

บทความวิจัย (Research Article)

การชักนำฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสารจินีสไทน์ในถั่วเหลืองฝักสด

Induction of antioxidant activity and genistein in vegetable soybean

บุญร่วม คิตคำ^{1*}

Bunruam Khitka^{1*}

บทคัดย่อ

การศึกษาชนิดของสารชักนำจำนวน 4 ชนิด (น้ำกลั่น คอปเปอร์คลอไรด์ ไคโตซาน และไคโตซานร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์) ต่อการชักนำฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสารจินีสไทน์ในถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ Kaori และพันธุ์ # 75 ที่อยู่ในระยะเริ่มออกดอก (R1) ถึงระยะที่เมล็ดพัฒนาเต็มที่ (R6) พบว่า สารชักนำทุกชนิด ยกเว้นน้ำกลั่นมีผลต่อการชักนำฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสารจินีสไทน์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะการใช้ไคโตซานร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์สามารถชักนำให้ถั่วเหลืองพันธุ์ Kaori และพันธุ์ # 75 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด (IC_{50} = 1,012 และ 925 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP value = 19.8 และ 20.1 ไมโครโมลของ Fe^{2+} /กรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อตรวจสอบด้วย FRAP assay) ยิ่งไปกว่านั้น การใช้ไคโตซานร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์ยังชักนำให้ถั่วเหลืองพันธุ์ # 75 มีปริมาณของสารจินีสไทน์สูงสุดเท่ากับ 29.286 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง แสดงว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารจินีสไทน์ในเมล็ดสดของถั่วเหลืองฝักสดเพิ่มขึ้นได้ด้วยการใช้คอปเปอร์คลอไรด์ร่วมกับไคโตซานเป็นสารชักนำ

คำสำคัญ : ถั่วเหลืองฝักสด, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, สารจินีสไทน์, สารไคโตซาน, สารคอปเปอร์คลอไรด์

Abstract

The antioxidant activities and genistein content in vegetable soybean varieties (Kaori and #75) that were treated with 4 inducers (distilled water, copper chloride, chitosan and copper chloride with chitosan) during the R1 to R6 of soybean growth stages were investigated. The results showed that almost applications of inducers, except distilled water had statistically significant effects on antioxidant activities and the amount of genistein produced. The application of $CuCl_2$ +chitosan gave the highest antioxidant activities in Kaori and #75 variety (IC_{50} value = 1,012 and 925 μ g/ml for DPPH assay, and FRAP value = 19.8 and 20.1 μ mol Fe^{2+} /g dry weight). Furthermore the application of chitosan together with copper chloride gave the highest amount of genistein 29.286 μ g/g dry weight in #75 variety. The data suggest that the antioxidant activities and amount of genistein in vegetable soybean are increased with using copper chloride with chitosan as the inducer.

Keywords : Vegetable soybean, antioxidant activities, genistein, chitosan, copper chloride

¹ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

¹ School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao province 56000

*Corresponding author e-mail: bkhitka@hotmail.com, Received: 13 January 2012; Accepted: 30 March 2012

(บทความวิจัยเรื่องนี้ได้นำเสนอการประชุมวิชาการพะเยาวิจัย ครั้งที่ 1 ในวันที่ 12-13 มกราคม 2555 ณ มหาวิทยาลัยพะเยา)

บทนำ

ถั่วเหลืองฝักสด [*Glycine max* (L.) Merrill] [7] เป็นพืชที่มีสารทุติยภูมิหลายชนิดสะสมอยู่ในเมล็ด โดยเฉพาะสารในกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ ได้แก่ สารจินีสทิน (genistein) ไดไซด์ (daidzein) และคูเมสโตรล (coumestrol) เป็นต้น [13] สารเหล่านี้ช่วยลดการเกิดภาวะกระดูกพรุนในผู้สูงอายุ [12] เป็นต้น ยิ่งไปกว่านั้น สารจินีสทินเป็นสารที่มีศักยภาพสูงในการต้านอนุมูลอิสระ [13] ปริมาณสารจินีสทินในถั่วเหลืองฝักสดจำนวน 18 สายพันธุ์มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 17.691 มิลลิกรัม/100กรัม [2] ขณะที่เคยมีรายงานว่าถั่วเหลืองฝักสดของประเทศญี่ปุ่น เกาหลี และไต้หวันมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 64.78 72.21 และ 31.54 มิลลิกรัม/100กรัม ตามลำดับ [15] จึงควรหาแนวทางในการกระตุ้นการสร้างสารสำคัญในเมล็ดถั่วเหลืองฝักสดตั้งแต่ในระดับแปลงปลูก การใช้สารชักนำ (inducer) เป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถกระตุ้นกระบวนการสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ได้ [14] เช่น การฉีดพ่นไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ใบของถั่วเหลืองสามารถเพิ่มสารไอโซฟลาโวนในเมล็ดถั่วเหลืองได้ 16-96 เปอร์เซ็นต์ [3] การให้สารคอปเปอร์คลอไรด์ 10 mM กับลำต้นถั่ว *Pueraria lobata* ที่หั่นเป็นชิ้นๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สามารถเพิ่มปริมาณของจินีสทินได้ 5 เท่า [8] การใช้ไคโตซาน 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้กาวเครือขาวสร้างสารจินีสทินสูงที่สุดเท่ากับ 22.6 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง และการฉีดพ่นไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้กาวเครือขาวยับยั้งสารอนุมูลอิสระได้ 54.7 เปอร์เซ็นต์ และสามารถรีดิวซ์สาร อนุมูลอิสระได้ 5.72 ไมโครโมลของ Fe^{2+} /กรัมน้ำหนักแห้ง [10] จากข้อมูลข้างต้นอาจมีความเป็นไปได้ว่าการชักนำให้ถั่วเหลืองฝักสดมีสารจินีสทินเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น และพันธุ์ของถั่วเหลืองก็อาจมีผลต่อปริมาณของสารจินีสทินด้วยเช่นกัน

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

วางแผนการทดลอง split plot design ปัจจัยหลัก (main plot) ได้แก่ พันธุ์คาโอริ (Kaori) และ พันธุ์

นมเบอร์ 75 (# 75) ปัจจัยรอง (sub plot) คือสารชักนำ 4 ชนิด ได้แก่ การฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น (distilled water) การฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ($CuCl_2$) การราดโคนต้นด้วยไคโตซาน 100 มิลลิกรัม/ลิตร (chitosan) และ การราดโคนต้นด้วยไคโตซาน 100 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ 200 มิลลิกรัม/ลิตร (chitosan + $CuCl_2$) ฉีดพ่นสารชักนำอย่างต่อเนื่องทุก 7 วัน ตามแผนการทดลอง ในถั่วเหลืองที่อยู่ในระยะเริ่มออกดอก (R1) ถึงระยะเมล็ดพัฒนาเต็มที่ (R6) เก็บฝักถั่วเหลืองของแต่ละกรรมวิธีมาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสารจินีสทินในสารสกัดหยาบจากเมล็ด

การสกัดสารสำคัญจากเมล็ดถั่วเหลืองฝักสด

อบเมล็ดที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วบดให้ละเอียด ชั่งผงบด 10 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำเอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วจึงเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 นาที [1]

ตรวจวัดฤทธิ์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH

นำสารสกัดแต่ละตัวอย่างมาละลายด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 750-4500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารสกัดแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 4.9 มิลลิลิตร กับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เมื่อผสมให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร แล้วจึงคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสาร DPPH ตามวิธีของ Brand-Williams [6] ด้วยสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระ} = \{ [\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}] / \text{Abs}_{\text{control}} \} \times 100$$

$\text{Abs}_{\text{sample}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด 1.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย DPPH 1.5 มิลลิลิตร

$\text{Abs}_{\text{control}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรผสมกับเมทานอล 1.5 มิลลิลิตร

สร้างกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของสารสกัดแต่ละตัวอย่าง สร้างสมการเส้นตรงเพื่อคำนวณ IC_{50}

การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

สร้างกราฟมาตรฐานของ ferrous sulfate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) ผสม $FeSO_4$ ความเข้มข้น 0.101 - 1.011 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับ FRAP reagent ปริมาตร 950 ไมโครลิตร และผสม FRAP reagent กับเมทานอล แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย acetate buffer pH 3.6 เป็น blank สร้างกราฟมาตรฐานตามวิธีของ Benzie and Strain [5] ระหว่างความเข้มข้นของ $FeSO_4$ กับค่า ผลต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร (ค่าดูดกลืนแสงของสาร $FeSO_4$ - ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม) แล้วคำนวณหาสมการเส้นตรงเพื่อใช้คำนวณค่า FRAP value ของแต่ละตัวอย่าง การหาค่า FRAP value ของแต่ละตัวอย่าง ผสมสารสกัดของแต่ละตัวอย่าง ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับ FRAP reagent ปริมาตร 950 ไมโครลิตร วัดค่าดูดกลืนแสง แล้วคำนวณ ผลต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตรของแต่ละตัวอย่าง

การหาปริมาณของจินสไตน์

โดยใช้เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) โดยกรองสารละลายของสารสกัดแต่ละตัวอย่างด้วยกระดาษกรองไนลอนเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บสารละลายที่กรองได้ใน vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย HPLC (Hewlett-packard 1050 series) ที่ใช้ diode array เป็น detector โดยฉีดสารสกัด 20 ไมโครลิตร/ครั้ง/ตัวอย่าง ผ่านคอลัมน์ชนิด $RP-C_{18}$ Agilent® column (4.6x150 มิลลิเมตร) ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร ใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) acetic acid ในน้ำ (A) และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) acetic acid ใน acetonitrile (B) โดยทำเป็นระดับ (gradient) (ตารางที่

1) ใช้อัตราการเคลื่อนที่ของสารเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิของระบบเท่ากับ 30°C [16]

ตารางที่ 1 ระดับ (gradient) ของเฟสเคลื่อนที่ชนิด A และชนิด B

เวลา (นาที)	ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ (เปอร์เซ็นต์)	
	A	B
0	90	10
35	72	28

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) ของ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP และปริมาณสารจินสไตน์ แล้วจึงเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ผลการศึกษา

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay

สารชักนำทุกกรรมวิธีสามารถชักนำให้ถั่วเหลืองฝักสด พันธุ์ Kaori และ # 75 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการชักนำด้วย Distilled water (กลุ่มควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการชักนำด้วยโคโตซานร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์เพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1,012 และ 925 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ขณะที่การชักนำด้วยน้ำกลั่น พบว่าพันธุ์ Kaori มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด เท่ากับ 1,757 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่ 2)

ผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย FRAP assay

สารชักนำทุกกรรมวิธีสามารถชักนำให้ถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ Kaori และ # 75 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการชักนำด้วย distilled water อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการชักนำด้วย chitosan+ $CuCl_2$ สามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับการชักนำด้วย chitosan และ chitosan+ $CuCl_2$ ทำให้ถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ # 75 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า FRAP value

เท่ากับ 19.8 และ 20.1 ไมโครโมลของ Fe^{2+} /กรัม น้ำหนักแห้ง ขณะที่การชักนำด้วยน้ำกลั่นพบว่าพันธุ์ Kaori มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด เท่ากับ 12.7 ไมโครโมลของ Fe^{2+} /กรัม น้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจวัดด้วยวิธี DPPH ในถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ Kaori และ # 75 หลังการชักนำ

พันธุ์	สารชักนำ	IC ₅₀ value ^{1'}
Kaori	distilled water	1,757 c
	CuCl ₂	1,423 b
	chitosan	1,304 b
	chitosan + CuCl ₂	1,012 a
# 75	distilled water	1,540 bc
	CuCl ₂	1,316 b
	chitosan	1,219 ab
	chitosan + CuCl ₂	925 a

หน่วย : ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

^{1'}หมายถึงค่าเฉลี่ยของกรรมวิธีที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจวัดด้วยวิธี FRAP assay ในถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ Kaori และพันธุ์ # 75 หลังการชักนำ

พันธุ์	สารชักนำ	FRAP value ^{1'}
Kaori	distilled water	12.7 a
	CuCl ₂	15.6 b
	chitosan	15.2 b
	chitosan + CuCl ₂	17.9 bc
# 75	distilled water	14.1 ab
	CuCl ₂	17.7 bc
	chitosan	19.8 c
	chitosan + CuCl ₂	20.1 c

หน่วย: ไมโครโมลของ Fe^{2+} /กรัม น้ำหนักแห้ง

^{1'}หมายถึงค่าเฉลี่ยของกรรมวิธีที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ปริมาณสารจินสโตน

สารชักนำทุกกรรมวิธีสามารถชักนำให้ถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ Kaori และ # 75 มีปริมาณสารจินสโตนสูงกว่าการชักนำด้วย distilled water อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการชักนำด้วยไคโตซานร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์ ทำให้พันธุ์ # 75 มีปริมาณสารสูงที่สุดเท่ากับ 29.268 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง ขณะที่ปริมาณต่ำที่ปริมาณที่ต่ำที่สุดนั้นเกิดจากการชักนำด้วยน้ำกลั่นในพันธุ์ Kaori ซึ่งมีปริมาณสารจินสโตนเท่ากับ 12.615 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ปริมาณสารจินสโตนในถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ Kaori และพันธุ์ # 75 หลังการชักนำ

พันธุ์	สารชักนำ	genistein ^{1'}
Kaori	distilled water	12.615 a
	CuCl ₂	17.081 b
	chitosan	16.527 b
	chitosan + CuCl ₂	25.683 c
# 75	distilled water	18.173 b
	CuCl ₂	24.058 c
	chitosan	21.019 bc
	chitosan + CuCl ₂	29.286 d

หน่วย: ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง

^{1'}หมายถึงค่าเฉลี่ยของกรรมวิธีที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

วิจารณ์และสรุปผล

เมื่อพิจารณาจากปัจจัยพันธุ์ของถั่วเหลืองฝักสดพบว่ามีความแตกต่างของปริมาณสารจินสโตน และการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า ในระยะ R6 ของทั้งสองพันธุ์นั้นพันธุ์ Kaori จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสะสมสารจินสโตนในปริมาณที่ต่ำกว่าพันธุ์ # 75 สอดคล้องกับ ข้อมูลของถั่วเหลืองต่างสายพันธุ์ที่ปลูกในพื้นที่เดียวกันจะมีปริมาณสารไอโซฟลาโวนอยด์ต่างกันในช่วง 116-309 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง

แต่ถ้าเป็นถั่วเหลืองพันธุ์เดียวกันจะมีความแตกต่างกันอยู่ในช่วง 46-125 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง [4]

ขณะที่ปัจจัยของชนิดของสารชักนำมีผลต่อปริมาณของสารจินีสไทน์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน เห็นได้จากการใช้คอปเปอร์คลอไรด์ และโคโตซาน รวมถึงใช้ทั้งสองชนิดร่วมกัน ต่างก็มีผลชักนำให้ถั่วเหลืองฝักสดทั้งสองพันธุ์เกิดการสะสมสารต้านอนุมูลอิสระและสารจินีสไทน์ให้เพิ่มขึ้นได้ สอดคล้องกับ Hubert and Ragai [9] ที่พบว่าการใช้โคโตซาน และคอปเปอร์คลอไรด์เป็นสารชักนำสามารถเพิ่มปริมาณสารจินีสไทน์ในถั่วลันเตาได้ 6 ถึง 13 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และ พบว่าโคโตซานความเข้มข้น 0.12 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่ใช้ร่วมกับการเลี้ยงเซลล์รากถั่วลันเตานั้นสามารถเพิ่มสารจินีสไทน์ได้ 108.0 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง [11] ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นนั้นเป็นไปได้ว่าส่วนหนึ่งเกิดจากการมีสารจินีสไทน์ที่เพิ่มขึ้นจากการถูกชักนำ และสารชักนำที่ใช้ทดลองอาจมีผลชักนำสารไอโซฟลาโวนอยด์ชนิดอื่นๆ ที่ไม่ได้ทำการตรวจวัดในการทดลองนี้ครั้งนี้ จึงแสดงผลให้เห็นจากการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะโคโตซาน และคอปเปอร์คลอไรด์สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์สารประกอบไอโซฟลาโวนอยด์ในพืชได้ [14] ยิ่งไปกว่านั้น คอปเปอร์คลอไรด์อาจมีผลในทางส่งเสริมกับโคโตซาน เห็นได้จากการใช้คอปเปอร์คลอไรด์ หรือ โคโตซานเป็นสารชักนำเพียงอย่างเดียว สามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสารจินีสไทน์ได้น้อยกว่าการใช้สารทั้งสองร่วมกัน ข้อมูลที่ได้ทั้งหมดจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าพันธุ์ของถั่วเหลืองฝักสดมีผลต่อปริมาณสารจินีสไทน์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการใช้โคโตซานร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์สามารถเพิ่มสารดังกล่าวในระดับแปลงปลูกได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เกษตรกรจึงควรนำแนวทางดังกล่าวมาปรับใช้เพื่อเป็นการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลืองฝักสดให้แก่ผู้บริโภคให้ได้รับประโยชน์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยพะเยาที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยและให้การสนับสนุนพื้นที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ ในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. บุญร่วม คิดคำ. ผลของสารชักนำต่อผลผลิตและสารไอโซฟลาโวนอยด์ในหัวถั่วเขียวและฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรท. [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต.] มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. นครราชสีมา; 2552.
2. มัลลิกา จินดาสิงห์, เศรษฐา ศิริพิณฑุ, ดนุวัต เพ็งอ้น, วีรชัย พุทธวงศ์. การระบุสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองฝักสดโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC). ว. วิทย. กษ. 2552; 40(3) (พิเศษ):309-312
3. Al-Tawaha AM, Seguin P, Smith DL, Beaulieu C. Biotic elicitors as a mean of increasing isoflavone concentration of soybean seeds. Annu Appl Biol. 2005;146:303-310.
4. Arthur CE, William FK. Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. J Agric Food Chem. 1983;31(2): 394-396.
5. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay. Anal Biochem. 1996;239:70-76.
6. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radicals method to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wiss Technol. 1995;28:25-30.
7. Hartwig EE. Varietal development. In: Soybeans: improvement, production, and uses Caldwell BE, editor. Madison, Wisconsin: Amer Soc Agron Inc. 1973;p.187-210.

8. Hakamatsuka T, Ebizuka Y, Sankawa U. Induced isoflavonoids from copper chloride treated stems of *Pueraria lobata*. *Phytochemistry* 1991;30(5):1481-1482.
9. Hubert G, Ragai KI. Effects of various elicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in white lupin. *Phytochemistry* 1997;44:1463-1467.
10. Khitka B, Kupittayanant S, Rangsiwatananon K, Manakasem Y. Antioxidant properties of puerarin and genistein from White Kwao Krua induced by elicitors and their antihyperglycemic effect on rats. *Suranaree J Sci Technol.* 2009;17(1):27-37
11. Kneer R, Poulev A, Olesinski A, Raskin I. Characterization of the elicitor-induced biosynthesis and secretion of genistein from roots of *Lupinus luteus* L. *J Exp Bot.* 1999;50:1553-1559.
12. Knight DC, Eden JA. A Review of the clinical effect of phytoestrogen. *Obstet Gynecol.* 1996;87(5):897-904.
13. Ruiz-Larrea MB, Mohan AR, Paganga G, Miller NJ, Bolwell GP, Rice-Evans CA. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radic Res.* 1997;26(1):63-70.
14. Young DH, Kauss H. Release of calcium from suspension cultured *Glycine max* cells by chitosan, other polycations and polyamines in relation to effects on membrane permeability. *Plant Physiol.* 1983;73:698-702.
15. U.S. Department of agriculture, agricultural research service. 2002. [Internet]. USDA-Iowa State university database on the Isoflavone content of foods, Release 1.3 - 2002. Nutrient Data Laboratory Web site: Available from [http:// www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/isoflav/isoflav.html](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/isoflav/isoflav.html)
16. Zhang Y, Tong TS, Cunnick JE, Murphy PA, Hendrich S. Daidzein and genistein glucuronides in vitro are weakly estrogenic and activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations. *J Nutr.* 1999;129:399-405.