การตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนโดยวิธีคัลเลอริเมตริกในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

Colorimetric Determination of Biogenic Amines Contents in Fermented Foods

จารุวรรณ ธนพฤฒิวงศ์[1] และจิรศักดิ์ คงเกียรติขจร[1]

Jaruwan Thanapurtiwong[1] and Jirasak Kongkiattikajorn[1]

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก โดยใช้วิธี Enzyme coupling assay จากการทำงานของเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสร่วมกับเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยสารผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดส สารละลายเอนไซม์ โบรโมเปอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีแดง โปตัสเซียมโบรไมด์ ฟีนอลเรด และ บัฟเฟอร์ pH 7 ซึ่งสามารถสร้างเป็นกราฟมาตรฐานของ putrescine cadaverine และ histamine เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบเอมีนที่มีอยู่ในอาหารหมักได้ในช่วงความเข้มข้น 0 – 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการศึกษานี้ได้พัฒนาการสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมัก ได้แก่ แหนม และไส้กรอกเปรี้ยว พบว่า การสกัดสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างด้วยกรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 3 โมลาร์ โดยใช้อัตราส่วนของน้ำหนักตัวอย่าง 1 ส่วนต่อปริมาตรสารละลายสกัด 2 ส่วนและสกัดทั้งหมด 3 ซ้ำ สามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกมาได้มากที่สุด โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การสกัดเท่ากับ 72.63 และ 76.49 ตามลำดับ และเมื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีน พบว่า มีปริมาณสารประกอบเอมีนเท่ากับ 340.70 และ 267.21 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ การเก็บรักษาสารละลายปฏิกิริยา โดยการเติมกลีเซอรอลสามารถยืดอายุการเก็บรักษาของน้ำยาได้ดี โดยทำให้น้ำยาตรวจวิเคราะห์มีอายุการเก็บอย่างน้อยที่สุด 16 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

คำสำคัญ : สารประกอบเอมีน อาหารหมัก วิธีคัลเลอริเมตริก

ABSTRACT

In this study, a developed method determining the biogenic amines in fermented food by enzyme coupling assay of is described. The reaction mixture composed of diamine oxidase, bromoperoxidase from sea weed, potassium bromide and phenol red in the buffer pH 7.0. Calibration curves of putrescine, cadaverine and histamine were settled for evaluation biogenic amines in fermented foods in the concentration of 0-8 mg/ml. In this study, 3 M perchloric acid was used as extraction medium for nham and fermented pork sausage. The ratio of sample and extraction medium was 1: 2 (w/v). Re-extraction for 3 times resulted highest recovery of 72.63% and 76.49% for biogenic amine contents of 340.70 mg/kg and 267.21 mg/kg in nham and fermented pork sausage,

[1] คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพฯ 10150

School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok 10150

respectively. The reaction mixture solution could be preserved to maintain enzyme activity with adding glycerol at least for 16 weeks at 4°C.

Keywords : biogenic amine, fermented food, colorimetric determination

E-mail : jirasak.kon@kmutt.ac.th

คำนำ

อาหารหมักดองจัดเป็นอาหารที่ผ่านการแปรรูปชนิดหนึ่ง ซึ่งได้รับความนิยมอย่างมากจากผู้บริโภค โดยเฉพาะอาหารหมักดองพื้นบ้านของไทยที่มีความหลากหลายในเรื่องของรสชาติ สี กลิ่น และมีเอกลักษณ์เฉพาะตัว ซึ่งการหมักโดยอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ โดยไม่มีการควบคุมกระบวนการหมักที่ถูกต้องเหมาะสม ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นโทษต่อร่างกาย รวมทั้งนำไปสู่การสะสมของสารประกอบที่เป็นพิษ คือ สารประกอบเอมีน โดยชนิดที่มีความสำคัญและพบได้มากในอาหาร ได้แก่ histamine, putrescine, cadaverine, tyramine, tryptamine, β-phenylethylamine, spermine และ spermidine (Shalaby, 1996)

งานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนด้วยเทคนิคต่าง ๆ กัน แต่เทคนิคที่ใช้กันส่วนใหญ่ได้แก่ วิธี HPLC (high performance liquid chromatography) ซึ่งมีข้อดีคือ ไวต่อปริมาณตัวอย่างที่มีน้อย (Badolo และคณะ, 1999) แต่จะมีข้อด้อยคือ ราคาของเครื่อง HPLC ที่มีราคาค่อนข้างสูง ต้องการตัวอย่างที่มีความบริสุทธิ์สูง และจำนวนตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ได้ต่อวันทำได้น้อย (Aygün และคณะ, 1999) ซึ่งวิธีนี้ใช้ในการวิเคราะห์อาหารหมัก เช่น เนย (Martuscelli และคณะ, 2005) ไส้กรอก (Coïsson และคณะ, 2004) ไวน์ (Anli และคณะ, 2004) เบียร์ (Loret และคณะ, 2005) เป็นต้น วิธี thin layer chromatography (TLC) และอีกเทคนิคคือ enzyme-linked immunosorbent assay system (ELISA) ซึ่งการตรวจวิเคราะห์โดยวิธีการดังกล่าวมีความยุ่งยาก ต้นทุนสูง และบางกรณีมีความคลาดเคลื่อนสูงเนื่องจากเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ และเครื่องมือและส่วนใหญ่จะใช้ในการตรวจวิเคราะห์ในการศึกษาวิจัย ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้จะได้พัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ที่มีความสะดวก รวดเร็ว และราคาประหยัด โดยใช้น้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยพัฒนาการสกัดและการผลิตน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปที่มีประสิทธิภาพ สำหรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก รวมถึงการพัฒนากระบวนการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมัก ที่มีความสะดวกและรวดเร็ว เพื่อช่วยในการควบคุมให้ผลิตภัณฑ์ได้มาตรฐาน

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างอาหารหมัก 2 ตัวอย่าง ได้แก่ แหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว จากตลาดสดภายในท้องถิ่น โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

การสร้างกราฟมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมักดอง โดยศึกษาความสามารถในการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนมาตรฐานได้แก่ putrescine cadaverine และ histamine เพื่อสร้างเป็นกราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา Enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยสารผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วย เอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดส เอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส ฟีนอลเรด โปตัสเซียมโบร์ไมด์ Tris-HCl buffer (พีเอช 7) และ

สารประกอบเอมีนมาตรฐาน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลู ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

ขั้นตอนการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนจากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก โดยเตรียมสารผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า (Sigma) สารละลาย เอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส จากสาหร่ายทะเล สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างสารสกัด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

การศึกษาชนิดของกรดที่นำมาใช้ในการสกัดสารประกอบเอมีน ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 4 โมลาร์ กรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 0.6 1.5 และ 3 โมลาร์ โดยชั่งตัวอย่างแหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว 20 กรัม ทำการบดด้วยเครื่องบด ให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ผสมกับสารละลายกรด ปริมาตร15 มิลลิลิตรทำการบดให้ละเอียด ผสมกับสารละลายกรดชนิดต่างๆ ปรับให้สารที่ได้มีพีเอชเป็นกลาง กรองผ่านกระดาษกรอง นำส่วนใสไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อทำการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนต่อไป

การศึกษาอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักอาหารหมักกับปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 4 โมลาร์ โดยตัวอย่างแหนมหมูและปริมาตรกรดในอัตราส่วน 1:0.75, 1:1.0, 1:1.5, 1:2.0 และ 1:2.5 ทำการสกัดโดยการบดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยเครื่องบด ผสมกับกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 4 โมลาร์ และกวนส่วนผสมเป็นเวลา 30 นาทีในอ่างน้ำแข็ง นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดไปทดสอบหาปริมาณสารประกอบเอมีน

การศึกษาจำนวนครั้งที่ใช้ในการสกัดสารประกอบเอมีน โดยชั่งตัวอย่าง แหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว แล้วทำการบดด้วยเครื่องบด ให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ผสมกับกรดไฮโดรคลอริก จากนั้นจึงทำการสกัดเป็นจำนวน 1-4 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดไปทดสอบหาปริมาณสารประกอบเอมีนด้วยปฏิกิริยา Enzyme coupling assay

การหาค่าเปอร์เซ็นต์การสกัดสารประกอบเอมีน (% Recovery) นำตัวอย่างแหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว โดยเมื่อได้อัตราส่วนของกรดที่เหมาะสมและน้ำหนักตัวอย่างที่ให้ค่าปริมาณสารประกอบเอมีนสูงสุด นำตัวอย่างมาเติมสารประกอบเอมีนมาตรฐานได้แก่ putrescine จากนั้นนำไปสกัดโดยใช้วิธีเดียวกันในทุกตัวอย่าง การคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การสกัดสารประกอบเอมีน (% Recovery) จากสูตร

$$\text{Recovery (\%)} = [(BA_2 - BA_1)/BA_3] \times 100$$

กำหนดให้ ; BA_1 = ปริมาณสารประกอบเอมีนก่อนการเติม (mg/kg)

BA_2 = ปริมาณสารประกอบเอมีนหลังการเติม (mg/kg)

BA_3 = สารประกอบเอมีนที่เติมลงไป (mg/kg)

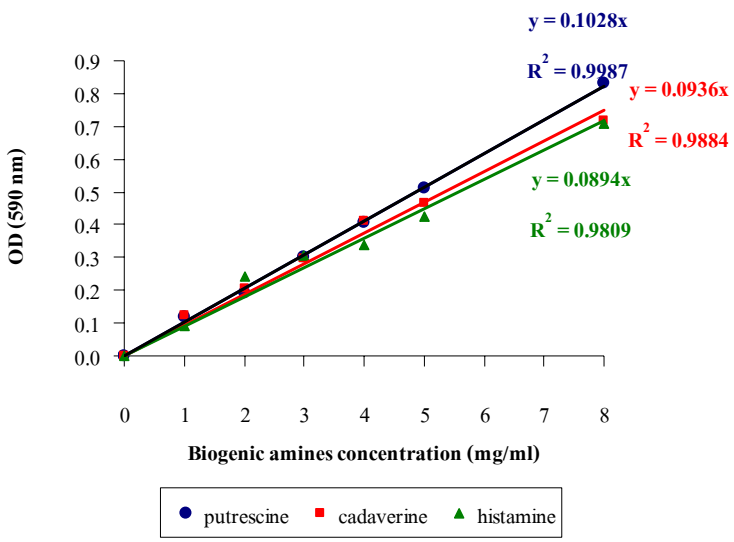
ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาความสามารถในการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนมาตรฐานได้แก่ putrescine cadaverine และ histamine ด้วยปฏิกิริยา Enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่า สามารถนำไปสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างอาหารหมักได้ในช่วงความเข้มข้น 0 – 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงดังในภาพที่ 1

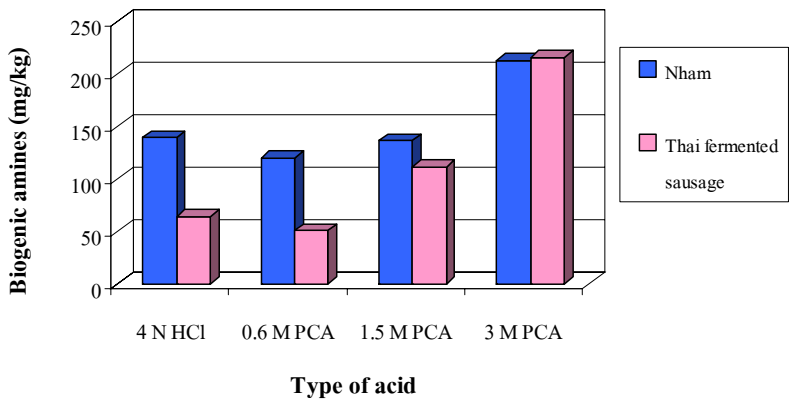
การศึกษาชนิดของกรดที่นำมาใช้ในการสกัดสารประกอบเอมีน ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 4 โมลาร์ กรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 0.6 1.5 และ 3 โมลาร์ พบว่า สารละลายสกัดที่เหมาะสมในการสกัดแหนมหมูและไส้กรอกเปรี้ยว คือ กรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 3 โมลาร์ เนื่องจากสามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกมามากที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยหลายงานที่ได้ทำการศึกษาสารประกอบเอมีนในผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์ โดยการสกัดด้วยกรดเปอร์คลอริก ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Latorre-Moratalla และคณะ (2008) และ Ansorena และคณะ (2002) ได้สกัดสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างไส้กรอกหมักของประเทศต่างๆ ในแถบทวีปยุโรป โดยการสกัดด้วยกรดเปอร์คลอริก นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Limsuwan (2004) ได้ทำการศึกษาชนิดของกรดที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบเอมีนในตัวอย่างแหนม พบว่า การสกัดแหนมด้วยกรดเปอร์คลอริก มีประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบเอมีนชนิด tryptamine phenlethylamine putrescine cadaverine และ tyramine ได้มากกว่าการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก และกรดไตรคลอโรอะซิติก

การศึกษาอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักอาหารหมักกับปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 4 โมลาร์ ที่ใช้เป็นสารละลายสกัด ในอัตราส่วน 1 : 0.75 1 : 1 1 : 1.5 1 : 2 และ1 : 2.5 พบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างแหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว คือ อัตราส่วน 1 : 2 เนื่องจากสามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกจากตัวอย่างได้มากที่สุด และใช้ปริมาตรของสารละลายสกัดน้อยกว่า การสกัดในอัตราส่วน 1 : 2.5 ซึ่งสกัดสารประกอบเอมีนออกมาได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 3

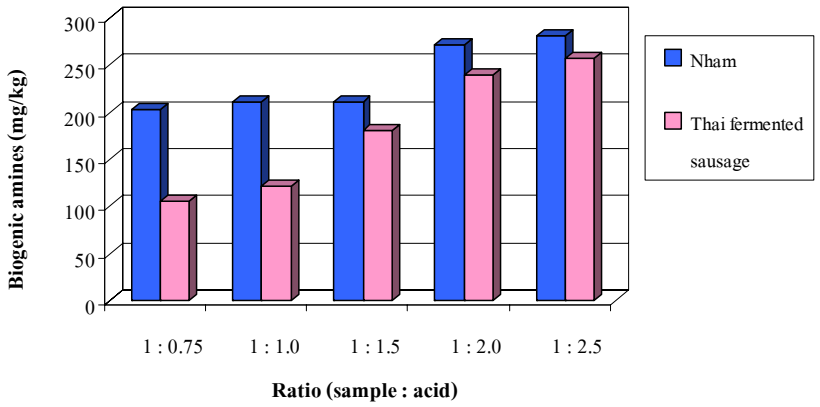
การศึกษาจำนวนครั้งที่ใช้ในการสกัดสารประกอบเอมีน ได้แก่ การสกัด 1 2 3 และ 4 ครั้ง พบว่า จำนวนครั้งที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างแหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว คือ การสกัดทั้งหมด 3 ครั้ง เนื่องจากสามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกจากตัวอย่างได้มากที่สุด รวมทั้งสิ้นเปลืองเวลาและสารละลายสกัดน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการสกัด 4 ครั้ง ที่สามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกมาได้ไม่แตกต่างกัน ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4



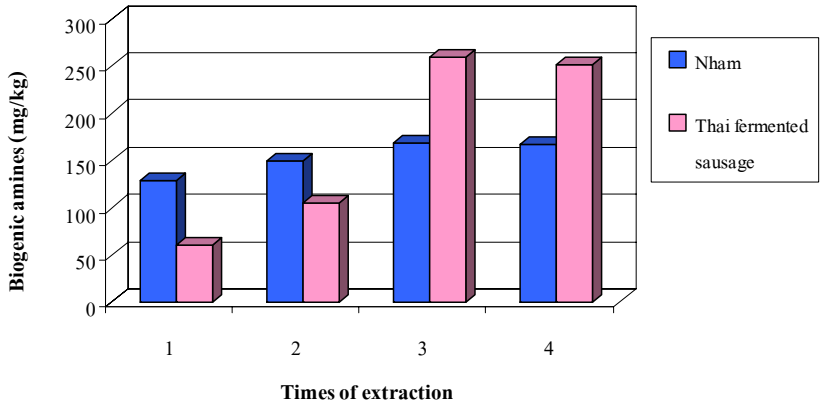
รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานสารประกอบเอมีน ได้แก่ putrescine cadaverine และ histamine ในช่วงความเข้มข้น 0 – 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยาEnzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร



รูปที่ 2 ผลของชนิดของสารละลายสกัดต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่สกัดได้จากแหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว



รูปที่ 3 ผลของอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักอาหารหมักกับปริมาตรของสารละลายสกัดต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่สกัดได้จากแหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว



รูปที่ 4 ผลของจำนวนครั้งที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบเอมีนจากแหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว

จากการสกัดสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างแหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว พบว่า มีค่าการสกัด putrescine เท่ากับ 72.63 และ 76.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเลือกใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐานชนิด putrescine เป็นตัวแทนของสารประกอบเอมีนชนิดอื่นๆ ก็เนื่องจากเป็นสารประกอบเอมีนชนิดที่พบได้มากใน

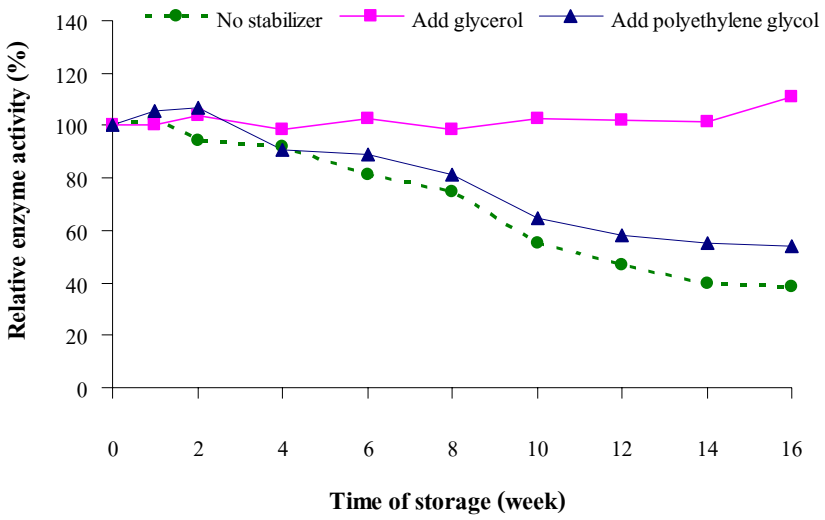
อาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์ พบว่า ตัวอย่างแหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว มีปริมาณสารประกอบเอมีน เท่ากับ 340.70 และ 267.21 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งจากงานวิจัยของ Limsuwan (2004) ที่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนในแหนมที่หมักโดยไม่ใช้กล้าเชื้อ ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่า มีปริมาณสารประกอบเอมีนชนิด putrescine cadaverine และ tyramine รวมทั้งหมด 383.89 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของตัวอย่างแห้ง ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับผลการทดลองที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างแหนมหมู ด้วยวิธี Enzyme coupling assay ในการศึกษานี้

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การสกัด (% recovery) และปริมาณสารประกอบเอมีนในแหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว

ตัวอย่าง	% Recovery	Biogenic amines (mg/kg)
แหนมหมู	72.63 ± 0.64	340.70 ± 16.27
ไส้กรอกเปรี้ยว	76.49 ± 0.32	267.21 ± 14.00

<u>หมายเหตุ</u> : ผลการทดลองเท่ากับ Mean ± SD, n = 2

Good Manufacturing Practice (GMP) ได้กำหนดปริมาณของ histamine, tyramine และ ß-phenyethylamine ในระดับที่ยอมรับได้ไว้ที่ 50-100, 100-800 และ 30 ppm ตามลำดับ หรือปริมาณสารประกอบ เอมีนทั้งหมดกำหนดไว้ที่ 100-200 ppm (Nout, 1994) ดังนั้นจากปริมาณสารประกอบเอมีนที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่าง แหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว จึงไม่ผ่านมาตรฐานของ GMP ซึ่งแสดงว่าเสี่ยงต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค แต่ในงานวิจัยของ Taylor (1985) ได้กำหนดปริมาณของสารประกอบเอมีนทั้งหมดที่ตรวจพบในอาหาร ไว้ว่าไม่ควรเกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นระดับที่คำนวณโดยมีพื้นฐานมาจากการเกิดอาการโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งถ้ายึดข้อกำหนดนี้จะพบว่า ตัวอย่าง แหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว มีปริมาณสารประกอบเอมีนไม่เกินที่กำหนด ดังนั้น การบริโภคตัวอย่างอาหารหมักดองเหล่านี้จึงไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค จากการศึกษาผลของการเก็บรักษา และการใช้ Stabilizer ต่อเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์ พบว่าภายหลัง 16 สัปดาห์ น้ำยาตรวจวิเคราะห์ที่ไม่มีการเติม Stabilizer และน้ำยาชนิดที่เติมโพลีเอทีลีนไกลคอล มีกิจกรรมของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาลดลงมาก โดยน้ำยาตรวจวิเคราะห์ชนิดที่ไม่มีการเติม Stabilizer และที่เติมโพลีเอทีลีนไกลคอลมีอายุการเก็บประมาณ 6 และ 8 สัปดาห์ตามลำดับ มีอายุการเก็บประมาณ 8 สัปดาห์ซึ่งสามารถยืดอายุการเก็บได้เพียง 2 สัปดาห์เท่านั้น โดยโพลีเอทีลีนไกลคอล ได้มีรายงานว่าสามารถใช้เป็น พลาสติไซเซอร์ สารปรับความนุ่ม สารปรับความชุ่มชื้น สารหล่อลื่น วัสดุเคลือบกระดาษ เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง และยา เป็นตัวทำละลาย และเป็นแอดดิทีฟในอาหาร (Joo และคณะ 1996) ในขณะที่การเติมกลีเซอรอลช่วยรักษาเสถียรภาพเอนไซม์ ดังแสดงในภาพที่ 5 ดังนั้นการเติมกลีเซอรอลสามารถยืดอายุการเก็บอย่างน้อยที่สุด 16 สัปดาห์ เนื่องจากกลีเซอรอลช่วยรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ และช่วยยังยั้งโปรติเอส นอกจากนี้ยังป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่อาจส่งผลให้น้ำยาเสื่อมสภาพลงได้ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วกลีเซอรอลถูกใช้เป็นสารที่เติมในขั้นตอนของการเตรียมเอนไซม์ เพื่อช่วยป้องกันการเกิดการเสียสภาพ (denature) ของโปรตีนระหว่างเกิดการแข็งตัวและการละลาย (Buss และ Stalter, 1978)



รูปที่ 5 ผลของการเก็บรักษาและการใช้ Stabilizer ต่อเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน

สรุปผลการทดลอง

การตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมัก โดยใช้วิธี Enzyme coupling assay ระหว่างเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสและเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล สามารถนำไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบเอมีนในอาหารหมักได้ในช่วงความเข้มข้น 0 – 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองการสกัดพบว่า การสกัดสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างแหนม และไส้กรอกเปรี้ยว ด้วยกรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 3 โมลาร์ โดยใช้อัตราส่วนของน้ำหนักตัวอย่าง 1 ส่วนต่อปริมาตรสารละลายสกัด 2 ส่วนและสกัดทั้งหมด 3 ครั้ง สามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกมาได้มากที่สุด โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การสกัดเท่ากับ 72.63 และ 76.49 ตามลำดับ และมีปริมาณสารประกอบเอมีนเท่ากับ 340.70 และ 267.21 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ การเก็บรักษาสารละลายปฏิกิริยา โดยการเติมกลีเซอรอลสามารถยืดอายุการเก็บรักษาของน้ำยาได้ดี โดยมีอายุการเก็บอย่างน้อยที่สุด 16 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารอ้างอิง

Anli, R. E., N. Vural, S. Yilmaz and Y. H. Vural. 2004. The determination of biogenic amines in Turkish red wines. J. Food Compos. Anal. 17: 53-62.

Ansorena, D., M.C. Montel, M. Rokka, R. Talon, S. Eerola, A. Rizzo, M. Raemaekersd and D. Demeyerd.2002. Analysis of biogenic amines in northern and southern European sausages and role of flora in amine production. Meat Science. 61: 141–147.

Aygün, O., E. Schneider, R. Scheuer, E. Usleber, M. Gareis and E. Märtlbauer. 1999. Comparison of ELISA and HPLC for the determination of histamine in cheese. J. Agric. Food Chem. 47: 1961-1964.

Badolo, L., V. Berlaimont, M. H. Cambier, M. Hanocq and J. Dubois. 1999. Simple and rapid enzymatic assay of ornithine decarboxylase activity. Talanta. 48: 127–134.

Buss, W.C. and K. Stalter. 1978. Stimulation of eukaryotic transcription by glycerol and polyhydroxylic compounds. Biochemistry. 17 (22): 4825-4832.

Coïsson, J. D., C. Cerutti, F. Travaglia and M. Arlorio. 2004. Production of biogenic amines in Salamini italiani alla cacciatore PDO. Meat Science. 67: 343-349.

Joo, H., Y.J. Yoo and Dewey D. Y. Ryut. 1996. A biosensor stabilized by polyethylene glycol for the monitoring of hydrogen peroxide in organic solvent media. Enzyme and Microbial Technology. 19: 50-56.

Latorre-Moratalla, M.L., T. Veciana-Nogués, V. Bover-Cid, V. Garriga, T. Aymerich, E. Zanardi, A. Ianieri, M.J. Fraqueza, L. Patarata, E.H. Drosinos, A. Laukováh, R. Talon and M.C. Vidal-Carou. 2008, Biogenic amines in traditional fermented sausages produced in selected European countries. Food Chemistry. 107: 912–921.

Limsuwan, S. 2004. Effect of starter cultures and temperatures on evolution of biogenic amines in nham during fermentation and storage, A Thesis of Master of Science Division of Biochemical Technology School of Bioresources and Technology King Mongkut's University of Technology Thonburi.

Loret, S., P. Deloyer and G. Dandrifosse. 2005. Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: Data from Belgian samples. Food Chem. 89: 519-525.

Martuscelli, M., F. Gadini, S. Torriani, D. Mastrocola, A. Serio, C. C. López, M. Schirone and G. Suzzi. 2005. Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. Int. Dairy J. 15: 571-578.

Nout, M.J.R. 1994. Fermented foods and food safety. Food Res. Int. 27: 291.

Ohsawa, N., Y. Ogata, N. Okada and N. Itoh. 2001. Physiological function of bromoperoxidase in the red marine alga, Corallina pilulifera: production of bromoform as an allelochemical and the simultaneous elimination of hydrogen peroxide. Phytochemistry 58: 683-692.

Shalaby, A. R. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. Food Res. Int. 29 (7): 675-690.

Taylor, S.L. 1985. Histamine poisoning associated with fish, cheese and other foods. World Health Organization. 1: 1-47.