Ultra, ZM 1000, Germany) จากนั้นชั่งถั่วเหลืองหมักผง 2 กรัม ละลายใน 10 มิลลิลิตร ของแต่ละตัวทำละลาย ทำให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลายเป็นระยะเวลา 1 นาที แล้วทำการสกัดด้วยเครื่องเขย่าแบบใช้ความถี่ (Sonicator) เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Sorvall Legend Mach 1.6R, Germany) ที่ความเร็ว 3200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสไว้จากนั้นนำไปสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายเดิม 10 มิลลิลิตร ที่สถานะเดิม นำส่วนใสทั้ง 2 ครั้งรวมกัน และกรองด้วยกระดาษกรอง ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร ทำให้แห้งตามวิธีของ รัชฎาพร (2010) เฉพาะสารสกัดน้ำนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไปทำให้แห้งโดยเครื่อง Freeze dryer (GEA, LYOVAC GT2-S, Germany) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนสารสกัดเอทานอล นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Therbo vap (Caliper, USA) จัดเก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.3 การศึกษาสารพฤกษเคมี

3.3.3.1 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-ciocalteu ตามวิธีของ Oonsivilai et al., 2007

ทำละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลายน้ำหรือเอทานอล แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่าง 20 μ l ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำปราศจากไอออน (DI) 1.58 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 20% 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (Biochrom Libra S22, UK) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ระดับความเข้มข้นของกาแลค (Gallic acid) ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานคือ 0, 50, 150, 250, 300, และ 350 ppm (มิลลิกรัม/ลิตร) ใน 95% เอทานอล ผลการวิเคราะห์รายงานในรูปสมมูลของมิลลิกรัมกาแลค/กรัมของสารสกัด

3.3.3.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์ตามวิธีของ Juan and Chou., 2010

ทำละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลายน้ำหรือเอทานอล แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่าง 250 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำปราศจากไอออน 1.25 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไนเตรดเข้มข้น 5% 75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นเติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์เข้มข้น 10% 150 ไมโครลิตร เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์ 500 ไมโครลิตร เติมน้ำปราศจากไอออน 275 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Biochrom Libra S22, UK) โดยใช้แคทีชินเป็นสารมาตรฐาน โดยจะมีระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0-350 ppm (มิลลิกรัม/ลิตร) ผลการวิเคราะห์รายงานในรูปสมมูลของมิลลิกรัมแคทีชิน/กรัมของสารสกัด

3.3.3.3 ปริมาณไอโซฟลาโวน

การหาปริมาณของไอโซฟลาโวนโดยใช้ HPLC ทำตามวิธีของ Punjaisee et al. (2011) โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างสารสกัดใส่หลอดทดลองฝาเกลียวแล้วเติมเมทานอล 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออนให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที ด้วยเครื่องผสมสารละลาย และนำเข้าเครื่องเขย่าแบบใช้ความถี่ (Sonicator) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Sorvall Legend Mach 1.6R, Germany) ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 25 องศาเซลเซียส กรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 μm จากนั้นฉีดเข้าเครื่อง HPLC 20 ไมโครลิตร สำหรับการวิเคราะห์ด้วย HPLC ใช้ reverse phase คอลัมน์ Zorbax SB C18 150x4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร (Agilent technologies, USA) โดยมีอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที โดย mobile phase ประกอบด้วยเมทานอล:น้ำ (10:90) และสารละลายกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 0.1% ใน reservoir A และเมทานอลผสมกับสารละลายกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 0.1% ใน reservoir B โดย solvent B จากเวลาที่ 0 นาทีถึง 25 นาที จะเพิ่มจาก 10% ถึง 100% ปริมาณของไอโซฟลาโวนหาได้จากข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงที่ 254 นาโนเมตร โดยสารมาตรฐานไอโซฟลาโวนที่ใช้คือ เดอัสซิทิน (Sigma) และเจนิสทิน (Sigma)

3.3.4 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

3.3.4.1 ABTS Assay

การศึกษาศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระทำตามวิธีของ Ksouri et al. (2009) ทำละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลายน้ำหรือเอทานอล แล้วบีบเปิดสารละลายตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารผสมระหว่าง ABTS และสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ซัลเฟต ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 950 ไมโครลิตร โดยสารผสมนี้จะต้องผสมทิ้งไว้ 16 ชั่วโมงก่อนจะนำมาใช้ทำปฏิกิริยา โดยสารที่จะนำมาใช้ได้ต้องมีค่าดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.700 ± 0.02 เมื่อใส่สารผสมลงไปทำปฏิกิริยากับสารละลายตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ด้วย spectrophotometer (Biochrom Libra S22, UK) ใช้ Trolox และ Ascorbic acid เป็นสารควบคุมทางการค้าและหา % inhibition ได้จากสูตร

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

A_{control}

3.3.4.2 DPPH Assay

การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทำตามวิธีของ Oonsivilai et al. (2007) และ Singthong et al. 2011 ทำละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลายน้ำหรือเอทานอล แล้วเปิดสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย DPPH 1.90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ในที่มืด 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer (Biochrom Libra S22, UK) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ใช้ Trolox และ Ascorbic acid เป็นสารควบคุมทางการค้าและหา % inhibition ได้จากสูตร

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A_{\text{control}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

3.3.4.3 FRAP Assay

การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทำตามวิธีของ Oonsivilai et al., 2007 และ Singthong et al., 2011 ทำละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลายน้ำหรือเอทานอล แล้วเปิดสารละลายตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย FRAP 1.5 มิลลิลิตร โดยสาร FRAP นี้จะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนจะนำมาใช้ทำปฏิกิริยา โดยสารนี้จะได้จากการผสมกรดกลูตาซีอะซีติกพีเอช 3.6 เข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ + 2,4,6 Tris(2-pyridyl)-s-triazine เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ + สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เมื่อใส่สารผสมลงไปทำปฏิกิริยากับสารละลายตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืดที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ด้วย spectrophotometer (Biochrom Libra S22, UK) ใช้ Trolox และ Ascorbic acid เป็นสารควบคุมทางการค้าและใช้สารเฟอร์รัสซัลเฟตเป็นสารมาตรฐาน โดยมีความเข้มข้นระหว่าง 0.2-1 มิลลิโมลาร์ คำนวณ Ferric-reducing antioxidant power ได้จากกราฟของสารมาตรฐาน

3.3.5 ศึกษาปริมาณของธาตุอาหารโภชนาการ

3.3.5.1 ไทอามินและไรโบฟลาวิน

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างสารสกัด 1 กรัม เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ลงไป 15 มิลลิลิตร ผสมและให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้อุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง ปรับพีเอชให้เป็น 4.3-4.7 ด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตรทเข้มข้น 2.5 โมลาร์ จากนั้นเติมสารละลายของเอนไซม์ทาคาไดเอสเทส (takadiastase) เข้มข้น 6% 1.25 มิลลิลิตร บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 541 (whatman) และปรับปริมาตรให้

เป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาทดสอบ (Sanchez-Machado et al., 2004)

- ในการวิเคราะห์โรโบฟลาวิน นำสารละลายที่เตรียมไว้มากรองด้วยเมมเบรน (PTFE syringe filters) ขนาด 0.45 ไมโครเมตรนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

- ในการวิเคราะห์ไทอามิน นำสารมา 2.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายที่ทำให้เกิดออกซิเดชัน 1.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน 15 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 45 วินาที เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3.75 นอร์มัล ลงไป 0.25 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

การวิเคราะห์ด้วย HPLC ใช้คอลัมน์ Waters Nova-Pak C18 150x3.9 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร (Agilent technologies, USA) เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตรทเข้มข้น 0.005 โมลาร์:เมทานอล (72:28 v/v) โดยมีอัตราการไหล 0.75 มิลลิลิตร/นาที ในการหาปริมาณโรโบฟลาวิน วิเคราะห์การเรืองแสงโดยใช้ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นโมเลกุลของสาร (excitation) ที่ 370 นาโนเมตร และความยาวคลื่นแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่โมเลกุลของสารคายแสงออกมา (emission) ที่ 520 นาโนเมตร ส่วนในการหาปริมาณไทอามิน วิเคราะห์การเรืองแสงหลังจากออกซิเดชันเป็นไทโอโครมแล้ว วิเคราะห์การเรืองแสงโดยใช้ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นโมเลกุลของสารที่ 370 นาโนเมตร และความยาวคลื่นแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่โมเลกุลของสารคายแสงออกมาที่ 435 นาโนเมตร

3.3.5.2 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดตามวิธีของ Zarkadas et al., 2007 นำตัวอย่างสารสกัดที่สกัดไขมันออกแล้ว 50 มิลลิกรัม ไฮโดรไลซ์ด้วย 5 มิลลิลิตร ของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6.0 โมลาร์ ที่มีฟีนอลเข้มข้น 0.2% (v/v) ภายใต้สุญญากาศที่ 110 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ย่อยแล้วไปทำแห้งด้วย Rotary evaporator (Buchi R-114, Switzerland) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 25 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.22 ไมโครเมตร รอวิเคราะห์ด้วยระบบลิเทียม-ซิเตรตบัฟเฟอร์ โดยเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโนอัตโนมัติ (Model Biochrom 30, Pharmacia-Biotech, UK)

การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทริปโตเฟนในตัวอย่างจะวิเคราะห์หลังจากการไฮโดรไลซ์ด้วยด่างภายใต้สุญญากาศ โดยนำตัวอย่างสารสกัดที่สกัดไขมันออกแล้ว 50 มิลลิกรัม เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4.2 โมลาร์ 1.2 มิลลิลิตร (น้ำปราศจากไอออน 0.2 มิลลิลิตร + สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5.0 โมลาร์ 1.0 มิลลิลิตร) ซึ่งจะต้องเตรียมสารใหม่ทุกครั้งที่ใช้จากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 50% ที่มี 5 ไมโครลิตร ของสารละลายแอล-ออกตะนอนอลเข้มข้น 1% ในสารละลายโทลูอีน) และไฮโดรไลซ์ภายใต้สุญญากาศที่ 110 องศา

เซลล์เชยีส 24 ชั่วโมง ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตรทพีเอช 4.25 เข้มข้น 0.2 นอร์มัล นำตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ 1800 g 10 นาที นำ 2 มิลลิลิตร ของ supernatant ใส่ eppendorf tube และปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 20 นาที ในเครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Micro Centrifuge) ที่ความเร็วรอบสูงสุด ส่วนใส่นำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนทริปโตเฟนด้วยระบบลิเทียม-ซิเตรตบัพเฟอร์ โดยเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโนอัตโนมัติ (Model Biochrom 30, Pharmacia-Biotech, UK)

3.3.6 การทดสอบความเป็นพิษ

3.3.6.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ใช้วิธีของ Choi et al. (2001) ใช้เซลล์สร้างกระดูกของหนู MC3T3-E1 (Subclone 4, ATCC® CRL-2593™) ทำการเลี้ยงเซลล์ใน T-75 flask โดยมีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 4×10^5 เซลล์/ตารางเซนติเมตร ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ คือ alpha MEM medium (α -MEM) ซึ่งประกอบด้วย แอล-กลูตามีน, ไรบิวทิลไอโซไซค์, คีโอกซีไรบิวทิลไอโซไซค์ (Gibco) และเสริมด้วยเซรัมฟีทาลโบไวน์ (FBS) เข้มข้น 10% (Gibco), 100 U/มิลลิลิตรของเพนนิซิลินและ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ของสเตโรปโตรมัยซิน (Gibco) ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้อัตราส่วนของอากาศและคาร์บอนไดออกไซด์ เท่ากับ 95:5

3.3.6.2 การทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT Assay ตามวิธีของ Choi et al. (2001)

เลี้ยงเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ใน 96-well plate โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^4 เซลล์/ช่อง ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำสารสกัดหัวเหลืองและสารสกัดหัวเหลืองที่ผ่านการหมักที่เตรียมได้เจือจางด้วยตัวทำละลายที่ใช้สกัด สารสกัดหัวเหลืองและสารสกัดหัวเหลืองที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยน้ำละลายกลับด้วยฟอสเฟสบัฟเฟอร์ซาลิน ส่วนสารสกัดหัวเหลืองและสารสกัดหัวเหลืองที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยเอทานอล ละลายกลับด้วยเอทานอล และละลายสารสกัดด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อให้มีความเข้มข้นตามที่ต้องการ ซึ่งอยู่ในช่วง 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรถึง 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใช้เอทานอลเข้มข้น 1.0% และฟอสเฟสบัฟเฟอร์ซาลินเข้มข้น 1.0% เป็นตัวอย่างควบคุม

ทำการบ่มสารสกัดในเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาดังกล่าว เปิดสารสกัดออกจากเซลล์ และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปใหม่ บ่มต่อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปทดสอบด้วย MTT โดยเติมสารละลาย MTT ที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ต่อช่อง ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเปิดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์และ MTT ออก แล้วล้างด้วยฟอสเฟสบัฟเฟอร์ซาลิน 100 ไมโครลิตร ปิดฟอสเฟสบัฟเฟอร์ซาลินออก

แล้วเติมสารละลายดีเอ็มเอสไอ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรในแต่ละช่อง เพื่อละลายผลึกของฟอร์มาซาน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (Bio-Rad Benchmark Plus, USA) นำค่าดูดกลืนแสงไปพล็อตกราฟ โดยพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจำนวน 5 ระดับ ใช้ค่าเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้นจาก 96-well plate จำนวน 5 ช่อง แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถทำลายเซลล์ได้ 50% ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด (LC_{50}) และการคำนวณร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ (%cell viability) โดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงในหลุมควบคุม ดังสมการ

$$\text{ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (\%cell viability)} = \left(\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม}} \right) \times 100$$

3.3.7 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดถั่วเหลืองและถั่วเหลืองหมักต่อการสร้างสารทางชีวเคมีของการสร้างกระดูก

3.3.7.1 การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline Phosphatase Activity) ตามวิธีของ Choi et al. (2001)

เพาะเลี้ยงเซลล์ตามวิธีใน 3.3.6.1 และเลี้ยงเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ในเพลท 96 หลุม (1×10^4 เซลล์ต่อช่อง) ด้วย α -MEM ที่เสริมด้วยเซรัมฟิวส์โบวีนเข้มข้น 10% ปล่อยให้เซลล์ยึดเกาะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติมสารสกัดลงในเซลล์ ทำการบ่มสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาดังกล่าวนำไปทดสอบการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสโดย Abcam's Alkaline Phosphatase Assay Kit (Colorimetric) โดยดูดสารสกัดและอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากนั้นล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน แล้วทำการละลายเซลล์โดยเติม Assay buffer 100 ไมโครลิตรต่อช่อง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000xg 3 นาที แล้วเติมสารละลายพาราไนโตรฟินิลฟอสเฟตเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ 50 ไมโครลิตรต่อช่อง เขย่าเพลทและบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส 60 นาที โดยปราศจากแสง เมื่อครบระยะเวลา 60 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อหยุดปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตรต่อช่อง จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (Bio-Rad Benchmark Plus, USA) พล็อตกราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินิลฟอสเฟตที่ระดับความเข้มข้น 4, 8, 12, 18, และ 20 นาโนโมล

3.3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้การวิเคราะห์ด้วย SPSS for window version 13.0 (SPSS Inc. USA) ในการหาค่า Mean และ Standard deviation standard error of mean (SEM) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan post hoc test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การศึกษาสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และไอโซฟลาโวน

4.1.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมัก ที่สกัดด้วยตัวทำละลายสองชนิดคือ น้ำ และเอทานอล วิเคราะห์โดยใช้ Folin-Ciocalteu reagent มีงานวิจัยที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกในถั่วเหลืองหมักของเกาหลี (chungkookjang) มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมีค่า EC50 เท่ากับ 334.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Kwak et al., 2007) ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมัก ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดถั่วเหลือง และสารสกัดถั่วเหลืองหมักที่เตรียมด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล

สารสกัด	ตัวทำละลาย	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมกาลีคต่อกรัมของสารสกัด)
ถั่วเหลือง	น้ำ	14.43 ± 0.77 ^a
	เอทานอล	29.02 ± 1.37 ^c
ถั่วเหลืองหมัก	น้ำ	16.94 ± 0.77 ^b
	เอทานอล	35.02 ± 0.60 ^d

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

โดยตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มนี้ หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

จากตารางที่ 4.1 พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดถั่วเหลืองหมักสูงกว่าสารสกัดถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในระหว่างกระบวนการหมัก มีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสและเอสเทอเรสสูงขึ้น ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฟีนอลิกให้สูงขึ้น (Cho et al., 2009; Cho et al., 2011) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lee et al. (2008) กล่าวว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของถั่วเหลืองดำที่หมักด้วย

A. awanori, *R. azygosporus* หรือ *Rhizopus sp* No. 2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับ ถั่วเหลืองดำที่ไม่ผ่านการหมัก และรายงานของ Chaia et al. (2012) สรุปได้ว่าเมื่อระยะเวลาการหมัก เพิ่มขึ้น ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะสูงขึ้น อีกทั้งปริมาณ ฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ สำหรับตัวอย่างสารสกัด เอทานอลของถั่วเหลืองมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 29.02 มิลลิกรัมกาคต่อกรัมของสารสกัด ในขณะที่ สารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองหมักมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่สูงกว่า คือ 35.02 มิลลิกรัมกาค ต่อกรัมของสารสกัด ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเอทานอลของทั้งถั่วเหลืองและถั่วเหลือง- หมักจะสูงกว่าสารสกัดน้ำของทั้งถั่วเหลืองและถั่วเหลืองหมัก เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกมี หมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในโครงสร้างและมีความมีขั้วสูง จะละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีความมีขั้วสูง และเอทานอลมีความมีขั้วที่สูงกว่าน้ำ เอทานอลจึงสามารถละลายสารประกอบดังกล่าวออกมาได้ ดีกว่าน้ำ (Quy et al., 2014; Sultana et al., 2009)

4.1.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกที่มีความสำคัญในการต้านการเกิด ออกซิเดชันและคุณสมบัติในการจับกับโลหะที่มีผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระ ทำให้ปฏิกิริยาออกซิ- เดชันนั้นหยุดลง (Korkina and Afans'ev, 1997) ปริมาณฟลาโวนอยด์ (มิลลิกรัมแคทีชินต่อกรัมของ สารสกัด) ของสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมักที่เตรียมด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน คือ น้ำ และเอทานอล ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดแต่ละชนิด ดังตารางที่ 4.2 ซึ่งพบว่า ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดถั่วเหลืองหมักสูงกว่าสารสกัดถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในระหว่างกระบวนการหมักมีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสและเอสเทอร์ส สูงขึ้น ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฟลาโวนอยด์ให้สูงขึ้น (Cho et al., 2009; Cho et al., 2011) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Juan and Chou (2010) โดยพบว่าเมื่อหมัก ถั่วเหลืองดำด้วย *Bacillus subtilis* BCRC 14715 ปริมาณฟลาโวนอยด์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับถั่วเหลืองดำไม่ผ่านกระบวนการหมัก สารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองมีปริมาณ ฟลาโวนอยด์ 8.77 มิลลิกรัมแคทีชินต่อกรัมของสารสกัดในขณะที่สารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองหมักมี ปริมาณฟลาโวนอยด์ ที่สูงกว่าเท่ากับ 14.02 มิลลิกรัมแคทีชินต่อกรัมของสารสกัด

และพบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดเอทานอลสูงกว่าสารสกัดน้ำ เนื่องจาก สารประกอบฟลาโวนอยด์ มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในโครงสร้างและมีความมีขั้วสูงจะละลายได้ดีในตัว ทำละลายที่มีความมีขั้วสูง และเอทานอลมีความมีขั้วที่สูงกว่าน้ำ เอทานอลจึงสามารถละลาย สารประกอบดังกล่าวออกมาได้ดีกว่าน้ำ (Quy et al., 2014; Sultana et al., 2009)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมักที่เตรียมด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล

สารสกัด	ตัวทำละลาย	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (มิลลิกรัมแคทีชินต่อกรัมของสารสกัด)
ถั่วเหลือง	น้ำ	5.37 ± 0.24 ^a
	เอทานอล	8.77 ± 0.21 ^c
ถั่วเหลืองหมัก	น้ำ	7.02 ± 0.61 ^b
	เอทานอล	14.02 ± 0.66 ^d

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

โดยตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มนี้ หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05)

4.1.3 ปริมาณไอโซฟลาโวน

ปริมาณของเคอัสตินและเจนิสทิน (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมสารสกัด) ของสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมักใช้การวิเคราะห์ด้วย HPLC ปริมาณของเคอัสตินและเจนิสทินของสารสกัดแต่ละชนิด มีรายละเอียดดังตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.1 ซึ่งพบว่าปริมาณของเคอัสตินและเจนิสทินของสารสกัดถั่วเหลืองหมักสูงกว่าสารสกัดถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากงานวิจัยของ Cho et al. (2009) และ Cho et al. (2011) กล่าวไว้ว่าการเพิ่มขึ้นของไอโซฟลาโวนในกลุ่มมะกอกโคน เกิดเนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสของเชื้อบาคิลลัสซับติลิส และในระหว่างการหมักพบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส และเอสเทอร์เอสเพิ่มขึ้นซึ่งส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และไอโซฟลาโวนในกลุ่มมะกอกโคนสูงขึ้นเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Dajanta et al. (2009) ถั่วเหลืองที่หมักด้วยกล้าเชื้อบริสุทธิ์ของ *Bacillus subtilis* แสดงปริมาณของไอโซฟลาโวน (daidzin, genistin, glycitin, daidzein, genistein และ glycitein) สูงกว่าถั่วเหลืองที่หมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติจากการหมักถั่วเน่าแบบดั้งเดิม สำหรับตัวอย่างถั่วเหลืองที่สกัดด้วยเอทานอลแสดงปริมาณของเคอัสติน 398.84 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมสารสกัดและเจนิสทิน 1,032.05 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมสารสกัด ตามลำดับ ในขณะที่พบปริมาณของเคอัสตินและเจนิสทินสูงกว่าในสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองหมัก ซึ่งมีปริมาณของเคอัสติน 896.86 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมสารสกัดและเจนิสทิน 1,641.61 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมสารสกัด ตามลำดับ

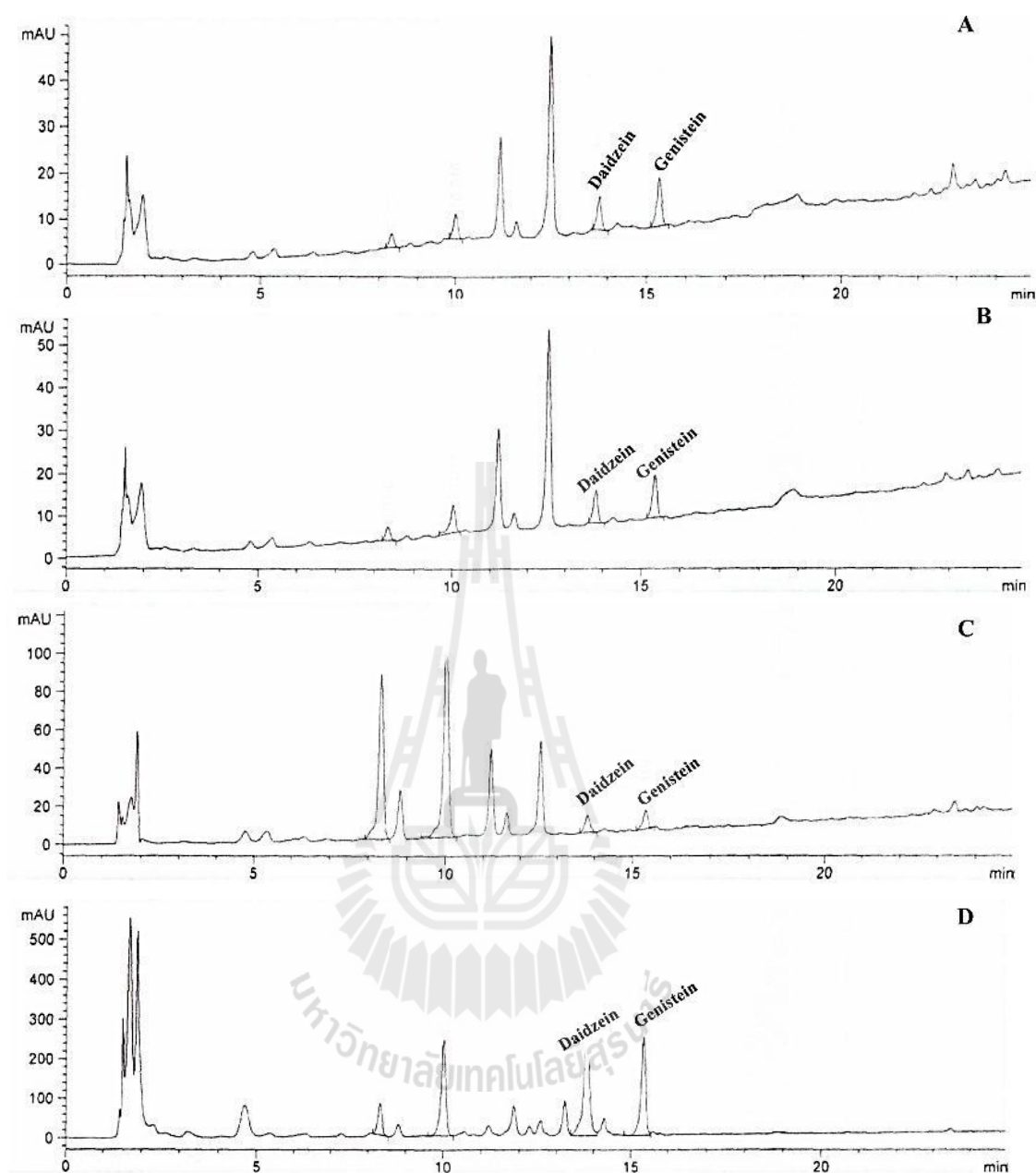
ปริมาณของเคอสิซินและเจนิสทินของสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสูงกว่า สารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ กล่าวโดยสรุปถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณของเคอสิซินและ เจนิสทินสูงที่สุด เนื่องจากสารประกอบกลุ่มฟีนอล ได้แก่ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ไอโซฟลาโวนมี หมูไฮดรอกซิลอยู่ในโครงสร้างและมีความมีขั้วสูง จะละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีความมีขั้วสูง และเอทานอลมีความมีขั้วที่สูงกว่าน้ำ เอทานอลจึงสามารถละลายสารประกอบดังกล่าวออกมาได้ ดีกว่าน้ำ (Quy et al., 2014; Sultana et al., 2009)

ตารางที่ 4.3 ปริมาณไอโซฟลาโวน (เคอสิซินและเจนิสทิน) ของสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัด ถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล

สารสกัด	ตัวทำละลาย	เคอสิซิน (มิลลิกรัมต่อ	เจนิสทิน (มิลลิกรัมต่อ
		100 กรัมสารสกัด)	100 กรัมสารสกัด)
ถั่วเหลือง	น้ำ	38.93 ± 4.18 ^a	85.42 ± 6.93 ^a
	เอทานอล	398.84 ± 12.91 ^c	1,032.05 ± 19.49 ^c
ถั่วเหลืองหมัก	น้ำ	165.30 ± 5.77 ^b	665.61 ± 7.58 ^b
	เอทานอล	896.86 ± 9.63 ^d	1,641.61 ± 12.40 ^d

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

โดยตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มนี้ หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความ- เชื่อมั่น 95% (p<0.05)



ภาพที่ 4.1 โครมาโตแกรมไอโซฟลาโวน (เดอิดซีนและเจนิสทีน) ของสารสกัดน้ำของถั่วเหลือง (A): 174.3 mg สารสกัดน้ำของถั่วเหลืองหมัก (B): 29.2 mg สารสกัดเอทานอลของถั่วเหลือง (C): 4.5 mg และสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองหมัก (D): 9.6 mg

4.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

4.2.1 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

โดย ABTS จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระด้วยการเติมโซเดียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) และคลุกกันแสง ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ในการศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดโดยใช้ Trolox และ Ascorbic acid เป็นตัวควบคุม ดังตารางที่ 4.4 โดยพบว่าสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองหมักมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.52 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามด้วย สารสกัดน้ำของถั่วเหลืองหมักและสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลือง ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.62 และ 12.62 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันทาง สถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ส่วนสารสกัดน้ำของถั่วเหลืองมีความสามารถในการต้านอนุมูล-อิสระต่ำสุดเท่ากับ 20.85 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ของสารสกัดถั่วเหลือง และสารสกัดถั่วเหลืองหมักที่เตรียมด้วยตัวทำ-ละลายน้ำและเอทานอล

สารสกัด	ตัวทำละลาย	IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
ถั่วเหลือง	น้ำ	20.85 ± 0.63^d
	เอทานอล	12.62 ± 0.20^c
ถั่วเหลืองหมัก	น้ำ	10.62 ± 0.33^c
	เอทานอล	4.52 ± 0.22^b
Trolox		0.05 ± 0.00^a
Ascorbic acid		0.04 ± 0.01^a

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

โดยตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มนี้ หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความ-เชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

4.2.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhy-drazyl (DPPH)

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhy-drazyl (DPPH) เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่ เสถียรที่อยู่ในสารละลาย โดย DPPH คือ อนุภาคอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้ เมื่อ ได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ ใน การศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดในการทำให้ความเข้มข้นของ DPPH[•] ลดลง 50% (IC_{50}) โดยใช้ Trolox และ Ascorbic acid เป็นตัวควบคุม ดังตารางที่ 4.5 โดยพบว่าสารสกัดเอทานอล

ของถั่วเหลืองหมักมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 18.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามด้วยสารสกัดน้ำของถั่วเหลืองหมักและสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลือง ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 28.35 และ 27.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ส่วนสารสกัดน้ำของถั่วเหลืองมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำสุดเท่ากับ 56.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ของสารสกัดถั่วเหลือง และสารสกัดถั่วเหลืองหมักที่เตรียมด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล

สารสกัด	ตัวทำละลาย	IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
ถั่วเหลือง	น้ำ	56.50 ± 1.22^d
	เอทานอล	27.21 ± 0.96^c
ถั่วเหลืองหมัก	น้ำ	28.35 ± 0.02^c
	เอทานอล	18.45 ± 1.02^b
Trolox		0.09 ± 0.01^a
Ascorbic acid		0.07 ± 0.01^a

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

โดยตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มนี้ หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

4.2.3 การวัดสมบัติการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาการรีดิวซ์ โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอริก Fe^{3+} กับ TPTZ (ferric tripyridyltriazine) ได้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอรัส Fe^{2+} กับ TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงิน และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ในการศึกษาสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใช้ Trolox และ Ascorbic acid เป็นตัวควบคุม พบว่าตัวอย่างที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าน้ำ ดังตารางที่ 4.6 โดยพบว่าถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุด (0.258 มิลลิโมลเฟอรัส/กรัมสารสกัด) ตามด้วยสารสกัดน้ำของถั่วเหลืองหมักและสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลือง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.114 และ 0.128 มิลลิโมลเฟอรัส/กรัมสารสกัด ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ส่วนสารสกัดน้ำของถั่วเหลืองมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด (0.054 มิลลิโมลเฟอรัส/กรัมสารสกัด)

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดถั่วเหลือง และสารสกัดถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักที่เตรียมด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล

สารสกัด	ตัวทำละลาย	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (มิลลิโมลเฟอรส์ส/กรัมสารสกัด)
ถั่วเหลือง	น้ำ	0.054 ± 0.005 ^a
	เอทานอล	0.128 ± 0.003 ^b
ถั่วเหลืองหมัก	น้ำ	0.114 ± 0.008 ^b
	เอทานอล	0.258 ± 0.017 ^c
Trolox		9.681 ± 0.303 ^d
Ascorbic acid		10.867 ± 1.035 ^d

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

โดยตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มนี้ หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05)

จากการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดถั่วเหลือง และสารสกัดถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอลด้วยวิธี ABTS, DPPH และ FRAP assay พบว่า สารสกัดเอทานอลมีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันได้ดีที่สุด โดยสามารถเรียงลำดับความสามารถในการต้านออกซิเดชันจากสูงสุดไปต่ำสุดตามชนิดของสารสกัดได้ ดังนี้ สารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองหมัก ตามด้วยสารสกัดน้ำของถั่วเหลืองหมัก และสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลือง ซึ่งสารสกัดสองชนิดนี้ไม่พบความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และสารสกัดน้ำของถั่วเหลือง ตามลำดับ หากเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคือ Ascorbic acid และ Trolox พบว่าสารสกัดถั่วเหลือง และถั่วเหลืองหมักมีประสิทธิภาพต่ำกว่าสารมาตรฐาน และพบว่าการหมักถั่วเหลืองมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ เคอัสซัน และเจนิสทินสูงขึ้น ซึ่งส่งเสริมให้ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดถั่วเหลืองหมักสูงขึ้นด้วย เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และไอโซฟลาโวนเป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอล โครงสร้างมีหมู่ไฮดรอกซิลที่สามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระได้ จึงมีความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันหรืออนุมูลอิสระได้ (Hussain et al., 1987; Rice-Evans et al., 1996) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Juan and Chou (2010) ซึ่งพบว่าถั่วเหลืองคั่วที่หมักด้วย *Bacillus subtilis* BCRC 14715 มีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงขึ้นและมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นด้วย

ทั้งนี้ยังพบว่าสารสกัดเมทานอลของ kinema ซึ่งคือ ถั่วเหลืองหมักของประเทศอินเดียที่หมักด้วย *Bacillus subtilis* ส่งเสริมให้ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ, ความสามารถในการจับโลหะ และความสามารถในการรีดิวซ์สูงขึ้นเมื่อเทียบกับถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (Moktan et al., 2008) และสารประกอบฟีนอลิก (Kwak et al., 2007) ฟลาโวนอยด์ (Korkina and Afans'ev, 1997) เตอิชชินและเจนิสทิน (Kim et al., 2008) เป็นสารประกอบสำคัญในการต้านการเกิดออกซิเดชั่น

4.3 ศึกษาปริมาณของธาตุอาหารโภชนาการ

4.3.1 ไทอามินและไรโบฟลาวิน

การวิเคราะห์ไทอามินและไรโบฟลาวินของสารสกัดถั่วเหลือง และสารสกัดถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอลโดยใช้ HPLC ปริมาณของไทอามิน และไรโบฟลาวินของสารสกัดแต่ละชนิด ดังตารางที่ 4.7 ซึ่งพบว่าปริมาณของไทอามิน และไรโบฟลาวินของสารสกัดถั่วเหลืองหมักสูงกว่าสารสกัดถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sarkar et al. (1998), ในระหว่างการหมัก kinema ด้วย *B. subtilis* พบว่ากระบวนการหมักส่งเสริมให้ปริมาณของไทอามิน ไรโบฟลาวิน และไนอะซินสูงขึ้นถึง 45%, 71% และ 23% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก และพบว่าปริมาณ ไรโบฟลาวินใน natto สูงกว่าในถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมักอย่างมีนัยสำคัญทาง-สถิติ (Van Veen and Steinkraus, 1970) สำหรับตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยเอทานอลแสดงปริมาณของไทอามิน และไรโบฟลาวินเท่ากับ 10.08 ไมโครกรัมต่อกรัมสารสกัด และ 20.68 ไมโครกรัมต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ในขณะที่พบปริมาณของไทอามิน และไรโบฟลาวินที่สูงกว่าในสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองหมัก ซึ่งมีปริมาณของไทอามิน และไรโบฟลาวิน เท่ากับ 12.16 ไมโครกรัมต่อกรัม สารสกัด 29.62 ไมโครกรัมต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ปริมาณของไทอามิน และไรโบฟลาวินของสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสูงกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ และยังพบว่าถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยเอทานอลปริมาณของไทอามิน และไรโบฟลาวินสูงที่สุด

ตารางที่ 4.7 ปริมาณของไทอามิน และไรโบฟลาวินของสารสกัดถั่วเหลือง และสารสกัดถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักที่เตรียมด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล

สารสกัด	ตัวทำละลาย	Thiamine (ไมโครกรัมต่อกรัมสารสกัด)	Riboflavin (ไมโครกรัมต่อกรัมสารสกัด)
ถั่วเหลือง	น้ำ	4.62 ± 0.20 ^a	11.86 ± 2.38 ^a
	เอทานอล	10.08 ± 0.60 ^c	20.68 ± 1.90 ^b
ถั่วเหลืองหมัก	น้ำ	6.72 ± 0.13 ^b	18.48 ± 1.32 ^b
	เอทานอล	12.16 ± 0.54 ^d	29.62 ± 1.40 ^c

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

โดยตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์ หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05)

Eka (1980) รายงานว่าในถั่วโลคัส (locust bean) หมักของแอฟริกาหรือเรียกว่า ดาว่า-ดาว่า (Dawadawa) มีปริมาณไทอามิน เพิ่มขึ้นจาก 0.65 มิลลิกรัม/100 กรัมของถั่วโลคัสที่ไม่ผ่านการหมัก เป็น 1.35 มิลลิกรัม/100 กรัมของถั่วโลคัสที่ผ่านการหมัก และพบปริมาณไรโบฟลาวินสูงขึ้นจาก 0.45 มิลลิกรัม เป็น 1.30 ต่อ 100 กรัมของถั่วหมักดาว่าดาว่า

4.3.2 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด

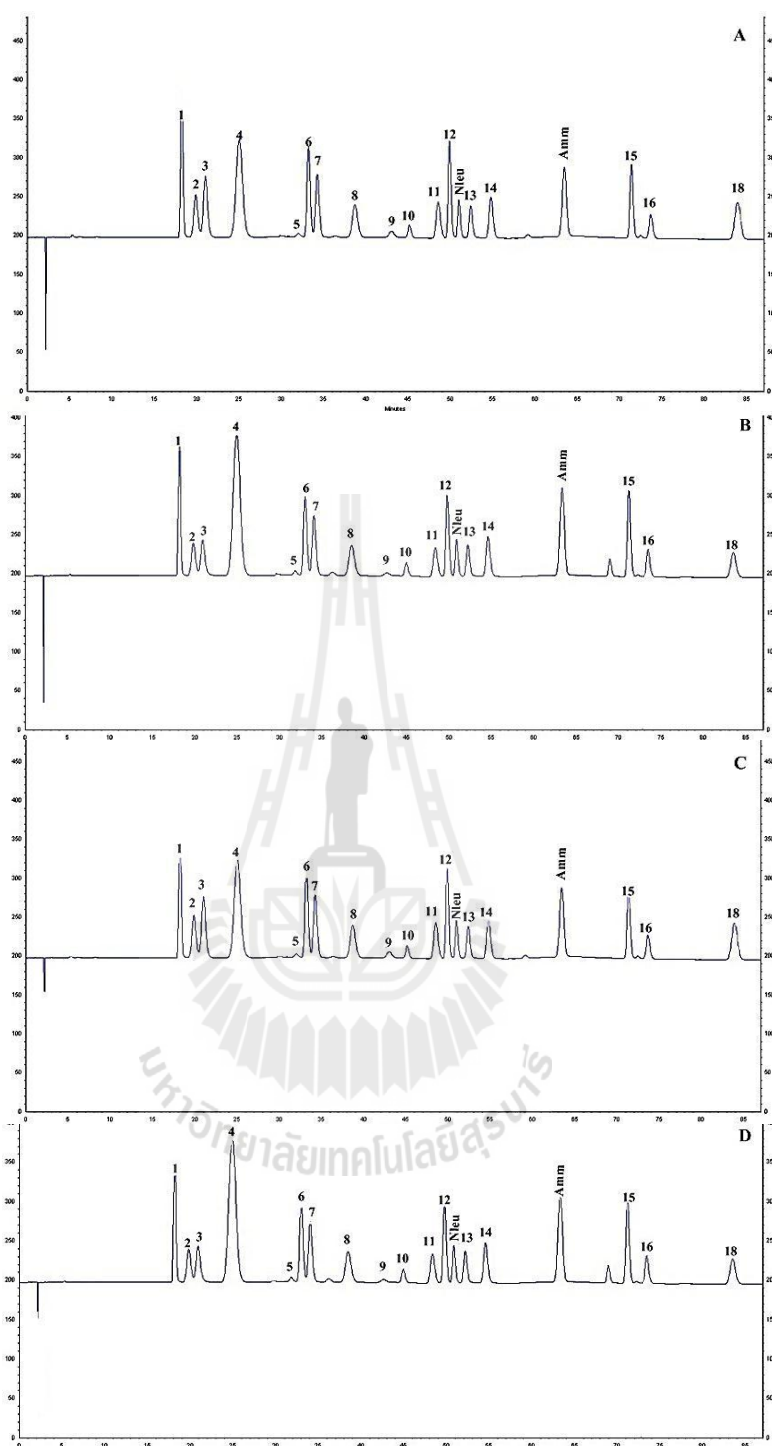
ในการหมักถั่วเหลืองจะมีเอนไซม์โปรติเอสเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของ *Bacillus subtilis* เอนไซม์โปรติเอสจะย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองให้เป็นกรดอะมิโน ซึ่งปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดที่เกิดจากการย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองของ *Bacillus subtilis* SB-MYP-1 มีรายละเอียดดังตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.2 จากการศึกษพบว่าปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองหมักสูงกว่าสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลือง, สารสกัดน้ำของถั่วเหลืองหมักและสารสกัดน้ำของถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยพบปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดเท่ากับ 2450.08 ไมโครโมล/กรัมสารสกัด

ตารางที่ 4.8 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดของสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักที่เตรียมด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล

Amino acids	Total amino acids (ไมโครโมล/กรัมสารสกัด)			
	น้ำ		เอทานอล	
	ถั่วเหลือง	ถั่วเหลืองหมัก	ถั่วเหลือง	ถั่วเหลืองหมัก
Asp	192.85 ± 0.81 ^a	211.19 ± 1.41 ^c	202.11 ± 2.52 ^b	269.99 ± 5.66 ^d
Thr	87.98 ± 0.37 ^a	94.92 ± 0.63 ^c	90.71 ± 1.13 ^b	115.88 ± 2.43 ^d
Ser	135.31 ± 0.57 ^a	138.86 ± 0.93 ^b	139.73 ± 1.74 ^b	167.68 ± 3.51 ^c
Glu	227.35 ± 0.95 ^a	236.40 ± 1.58 ^c	231.72 ± 2.89 ^b	343.50 ± 7.20 ^d
Pro	13.07 ± 0.05 ^a	15.91 ± 0.11 ^b	16.77 ± 0.21 ^c	23.20 ± 0.49 ^d
Gly	146.65 ± 0.62 ^a	156.40 ± 1.04 ^b	154.27 ± 1.92 ^b	216.74 ± 4.54 ^c
Ala	141.97 ± 0.60 ^a	147.40 ± 0.98 ^b	147.10 ± 1.84 ^b	178.59 ± 3.74 ^c
Val	96.78 ± 0.41 ^a	100.26 ± 0.67 ^c	97.71 ± 1.22 ^b	118.20 ± 2.48 ^d
Cys	13.44 ± 0.06 ^a	24.24 ± 0.16 ^b	24.49 ± 0.31 ^b	45.68 ± 0.96 ^c
Met	16.83 ± 0.07 ^a	20.41 ± 0.14 ^b	22.51 ± 0.28 ^c	30.01 ± 0.63 ^d
Ile	63.87 ± 0.27 ^a	66.77 ± 0.45 ^b	67.16 ± 0.84 ^b	83.81 ± 1.76 ^c
Leu	175.31 ± 0.74 ^a	177.38 ± 1.18 ^b	179.87 ± 2.24 ^b	228.59 ± 4.79 ^c
Tyr	40.11 ± 0.17 ^a	41.65 ± 0.28 ^b	44.54 ± 0.56 ^c	54.92 ± 1.15 ^d
Phe	126.73 ± 0.53 ^a	129.51 ± 0.86 ^b	126.98 ± 1.58 ^a	156.93 ± 3.29 ^c
Lys	161.74 ± 0.68 ^a	167.58 ± 1.12 ^b	168.18 ± 2.10 ^b	205.65 ± 4.31 ^c
His	33.70 ± 0.14 ^a	33.88 ± 0.23 ^a	33.87 ± 0.42 ^a	42.47 ± 0.89 ^b
Trp	26.87 ± 0.11 ^a	28.96 ± 0.19 ^b	31.75 ± 0.40 ^c	39.18 ± 0.82 ^d
Arg	105.98 ± 0.44 ^a	109.11 ± 0.73 ^b	105.58 ± 1.32 ^a	129.06 ± 2.70 ^c
Total	1806.54 ± 7.58^a	1900.84 ± 12.69^b	1885.04 ± 23.52^b	2450.08 ± 51.33^c

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

โดยตัวอักษรที่ต่างกันแถว หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05)



ภาพที่ 4.2 โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนทั้งหมดของสารสกัดน้ำของถั่วเหลือง (A): 50.7 mg สารสกัดน้ำของถั่วเหลืองหมัก (B): 53.2 mg สารสกัดเอทานอลของถั่วเหลือง (C): 30.9 mg และสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองหมัก (D): 31.1 mg ซึ่งหมายเลข 1 ถึง 18 คือ Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Val, Cys, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, Lys, His, Trp (วิเคราะห์แยก) และ Arg

ปริมาณกรดอะมิโนของสารสกัดถั่วเหลืองหมักมีปริมาณสูงกว่ากรดอะมิโนของสารสกัดถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก เนื่องจากในระหว่างกระบวนการหมัก เชื้อบาซิลลัสซับติลิสผลิตเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งมีคุณสมบัติย่อยโปรตีนโดยการตัดพันธะเปปไทด์ทำให้มีปริมาณกรดอะมิโนสูงขึ้น (Chantawannakul et al., 2002; Chukeatirote and Thakang, 2006) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sarkar et al. (1997) พบว่าการหมักถั่วเหลืองด้วย *Bacillus subtilis* มีกิจกรรมการทำงานของโปรติเอสสูง ซึ่งส่งผลให้ปริมาณกรดอะมิโนสูงขึ้นด้วย เมื่อเทียบกับถั่วเหลืองที่ไม่หมัก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Bernard et al. (2004) พบว่าในถั่วเหลืองหมักของญี่ปุ่น (นัตโตะ) เมื่อเวลาการหมักครบ 24 ชั่วโมง พบปริมาณกรดอะมิโนสูงกว่าถั่วเหลืองที่หมักเป็นเวลา 12 ชั่วโมงและถั่วเหลืองที่ไม่หมัก

4.4 ผลของสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมักที่มีต่อความเป็นพิษและการเจริญของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1

4.4.1 การทดสอบความเป็นพิษ

ในการทดลองเมื่อทำการเติม MTT ในหลุมของเพลทที่มีการยึดเกาะของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 พบว่าเมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ จะพบผลึกรูปดาวสีม่วงเกิดขึ้นซึ่งผลึกที่เกิดขึ้นนี้ เกิดจากเอนไซม์ไมโทคอนเดรียซัคซิเนสดีไฮโดรจีเนสในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เปลี่ยน MTT ให้กลายเป็นผลึกฟอร์มazan ซึ่งจะไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ใน 100% DMSO และสามารถวัดสีของสารละลายฟอร์มazanที่เกิดขึ้นได้จากค่าดูดกลืนแสงที่ระดับความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

ตารางที่ 4.9 ความเป็นพิษของสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมักที่เตรียมด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอลต่อเซลล์ไลน์ MC3T3-E1

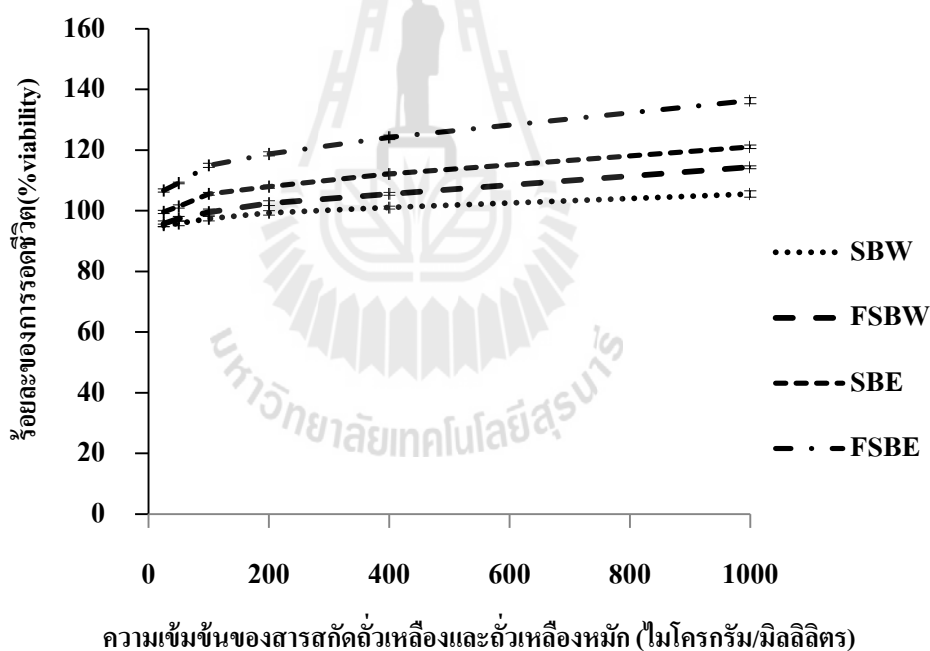
สารสกัด	ตัวทำละลาย	LC ₅₀ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
ถั่วเหลือง	น้ำ	>200
	เอทานอล	>200
ถั่วเหลืองหมัก	น้ำ	>200
	เอทานอล	>200

ในการศึกษาเปรียบเทียบผลของสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำและเอทานอลที่มีต่อเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 หากค่าดูดกลืนแสงมีค่าลดลงเมื่อ

เทียบกับตัวควบคุม แสดงว่าเซลล์มีการตายเกิดขึ้น ซึ่งสามารถนำไปคำนวณเป็นอัตราการรอดชีวิต เทียบกับตัวควบคุม (เซลล์ที่ไม่ได้เติมสารสกัด) โดยตัวควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 100% ผลการทดลองพบว่าทั้งสารสกัดน้ำและเอทานอลของถั่วเหลืองและถั่วเหลืองหมักไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ซึ่งมีค่า LC_{50} มากกว่า 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อค่า LC_{50} มีค่ามากกว่า 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะจัดสารนั้นอยู่ในกลุ่มสารที่ไม่เป็นพิษ (Okonogi et al., 2007)

4.4.2 การเจริญของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1

พบว่าอัตราการรอดชีวิต (%viability) ของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น จากภาพที่ 4.3 พบว่าสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองหมักส่งเสริมการเจริญของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ได้สูงสุด ที่อัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 136% เมื่อเทียบกับตัวควบคุม ซึ่งรองลงมาคือสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลือง, สารสกัดน้ำของถั่วเหลืองหมัก และสารสกัดน้ำของถั่วเหลือง ตามลำดับ



ภาพที่ 4.3 ผลของสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอลที่มีต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ด้วยวิธี MTT ซึ่ง SBW คือสารสกัดน้ำของถั่วเหลือง, FSBW คือ สารสกัดน้ำของถั่วเหลืองหมัก, SBE คือ สารสกัดเอทานอลของถั่วเหลือง และ FSBE คือ สารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองหมัก

ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมักส่งเสริมการเจริญของเซลล์สร้างกระดูก พบการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ซึ่งเป็นเซลล์สร้างกระดูกของหนู จึงอาจเป็นข้อมูลเบื้องต้นระบุว่าสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมักมีผลต่อการเพิ่มมวลกระดูก จากปริมาณเซลล์สร้างกระดูกที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Lee et al. (2001) พบว่าเมื่อเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ได้รับเงินสทิน ส่งผลกระทบต่อกระบวนการแบ่งตัวและป้องกันความเสียหายของเซลล์จากอนุมูลอิสระของออกซิเจน และพบว่าสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 0.05 กรัม/ลิตร กระตุ้นการสร้างคอลลาเจน เมื่อเซลล์มีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนจะมีการสร้างคอลลาเจนเกิดขึ้น (Choi et al., 2001)

4.5 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมักต่อการสร้างสารทางชีวเคมีของการสร้างกระดูก

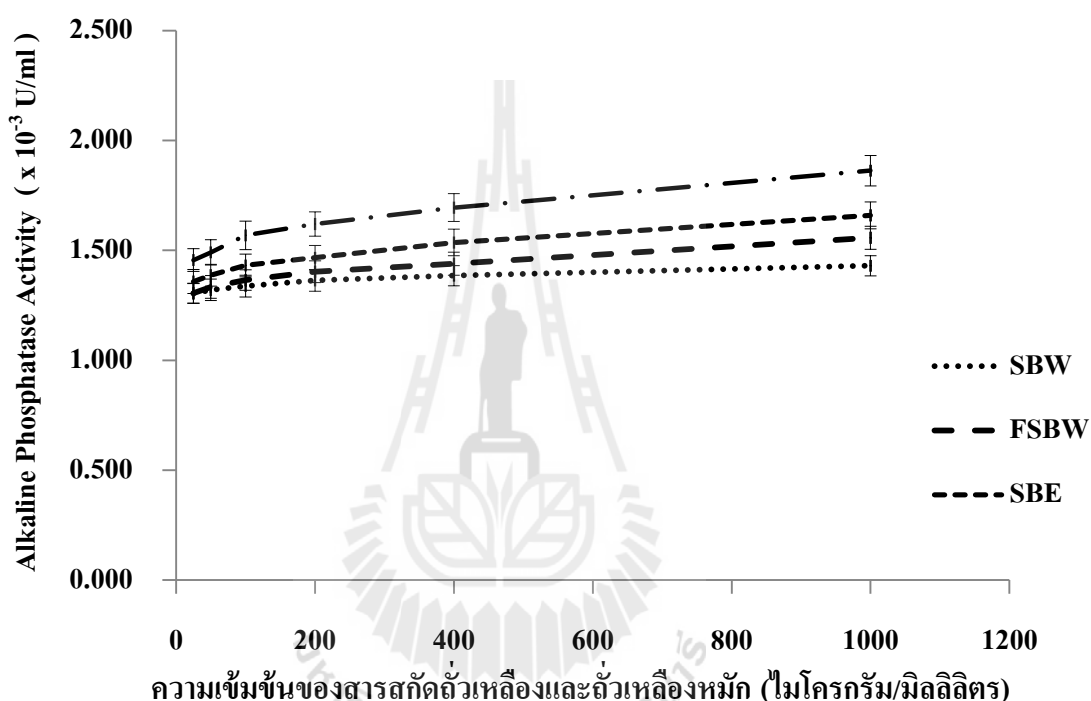
การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase activity)

การวัดค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 เมื่อได้รับสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการละลายเซลล์และนำมาวัดค่าปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสโดยใช้พาราไนโตรฟินิลฟอสเฟต (p-NPP) เป็นซับสเตรต เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 จะเปลี่ยนพาราไนโตรฟินิลฟอสเฟตให้เป็นพาราไนโตรฟินอล (p-nitrophenol) ซึ่งเป็นสารที่มีสีเหลือง การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 เมื่อได้รับสารสกัดถั่วเหลืองและถั่วเหลืองหมัก พบว่าเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ที่ได้รับสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองหมักมีค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงสุด คิดเป็น 135.61 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับตัวควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ที่ได้รับสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองในทุกความเข้มข้น สำหรับสารสกัดน้ำพบว่าสารสกัดจากถั่วเหลืองหมักที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรทำให้เซลล์ไลน์ MC3T3-E1 มีค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงกว่าสารสกัดจากถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดน้ำและเอทานอล ในถั่วเหลืองหมักพบว่าเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ที่ได้รับสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล มีค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงกว่าเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ที่ได้รับสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในทุกความเข้มข้น

เมื่อเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ได้รับสารสกัดจากถั่วเหลืองและสารสกัดจากถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำและเอทานอล ค่าการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์-

ไลน์ MC3T3-E1 เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 4.4 และยังพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยเมื่อเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 มีการเจริญเติบโตสูงขึ้นส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงขึ้นด้วย เนื่องจากเมื่อเซลล์สร้างกระดูกมีการเจริญจะมีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนและหลั่งเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เมื่อเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงขึ้นบ่งชี้ว่ามีการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกและกระบวนการสร้างกระดูกเกิดขึ้น (Louis and Stephen, 1998)



ภาพที่ 4.4 ผลของสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ซึ่ง SBW คือ สารสกัดน้ำของถั่วเหลือง, FSBW คือ สารสกัดน้ำของถั่วเหลืองหมัก, SBE คือ สารสกัดเอทานอลของถั่วเหลือง และ FSBE คือ สารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองหมัก

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมักส่งเสริมการเจริญเติบโตและกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Choi et al. (2001) ที่ศึกษาสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองที่ระดับความเข้มข้น 0.01-0.1 กรัม/ลิตร ต่อเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 พบการมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์เพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสารสกัด และสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองที่ระดับความเข้มข้น 0.05 กรัม/ลิตร พบ

กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และการสังเคราะห์คอลลาเจนสูงขึ้น ส่วนการศึกษาของ Gao and Yamaguchi (1999) และ Yamaguchi and Ma (2001) ซึ่งศึกษาในเนื้อเยื่อกระดูกต้นขาของหนูแก่เพศเมีย โดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบปริมาณเคออสซีน และเจนิสทินที่ระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ และ 10^{-5} โมลาร์ สามารถกระตุ้นการสร้างแคลเซียมและกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ซึ่งบ่งชี้ว่าเคออสซีนและเจนิสทิน ส่งเสริมกระบวนการสร้างกระดูก และยังพบว่าเคออสซีนและเจนิสทินที่ระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ และ 10^{-5} โมลาร์ สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและโปรตีน รวมถึงกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 (Sugimoto and Yamaguchi, 2000)

จากการศึกษาของ Roud Sari et al. (2005) เมื่อให้ถั่วเหลืองปริมาณ 35 กรัม/วัน กับผู้หญิงที่มีอายุระหว่าง 45-64 ปี เป็นเวลา 12 สัปดาห์ จากผลการตรวจเลือดและปัสสาวะ พบว่าปริมาณสารชีวเคมีของกระบวนการสลายกระดูกคือออกซีไพริดีโนลินลดลง และสารชีวเคมีของกระบวนการสร้างกระดูก เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น การกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ของสารสกัดถั่วเหลืองหมักจึงเป็นการระบุถึงการส่งเสริมกระบวนการสร้างกระดูกของสารสกัดถั่วเหลืองหมัก



บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 บทสรุป

จากการศึกษาปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมัก โดยเตรียมสารสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ น้ำและเอทานอล พบว่าสารสกัดถั่วเหลืองหมักมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ เคอัสซัน และเจนิสทินสูงกว่าสารสกัดถั่วเหลืองทั้งสารสกัดน้ำและเอทานอล และพบว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ เคอัสซัน และเจนิสทินของสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองหมักมีปริมาณสูงสุด และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลายที่นำมาใช้สกัดพบว่าเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ส่งเสริมให้ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ เคอัสซัน และเจนิสทินสูงขึ้น

จากการศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP พบว่า สารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองหมักมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ สารสกัดน้ำของถั่วเหลืองที่หมักและสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลือง และพบว่าสารสกัดน้ำของถั่วเหลืองมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด

จากการศึกษาปริมาณของธาตุอาหาร โภชนาการ (ไทอามิน ไรโบฟลาวิน และกรดอะมิโนทั้งหมด) พบว่าสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักมีปริมาณไทอามิน ไรโบฟลาวิน และกรดอะมิโนทั้งหมดสูงสุด และพบว่าสารสกัดถั่วเหลืองหมักมีปริมาณไทอามิน ไรโบฟลาวิน และกรดอะมิโนทั้งหมดสูงกว่าสารสกัดถั่วเหลือง และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลายที่นำมาใช้สกัดพบว่าเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ส่งเสริมให้ค่าของไทอามิน ไรโบฟลาวิน และกรดอะมิโนทั้งหมดสูงขึ้น

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมักที่สกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำและเอทานอลที่มีต่อเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 พบว่าทั้งสารสกัดน้ำและเอทานอลของถั่วเหลืองและถั่วเหลืองหมักไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ซึ่งมีค่า LC_{50} สูงกว่า 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสารที่ไม่เป็นพิษ

จากศึกษาการเจริญของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 เมื่อได้รับสารสกัดถั่วเหลืองและสารสกัดถั่วเหลืองหมักที่เตรียมด้วยตัวทำละลายน้ำและเอทานอล พบว่าอัตราการรอดชีวิต (%viability) ของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 สูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น สรุปได้ว่าสารสกัดถั่วเหลืองและ

สารสกัดถั่วเหลืองหมักส่งเสริมการเจริญของเซลล์กระดูก ซึ่งสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองหมักสามารถส่งเสริมการเจริญของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ได้สูงสุด

จากการศึกษาผลของสารสกัดต่อการสร้างสารชีวเคมีของการสร้างกระดูก พบว่าเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ที่ได้รับสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองหมักมีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดน้ำและเอทานอล พบว่าเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ที่ได้รับสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล มีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงกว่าเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ที่ได้รับสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อีกทั้งอัตราการเจริญเติบโตมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เมื่อเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 มีการเจริญเติบโตสูงจะส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงขึ้นด้วย

ดังนั้นสารสกัดเอทานอลของถั่วเหลืองหมักจัดเป็นสารสกัดที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ เนื่องจากมีปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ เคนิสทิน เคอสิซิน ไทอามิน ไรโบฟลาวิน และกรดอะมิโนทั้งหมดสูงสุด มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน รวมทั้งส่งเสริมกระบวนการสร้างมวลกระดูก

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากกลไกการทำงานของไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองหมักต่อกระดูกยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน แต่พบว่าเมื่อผลต่อกลไกการยับยั้งการสลายกระดูกและส่งเสริมการสร้างกระดูก จากที่ผู้วิจัยทำได้การวิจัยในส่วนของส่งเสริมการสร้างกระดูก จึงควรมีการศึกษาถึงกลไกในการทำงานที่เกี่ยวข้องกันระหว่างการสร้างและการสลายกระดูกต่อไป

2. ควรมีงานวิจัยต่อเนื่องด้านคลินิก

3. ควรมีการหาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ เพื่อประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในอนาคตต่อไป



บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- กรมพัฒนาที่ดิน กลุ่มวิจัยและพัฒนาการอนุรักษ์ดินและน้ำพื้นที่พืชไร่. (ม.ป.ป). [ออนไลน์]. ได้จาก:
www.Idd.go.th
- กรมส่งเสริมการเกษตร. (2543). [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://doa.go.th/fcri/index.html>
- ณัฐวุฒิ บุญยีน. กระจุกวิชาการ. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.vcharkarn.com/vcafe/141067>
- ทรงพล รติพงษ์, กรรณิการ์ บุตรเอก และขนิษฐา อัสวชัยณรงค์. (2546). สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compound). [ออนไลน์]. ได้จาก: www.dss.go.th/dssweb/st-articles/Files/pep_12_2546_phenolic.pdf.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนานพนธ์. (2014). ถั่วเน่า. [ออนไลน์]. ได้จาก:
<http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/3170.html>
- มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. (2013). ถั่วเหลือง (Soybean). [ออนไลน์]. ได้จาก:
<http://gri.kps.ku.ac.th>.
- มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ. [ออนไลน์]. ได้จาก: www.natres.psu.ac.th.
- วสกร บัลลังก์โพธิ์. (ม.ป.ป). พิษวิทยาในสิ่งแวดล้อมเบื้องต้น. [ออนไลน์]. ได้จาก: http://pirun.ku.ac.th/~fscibtb/Boonsatien/01424381_Ecology_files/Principle_of_Ecotoxicology.pdf
- สถาบันวิจัยพืชไร่. (2543). [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://doae.go.th/plant/soybean.html>
- Adlercreutz, H, Mousavi, Y., and Clark, J. (1992). Dietary phytoestrogens and cancer: *in vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. 41: 331-337.
- Ajimandi, B. H., Alekel, L., Hollis, B. W., Amin, D., Stawicz-Sapuntzakis, M., Guo, P., and Kukurja, S. C. (1996). Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. **Journal of Nutrition**. 126: 161-167.
- Anderson, J. W., Smith, B. M., and Washnock, C. S. (1999). Cardiovascular and renal benefit of dry bean and soybean intake. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 70: 464-474.
- Anderson, J. J. B., Thomsen, K., and Christiansen, C. (1987). High protein meals, insulin hormones and urinary calcium excretion in human subjects. **Osteoporosis International**. 240-245.

- Andrea, J., and Rapkin, M. D. (2007). Vasomotor symptoms in menopause: Physiologic condition and central nervous system approaches to treatment. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. 196: 97-106.
- Anne, E., King, A. E., and Hilary O. D. (2010). Oestrogen and progesterone regulation of inflammatory processes in the human endometrium. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. 120: 116-126.
- Anon. (2001). **Soybean isoflavone**. [Online]. Available: http://www.tokiwaph.co.jp/products/product02/soy_bean/soy_bean.htm.
- Anthony, M. S., Carkson, T. B., Hughes, V. L., Jr, Morgan, T. M., and Burke, G. L. (1996). Soy isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkey. **Journal of Nutrition**. 126: 43-50.
- Baird, D. D., Umbach, D. M., Lansdell, L., Hughes, C. L., Setchell, K. D., Weinberg, C. R., Haney, A. F., Wilcox, A. J., and Mclachlan, J. A. (1995). Dietary intervention study to assess estrogenicity of dietary soy among postmenopausal woman. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 80(5): 1685-1690.
- Benzie, I. F. F., and Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power" the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**. 239: 70-76.
- Bernard, F. G., Alexandre, Z., Robert, M., and Atherine, M. (2004). Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. **Food Research International**. 37: 123-131.
- Blair, H. C., Jordan, S. E., Peterson, T. G., and Barnes, S. (1996). Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. **Journal of Cellular Biochemistry**. 61: 629.
- Brand-Williams, W., Bondet, V., and Berset, C. (1995). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Food Science Technology**. 30: 609-615.
- Brandi, M. L. (1999). Phytoestrogens and menopause. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 7: 213-216.
- Brenner, B. M., Meyer, T. W., and Hastetter, T. H. (1982). Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. **The New England Journal of Medicine**. 307: 652-659.

- Brzezinski, A., and Debi, A. (1999). Phytoestrogens: the natural selective estrogen receptor modulators. **The European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**. 85(1): 47-51.
- Chaia, C., Jua, H. K., Kimc, S. C., Parka, J. H., Limd, J., Kwona, S. W., and Lee, J. (2012). Determination of bioactive compounds in fermented soybean products using GC/MS and further investigation of correlation of their bioactivities. **Journal of Chromatography B**. 880: 42-49.
- Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote, E., and Lumyong, S. (2002). Characterization of protease of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. **Science Asia**. 28: 241-245.
- Chapple, I. L. C., and Matthews, J. B. (2007). The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. **Periodontol**. 43: 160-232.
- Chiechia, L. M., Secretob, G., Amorec, M. D., Fanellid, M., Venturellib, E., Cantatorec, F., Valerioa, T., Laselvac, G., and Loizzia, P. (2002). Efficacy of a soy rich diet in preventing postmenopausal osteoporosis: the menfis randomized trial. **Maturitas**. 42: 295-300.
- Cho, K. M., Lee, J. H., Yun, H. D., Ahn, B. Y., Kime, H., and Seo, W. T. (2011). Changes of phytochemical constituents (isoflavones, flavanols, and phenolicacids) during cheonggukjang soybeans fermentation using potential probiotics *Bacillus subtilis* CS90. **Journal of Food Composition and Analysis**. 24: 402-410.
- Choi, E. M., Suh, K. S., Kim, Y. S., Choue, R. W., and Koo, S. J. (2001). Soybean ethanol extract increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Phytochemistry**. 56: 733-739.
- Chrischilles, E. A., Butler, C.D., Davis, C. S., and Wallace, R. B. (1991). A model of lifetime osteoporosis impact. **Archives of Internal Medicine**. 151(10): 2026-2032.
- Chukeatirote, E., Chainun, C., Moukamnerd, C., Thakang, P., Chantawannakul, P., Lumyong, S., Boontim, N., and Siengsubchart, A. (2005). Microbiological and biochemical changes in Thua-Nao fermentation. **Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology**.
- Chukeatirote, E., and Thakang, P. (2006). Chemical composition of thua nao-a fermented soybean food of Northern Thailand. **Chiang Mai Journal of Science**. 33(2): 243-245.

- Dajanta, K., Chukeatirote, E., Apichartsrangkoon, A., and Frazier, R. A. (2009). Enhanced aglycone production of fermented soybean products by *Bacillus* species. **Acta Biologica Szegediensis**. 53(2): 93-98.
- Dajanta, K., Apichartsrangkoon, A., Chukeatirote, E., and Frazier, R. A. (2011). Free-amino acid profiles of thua nao, a Thai fermented soybean. **Food Chemistry**. 125: 342-347.
- Delmas, P. D., Ensrud, K.E., Adachi, J. D., Harper, K.D., Sarkar, S., Gennari, C., Black, D. M., and Eastell, R. (2002). Efficacy of raloxifene on vertebral fracture risk reduction in postmenopausal women with osteoporosis: four-year results from a randomized clinical trial. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 87: 3609-3617.
- De Robertis, E. D. P. (1975). **Cell Biology** (6th ed.). Saunders (W.B.) Co Ltd.
- Eskin, N. A. M., and Przybylski, R. (2001). **Antioxidant and shelf life of foods**. New York: CRC Press Inc. pp. 175-202.
- Fanti, P., Monier-Faugere, M. C., Geng, Z., Schmidt, J., Morris, P. E., Cohen, D., and Malluche, H. H. (1998). The phytoestrogens genistein reduced bone loss in short-term ovariectomised rats. **Osteoporosis International**. 8: 274-281.
- Feng, J., Liu, X., Xu, Z. R., Lu, Y. P., and Liu, Y. Y. (2007). Effect of fermented soybean meal on intestinal morphology and digestive enzyme activities in weaned piglets. **Digestive Diseases and Sciences**. 52: 1845-1850.
- Gao, Y. H., and Yamaguchi, M. (1999a). Inhibitory effect of genistein on osteoblast-like cell formation in mouse marrow cultures. **Biochemical Pharmacology**. 58: 767-772.
- Gao, Y. H., and Yamaguchi, M. (1999b). Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclasts: Apoptosis is induced through Ca²⁺ signaling. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. 22: 805-809.
- Gao, Y. H., and Yamaguchi, M. (1999c). Anabolic effect of daidzein on cortical bone in tissue culture: Comparison with genistein effect. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 194: 93-98.
- Garcia, M. C., Torre, M., Marina, M. L., and Laborada, F. (1997). Composition and characterization of soybean and related products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 37: 361-391.

- Garnero, P., Sornay-Rendu, E., Claustrat, B., and Delmas, P. D. (2000). Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women. **Journal of Bone and Mineral Research**. 15: 1526-1536.
- Gasaluck, P., and Oonsivilai, R. (2011). Decreasing of undesirable aroma compound and valuating nutritional fermented soybean by the use of *Bacillus subtilis* as fermentation starter culture. **Suranaree Journal Science Technology**.
- Gil, I. M., Tomas-Barberan, A. F., Hess-Pierce, B., and Kader, A. A. (2002). Antioxidant capacities, phenolic compounds, and vitamin C contents of nectarine, peach and plum cultivars from California. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50: 4976-4982.
- Greaves, K. A., Zhang, L., Williams, K., Parks, J., and Wagner, J. D. (1997). Phytoestrogen and intact soy protein administrations differ in their effects on plasma lipids and lipoproteins. **In the Symposium on Phytoestrogen Research Methods**. Tuscon: Arizona.
- Han, B. Z., Rombouts, F. M., and Nout, M. J. R. (2004). Amino acid profile of sufu, a Chinese fermented soybean food. **The Journal of Food Composition and Analysis**. 17: 689-698.
- Hawrylewicz, E. J., Zapata, J. J., and Blair, W. H. (1995). Soy and experimental cancer: Animal study. **Journal of Nutrition**. 125: 698-708.
- Heidi, D. N. (2008). Menopause. **The Lancet**. 371(9614): 760-770.
- Heinonen, S. W. K. (2002). Metabolism of isoflavones in human subjects. **Phytochemistry Reviews**. 1(2): 175-182.
- Hsu, M. F., and Chiang, B. H. (2009). Effect of *Bacillus subtilis* natto-fermented *Radix astragali* on collagen production in human skin fibroblasts. **Process Biochemistry**. 44: 83-90.
- Huang, D., Qu, B., and Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53: 1841-1856.
- Hussain, S. R., Cillard, J., and Cillard, P. (1987). Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**. 26: 2489-2491.
- Hymowitz, T., and Singh, R. J. (1987). **Taxonomy and speciation In Soybean : Improvement Production and uses** (2nd ed.). Madison: Agronomy Monograph.
- Inatsu, Y., Nakamura, N., Yuriko, Y., Fushimi, T., Watanasiritum, L., and Kawamoto, S. (2006). Characterization of *Bacillus subtilis* strains in thua nao, a traditional fermented soybean food in northern Thailand. **Letters in Letters in Applied Microbiology**. 43: 237-242.

- Ishimi, Y., Miyuara, C., Ohmura, M., Onoe, Y., Sato, T., Uchiyama, Y., Ito, M., Wang, X., Suda, T. and Ikegami, S. (1999). Selective effect of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. **Endocrinology**. 140: 1893-1900.
- Itoha, F., Aoyagia, S., Furihata-Komatsua, H., Aokia, M., Kusamaa, H., Kojimaa, M., and Kogob, H. (2003). Clodronate stimulates osteoblast differentiation in ST2 and MC3T3-E1 cells and rat organ cultures. **European Journal of Pharmacology**. 477 : 9-16.
- Jing, L. G., and Zhang, Y. Z. (2006). Determination of soybean isoflavones extracted from soybean by HPLC. **Journal of US-China Medical Science**. 26(3): 629- 632.
- Johnson, I., and Williamson, G. (2003). **Phytochemical functional foods**. England: Woodhead Publishing.
- Juan, M. Y., and Chou, C. C. (2010). Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC14715. **Food Microbiology**. 27: 586-591.
- Kao, P. C., and P'eng, F. K. (1995). How to reduce the risk factors of osteoposis in Asia. **Chung Hua I Hsueh Tsa Chih-Chinese Medical Journal**. 55: 209-213.
- Kajiya, H., Okabe, K., Okamoto, F., Tsuzuki, T., and Soeda, H. (2000). Protein tyrosine kinase inhibitors increase cytosolic calcium and inhibit actin organization as resorbing activity in rat osteoclasts. **Journal of Cellular Physiology**. 183: 83-90.
- Kenneth, D., Setchell, R., and Cassidy, A. (1999). Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health. **Journal of Nutrition**. 129: 758-767.
- Kerry, E. W., Alison, M. D., Barb, E. M. D., Xia, X., Robert, M., William, R. P., and Mindy, S. K. (2000). Effects of soy isoflavones on markers of bone turnover in premenopausal and postmenopausal woman. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 85: 3043-3048.
- Kim, J. J., Kim, S. H., Hahn, S. J., and Chung, I. M. (2005). Changing soybean isoflavone composition and concentrations under two different storage conditions over three years. **Food Research International**. 38: 435-444.
- Kim, N. Y., Song, E. J., Kwon, D. Y., Kim, H. P., and Heo, M. Y. (2008). Antioxidant and antimutagenic activities of Korean fermented soybean. **Food and Chemical Toxicology**. 46:1184-1189.

- Kontessis, P., Jones, S., Dodd, R., Trevisan, R., Nosadini, R., Fioretto, P., Borsato, M., Sacerdoti, D., and Viberti, G. (1990). Renal metabolic and hormonal responses to ingestion of animal and vegetable proteins. **Kidney International**. 38(1): 136-144.
- Korkina, L. G., and Afans'ev, I. B. (1997). Antioxidant and chelating properties of flavonoids. **Journal of Advanced Clinical Pharmacology**. 38: 151-163.
- Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., Mhamdi, B., Chaieb, K., Bakrouf, A., Magné, C., and Abdelly, C. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. **Food and Chemical Toxicology**. 47: 2083-2091.
- Kwak, C. K., Lee, M. S., and Park, S. C. (2007). Higher antioxidant properties of Chungkookjang a fermented soybean paste, may be due to increased aglycone and malonylglycoside isoflavone during fermentation. **Nutrition Research**. 27: 719-727.
- Lee, I. H., Hung, Y. H., and Chou, C. C. (2008). Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean. **The International Journal of Food Microbiology**. 121: 150-156.
- Lee, Y. S., Chen, X. and Anderson, J. B. (2001). Physiological concentrations of genistein stimulate the proliferation and protect against free radical induced oxidative damage of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. **Nutrition Research**. 21: 1287-1298.
- Legrand, E., Hedde, C., Gallois, Y., Degasne, I., Boux De Casson, F., Mathieu, E., Basle, M. F., Chappard, D., and Audran, M. (2001). Osteoporosis in Men: A potential role for the sex hormone binding globulin. **Bone**. 29(1): 90-95.
- Lindsay, R., Aitken, J. M., Andersen, J. B., Hart, D. M., Macdonald, E. B., and Clarke, A. C. (1976). Long term prevention of postmenopausal osteoporosis by estrogen, evidence for an increased bone mass after delayed onset of estrogen treatment. **Lancet**. 1: 1038-1040.
- Lindsay, R., Gallagher, J. C., Kleerekoper, M., and Pickar, J. H. (2000). Effect of lower doses of conjugated equine estrogens with and without medroxyprogesterone acetate on bone in early postmenopausal women. **Journal of the American Medical Association**. 287: 2668-2676.
- Liu, K. (1997). **Soybeans: Chemistry, technology and utilization**. Springer. 532 pp.
- Louis, V. A., and Stephen, M. K. (1998). **Metabolic bone diseases and clinically related disorders**. California: Academic Press.

- Lu, W. W., Luk, K.D., Cheung, K. C., Gui-Xing, Q., Shen, J. X., Yuen, L., Ouyang, J., and Leong, J.C. (2004). Microfracture and changes in energy absorption to fracture of young vertebral cancellous bone following physiological fatigue loading. **Spine**. 29: 1196-1201.
- Marshall, N. J, Goodwin, C. J, Holt, S. J. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. **Plant Growth Regulation**. 5(2): 69-84.
- Mei, J., Yeung, S. S., and Kung, A. W. (2001). High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal woman. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 86(11): 5217-5221.
- Melchior, H. (1994). **Syllabus of plant families - A. Engler's syllabus der pflanzenfamilien part 3: Bryophytes and seedless vascular plants**. Berlin: Borntraeger.
- Merz-Demlow, B. E., Duncan, A. M., Wangen, K. E., Carr, T. P., Phipps, W. R., and Kurzer, M. S. (2000). Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal woman. **American Journal of Clinical Nutrition**. 71(6): 1462-1469.
- Marieb, E. N. (1998). **Human Anatomy & Physiology** (4th ed.). California: Benjamin/Cummings Science Publishing.
- Messina, M. J. (1999). Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. **American Journal of Clinical Nutrition**. 70: 439-450.
- Messina, M., and Barns, S. (1991). The role of soy products in reduced risk of cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. 83: 541-546.
- Messina, M. J., Persky, V., Setchell, K. D., and Barnes, S. (1994). Soy intake and cancer risk: A review of the *in vitro* and *in vivo* data. **Nutrition and Cancer**. 21(2): 113-131.
- Michael, P. A. (2003). What is bone mineralization?. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 88(10): 5043.
- Moktan, B., Saha, J., and Sarkar, P. K. (2008). Antioxidant activities of soybean as affected by Bacillus-fermentation to kinema. **Food Research International**. 41: 586-593.
- Mossmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological Methods**. 65: 55-63
- Murkies, A. L, Lombard, C., Strauss, B. J. G., Wilcox, G., Burger, H. G., and Morton, M. S. (1995). Dietary flour supplementation decrease postmenopausal hot flushes: Effect of soy and wheat. **Maturitas**. 21: 189-195.

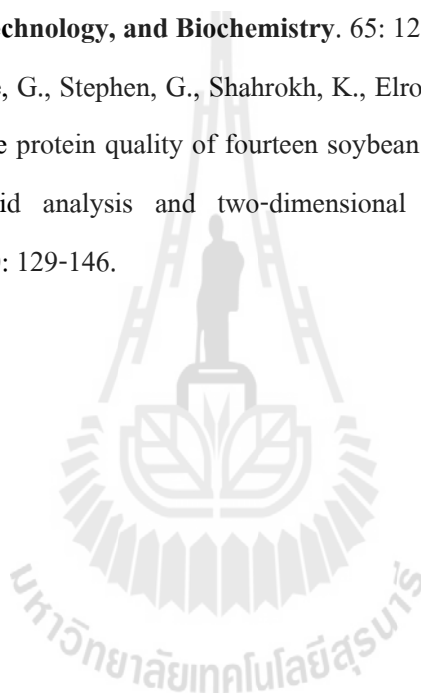
- Nagata, C., Shimisu, H., Takami, R., Hayashi, M., Takeda, N., and Yasudat, K. (1998). Hot flushes and other menopausal symptoms in relation to soy product intake in Japanese women. **Climacteric**. 2: 6-12.
- Nagata, C., Takatsuka, N., Kurisu, Y., and Shimisu, H. (1998). Decreased serum total cholesterol concentration is associated with high intake of soy products in Japanese men and woman. **Journal of Nutrition**. 128: 209-213.
- Nakajima, N., Nozaki, N., Ishihara, K., Ishikawa, A., and Tsuji, H. (2005). Analysis of isoflavone content in tempeh, a fermented soybean, and preparation of a new isoflavone-enriched tempeh. **The Journal of Bioscience and Bioengineering**. 6: 685-687.
- Nam, N. H., and Kampa, N. (2013). Bone cell function: A review. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**. 43(3): 329-336.
- Nielsen, T. F., Ravn, P., Bagger, Y. Z., Warming, L., and Christiansen, C. (2004). Pulsed estrogen therapy in prevention of postmenopausal osteoporosis. A 2-year randomized, double blind, placebo-controlled study. **Osteoporosis International**. 15: 168-174.
- NIH consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. (2001). **Journal of the American Medical Association**. 285: 785-795.
- Nomura, N., Saijo, K., Kato, M., Wang, P. C., Ohno, T., and Matsumura, M. (1996). Improved MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay for the measurement of viable animal cell number in porous cellulose carriers. **Biotechnology Techniques**. 10: 883-888.
- Okonogi, S., Duangrata, C., Anuchpreedab, S., Tachakittirungroda, S., and Chowwanapoonpohna, S. (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. **Food Chemistry**. 103(3): 839-846.
- Oonsivilai, R., Chajareonudomrourng, N., Huantanom, Y., and Oonsivilai, A. (2010). Extraction condition of *Echinocactus grusonii*. **World Academy of Science, Engineering and Technology Journal**. 7: 366-369.
- Oonsivilai, R., Cheng, C., Bomser, J. A., Ferruzzi, M. G., and Ningsanond, S. (2007). Phytochemical profiling and detoxification properties of *Thunbergia Laurifolia* Lindl(Rang Chuet) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. 114: 300-306.

- Osman, A. M. (2011). Multiple pathways of the reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH[•]) with (+)-catechin: Evidence for the formation of a covalent adduct between DPPH[•] and the oxidized form of the polyphenol. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 412: 473-478.
- Perez-Jimenez, J., and Saura-Calixto, F. (2006). Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**. 39: 791-800.
- Picherit, C. C., Bennetau-Pelissero, C., Kati-Coulibaly, S., Davicco, M. J., Lebecque, P., and Barlet, J. P. (2000). Diadzein is more efficiency than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. **Journal of Nutrition**. 130: 1675-1681.
- Polkowski, K., and Mazurek, A. P. (2000). Biological properties of genistein. A review of *in vitro* and *in vivo* data. **Acta Poloniae Pharmaceutica**. 57(2): 135-155.
- Potter, S. M., Baum, J. A., Teng, H. Stillman, R. J., Shay, N. F. and Erdman, J. W. (1998). Soy protein and isoflavones: Their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. **American Journal of clinical Nutrition**. 68: 1375-1379.
- Punchard, N. A., and Kelly, F. J. (1996). **Free radicals, a practical approach**. Oxford: IRL Press. pp. 271-285.
- Punjaisee, C., Chaiyasut, C., Chansakaow, S., Tharata, S., Visessanguan, W., and Punjaisee, S. (2011). 8-Hydroxygenistein formation of soybean fermented with *Aspergillus oryzae* BCC 3088. **African journal of Agricultural Research**. 6(4): 785-789.
- Quy, D. D., Artik, E. A., Phuong, L. T. N., Lien, H. H., Felycia, E. S., Suryadi, I., and Yi-Hsu, J. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavoids content, and antioxidant activity of *Lamnophila aromatic*. **Journal of Food and Drug Analysis**. 22(3): 296-302.
- Ransly, J. K., Donnelly, J. K., and Read, N. W. (2001). **Food and nutritional supplements**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Rassi, C. M., Lieberherr, M., Chaumaz, G., Pointillart, A., and Cournot, G. (2002). Down-regulation of osteoclast differentiation by daidzein via caspase 3. **Journal of Bone and Mineral Research**. 17: 630-638.
- Renich, T., Bhathena, S. J., and Velasquez, M. T. (2001). Protective effects of dietary phytoestrogens in chronic renal disease. **Journal of Renal Nutrition**. 11(4): 183-193.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., and Paganga, G. (1996). Structure antioxidant activity

- relationship of flavonoid and phenolic acid. **Free Radical Biology and Medicine**. 20: 953-956.
- Rolls, B. J. (1995). Carbohydrates fat and satiety. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 61(4): 960-967.
- Rossouw, J. E., Anderson, G. L., Prentice, R. L., LaCroix, A. Z., Kooperberg, C., and Stefanick, M. L. (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. **Journal of the American Medical Association**. 288(3): 321-333.
- Sánchez-Machado, D. I., López-Cervantes, J., López-Hernández, J., and Paseiro-Losada, P. (2004). Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in edible marine seaweeds by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science**. 42: 117-120.
- Sarkar, P. K., Jones, L. J., Craven, G. S., Somerset, S. M., and Palmer, C. (1997). Amino acid profiles of kinema, a soybean-fermented food. **Food Chemistry**. 59: 69-75.
- Setchell, K. D. R. (1998). Phytoestrogens: The biochemistry, physiology, and implications for human health of isoflavones. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 68: 1333-1346.
- Setchell, K. D. R. (2001). Soy isoflavones-benefits and risk from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs). **The American Journal of Clinical Nutrition**. 20: 354-362.
- Shanmugasundaram, S. (1976). **Varietal development and germplasm utilization in soybean**. Taiwan: Food and Fertilizer Technology Center Technology Bulletin.
- Shawky, Z. A. B. (1999). **Clinical management of the perimenopause**. United Kingdom: Anybook Ltd.
- Silva, M. J., and Gibson, L. J. (1997). Modeling the mechanical behavior of vertebral trabecular bone: Effects of age-related changes in microstructure. **Bone**. 21(2): 191-199.
- Singthong, J., Oonsivilai, R., Oonmetta-aree., and Ningsanond, S. (2011). Phytochemical profile, antioxidant activity and cytotoxicity of *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels. (Yanang) extracts on Caco-2-cells. In **the 5th Thailand Congress of Nutrition**.
- Sugimoto, E., and Yamaguchi, M. (2000a). Anabolic effect of genistein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. **International Journal of Molecular Medicine**. 5: 515-520.

- Sugimoto, E., and Yamaguchi, M. (2000b). Stimulatory effect of daidzein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Biochemical Pharmacology**. 59: 471-475.
- Sultana, B., Anwar, F., and Ashraf, M. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. **Molecules**. 14: 2167-2180.
- Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H., and Muraki, H. (1987). A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. **Experientia**. 43: 1110-1111.
- Tobe, H., Komiyama, O., Komiyama, Y., and Maruyama, H. B. (1997). Daidzein stimulation of bone resorption in pit formation assay. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 61: 370-371.
- Twentyman, P. R., and Luscombe, M. (1987). A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. **British Journal of Cancer**. 56(3): 279-285.
- Van Veen, A. G., and Steinkraus, K. H. (1970). Nutritive value and whole someness of fermented foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 18: 576-578.
- Vatuen, S., Cashman, K. D., Robins, S. P., Cassidy, A., Kardinaal, A., and Branca, F. (2003). Investigating the role of natural phytoestrogens on bone health in postmenopausal woman. **British Journal of Nutrition**. 89(1): 87-99.
- Vicky, K., and Kong, W. N. (2004). Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. **Journal of Molecular and Cellular Endocrinology**. 228: 79-102.
- Wong, C. C., Li, H., Cheng, K., and Chen, F. (2006). A systemic survey of antioxidant activity of 30 chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. **Food Chemistry**. 97: 705-711.
- Yamaguchi, M., and Gao, Y. H. (1998). Inhibitory effect of genistein on bone resorption in tissue culture. **Biochemical Pharmacology**. 55: 71-76.
- Yamaguchi, M., and Ma, Z. J. (2001). Effect of polyphenols on calcium content and alkaline phosphatase activity in rat femoral tissues *in vitro*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**. 24: 1437-1439.
- Yamaguchi, M., and Sugimoto, E. (2000). Stimulatory effect of genistein and daidzein on protein synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells: Activation of aminoacyl-tRNA synthetase. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 55: 71-76.

- Yamagishi, T., Otsuka, E., and Hagiwara, H. (2001). Reciprocal control of expression of bRNAs for osteoclast differentiation factor and OPG in osteogenic stromal cells by genistein: Evidence for the involvement of topoisomerase II in osteoclastogenesis. **Endocrinology**. 142: 3632-3637.
- Yewade, N. G., Wolfe, A., Novaira, H. J., and Radovick, S. (2009). Estrogen regulation of gene expression in GnRH neurons. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 303: 25-30.
- Yoshida, H., Teramoto, T., Ikeda, K., and Yamori, Y. (2001). Glycitein effect on suppressing the proliferation and stimulating the differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 65: 1211-1213.
- Zarkadas, C. G., Christine, G., Stephen, G., Shahrokh, K., Elroy, R. C., and Ron, J. D. G. (2007). Assessment of the protein quality of fourteen soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars using amino acid analysis and two-dimensional electrophoresis. **Food Research International**. 40: 129-146.





ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
คุณค่าอาหารทางโภชนาและความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1) การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 20% (w/v)

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 20 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

2) การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดกาฬิก 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ละลายกรดกาฬิก 0.5 กรัม ใน 95% เอทานอล 10 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

3) การเตรียมสารละลาย DPPH 62.5 ไมโครโมลาร์

ละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 2.4643 มิลลิกรัม ในเมทานอลเล็กน้อย จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 100 มิลลิลิตร

4) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BHT 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ละลาย BHT 50.0 มิลลิกรัมในเอทานอล 95% และปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร

5) การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ละลายกรดแอสคอร์บิก 25.0 มิลลิกรัมในเมทานอลและปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร

6) การเตรียมสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ 300 มิลลิโมลาร์ pH 3.6

ละลายโซเดียมอะซีเตตไตรไฮเดรต 1.55 กรัม ในกรดอะซีติก 8 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร

7) การเจือจางกรดไฮโดรคลอริกให้มีความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์

เปิดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (12.04 โมลาร์) 1.66 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร

8) การเตรียมสารละลาย TPTZ 10 มิลลิโมลาร์

ละลาย TPTZ 0.0312 กรัม ใน 10 มิลลิลิตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 40 มิลลิโมลาร์ โดยต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนนำมาวิเคราะห์

9) การเตรียมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 20 มิลลิโมลาร์

ละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.054 กรัมในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร โดยต้องเตรียมใหม่ ทุกครั้งก่อนนำมาวิเคราะห์

10) การเตรียมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต 2 มิลลิโมลาร์

ละลายเฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.0278 กรัมในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร

11) การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 4.9 มิลลิโมลาร์

ละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 0.0662 กรัมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร

12) การเตรียมสารละลาย ABTS 14 มิลลิโมลาร์

ละลาย ABTS 0.0385 กรัม ในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด

13) การเตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตต 2.5 โมลาร์

ละลายโซเดียมอะซิเตต 34.02 กรัมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

14) การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไซยาไนด์ 1%

ละลายโพแทสเซียมเพอร์ริกไซยาไนด์ 1 กรัมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

15) การเตรียมสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตต 0.005 โมลาร์

ละลายแอมโมเนียมอะซิเตต 192.7 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนครบ 500 มิลลิลิตร

16) การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 15%

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 150 กรัมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนครบ 1000 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์และเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์



Medium ชนิดเตรียมจากผง α -MEM

- α -MEM high glucose (D7777)	1.35	กรัม
- โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3)	3.7	กรัม
- น้ำบริสุทธิ์สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์	1	ลิตร

วิธีการเตรียม

- 1) ชั่ง α -MEM ตามปริมาณที่ต้องการ เติลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำอยู่ประมาณ 300-400 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันด้วย stirrer
- 2) ชั่ง โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3) ตามปริมาณที่กำหนด แล้วเติลงในบีกเกอร์ เดิม แล้วกวนให้เข้ากัน
- 3) เทสารในบีกเกอร์ข้อ 3 ลงใน volumetric flask ขนาด 1 ลิตร
- 4) ปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้ 1 ลิตร
- 5) นำไปกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน ทำการกรองในตู้ปลอดเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 3 เดือน

หมายเหตุ: α -MEM ที่มีส่วนประกอบของแอล-กลูตามีน ซึ่งมี Half life เพียง 1 เดือน ถ้าใช้ไม่หมด ต้องเติมแอล-กลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ทุกเดือน

การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (1X)

- 1) ละลายสารต่าง ๆ เหล่านี้ในน้ำกลั่น ได้แก่
 - โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 8.00 กรัม
 - โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.20 กรัม
 - ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 1.44 กรัม
 - โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.24 กรัม
- 2) ปรับ pH ให้เป็น 7.4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล
- 3) ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น
- 4) นำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (autoclave)

การเตรียม Supplement อื่น ๆ

Heat Inactivation Procedure

- 1) นำซีรัมออกจากตู้แช่แข็งแล้วทิ้งไว้ให้ละลายในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส และต้องทำการเขย่าให้ผสมเข้ากันดีก่อนจะทำการ Heat inactivate
- 2) ตั้งอุณหภูมิของน้ำในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เท่ากับ 56 องศาเซลเซียส
- 3) เมื่ออุณหภูมิถึงที่กำหนดไว้ให้นำซีรัมลงแช่เป็นเวลา 30 นาที โดยนำออกมาเขย่าทุก 10 นาที
- 4) เมื่อครบกำหนดให้นำมาแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อลดอุณหภูมิของซีรัม
- 5) ปิเปตซีรัม 40 มิลลิลิตร ลงใน conical tube ปิดฝาให้แน่นและซีลด้วยพาราฟิล์ม นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารเคมีอื่น ๆ

1) แอล-กลูตามีน

ให้ทำการปิเปตแอล-กลูตามีน 10 มิลลิลิตร ใส่ conical tube แล้วซีลด้วยพาราฟิล์ม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2) เพนนิซิลิน-สเตปโตไมซิน (Penicilin-steptomycin)

ให้ทำการปิเปตเพนนิซิลิน-สเตปโตไมซิน 10 มิลลิลิตร ใส่ conical tube แล้วซีลด้วยพาราฟิล์ม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3) กรดอะมิโนไม่จำเป็น (Non-essential amino acids)

ให้ทำการปิเปตกรดอะมิโนไม่จำเป็น 10 มิลลิลิตรใส่ conical tube แล้วซีลด้วยพาราฟิล์ม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ: สารเคมีทุกชนิดจะต้องระบุชื่อสาร, วันที่เตรียม, วันหมดอายุ, และชื่อผู้เตรียมให้เรียบร้อย

น้ำยาเลี้ยงเซลล์

ส่วนประกอบ

- Alpha-Modified Eagle's minimal essential
- heat-inactivated fetal bovine serum 10% (v/v)
- 2 มิลลิโมลาร์แอลกลูตามีน (1%v/v)
- Non-essential amino acid 1% (v/v)
- เจนตาไมซิน (50 มิลลิกรัม/ลิตร)
- แอมโฟเทอริซิน บี (0.5 มิลลิกรัม/ลิตร)
- HEPES buffer (15 มิลลิโมล/ลิตร)
- โซเดียมไบคาร์บอเนต (44 มิลลิโมล/ลิตร)

การแยกเซลล์เพาะเลี้ยง

1) ใช้ pipette man และ serological pipette ขนาด 10 มิลลิลิตร ปิเปตเอาอาหารเก่าออกจากภาชนะเพาะเลี้ยง โดยกระทำในตู้ปลอดเชื้อ

2) ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 มิลลิลิตร สำหรับ Flask 25 ตารางเซนติเมตร และ 5 มิลลิลิตร สำหรับ Flask 75 ตารางเซนติเมตร ในการเติม PBS ควรปิเปตลงด้านข้างภาชนะเพื่อหลีกเลี่ยงการทำให้เซลล์ได้รับความเสียหายและหลุดออกไป แกว่งเบา ๆ ประมาณ 1 นาที และปิเปต PBS ทั้ง เพื่อกำจัดส่วนที่เหลือของซีรัมซึ่งยับยั้งการทำงานของ 0.25% trypsin/EDTA

3) เติม 0.25% trypsin/EDTA 1 มิลลิลิตร (Flask 25 ตารางเซนติเมตร) และ 5 มิลลิลิตร สำหรับ (Flask 75 ตารางเซนติเมตร) กลับด้านให้มาท่วมอยู่บนเซลล์โดยทั่วถึงประมาณ 1 นาที

4) นำภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ไปบ่มในตู้บ่มเชื้อภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยวางภาชนะในแนวราบประมาณ 5 นาที ในระหว่างนี้เซลล์จะกลมตัวและหลุดออกมาจากพื้นผิว

5) เมื่อพบว่าเซลล์ส่วนใหญ่หลุดออกจากพื้นผิวแล้ว ให้เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (Complete medium) ในอัตราส่วน 1:1 โดยเปรียบเทียบกับ 0.25% trypsin/EDTA ทำการกระจายเซลล์ออกจากกัน โดยใช้ปิเปตดูดขึ้น-ลงเบา ๆ บนพื้นผิวที่เซลล์เกาะ และต้องระวังไม่ให้เกิดฟอง

6) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1100 rpm 5 นาที เซลล์ที่ได้มาควรแยกเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ อย่างสม่ำเสมอ ทั้งนี้จะทำให้การนับเป็นไปอย่างถูกต้องแม่นยำ นำไปเพาะเลี้ยงใหม่ได้เซลล์ที่เจริญดีและสม่ำเสมอ

7) นับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemocytometer

8) แยกเซลล์ที่ได้ลงใน การเพาะเลี้ยงเซลล์ flask และนำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ 37 องศาเซลเซียสคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

ความหนาแน่นของเซลล์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงตอนเริ่มต้น คือ 3×10^4 ถึง 5×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร อัตราส่วนในการ subculture คือ 1:6 - 1:8 เช่น หากเลี้ยงเซลล์ใน T75 1 flask จะสามารถขยายได้เพิ่มเป็น 6-8 flasks และตรวจสอบการลงเกาะของเซลล์ในวันรุ่งขึ้น

การแช่แข็งเซลล์

วิธีการเตรียม

- 1) ทำการ passage cell ตามขั้นตอนที่ระบุไว้ข้างต้น
- 2) ทำการนับจำนวนเซลล์ที่ได้
- 3) คำนวณเซลล์ที่จะแช่แข็ง โดยจำนวนที่แช่แข็งใน 1 หลอด คือ 1.5×10^6 - 2.0×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร

น้ำยาลำหรับแช่แข็งเซลล์ไลน์ Caco-2 (60% α -MEM + 30% FBS + 10% DMSO)

- 1) เตรียม DMSO โดยกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร ใต้ลงใน conical tube ปิดลวดเชื้อ จากนั้นห่อฟอยด์เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- 2) ผสมน้ำยาแช่แข็งเซลล์ โดยใช้อัตราส่วนดังนี้
 - 30% α MEM (อีก 30% ที่เหลือผสมกับเซลล์ไว้ และแช่ไว้ในน้ำแข็ง)
 - 30% FBS
 - 10% DMSO
- 3) ค่อย ๆ หยด ลงในหลอดน้ำยาแช่แข็งที่เตรียมได้ลงในเซลล์ที่เตรียมไว้ ในระหว่างนี้ให้เขย่าหลอดเบา ๆ เป็นระยะ เพื่อให้ให้น้ำยาเข้ากันดี
- 4) ควบใส่หลอด Cryovial แช่ในน้ำแข็งแล้วนำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นนำไปเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส หรือเก็บในไนโตรเจนเหลว

การละลายและนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ (Thawing cell)



หมายเหตุ: ในช่วงแรกที่นำเซลล์มาละลายเพื่อเลี้ยงเพิ่มจำนวน อาจต้องเพิ่ม %FBS เป็น 20% หลังจากการแยกเซลล์เพาะเลี้ยงจึงค่อยปรับเป็น 10% เช่นเดิม

การนับจำนวนเซลล์โดยวิธี Trypan blue exclusion

1) นำ cell suspension ที่ได้ปรับให้มี ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการนับใช้เซลล์ 100 ไมโครลิตร และใช้ 0.4% trypan blue ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ ประมาณ 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2) ใส่สารละลายเซลล์ ที่มี trypan blue 1 หยดลงใน haemocytometer และนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3) นับจำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสีและเซลล์ที่ติดสีน้ำเงินแยกกันจำเป็นต้องรีบนับเซลล์ภายใน 3-5 นาทีหลังจากใส่ trypan blue (ถ้าทิ้งเซลล์ใน trypan blue เป็นเวลานานเซลล์จะติดสีน้ำเงินหมด)

4) คำนวณ %เซลล์ที่มีชีวิต จากสูตรดังนี้:

$$\% \text{ เซลล์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ติดสีน้ำเงิน} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด (ติดสี + ไม่ติดสี)}}$$





ภาคผนวก ค

สารอาหารที่แนะนำให้บริโภคประจำวันสำหรับคนไทยอายุตั้งแต่ 6 ปีขึ้นไป
(THAI RECOMMENDED DAILY INTAKES-THAI: RDI) พ.ศ. 2541

บัญชีหมายเลข 3

แบบท้ายประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 182) พ.ศ. 2541

สารอาหารที่แนะนำให้บริโภคประจำวันสำหรับคนไทยอายุตั้งแต่ 6 ปีขึ้นไป (THAI RECOMMENDED DAILY INTAKES-THAI: RDI)

“มาตรการสำคัญในการดำเนินการปรับปรุงและส่งเสริมให้ประชาชนมีภาวะโภชนาการที่ดี สามารถดำรงสุขภาพอนามัยอย่างสมบูรณ์ คือ การวางแผนจัดการด้านอาหารบริโภค โดยมุ่งให้ประชาชนส่วนรวมของประเทศได้รับอาหารบริโภคประจำวันซึ่งประกอบด้วยสารอาหารชนิดต่าง ๆ ที่มีคุณค่าทางโภชนาการอย่างเหมาะสมและเพียงพอกับความต้องการของร่างกาย ซึ่งความต้องการอาหารและโภชนาการในระดับบุคคล กลุ่มบุคคล หรือชุมชน จะเปลี่ยนแปลงและแตกต่างกันเป็นอย่างมาก เนื่องจากปัจจัยแวดล้อมและองค์ประกอบอื่น ๆ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ประเทศต่าง ๆ จะต้องจัดให้มีแนวทางหรือหลักการในการแนะนำอาหารบริโภคสำหรับประชาชนในประเทศของตน ให้บริโภคอาหารมีคุณค่าสารอาหารชนิดต่าง ๆ ที่เหมาะสมกับความต้องการด้านโภชนาการอย่างแท้จริง”

กรมอนามัยได้จัดทำข้อกำหนดสารอาหารที่ควรได้รับประจำวันสำหรับคนไทย (Recommended Daily Dietary Allowances for Healthy Thais) ซึ่งใช้ชื่อย่อว่า RDA ขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2532 บัญชี RDA นี้กำหนดสารอาหารที่ควรได้รับประจำวันสำหรับคนไทยไว้รวม 17 ชนิด โดยแบ่งกลุ่มคนไทยเป็นกลุ่มใหญ่ 8 กลุ่มตามอายุและเพศ และเนื่องจากความต้องการสารอาหารบางชนิดแตกต่างกันตามอายุ แต่ละกลุ่มจึงยังมีการแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามระดับอายุอีกด้วย ข้อกำหนดนี้จึงจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์ เพื่อให้มีสารอาหารตามความต้องการสำหรับแต่ละกลุ่มโดยเฉพาะ อย่างไรก็ตามการจัดทำฉลากโภชนาการของผลิตภัณฑ์อาหารทั่วไป กำหนดไว้ว่าต้องแสดงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารนั้น โดยแจ้งชนิดและปริมาณของสารอาหารที่มี รวมถึงให้แจ้งด้วยว่าปริมาณสารอาหารที่มีนั้นมิใช่เป็นสัดส่วนเท่าใดของปริมาณที่ผู้บริโภคต้องการต่อวัน และเนื่องจากผู้บริโภคในที่นี้ หมายถึง บุคคลทั่วไปตั้งแต่เด็กถึงผู้ใหญ่ จึงจำเป็นจะต้องมีค่าความต้องการสารอาหารต่อวันสำหรับบุคคลทั่วไปนี้เพียงค่าเดียวเป็นค่ากลาง เพื่อใช้สำหรับการคำนวณและเปรียบเทียบ

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาจึงได้พิจารณาจัดทำบัญชีสารอาหารที่แนะนำให้ควรบริโภคประจำวันสำหรับคนไทย อายุตั้งแต่ 6 ปีขึ้นไป (Thai Recommended Daily Intakes-Thai

RDI) นี้ขึ้น เพื่อวัตถุประสงค์หลักในการเป็นค่าอ้างอิงสำหรับคำนวณในแสดงคุณค่าทางโภชนาการบนฉลากของอาหาร อย่างไรก็ตามค่า Thai RDI ซึ่งเป็นค่ากลางสำหรับคนไทยทั่วไปนั้นสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาสูตรอาหาร ให้เป็นเกณฑ์สำหรับการกำหนดนโยบายทางโภชนาการกว้าง ๆ สำหรับบุคคลทั่วไป เช่น การเติมสารอาหาร หรือการประยุกต์ใช้อื่น ๆ ได้ตามความเหมาะสมโดยต้องคำนึงด้วยว่าข้อกำหนดนี้ใช้สำหรับผู้ที่มิสุขภาพปกติ (healthy) มิใช่ผู้ป่วย เด็กทารก หญิงมีครรภ์ หรือกลุ่มอื่น ๆ ซึ่งมีความต้องการทางโภชนาการต่างไปจากกลุ่มบุคคลปกติ นอกจากนี้การได้รับสารอาหารต่าง ๆ ตามที่กำหนดนี้ควรได้รับจากการบริโภคอาหารหลัก 5 หมู่เป็นสำคัญ เนื่องจากยังมีสารอาหารอื่น ๆ อีกมากในอาหารหลักของเราที่ยังไม่ได้รับการแยกออก และเป็นที่รู้จักเป็นตัวเดียว ๆ แต่ก็มีความสำคัญและจำเป็นต่อระบบการทำงานตามปกติของร่างกาย

สารอาหารที่แนะนำให้บริโภคประจำวันสำหรับคนไทยอายุตั้งแต่ 6 ปีขึ้นไป (Thai RDI) จัดทำขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการแสดงคุณค่าทางโภชนาการบนฉลากของอาหาร หรือที่เรียกว่า “ฉลากโภชนาการ” (Nutrition Labeling) โดยอาศัยข้อมูลพื้นฐานจากค่า Recommended Daily Dietary Allowances for Healthy Thais (Thai RDA) โดยเลือกค่าสูงสุดจากค่าที่แนะนำสำหรับคนอายุ 20-29 ปีทั้ง 2 เพศ, ค่า Daily Values (DV), Daily Reference Values (DRV), Reference Daily Intakes (RDI) (หรือค่า US RDA เดิม) ซึ่งกำหนดโดย United States Food and Drug Administration และ ค่า Nutrient Reference Values (NRV) จาก Codex โดยกำหนดให้ค่าความต้องการพลังงานวันละ 2,000 กิโลแคลอรี ซึ่งเป็นระดับที่คนไทย (ผู้ใหญ่) ส่วนใหญ่ที่มีสภาวะทางสุขภาพปกติต้องการ เป็นฐานหรือเป็นตัวเลขกลางในการคำนวณ เพื่อวัตถุประสงค์ในการแสดงฉลากโภชนาการเท่านั้น ทั้งนี้ความต้องการพลังงานที่แท้จริงต่อวันของแต่ละบุคคลอาจน้อยหรือมากกว่า 2,000 กิโลแคลอรีได้ ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น อายุ เพศ และความแตกต่างของระดับการใช้พลังงานทางกายภาพ (physical activity level) ของแต่ละบุคคล

ลำดับที่ (No.)	สารอาหาร (Nutrient)	ปริมาณที่แนะนำต่อวัน (Thai RDI)	หน่วย (Unit)
1.	ไขมันทั้งหมด (Total Fat)	65*	กรัม (g)
2.	ไขมันอิ่มตัว (Saturated Fat)	20*	กรัม (g)
3.	โคเลสเตอรอล (Cholesterol)	300	มิลลิกรัม (mg)
4.	โปรตีน (Protein)	50*	กรัม (g)
5.	คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (Total Carbohydrate)	300*	กรัม (g)

ลำดับที่ (No.)	สารอาหาร (Nutrient)	ปริมาณที่แนะนำต่อวัน (Thai RDI)	หน่วย (Unit)
6.	ใยอาหาร (Dietary Fiber)	25	กรัม (g)
7.	วิตามินเอ (Vitamin A)	800	ไมโครกรัม อาร์ อี ($\mu\text{g RE}$)
8.	วิตามินบี 1 (Thiamin)	1.5	มิลลิกรัม (mg)
9.	วิตามินบี 2 (Riboflavin)	1.7	มิลลิกรัม (mg)
10.	ไนอะซิน (Niacin)	20	มิลลิกรัม เอ็น อี (mg NE)
11.	วิตามินบี 6 (Vitamin B6)	2	มิลลิกรัม (mg)
12.	โฟเลต (Folate)	200	ไมโครกรัม (μg)
13.	ไบโอติน (Biotin)	150	ไมโครกรัม (μg)
14.	กรดแพนโทธีนิก (Pantothenic Acid)	6	มิลลิกรัม (mg)
15.	วิตามินบี 12 (Vitamin B12)	2	ไมโครกรัม (μg)
16.	วิตามินซี (Vitamin C)	60	มิลลิกรัม (mg)
17.	วิตามินดี (Vitamin D)	5	ไมโครกรัม (μg)
18.	วิตามินอี (Vitamin E)	10	มิลลิกรัม แอลฟา- ที อี ($\text{mg}\alpha\text{-TE}$)
19.	วิตามินเค (Vitamin K)	80	ไมโครกรัม (μg)
20.	แคลเซียม (Calcium)	800	มิลลิกรัม (mg)
21.	ฟอสฟอรัส (Phosphorus)	800	มิลลิกรัม (mg)
22.	เหล็ก (Iron)	15	มิลลิกรัม (mg)
23.	ไอโอดีน (Iodine)	150	ไมโครกรัม (μg)
24.	แมกนีเซียม (Magnesium)	350	มิลลิกรัม (mg)
25.	สังกะสี (Zinc)	15	มิลลิกรัม (mg)
26.	ทองแดง (Copper)	2	มิลลิกรัม (mg)
27.	โพแทสเซียม (Potassium)	3,500	มิลลิกรัม (mg)
28.	โซเดียม (Sodium)	2,400	มิลลิกรัม (mg)

ลำดับที่ (No.)	สารอาหาร (Nutrient)	ปริมาณที่แนะนำต่อวัน (Thai RDI)	หน่วย (Unit)
29.	แมงกานีส (Manganese)	3.5	มิลลิกรัม (mg)
30.	ซีลีเนียม (Selenium)	70	ไมโครกรัม (µg)
31.	ฟลูออไรด์ (Fluoride)	2	มิลลิกรัม (mg)
32.	โมลิบดีนัม (Molybdenum)	160	ไมโครกรัม (µg)
33.	โครเมียม (Chromium)	130	ไมโครกรัม (µg)
34.	คลอไรด์ (Chloride)	3,400	มิลลิกรัม (mg)

* ปริมาณของไขมันทั้งหมด ไขมันอิ่มตัว โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ที่แนะนำให้บริโภคต่อวันคิดจากการเปรียบเทียบพลังงานที่ควรได้จากสารอาหารดังกล่าวเป็นร้อยละ 30, 10, 10 และ 60 ตามลำดับของพลังงานทั้งหมด หากพลังงานทั้งหมดที่ควรได้รับต่อวันเป็น 2,000 กิโลแคลอรี (ไขมัน 1 กรัมให้พลังงาน 9 กิโลแคลอรี, โปรตีน 1 กรัมให้พลังงาน 4 กิโลแคลอรี, คาร์โบไฮเดรต 1 กรัม ให้พลังงาน 4 กิโลแคลอรี)

หมายเหตุ 1. สำหรับน้ำตาลไม่ควรบริโภคเกินร้อยละ 10 ของพลังงานทั้งหมดที่ได้รับต่อวัน

2. คำอธิบายหน่วยของวิตามินเอ ไนอะซิน วิตามินอี และวิตามินดี

2.1 วิตามินเอ RE = Retinol equivalent

1 RE = 1 µg retinol = 6 µg β-carotene = 3.33 IU

2.2 ไนอะซิน NE = Niacin equivalent

1 NE = 1 mg niacin = 60 mg tryptophan

2.3 วิตามินอี α-TE = α-Tocopherol equivalent

1 α-TE = 1 mg D-α-tocopherol = 1.5 IU

2.4 วิตามินดีมีหน่วยเป็น ไมโครกรัม โดยคำนวณเป็น cholecalciferol

1 µg = 40 IU

ประวัติผู้เขียน

นางสาววรวลัญช์ ตำรวล เกิดเมื่อวันที่ 29 ธันวาคม พ.ศ. 2529 ที่อำเภอเมือง จังหวัดอ่างทอง จบการศึกษาระดับประถมศึกษาจากโรงเรียนวัดบางสงบ (กองวารีย์วิทยานุสรณ์) จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้นและตอนปลาย จากโรงเรียนอ่างทองปัทมโรจน์วิทยาคม และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ในปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2552

ประสบการณ์ทำงาน/ฝึกอบรม

- ปฏิบัติงานโครงการสหกิจศึกษาในแผนกควบคุมคุณภาพ (Quality control) ณ บริษัท เอ็ม แอนด์ อาร์ แลบอราทอรี จำกัด จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (เมษายน-สิงหาคม 2552)
- ผู้ช่วยสอนวิชาเลือกสาขา “เทคโนโลยีการหมัก” (พ.ศ. 2553)
- ผู้ช่วยวิจัยโครงการ “ฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของถั่วเหลืองและถั่วขาวที่ผ่านการหมัก” ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (พ.ศ. 2554-2556)