ว.วิทย. มข. 45(1) 138-150 (2560) KKU Sci. J. 45(1) 138-150 (2017)

ผลของอุณหภูมิอบแห้งที่มีต่อปริมาณไอโซฟลาโวนและความสามารถการต้านออกซิเดชันของถั่วเหลืองหมัก (ถั่วเน่า)

Effects of Drying Temperature on the Isoflavone Content and Antioxidant Capacity of Fermented Soybean (Thua Nao)

เกตุการ ดาจันทา[1*] และ หทัยทิพย์ ร้องคำ[1]

[1]สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

[*]Corresponding Author, E-mail: dkatekan@hotmail.com

บทคัดย่อ

ถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองถูกจัดเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ งานวิจัยนี้ศึกษาผลของอุณหภูมิอบแห้งที่มีต่อปริมาณสารไอโซฟลาโวนและการต้านอนุมูลอิสระในถั่วเหลืองหมักของไทย (ถั่วเน่า) โดยหมักถั่วเหลืองนึ่งสุกด้วยผงกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอัตรา 0.1% (w/w) บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นอบแห้งในตู้อบแห้งแบบลมร้อนที่ 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส และตรวจวิเคราะห์ปริมาณของสารไอโซฟลาโวนกลุ่ม β-glycosides (daidzin genistin และ glycitin) และ aglycosides (daidzein genistein และ glycitein) สารประกอบฟีนอล และฤทธิ์ DPPH radical scavenging activity (DPPH) และ ferric reducing antioxidant power (FRAP) อุณหภูมิในการอบแห้งมีผลต่อปริมาณคงเหลือของสารต้านออกซิเดชันในถั่วเหลืองหมัก โดยถั่วเน่าที่อบแห้งในอุณหภูมิที่แตกต่างกันมีปริมาณสารประกอบฟีนอลและไอโซฟลาโวนกลุ่ม aglycosides ไม่แตกต่างกัน ขณะที่ถั่วเน่าอบแห้งที่ 70 และ 80 องศาเซลเซียส มีปริมาณสารไอโซฟลาโวนกลุ่ม β-glycosides (11 และ 11%) และไอโซฟลาโวนทั้งหมด (17 และ 20%) สูงกว่าถั่วเน่าอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าถั่วเน่าอบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทั้งฤทธิ์ DPPH และ FRAP สูงกว่าถั่วเน่าอบแห้งที่อุณหภูมิต่ำกว่า และพบไอโซฟลาโวนชนิด genistin ในถั่วเน่าอบแห้งมากที่สุด รองลงมาคือ daidzin และ daidzein ตามลำดับ

ABSTRACT

Soybeans and soy products are recognized as health food. In the present study, the effect of drying temperature on the content of isoflavones and capacity of antioxidant of Thai fermented soybean (Thua Nao) was studied. The fermented soybean was prepared by inoculating autoclaved soybean with starter powder of the *Bacillus subtilis* at the ratio 0.1% (w/w), incubated at 42°C for 48 h, and then dried in a hot air oven at 60, 70, and 80°C. The contents of isoflavone β-glycosides (daidzin, genistin and glycitin), aglycosides (daidzein, genistein and glycitein) and total phenolic compounds were evaluated. Antioxidant activities in terms of DPPH radical scavenging activity (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) were also investigated. Drying temperature significantly affected the retention of antioxidants. Although there was no significant difference in total phenolic compounds and isoflavone aglycosides at different drying temperature, Thua Nao dried at 70 and 80°C had higher contents of β-glycosides (11 and 11%) and total isoflavones (17 and 20%) than those of dried product at 60°C. In addition, the product dried at 80°C had superior activities of both DPPH and FRAP compared with those at below drying temperature. Genistin was found the most in all dried products, followed by daidzin and daidzein, respectively.

คำสำคัญ: ถั่วเหลืองหมัก ถั่วเน่า ไอโซฟลาโวน การต้านออกซิเดชัน

Keywords: Fermented soybean, Thua Nao, Isoflavone, Antioxidant

1. บทนำ

ถั่วเน่า เป็นถั่วเหลืองหมักของไทยที่นิยมบริโภคในภาคเหนือของประเทศ เช่น เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง และแม่ฮ่องสอน โดยใช้เป็นเครื่องปรุงรสชาติในอาหารพื้นบ้านหลายชนิด เนื่องจากถั่วเน่ามีรสชาติอร่อยคล้ายกับผงชูรสหรือที่เรียกว่าอูมามิซึ่งเป็นรสชาติที่ได้จากกรดอะมิโนอิสระ ได้แก่ กรดกลูตามิคและกรดแอสปาติก (Tseng et al., 2005) ซึ่งได้จากการหมักถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* และผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะสีเหลืองคล้ำปนกับเมือกเหนียวเล็กน้อยและมีกลิ่นเหม็นของแอมโมเนีย นอกจากประเทศไทยแล้วถั่วเหลืองหมักยังมีการบริโภคอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ โดยมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันตามท้องถิ่น เช่น ญี่ปุ่น เรียก นัตโตะ (Natto) อินเดีย เรียก คินีมา (Kinema) และเกาหลี เรียก จุงคุคแจง (Chungkukjang) (Steinkraus, 1996)

ถั่วเน่าจัดเป็นอาหารสุขภาพเนื่องจากเป็นแหล่งของโปรตีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดอะมิโนอิสระที่ได้จากการหมักย่อยของเชื้อจุลินทรีย์ทำให้ร่างกายดูดซึมได้ง่าย ถั่วเน่ามีกรดอะมิโนอิสระชนิดจำเป็นมากกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมักถึง 7 เท่า (Dajanta et al., 2011a) นอกจากนี้ถั่วเหลืองหมักยังเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านออกซิเดชันคือสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) และสารไอโซฟลาโวน (isoflavones) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารไอโซฟลาโวนในรูปของ aglycosides ซึ่งเป็นอนุพันธุ์ที่มีประโยชน์ต่อ

ร่างกายมากที่สุดและร่างกายสามารถดูดซึมได้ในปริมาณที่สูงและรวดเร็วมากกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก (Izumi et al., 2000) มีรายงานการวิจัยที่บ่งชี้ว่าการบริโภคถั่วเหลืองหมักช่วยรักษาและป้องกันโรคที่สำคัญ ได้แก่ มะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งลำไส้ (Gotoh et al., 1998) โรคหลอดเลือดหัวใจ (Potter et al., 1998; Park et al., 2003) โรคเบาหวาน (Liu et al., 2006) โรคกระดูกพรุน (Potter et al., 1998; Ishimi et al., 2002) โรคคอเลสเตอรอลในเลือดสูง รวมถึงการใช้ไอโซฟลาโวนเป็นสารทดแทนฮอร์โมนเพศหญิงในหญิงวัยหมดประจำเดือนได้อีกด้วย (Morabito et al., 2002) รายงานของ Kang et al. (2012) ระบุว่าการบริโภคถั่วเหลืองมีความสัมพันธ์กับการลดลงของความเสี่ยงต่อการตายของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในประเทศจีน และรายงานของ Zhang et al. (2012) บ่งชี้ว่าการบริโภคสารไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองในปริมาณสูงกว่า 17.3 มิลลิกรัม/วัน ช่วยลดอัตราการตายจากโรคมะเร็งเต้านมได้ 38-36% โดยกลไกการยับยั้งอาการของมะเร็งเต้านมเกิดจากสารไอโซฟลาโวนชนิด genistein ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับฮอร์โมนเอสโตรเจนของผู้หญิง (He and Chen, 2013) และรายงานของ Wei et al. (2012) ซึ่งได้ทำการศึกษาด้วยวิธี Meta analysis พบว่า การบริโภคไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองมีผลต่อการเพิ่มความหนาแน่นของแร่ธาตุในกระดูกและช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคกระดูกพรุน

กระบวนการผลิตถั่วเน่าของไทยในปัจจุบันยังเป็นการผลิตแบบพื้นบ้าน คือการหมักถั่วเหลืองที่ต้มสุกแล้วในตะกร้าไม้ไผ่และคลุมด้วยใบตองหรือวัสดุอื่นหมักบ่มที่อุณหภูมิห้อง นานประมาณ 3-7 วัน และทำเป็นแผ่นบาง ตากแดดให้แห้ง เพื่อให้สามารถเก็บรักษาไว้ได้นานขึ้น ภาษาท้องถิ่นเรียกว่า “ถั่วเน่าแค็บ” การหมักถั่วเน่าแบบพื้นบ้านอาศัยการหมักย่อยของเชื้อจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่ปนเปื้อนอยู่กับเมล็ดถั่วเหลืองหรือภาชนะที่ใช้ในการผลิต ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอขึ้นอยู่กับความสะอาดของอุปกรณ์และสุขลักษณะของผู้ผลิต มีกลิ่นเหม็นของแอมโมเนียค่อนข้างแรง บางครั้งอาจเกิดการเน่าเสียเนื่องจากมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และยังเสี่ยงอันตรายจากจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิดที่ปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิต (Nout et al., 1998; Dike and Odunfa, 2003; Leejeerajumnean, 2003) จึงได้มีความพยายามในการศึกษาวิจัยเพื่อแก้ไขปัญหาด้านสุขอนามัยความสม่ำเสมอของผลิตภัณฑ์ และปรับปรุงกระบวนการผลิตให้สอดคล้องกับการผลิตในเชิงพาณิชย์อย่างต่อเนื่อง โดยได้มีคัดแยกแบคทีเรียที่เหมาะสมในการหมักถั่วเน่า คือ *B. subtilis* TN51 จากถั่วเน่าพื้นเมืองโดย ผศ.ดร.เอกชัย ชูเกียรติโรจน์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง (Dajanta et al., 2009a) (Dajanta et al., 2009a) และมีการศึกษาพัฒนาเป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์สำหรับหมักถั่วเน่าทั้งในรูปของเชื้อสดซึ่งต้องมีการเตรียมในห้องปฏิบัติการ (Dajanta et al., 2011d) และการพัฒนาเป็นผงกล้าเชื้อแห้งสำเร็จรูป (เกตุการ, 2557) รวมถึงการศึกษาคุณภาพของถั่วเน่าที่ผลิตจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ซึ่งพบว่าถั่วเน่าที่หมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์*B. subtilis* TN51 มีคุณภาพที่ดีกว่าถั่วเน่าที่ผลิตจากวิธีพื้นบ้านดั้งเดิมทั้งทางเคมี กายภาพ คุณภาพทางประสาทสัมผัส กลิ่นรสที่ระเหยได้ และสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น กรดอะมิโนอิสระ สารไอโซฟลาโวนชนิด aglycosides สารประกอบฟีนอลและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Dajanta et al., 2009a; b; Dajanta et al., 2011a, b, c, d) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความประสงค์ที่จะพัฒนาถั่วเน่าอบแห้งเพื่อใช้เป็นผงปรุงรสทดแทนถั่วเน่าอบแห้งชนิดแผ่นแบบดั้งเดิมเพื่อ

ช่วยปรับปรุงกระบวนการผลิตถั่วเหลืองหมักให้ถูกต้องตามหลักสุขลักษณะที่ดีของกระบวนการผลิตและเป็นการยกระดับอาหารพื้นบ้านสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์โดยใช้กระบวนการหมักถั่วเหลืองจากผงกล้าเชื้อบริสุทธิ์ที่นักวิจัยได้พัฒนาขึ้น และได้คัดเลือกอุณหภูมิในการอบแห้งถั่วเน่าที่เหมาะสมในการรักษาคุณภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผงปรุงรสถั่วเน่าสำเร็จรูป

2. วิธีการดำเนินงานวิจัย

2.1 การเตรียมถั่วเน่า

แช่เมล็ดถั่วเหลืองสายพันธุ์เชียงใหม่ 60 ในน้ำอัตรา 1:4 (w/w) นาน 16 ชั่วโมง หลังสะเด็ดน้ำนึ่งถั่วเหลืองให้สุกในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที เติมผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* ลงในถั่วเหลืองขณะร้อน ในอัตรา 0.1% (w/w) บรรจุถั่วเหลืองที่เติมกล้าเชื้อแล้วในกล่องพลาสติกปลอดเชื้อขนาด 13x18x10 เซนติเมตร และบ่มในตู้บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

2.2 การอบแห้งถั่วเน่า

บดถั่วเน่าให้ละเอียดและอบให้แห้งด้วยตู้อบแห้งแบบลมร้อน ผันแปรอุณหภูมิในการทำแห้ง 3 ระดับ คือ 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส จนได้ค่า water activity ต่ำกว่า 0.5 บดถั่วเน่าให้ละเอียดอีกครั้งจะได้ผงปรุงรสถั่วเน่าอบแห้ง บรรจุใส่ในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจวิเคราะห์คุณภาพต่อไป

2.3 การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระในถั่วเน่า

สกัดผงถั่วเน่าอบแห้ง 10 กรัม ด้วยตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 80% (v/v) จำนวน 100 มิลลิลิตร ในเครื่องอัลตราโซนิก กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 นำกากที่เหลือไปสกัดซ้ำด้วยวิธีการสกัดเดิม นำสารสกัดที่กรองได้ทั้ง 2 ครั้งมารวมกันและนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 3,000 rpm นาน 15 นาที แยกเอาเฉพาะสารละลายส่วนใสไปทำให้แห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศด้วยเครื่อง evaporator อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เก็บผงแห้งของสารสกัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจวิเคราะห์

2.4 การตรวจชนิดและปริมาณสารไอโซฟลาโวน

ละลายสารสกัดถั่วเน่าในตัวทำละลายเมทานอลความเข้มข้น 80% (v/v) กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารไอโซฟลาโวนตามวิธีการของ Lee et al. (2008) ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (Shimadzu Instruments Co., Ltd., Japan) ที่ประกอบด้วยปั๊ม (model LC-10AD VP) และดีเท็กเตอร์แบบ photo diode array (model SPD-M10A VP) และใช้คอลัมน์ YMC-Pack ODS-AM-303 (250 mm x 4.6 mm I.D.) วิเคราะห์ชนิดของไอโซฟลาโวนโดยวัดด้วยความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และเทียบค่า retention time กับสารไอโซฟลาโวนมาตรฐานแต่ละชนิด ได้แก่ daidzein genistein glycitein daidzin genistin glycitin และใช้ flavone เป็น internal standard วิเคราะห์ปริมาณสารไอโซฟลาโวนโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารแต่ละชนิด ซึ่งมีค่า R^2 อยู่ระหว่าง 0.996-0.998 คำนวณปริมาณสารไอโซฟลาโวนในหน่วยไมโครกรัม/กรัมตัวอย่าง

2.5 การตรวจปริมาณสารประกอบฟีนอล

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลในสารสกัดถั่วเน่าอบแห้งตามวิธีของ Luque-Rodriguez et al. (2007) โดยละลายสารสกัดถั่วเน่าในสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 80% (v/v) และผสมสารสกัด 400 ไมโครลิตร กับสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ที่มีความเข้มข้น 0.25 นอร์มัล จำนวน 2

มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 7.5% (w/v) จำนวน 1.6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี และบ่มหลอดทดสอบในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และบ่มต่อในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (Spectrophotometer evolution 201, USA) ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมสารสกัด โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก ซึ่งมีค่า R^2 เป็น 0.996

2.6 การตรวจ DPPH radical scavenging activity (DPPH)

ตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในสารสกัดถั่วเน่าอบแห้งตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Nuengchamnong et al. (2009) โดยผสมสารสกัดถั่วเน่าอบแห้ง 1 มิลลิลิตร กับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี บ่มในที่มืดนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร สำหรับชุดควบคุมใช้เมทานอลความเข้มข้น 80% (v/v) แทนสารสกัด คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสูตร

$$\text{DPPH (\%)} = \frac{[1 - (\text{ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง})] \times 100}{\text{ค่าดูดกลืนแสงของชุดควบคุม}}$$

และแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในหน่วย half-inhibition concentration (IC_{50})

2.7 การตรวจค่า Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

ตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ FRAP ในสารสกัดถั่วเน่าอบแห้งตามวิธีของ Maier et al. (2009) โดยผสมสารสกัด 400 ไมโครลิตร กับสารละลาย FRAP 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 4 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร คำนวณค่า FRAP ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์/กรัมสารสกัด โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารโทรลอกซ์ซึ่งมีค่า R^2 เป็น 0.999

2.8 การวางแผนการทดลองทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 ชนิดและปริมาณสารไอโซฟลาโวนในถั่วเน่าอบแห้ง

งานวิจัยนี้ตรวจวิเคราะห์สารไอโซฟลาโวน 6 ชนิด ในถั่วเน่าอบแห้ง ได้แก่ ไอโซฟลาโวนกลุ่ม β-glycosides คือ daidzin genistin และ glycitin และไอโซฟลาโวนกลุ่ม aglycosides คือ daidzein genistein และ glycitein แสดงปริมาณของสารไอโซฟลาโวนในถั่วเน่าที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิแตกต่างกันในตารางที่ 1

ถั่วเน่าที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส มีสารไอโซฟลาโวนทั้งหมดอยู่ในช่วง 2,129 – 2,367 ไมโครกรัม/กรัมตัวอย่าง และส่วนใหญ่เป็นสารไอโซฟลาโวนที่อยู่ในรูปของ β-glycosides คิดเป็นสัดส่วน 68 – 73% ของไอโซฟลาโวนทั้งหมด โดยมีความเข้มข้นระหว่าง 1,444 – 1,734 ไมโครกรัม/กรัมตัวอย่าง ชนิดสารของไอโซฟลาโวนที่พบมากที่สุด คือ genistin คิดเป็นสัดส่วน 35 – 39% ของไอโซฟลาโวนทั้งหมด สำหรับปริมาณสารไอโซฟลาโวนกลุ่ม aglycosides พบอยู่ในช่วง 633 – 685 ไมโครกรัม/กรัมตัวอย่าง (คิดเป็นสัดส่วน 27-32% ของไอโซฟลาโวนทั้งหมด) ชนิดสารของไอโซฟลาโวน ที่พบมาก

ที่สุด คือ daidzein คิดเป็นสัดส่วน 17-23% ของไอโซฟลาโวนทั้งหมด

ความร้อนในการอบแห้งถั่วเน่ามีผลต่อชนิดและปริมาณของสารไอโซฟลาโวน โดยเมื่อใช้ความร้อนในการอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส ทำให้ปริมาณของไอโซฟลาโวน glycosides (17 และ 20% ตามลำดับ) และไอโซฟลาโวนทั้งหมด (11 และ 11% ตามลำดับ) ในถั่วเน่าสูงกว่าถั่วเน่าที่ผ่านการอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ขณะที่ไอโซฟลาโวนกลุ่ม aglycosides ในถั่วเน่าที่อบแห้งอุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส มีปริมาณไม่แตกต่างกัน

ถั่วเน่าอบแห้งที่ผลิตได้จากงานวิจัยนี้ตรวจพบสารไอโซฟลาโวนทั้งหมดในปริมาณที่สูงกว่าถั่วเน่าที่ผลิตจากกล้าเชื้อ *B. subtilis* ในรายงานของ Dajanta et al. (2009b) มากถึง 2.2 – 2.7 เท่า ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากความแตกต่างกันของสายพันธุ์ของถั่วเหลืองและระยะการหมักถั่วเหลืองที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 1 ปริมาณสารไอโซฟลาโวน (ไมโครกรัม/กรัมตัวอย่าง) ในผงถั่วเน่าอบแห้งที่ผ่านการอบแห้งในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

สารไอโซฟลาโวน	อุณหภูมิการอบแห้ง (องศาเซลเซียส)		
	60	70	80
β-glycoside isoflavones	1,444 ± 45b	1,734 ± 20a	1,686 ± 79a
Daidzin	452 ± 12b	562 ± 22a	540 ± 26a
Genistin	750 ± 22b	912 ± 9a	861 ± 40a
Glycitin	243 ± 11b	260 ± 7b	286 ± 5a
Aglycoside isoflavones	685 ± 11a	633 ± 48a	666 ± 31a
Daidzein	487 ± 19a	405 ± 48b	416 ± 18b
Genistein	100 ± 5b	106 ± 5b	121 ± 6a
Glycitein	98 ± 7b	122 ± 12a	129 ± 7a
Total isoflavones	2,129 ± 54b	2,367 ± 67a	2,353± 89a

ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

3.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลในถั่วเน่าอบแห้ง

ผงถั่วเน่าที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส ถูกสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลความเข้มข้น 80% (v/v) ได้ปริมาณสารสกัด (yield) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยมีปริมาณสารสกัดอยู่ที่ 27.17 - 30.99% (ตารางที่ 2) และพบว่าสารสกัดของผงถั่วเน่าที่ผ่านการอบแห้งทั้ง 3 อุณหภูมิมีปริมาณของสารต้านออกซิเดชันกลุ่มสารประกอบฟีนอลใกล้เคียงกันโดยพบอยู่ในช่วง 34.80 – 37.10 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมสารสกัด หรือ 9.46 – 11.49 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมตัวอย่าง ซึ่งเป็นปริมาณที่ใกล้เคียงกับที่ตรวจพบในถั่วเน่า (ปริมาณ 35.18-37.29 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมสารสกัด) ในรายงานของ Dajanta et al. (2011c) และถั่วเหลืองหมักโคจิ (ปริมาณ 23.70 - 45.72 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/

กรัมสารสกัด) (Lin et al., 2006) แต่มีปริมาณน้อยกว่าถั่วเหลืองหมักจุงคุคแจงของเกาหลี (ปริมาณ 22.19 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมตัวอย่าง) (Kwak et al., 2007)

ตารางที่ 2 ปริมาณสารสกัด สารประกอบฟีนอล ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และฤทธิ์ FRAP ของถั่วเน่าอบแห้งที่ผ่านการอบแห้งในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

คุณภาพ	อุณหภูมิการอบแห้ง (องศาเซลเซียส)		
	60	70	80
Extract yield (%)	30.99 ± 1.66a	29.13 ± 2.73a	27.17 ± 0.56a
Total phenolics (มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมสารสกัด)	37.10 ± 2.14a	35.02 ± 0.58a	34.80 ± 1.04a
DPPH radical-scavenging activity (IC_{50}; มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	3.42 ± 0.25a	2.53 ± 0.36b	1.53 ± 0.18c
FRAP (มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์/กรัมสารสกัด)	13.42 ± 0.12b	14.71 ± 0.24a	14.91 ± 0.24a

ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

3.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของถั่วเน่าอบแห้ง

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดถั่วเน่าอบแห้งมีความผันแปรขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด โดยที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่า สารสกัดถั่วเน่าที่ผ่านการอบแห้งที่ 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เป็น 32 43 และ 60% ตามลำดับ

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มสูงขึ้นเป็น 76 95 และ 91% ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของถั่วเน่าที่ผ่านการอบแห้งทั้ง 3 อุณหภูมิมีความคงที่อยู่ในช่วง 97–98% เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 10 – 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ถั่วเน่าอบแห้งที่ได้จากงานวิจัยนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าถั่วเหลืองหมักจุงคุคแจงในรายงานของ Shon et al. (2007) เล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกันที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยจุงคุคแจงพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในช่วง 72–77% และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าถั่วเหลืองหมักคินีมาค่อนข้างมาก ซึ่งรายงานของ Moktan et al. (2008) ระบุว่าสารสกัดคินีมา ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพียง 44% เท่านั้น

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในหน่วย half-inhibition concentration (IC_{50}) หมายถึง ปริมาณของสารต้านออกซิเดชันที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระลงได้ 50% (Lin et al., 2006) ดังนั้นค่า IC_{50} ที่ต่ำจะแสดงถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ดีกว่าค่า IC_{50} ที่สูง ผลในตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าค่า IC_{50} ของถั่วเน่าลดลงเมื่อใช้อุณหภูมิในการอบแห้งสูงมากขึ้น โดยค่า IC_{50} ของถั่วเน่าที่ผ่านการอบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส มีค่าต่ำที่สุด และค่า IC_{50} ของถั่วเน่าที่ผ่านการอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส มีค่าสูงที่สุด แสดงให้เห็นว่าถั่วเน่าที่ได้จากการอบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าถั่วเน่าที่ผ่านการอบแห้งที่ 60 และ 70 องศาเซลเซียส คิดเป็น 2.2 และ 1.6 เท่า ตามลำดับ

3.4 ฤทธิ์ FRAP ของถั่วเน่าอบแห้ง

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่วัดด้วยวิธี FRAP พบว่าถั่วเน่าอบแห้งมีฤทธิ์ FRAP อยู่ในช่วง 13.42 – 14.91 มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์/กรัมสารสกัด (ตารางที่ 2) ถั่วเน่าที่ได้จากการอบแห้งที่ 70 และ 80 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ FRAP สูงกว่าการอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ฤทธิ์ FRAP เป็นการวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชันรวม (total antioxidant activity) ด้วยกลไกการลดลงของ ferric-tripyridyl-triazine complex ไปเป็นสารประกอบ ferrous และเกิดสารสีขึ้น ดังนั้นจึงเป็นการวัดค่า total reducing power ของสารต้านออกซิเดชัน (Benzie and Strain, 1996)

เมื่อพิจารณาจากปริมาณของสารต้านออกซิเดชัน คือ สารไอโซฟลาโวน สารประกอบฟีนอล และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันคือ DPPH radical-scavenging activity และฤทธิ์ FRAP ที่พบในถั่วเน่าอบแห้งแล้ว พบว่าการอบแห้งถั่วเน่าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ทำให้ถั่วเน่ามีปริมาณของสารต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่าการอบแห้งที่อุณหภูมิต่ำกว่า

4. วิจารณ์ผลการวิจัย

ไอโซฟลาโวนเป็นสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลที่เกิดจากการรวมตัวของสาร phenylpropane และ malonyl coenzyme A จำนวน 3 โมเลกุล พบในถั่วเหลืองทั้งที่ผ่านกระบวนการหมักและไม่หมัก (Liu, 2004) ไอโซฟลาโวนมีหลายกลุ่มตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี โดยงานวิจัยนี้ตรวจวิเคราะห์ไอโซฟลาโวนในกลุ่ม β-glycosides และ aglycosides เท่านั้น นอกจากนี้ในถั่วเหลืองยังมีรายงานการพบไอโซฟลาโวนกลุ่ม acetylglycosides ได้แก่ acetyldaidzin acetylgenistin acetylglycitin และกลุ่ม malonylglycosides ได้แก่malonyldaidzin malonylgenistin malonylglycitin โดยชนิดและปริมาณของสารไอโซฟลาโวนขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของถั่วเหลืองและลักษณะของการแปรรูป (Liu, 2004; Lee et al., 2010)

ความร้อนในการอบแห้งถั่วเหลืองหมักมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงชนิดของสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง โดยรายงานของ Chein et al. (2005) พบว่าความร้อนทำให้สารไอโซฟลาโวนชนิด malonylgenistin เปลี่ยนรูปเป็น genistin ได้เร็วที่สุด รองลงมาคือการเปลี่ยนไอโซฟลาโวนชนิด malonylgenistin เป็น acetylgenistin และ acetylgenistin เป็น genistin ตามลำดับ จากเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้ผงปรุงรสจากถั่วเน่าที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 – 80 องศาเซลเซียส มีปริมาณของสาร genistin มากกว่าสารไอโซฟลาโวนชนิดอื่นๆ และการอบแห้งถั่วเน่าที่อุณหภูมิ 70 – 80 องศาเซลเซียส มีปริมาณของสาร genistin สูงกว่าการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ผลการศึกษาในครั้งนี้แตกต่างจากรายงานของ Dajanta et al. (2009b) ที่พบว่าในถั่วเน่าที่หมักจากแบคทีเรีย *B. subtilis* TN51 มีปริมาณสารไอโซฟลาโวนชนิด daidzein และ glycitin สูงที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในการผลิต และความแตกต่างของระยะเวลาในการหมัก โดยงานวิจัย ของ Dajanta et al. (2009b) ใช้เวลาในการหมักถั่วเหลืองสายพันธุ์ TG145 ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นานถึง 72 ชั่วโมง ขณะที่งานวิจัยนี้ใช้ถั่วเหลืองสายพันธุ์เชียงใหม่ 60 และใช้เวลาในการหมักทั้งหมดเพียง 48 ชั่วโมงเท่านั้น ซึ่งรายงานของ Kuo et al. (2006) ระบุว่าเวลาในการหมักถั่วเหลืองด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงชนิดของสารไอโซฟลาโวน โดยแบคทีเรีย

จะสร้างเอนไซม์ β-glucosidase ออกมาย่อยสลายไอโซฟลาโวนกลุ่ม malonylglycosides และ acetylglycosides ให้เปลี่ยนเป็น β-glycosides และย่อยสลาย β-glycosides ต่อไปจนได้เป็น aglycosides ผ่านทางกระบวนการ deglycosylation และจากเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้ถั่วเหลืองหมักมีปริมาณของไอโซฟลาโวน aglycosides คือ genistein daidzein และ glycitein เพิ่มสูงขึ้นหลังจากการหมักด้วยจุลินทรีย์ สอดคล้องกับรายงานของ Dajanta et al. (2009b) ที่พบว่าหลังการหมักถั่วเหลืองนึ่งสุกด้วย *B. subtilis* TN51 ทำให้ไอโซฟลาโวน กลุ่ม aglycosides เพิ่มสูงขึ้นถึง 318% เมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองก่อนหมัก และอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้งานวิจัยนี้ตรวจพบปริมาณของสารไอโซฟลาโวนแต่ละชนิดแตกต่างจากรายงานของ Dajanta et al. (2009b) คือวิธีการทำแห้งถั่วเน่าก่อนการตรวจวิเคราะห์คุณภาพ โดยรายงานของ Dajanta et al. (2009b) ใช้วิธีการทำแห้งถั่วเน่าก่อนการตรวจวิเคราะห์ไอโซฟลาโวนด้วยวิธี freeze-dry ซึ่งเป็นการทำแห้งที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็งแต่งานวิจัยนี้ใช้วิธีการอบแห้งแบบลมร้อนที่มีอุณหภูมิสูงกว่า ดังนั้นจึงส่งผลต่อการเปลี่ยนรูปของสารไอโซฟลาโวนที่แตกต่างกัน

มีรายงานที่บ่งชี้ว่าสารไอโซฟลาโวน โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิด aglycosides มีสรรพคุณในการป้องกันโรคที่สำคัญหลายชนิด เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน ทดแทนฮอร์โมนเอสโตรเจนในหญิงวัยหมดประจำเดือนและป้องการเสื่อมของกระดูก (Gotoh et al., 1998; Peterson et al., 1998; Ishimi et al., 2002; Kim et al., 2006; Liu et al., 2006)

สารประกอบฟีนอลจัดเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (free radical terminators) และ metal chelators (Hogg et al., 1993; Parthasarathy and Santanam, 1994; Patel and Darley-Usmar, 1999; Mathew and Abraham, 2006) โดยทั่วไปสารประกอบฟีนอลมักสร้างพันธะเชื่อมอยู่กับโครงสร้างของพืช ในถั่วเหลืองพบสารประกอบฟีนอลในปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ และมีรายงานที่บ่งชี้ว่าการหมักถั่วเหลืองด้วยจุลินทรีย์ช่วยเพิ่มปริมาณของสารประกอบฟีนอลในถั่วเหลืองหมัก เนื่องจากจุลินทรีย์ได้สร้างเอนไซม์ β-glucosidase ออกมาย่อยสารประกอบฟีนอลที่เชื่อมต่ออยู่กับองค์ประกอบของพืชให้หลุดออกมาอยู่ในรูปของสารประกอบฟีนอลอิสระ (Lee et al., 2007; Moktan et al., 2008; Georgetti et al., 2009) และรายงานของ Dajanta et al. (2011c) และ Dajanta et al. (2013) พบว่าหลังการหมักถั่วเน่าด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* มีปริมาณสารประกอบฟีนอลเพิ่มขึ้นจากถั่วเหลืองก่อนหมักมากถึง 217-859% สอดคล้องกับการตรวจพบในกระบวนการหมักนัตโตะและคินีมา (Moktan et al., 2008; Juan and Chou, 2010; Yao et al., 2010)

DPPH radical-scavenging activity เป็นปฏิกิริยาที่บ่งชี้ถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึง primary antioxidant activity และเป็นกลไกสำคัญในการช่วยป้องกันเซลล์จากการทำลายของอนุมูลอิสระ ป้องกัน genotoxic และ oxidative DNA damage ทำให้สามารถต่อต้านโรคที่มีสาเหตุจากอนุมูลอิสระ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ ความดันเลือดสูง โรคพาร์กินสัน และไขข้ออักเสบ (Ames et al.,1993; Kim et al., 2008) ผงปรุงรสถั่วเหลืองหมักที่ผลิตได้จากงานวิจัยนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ใกล้เคียงกับถั่วเน่าพื้นเมืองที่มีจำหน่ายในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ (Dajanta et al., 2012) และถั่วเน่าที่ผลิตจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์ในรายงานของ Dajanta et al. (2011c; 2013) โดยมีค่า IC_{50} ของ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ในช่วง 2.43 – 3.27 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน DPPH radical-scavenging activity และฤทธิ์ FRAP ที่พบในถั่วเน่าอบแห้งเป็นผลจากสารประกอบฟีนอลและสารไอโซฟลาโวนที่ตรวจพบในถั่วเน่าอบแห้ง โดยสารประกอบฟีนอลมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันจากความสามารถในการรีดิวซ์ การให้ไฮโดรเจน (hydrogen donators) ยับยั้งออกซิเจนโมเลกุลเดี่ยว (single oxygen quencher) และการจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (metal chelating) (Rice-Evans et al., 1995) ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารต้านออกซิเดชันและขึ้นอยู่กับชนิดและโครงสร้างของสารต้านออกซิเดชัน โดยสาร genistin มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระมากที่สุดในกลุ่มของสารไอโซฟลาโวนที่พบในถั่วเหลือง (Lee et al., 2005)

5. สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าผงปรุงรสจากถั่วเน่านอกจากจะสามารถช่วยเพิ่มรสชาติอร่อยหรือรสอูมามิให้กับอาหารแล้วยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงและอุดมด้วยสารต้านออกซิเดชันที่มีประโยชน์ต่อร่างกายทั้งสารประกอบฟีนอล และสารไอโซฟลาโวน โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิด aglycosides ซึ่งช่วยในการป้องกันโรคที่สำคัญหลายชนิด ดังนั้นถั่วเน่าจึงจัดเป็นอาหารเสริมสารต้านออกซิเดชันที่ควรนำไปศึกษาต่อยอดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพต่อไปในอนาคตเพื่อขยายตลาดถั่วเน่าพื้นบ้านของไทยรวมถึงการศึกษาต่อยอดถึงศักยภาพในการนำไปใช้ในการป้องกันโรคต่างๆ ในเชิงลึกต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษาในคลัสเตอร์โครงการบูรณาการวิจัยจากรากฐานภูมิปัญญาท้องถิ่นสู่นวัตกรรมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

7. เอกสารอ้างอิง

เกตุการ ดาจันทา. (2557). สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวจากแป้งและกรรมวิธีการผลิตผงกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*. เลขที่อนุสิทธิบัตร 9285.

Ames, B.M., Shigena, M.K. and Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci USA. 90: 7915-7922.

Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. (1998). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of Antioxidant power: The FRAP assay. Anal Biochem. 239: 70-76.

Chein, J.T., Hsieh, H. C., Kao, T.H. and Chen, B.H. (2005). Kinetic model for studying the conversion and degradation of isoflavones during heating. Food Chem. 91: 425-434.

Dajanta, K., Apichartsrangkoon, A. and Chukeatirote, E. (2011b). Volatile profiles of *thua nao*, a Thai fermented soy products. Food Chem. 125: 464-470.

Dajanta, K., Apichartsrangkoon, A. and Chukeatirote, E. (2011c). Antioxidant properties and total phenolics of Thua Nao (a Thai Fermented Soybean) as affected by *Bacillus*-fermentation. J Microbial Biochem Technol. 3(4): 56-59.

Dajanta, K., Apichartsrangkoon, A., Chukeatirote, E. and Frazier, R.A. (2011a). Free amino acid profiles of *Thua Nao*, a Thai fermented soybean. Food Chem. 125: 342-347.

Dajanta, K., Chukeatirote, E. and Apichartsrangkoon, A. (2011d). Improvement of thua nao production using protein-rich soybean and *Bacillus subtilis* TN51 starter culture. Ann Microbiol. 62(2): 785-795.

Dajanta, K., Chukeatirote, E. and Apichartsrangkoon, A. (2012). Nutritional and Physicochemical Qualities of *Thua Nao* (Thai Traditional Fermented Soybean). Chiang Mai J Sci. 39(4): 562-574.

Dajanta, K., Chukeatirote, E., Apichartsrangkoon, A. and Frazier, R.A. (2009b). Enhanced aglycone production of fermented soybean products by *Bacillus* species. Acta Biologica Szegediensis. 52(2): 93-98.

Dajanta, K., Janpum, P. and Leksing, W. (2013). Antioxidant capacities, total phenolics and flavonoids in black and yellow soybeans fermented by *Bacillus subtilis*: A comparative study of Thai fermented soybeans (*thua nao*). Int Food Res J. 20(6): 3125-3132.

Dajanta, K., Wongkham, S., Thirach, P., Baophoeng, P., Apichartsrangkoon, A., Santithum, P. and Chukeatirote, E. (2009a). Comparative study of proteolytic activity of protease-producing bacteria isolated from *thua nao*. Maejo Int J Sci Technol. 3(2): 269-276.

Dike, E.N. and Odunfa, S.A. (2003). Microbiological and biochemical evaluation of a fermented soyabean product: Soyadawadawa. J Food Sci Technol. 40: 606-610.

Georgetti, S.R., Vicentini, F.T.M.C., Yokoyama, C.Y., Borin, M.F. and Spadaro, A.C.C. (2009). Enhanced *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and mobilization of free phenolic compounds of soybean flour fermented with different β-glucosidase-producing fungi. J Appl Microbiol. 106: 459-466.

Gotoh, T., Yamada, K., Yin, H., Ito, A., Kataoka, T. and Dohi, K. (1998). Chemoprevention of N-Nitroso-N-methylurea-induced rat mammary carcinogenesis by soy foods or biochanin A. Jpn J Cancer Res. 89: 137–142.

He, F.J. and Chen, J.Q. (2013). Consumption of soybean, soy foods, soy isoflavones and breast cancer incidence: Differences between Chinese women and women in Western countries and possible mechanisms. Food Science and Human Wellness. 2: 146–161.

Hogg, N., Darley-Usmar, V.M., Wilson, M.T. and Moncada, S. (1993). The oxidation of alpha-tocopherol in human low-density lipoprotein by the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. FEBS Lett. 326: 199–203.

Ishimi, Y., Yoshida, M., Wakimoto, S., Wu, J., Chiba, H., Wang, X., Takeda, K. and Miyaura, C. (2002). Genistein, a soybean isoflavone, affects bone marrow lymphopoiesis and prevents bone loss in castrated male mice. Bone. 31: 180-185.

Izumi, T., Piskula, M.K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Kubota, Y. and Kikuchi, M. (2000). Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. J Nutr. 130: 1695-1699.

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* BCRC 14715. Food Microbiol. 27: 586-591.

Kang, H.B., Zhang, Y.E., Yang, J.D. and Lu, K.L. (2012). Study on soy isoflavone consumption and risk of breast cancer and survival, Asian Pac J Cancer Prev. 13(3): 995–998.

Kim, N.Y., Song, E.J., Kwon, D.Y., Kim, H.P. and Heo, M.Y. (2008). Antioxidant and antigenotoxic activities of Korean fermented soybean. Food Chem Toxicol. 46: 1184-1189.

Kim, S.L., Chi, H.Y., Kim, J.T., Lee, Y.H., Park, N.K., Son, J.R. and Kim, S.J. (2006). Isoflavone content and its relationship with other seed quality traits of soybean cultivars collected in South Korea. Korean J Crop Sci. 51: 81–88.

Kuo, L.C., Cheng, W.Y., Wu, R.Y., Huang, C.J. and Lee, K.T. (2006). Hydrolysis of black soybean isoflavone glycosides by *Bacillus subtilis* natto. Appl Microbiol Biotechnol. 73: 314-320.

Kwak, C.S., Lee, M.S. and Park, S.C. (2007). Higher antioxidant properties of Chungkukjang, a fermented soybean paste, may be due to increased aglycone and malonylglycoside isoflavone during fermentation. Nutr Res. 27: 719-727.

Lee, I.H., Hung, Y.H. and Chou, C.C. (2007). Total phenolic and anthocyanin contents, as well as antioxidant activity of black bean koji fermented by *Aspergillus awamori* under different culture conditions. Food Chem. 104: 936-942.

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. Int J Food Microbiol. 121: 150-156.

Lee, M.Y., Park, S.Y., Jung, K.O., Park, K.Y. and Kim, S.D. (2005). Quality and functional characteristics of Chungkukjang prepared with various *Bacillus* sp. isolated from traditional Chungkukjang. J Food Sci. 70: M191-M196.

Lee, S.J., Seguin, P., Kim, J.J., Moond, H.I., Ro, H.M., Kim, E.H., Seo, S.H., Kang, E.Y., Ahn, J.K. and Chung, I.M. (2010). Isoflavones in Korean soybeans differing in seed coat and cotyledon color. J Food Comp Anal. 23: 160–165.

Leejeerajumnean, A. (2003). Thua nao: alkali fermented soybean from *Bacillus subtilis*. SUIJ. 3: 277-292.

Lin, C.H., Wei, Y.T. and Chou, C.C. (2006). Enhanced antioxidant activity of soybean koji prepared with various filamentous fungi. Food Microbiol. 23: 628-633.

Liu, D., Zhen, W., Yang, Z., Carter, J.D., Si, H. and Reynolds, K.A. (2006). Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic β-cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway. Diabetes. 55: 1043–1050.

Liu, K. (2004). Soy isoflavones: Chemistry, processing effects, health benefits, and commercial production. *In* Soybean as Functional Foods and Ingredients. Champaign, Illinois: AOCS Press. pp. 51-72.

Luque-Rodriguez, J.M., Luque de Castro, M.D. and Perez-Juan, P. (2007). Dynamic superheated liquid extraction of anthocyanins and other phenolics from red grape skins of winemaking residues. Bioresource Technol. 98: 2705–2713.

Maier, T., Schieber, A., Kammerer, D.R. and Carle, R. (2009). Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. Food Chem. 112: 551-559.

Mathew, S. and Abraham, T.E. (2006). Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum vermum*) bark extract, through various in vitro models. Food Chem. 94: 520–528.

Moktan, B., Saha, J. and Sarkar, K. (2008). Antioxidant activities of soybean as affected by *Bacillus-*

fermentation of kinema. Food Res Int. 41: 586-593.

Morabito, N., Crisafulli, A. and Vergara, C. (2002). Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: A randomized double blind placebo-controlled study. J Bone Miner Res. 17: 1904-1912.

Nout, M.J.R., Bakshi, D. and Sarkar, P.K. (1998). Microbiological safety of kinema, a fermented soya bean food. Food Control. 9: 357-362.

Nuengchamnong, N., Krittasilp, K. and Ingkaninan, K. (2009). Rapid screening and identification of antioxidants in aqueous extracts of *Houttuynia cordata* using LC-ESI-MS coupled with DPPH assay. Food Chem. 117: 750-756.

Park, K.Y., Jung, K.O., Rhee, S.H. and Choi, Y.H. (2003). Antimutagenic effects of *doenjang* (Korean fermented soypaste) and its active compounds. Mutat Res Fund Mol Mech Mut. 523–524: 43–53.

Parthasarathy, S. and Santanam, N. (1994). Mechanisms of oxidation, antioxidants and atherosclerosis. Curr Opin Lipidol. 5: 371–375.

Patel, R.P. and Darley-Usmar, V.M. (1999). Molecular mechanisms of the copper dependent oxidation of low-density lipoprotein. Free Radical Res. 30: 1–9.

Peterson, T.G., Ji, G.P., Kirk, M., Coward, L., Falany, C.N. and Barnes, S. (1998). Metabolism of the isoflavones genistein and dichanin A in human breast cancer cell lines. Am J Clin Nutr. 68: 1505S-1511S.

Potter, S.M., Baum, J.A., Teng, H., Stillman, R.J., Shay, N.F. and Erdman, J.W.Jr. (1998). Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. Am J Clin Nutr. 68: 1375S-1379S.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M. and Pridham, J.B. (1995). The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. Free Radical Res. 22: 375–383.

Shon, M.Y., Lee, J., Choi, J.H., Choi, S.Y., Nam, S.H., Seo, K.I., Lee, S.W., Sung, N.J. and Park, S.K. (2007). Antioxidant and free radical scavenging activity of methanol extract of *chungkukjang*. J Food Comp Anal. 20: 113-118.

Steinkraus, K.H. (1996). Indonesian tempe and related fermentations: Protein-rich vegetarian meat substitutes. *In* Handbook of Indigenous Fermented Foods. 2nd Edn. New York: Marcel Dekker Inc. pp. 7-110.

Tseng, Y.H., Lee, Y.L., Li, R.C. and Mau, J.L. (2005). Non-volatile flavor components of *Ganoderma tsugae*. Food Chem. 90: 409-415.

Wei, P., Liu, M., Chen, Y., and Chen, D.C. (2012). Systematic review of soy isoflavone supplements on osteoporosis in women. Asian Pac J Trop Med. 5(3): 243-248.

Yao, Q., Xiao-Nan, J. and Dong, P.H. (2010). Comparison of antioxidant activities in black soybean preparations fermented with various microorganisms. Agr Sci China. 9: 1065-1071.

Zhang, Y.E., Kang, H.B., Li, B.L. and Zhang, R.M. (2012). Positive effects of soy isoflavone food on survival of breast cancer patients in China. Asian Pac J Cancer Prev. 13(2): 479–482.

❑❑❑❑❑