บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

อาหารหมักดองจัดเป็นอาหารที่ผ่านการแปรรูปชนิดหนึ่ง ซึ่งได้รับความนิยมอย่างมากจากผู้บริโภค โดยเฉพาะอาหารหมักดองพื้นบ้านของไทยที่มีความหลากหลายในเรื่องของรสชาติ สี กลิ่น และอาหารหมักดองยังมีเอกลักษณ์เฉพาะตัว อาหารหมักดองเป็นที่นิยมของผู้บริโภคมาก เนื่องจากมีกลิ่นและรสชาติที่ดี ดังนั้นอาหารหมักดองจึงเป็นผลิตภัณฑ์ที่ถูกผลิตขึ้นเป็นปริมาณมากในแต่ละปี การหมักโดยอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ โดยไม่มีการควบคุมกระบวนการหมักที่ถูกต้องเหมาะสม ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นโทษต่อร่างกาย รวมทั้งนำไปสู่การสะสมของสารประกอบที่เป็นพิษเมื่อได้รับจากการบริโภคในปริมาณที่มากเกินพอจะทำให้เกิดโทษต่อร่างกาย นั่นก็คือสารประกอบเอมีน โดยสารประกอบเอมีนที่มีความสำคัญและพบได้มากในอาหาร ได้แก่ histamine putrescine cadaverine tyramine tryptamine β-phenylethylamine spermine และ spermidine (Shalaby, 1996)

งานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนด้วยเทคนิคต่าง ๆ กัน แต่เทคนิคที่ใช้กันส่วนใหญ่ ได้แก่ วิธี HPLC (high performance liquid chromatography) ซึ่งมีข้อดีคือสามารถตรวจวัดปริมาณตัวอย่างที่มีน้อยได้ และต้องการตัวอย่างที่มีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งเทคนิคนี้ได้ใช้ตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมักดอง เช่น เนย ไส้กรอก ไวน์ และเบียร์ เป็นต้น อีกเทคนิคที่นิยมใช้ตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมักดองคือ วิธี thin layer chromatography (TLC) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ไวต่อปริมาณตัวอย่างที่มีน้อย แต่ก็ยังมีข้อด้อยคือ ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน และเกิดผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการซึ่งต้องทำการกำจัดโดยการทำ pre-chromatography บน silica gel column เทคนิคนี้ใช้ตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมักดอง เช่น ผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากปลา ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเนื้อหมูหรือวัว เป็นต้น และอีกเทคนิคคือ enzyme-linked immunosorbent assay system (ELISA) ซึ่งมีข้อดีคือ มีความจำเพาะสูง วัดได้รวดเร็ว แต่จะมีข้อด้อยคือ ต้องใช้ antibody ดังนั้นจึงต้องมีการสกัด antibody จากซีรัมของสัตว์ทดลองจึงจำเป็นต้องมีห้องทดลองที่เฉพาะเพื่อป้องกันการปนเปื้อนและเอนไซม์ที่นำมาใช้ต้องมีความจำเพาะกับ antibody หรือ antigen เพื่อใช้ในการติดฉลาก ซึ่งวิธีนี้ใช้ตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมักดอง เช่น เนย และปลาหมัก เป็นต้น

การตรวจวิเคราะห์โดยวิธีการดังกล่าวมีความยุ่งยาก ต้นทุนสูง และบางกรณีมีความคลาดเคลื่อนสูง เนื่องจากเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ และเครื่องมือ ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้จะได้พัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ที่มีความสะดวก รวดเร็ว และราคาประหยัด โดยใช้น้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์เพื่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ขึ้นเพื่อนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบต่างๆ เช่นน้ำตาลกลูโคส คอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ เป็นต้น ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทั้งในห้องปฏิบัติการและในภาคสนาม เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดสูง มีความแม่นยำ มีความรวดเร็วและมีราคาไม่แพง จึงทำให้มีการนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ การโภชนาการและสาธารณสุขในด้านต่างๆเป็นอย่างมาก

ชุดน้ำยาตรวจวิเคราะห์มีทั้งในรูปบรรจุเป็นผงแห้ง (lyophilized form) และสารละลาย (liquid) ซึ่งอาจมีสารเพิ่มความเสถียรและเพิ่มการเร่งปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มอายุการใช้งานและความไวในการตรวจวัด นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาให้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้บนแผ่นสตริป (strip) ซึ่งทำให้ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความสะดวกและรวดเร็วยิ่งขึ้น ในปัจจุบันยังไม่มีน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปสำหรับการตรวจสารประกอบเอมีนในผลิตภัณฑ์อาหารหมักทั้งในรูปของผงแห้ง สารละลาย และแผ่นสตริป การตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนนิยมใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง อย่างไรก็ดีวิธีการดังกล่าวมีความยุ่งยาก ใช้เวลานานและราคาแพงต้องใช้ผู้มีความชำนาญเฉพาะในการตรวจวิเคราะห์ และส่วนใหญ่จะใช้ในการตรวจวิเคราะห์ในการศึกษาวิจัย ดังนั้นการพัฒนาการตรวจวัดโดยน้ำยาสำเร็จรูปจะทำให้มีความสะดวกและรวดเร็วต่อการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนอันจะส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ได้มาตรฐานและถูกสุขลักษณะ

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะได้พัฒนาน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนโดยวิธี enzymatic method โดยคัดเลือกเอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่เหมาะสมจากพืชพื้นบ้านมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ โดยแหล่งของเอมีนออกซิเดสของพืช มีอยู่ในส่วนต่าง ๆ เช่น ใบ เมล็ดที่กำลังงอก ยาง ต้นอ่อน ใบเลี้ยงที่กำลังงอก และ ยอด

เอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่พบจากใบ ได้แก่ *Onobrychis viciifolia* (ต้นกก) *Trifolium subterraneum*(clover) *Vicia faba* (horse bean) *Thea sinesis* (ชาเขียว) *Avena sativa* (ข้าวโอ๊ต) และ *Hordeum vulgare* (ข้าวบาร์เลย์) เป็นต้น

ส่วนเอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่พบในเมล็ดที่กำลังงอก ได้แก่ *Cicer arietinum* (chickpea) *Glycine max* (ถั่วเหลือง) *Lathyrus cicera* (red vetching) *Lathyrus sativus* (chickling) *Lens esculenta* *Lupinus luteus* (yellow lupin) *Phaseolus vulgaris* (ถั่วฝักยาว) *Pisum sativum* (ถั่วลันเตา) *Vicia faba* (horse bean) *Hordeum vulgare* (ข้าวบาร์เลย์) และ *Zea mays* (ข้าวโพด)

ในส่วนของยางได้แก่ *Euphorbia characias* ต้นอ่อน เช่น *Pisum sativum* (ถั่วลันเตา) และ *Oryza sativa* (ข้าว) ใบเลี้ยงกำลังงอกเช่น *Pisum sativum* (ถั่วลันเตา) ส่วนยอด (shoot) เช่น *Zea mays* (ข้าวโพด)

เอนไซม์เอมีนออกซิเดส สามารถพบได้บริเวณ membranes และ cell walls ของใบ ในรากพบได้ที่ xylem ส่วน cotyledons พบเอมีนออกซิเดสได้ที่ plasma membranes (Medda และคณะ,1995; Rosaria และคณะ, 1995)

ในการศึกษาวิจัยได้ทำการเตรียมเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากพืชพื้นบ้านไทยมาใช้ทำปฏิกิริยาร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยอาศัยหลักการที่เอนไซม์เอมีนออกซิเดส (amine oxidase) ย่อยสารประกอบเอมีนในตัวอย่างอาหาร และได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องกับเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส (bromoperoxidase) ที่ได้จากสาหร่ายทะเล โดยทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันพวกเฮไลด์ - ไอออน (Br^- และ I^-) ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ได้จากขั้นตอนแรก (Ohsawa และคณะ, 2001) ทำให้เกิดสีตามความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น และนำไปหาปริมาณของสารประกอบเอมีนในตัวอย่างอาหาร โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากพืชพื้นบ้านสามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบเอมีนหลายชนิดทั้งโมโนเอมีน (monoamine) และไดเอมีน (diamine) ซึ่งจะสามารถตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนได้มากกว่าไดเอมีนออกซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีจำหน่ายในทางการค้าที่มีอยู่ในปัจจุบันซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาได้กับสารประกอบไดเอมีนบางชนิด ดังนั้นจึงเป็นการลดต้นทุนของสารละลายปฏิกิริยาจากการใช้เอนไซม์จากต่างประเทศ และเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบดังกล่าวโดยใช้แหล่งเอนไซม์ที่มีอยู่ในประเทศมาพัฒนาให้มีประสิทธิภาพ และมีความถูกต้องแม่นยำสูง

ในงานวิจัยจะได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจวัดโดยการใช้สารยับยั้งการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เมื่อจะทำการตรวจวัดโดยปฏิกิริยา end point determination เพื่อเพิ่มความแม่นยำ และพัฒนาการตรวจวัดโดย kinetic reaction determination และนอกจากนี้ได้ทำการพัฒนาการผลิตน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปทั้งแบบสารละลาย และแบบผงแห้ง ซึ่งสามารถทำการตรวจวัดสาร

ตัวอย่างในภาคสนามได้อย่างรวดเร็ว โดยมีความถูกต้องแม่นยำ มีความเสถียรในการตรวจวัดและการเก็บรักษา

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาการสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดองพื้นบ้านของไทยชนิดต่าง ๆ
2. เพื่อพัฒนาการนำเอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่สกัดได้จากถั่วเหลืองมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมักดองร่วมกับเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสที่สกัดจากสาหร่ายทะเล
3. เพื่อพัฒนาน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปที่มีประสิทธิภาพ สำหรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมักดอง

1.3 แนวทางการดำเนินงานวิจัย

1. สกัดเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง แล้วนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล ในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมักดอง
2. พัฒนาการสกัดสารประกอบเอมีนจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองพื้นบ้านของไทย ได้แก่ แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ข้าวหมาก ปลาร้า และหอยดอง
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาของเอมีนออกซิเดส และโบรโมเปอร์ออกซิเดสในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนมาตรฐาน และสารประกอบเอมีนในอาหารหมักดอง ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay เพื่อเตรียมเป็นน้ำยาวิเคราะห์สำเร็จรูป
4. ศึกษาความเสถียรของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปต่ออายุการเก็บรักษา และการใช้ stabilizer ได้แก่ กลีเซอรอล และโพลีเอทีลีน ไกลคอล เป็นเวลา 1-6 เดือน
5. ตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมักดองประเภทต่างๆ ได้แก่ อาหารหมักดองประเภทเนื้อสัตว์ นมและผลิตภัณฑ์นม ผัก และเครื่องดื่ม โดยใช้น้ำยาตรวจวิเคราะห์-สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถช่วยลดต้นทุนของสารละลายปฏิกิริยาจากการใช้เอนไซม์จากต่างประเทศ และเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนโดยใช้แหล่งเอนไซม์ที่มีอยู่ในประเทศมาพัฒนาให้มีประสิทธิภาพ และมีความถูกต้องแม่นยำสูง
2. สามารถผลิตน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปชนิดสารละลาย และชนิดผงแห้ง เพื่อใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์หาสารประกอบเอมีนในอาหารหมักดองได้อย่างมีประสิทธิภาพ
3. สามารถเพิ่มอายุการเก็บรักษาของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป
4. ทำให้ทราบปริมาณของสารประกอบเอมีนที่พบในอาหารหมักดองพื้นบ้านของไทยชนิดต่างๆ ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงได้

บทที่ 2
ทฤษฎี

2.1 อาหารหมักดอง

อาหารหมักดองเป็นอาหารที่ผ่านกระบวนการหมัก (fermentation) หรือการดอง (pickling) ซึ่งกระบวนการหมักดองเป็นกระบวนการแปรรูปโดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปรับสภาวะของอาหารให้เหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการ แต่ไม่เหมาะสมกับการเจริญและเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ชนิดที่เป็นอันตรายและชนิดที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย อีกทั้งยังทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสหรือลักษณะที่ต้องการ

การหมัก หมายถึง การถนอมอาหารโดยอาศัยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์บางชนิดเป็นตัวช่วยในการย่อยสลาย หรือเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ อาจเติมเกลือหรือไม่ก็ได้และอาจเติมส่วนประกอบอย่างอื่น เช่น ข้าวคั่วเพื่อเสริมให้จุลินทรีย์มีบทบาทในการหมักเพื่อเสริมให้จุลินทรีย์มีบทบาทในการหมัก เช่น น้ำปลา ปลาร้า ปลาเจ่าหม่ำ ไส้กรอกเปรี้ยว เค็มหมักนัด ข้าวหมาก อุ (น้ำเมาหมักจากข้าว) ผักกาดดอง และหน่อไม้ดอง เป็นต้น

การดอง หมายถึง การถนอมอาหารในน้ำเกลือและมีน้ำส้มเล็กน้อย อาจเติมเครื่องเทศ น้ำตาล หรือน้ำมัน ซึ่งการดองอาจอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ ถ้าดองในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นต่ำ เช่น แตงกวาดอง กระเทียมดอง ขิงดอง เป็นต้น หรืออาจไม่ต้องอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งมักใช้กับผลไม้ที่มีความเป็นกรดสูง และใช้น้ำเกลือที่เค็มจัด เช่น มะม่วงดอง เป็นต้น (บุหลัน พิทักษ์ผล และทัสนี สรสุชาติ, 2543)

2.1.1 ประเภทของอาหารหมักดอง

อาหารหมักดองสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ประเภท คือ (บุหลัน พิทักษ์ผล, 2551)

2.1.1.1 อาหารหมักดองประเภทเนื้อสัตว์

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองประเภทเนื้อสัตว์ของไทยมีด้วยกันหลายกลุ่ม ได้แก่ ผลิตภัณฑ์จากเนื้อหมู ผลิตภัณฑ์จากเนื้อวัวหรือเนื้อควาย และผลิตภัณฑ์จากสัตว์น้ำ

1. ผลิตภัณฑ์จากเนื้อหมู เช่น แหนม (หมูส้ม) ไส้กรอกเปรี้ยว (ไส้กรอกอีสาน) หนางหมู ส้มหูหมู เป็นต้น ซึ่งผลิตภัณฑ์แต่ละอย่างถึงแม้ว่าจะเป็นอาหารชนิดเดียวกันอาจจะมีชื่อเรียก ส่วนประกอบ หรือเครื่องปรุง รวมทั้งปริมาณสัดส่วนของวัตถุดิบที่ใช้ที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละท้องถิ่น แต่โดยรวมแล้วมีหลักการในการทำคล้ายคลึงกัน

2. ผลิตภัณฑ์จากเนื้อวัวหรือเนื้อควาย เช่น หม่ำ (มั่ม) แหนมเนื้อ ไส้กรอกเนื้อ หนางเนื้อ หนางหัววัว ส้มตีนวัว หนังเค็ม เป็นต้น อาหารหมักที่ทำจากเนื้อวัว หรือเนื้อควายส่วนมากจะเป็นอาหารที่ทำในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นอกจาก "หนางเนื้อ" ซึ่งเป็นอาหารหมักที่ทำกันในภาคใต้ การทำแหนมเนื้อก็เช่นเดียวกับแหนมหมูแต่ไม่ใช้หนัง

3. ผลิตภัณฑ์จากสัตว์น้ำ มีกรรมวิธีในการหมักที่แตกต่างกันหลายอย่าง ซึ่งพอจะแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ

ประเภทที่ 1 การหมักที่ใช้เกลือมากหรือเค็มจัด ผลิตภัณฑ์ที่รู้จักกันแพร่หลาย คือ น้ำปล านำ้บูดู กะปิ ไตปลาดอง ปลาทูเค็ม ปูเค็ม เป็นต้น ซึ่งกรรมวิธีในการหมักและปริมาณเกลือที่ใช้แตกต่างกันตามวัตถุดิบ และผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

ประเภทที่ 2 การหมักที่ใช้เกลือ และมีข้าวหรือแป้งเป็นส่วนประกอบ ผลิตภัณฑ์ประเภทนี้ที่รู้จักกันแพร่หลาย คือ ปลาร้า ปลาจ่อม กุ้งจ่อม ปลาเจ่า ปลาส้ม ไข่ปลาดอง ปลาแป้งแดง ส้มฟัก ปลาที่ใช้ในการทำผลิตภัณฑ์ประเภทนี้ส่วนมากจะเป็นปลาน้ำจืดและเป็นปลาที่มีขนาดเล็ก ข้าวหรือแป้งที่ใช้แล้วแต่ชนิดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

ประเภทที่ 3 การหมักที่ใช้เกลือ และมีผักหรือผลไม้เป็นส่วนประกอบ อาหารหมักประเภทนี้ไม่ค่อยแพร่หลายนิยมรับประทานกันเฉพาะในบางท้องถิ่น เช่น เค็มหมักนัด (หรือเค็มสับปะรด) ซึ่งนิยมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ปลาหมักผสมกับสับปะรด และปลาหม่ำเป็นผลิตภัณฑ์อีกชนิดหนึ่งที่ใช้ปลาผสมกับเกลือ ข้าวคั่ว มะละกอ และข่าแก่

2.1.1.2 อาหารหมักดองประเภทผักและผลไม้ดอง

ผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดอง ได้จากการหมักวัตถุดิบในน้ำเกลือความเข้มข้นประมาณ 2.5 – 6 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับผลิตผลทางการเกษตรมีการสร้างกรดแลคติก จนได้ความเข้มข้นของกรดแลคติกภายหลังกระบวนการหมักประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดองมีทั้งแบบเค็ม แบบเปรี้ยว และแบบหวาน เช่น มะขามดอง มะม่วงดอง ฝรั่งดอง และมะกอกดอง

เป็นต้น ในประเทศไทยผักดองในลักษณะนี้ซึ่งเป็นที่รู้จักกันทั่วไป ได้แก่ ผักเสี้ยนดอง หน่อไม้ดอง หอมดอง และผักกาดดอง เป็นต้น นอกจากผลิตภัณฑ์จากผักและผลไม้ดองแล้วผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองจากธัญพืชก็มีหลายชนิด เช่น เต้าเจี้ยว และซีอิ๊วขาว เป็นต้น

2.1.1.3 อาหารหมักประเภทเครื่องดื่ม

ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มมีหลายชนิด ตัวอย่างเช่น ไวน์ สาเก กระแช่ สาโท บรั่นดี และวิสกี้ หรืออาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว เช่น ข้าวหมาก โดยยีสต์จะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทธิลแอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นพิษกับจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ยังหลงเหลืออยู่ในอาหาร ทำให้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนหรือทำให้ผลิตภัณฑ์เน่าเสีย

ไวน์ (wine) หรือเหล้าองุ่น คือ น้ำองุ่นที่นำมาหมักด้วยเชื้อยีสต์ ซึ่งจะเปลี่ยนน้ำตาลในองุ่นไปเป็นแอลกอฮอล์ ไวน์สามารถทำได้จากการหมักน้ำผลไม้เกือบทุกชนิด แต่จะให้กลิ่นและรสชาติที่แตกต่างกัน เช่น ไวน์หม่อน ไวน์มะยม ไวน์กล้วย ไวน์กระท้อน ไวน์สับปะรด ไวน์กระเจี๊ยบ ไวน์ลิ้นจี่ ไวน์เชอรี่ ไวน์แอปเปิ้ล และไวน์พลัม เป็นต้น (ขวัญแก้ว วัชโรทัย, 2539)

2.1.1.4 อาหารหมักประเภทผลิตภัณฑ์นม

ผลิตภัณฑ์นม เช่น โยเกิร์ต เนยแข็ง นมเปรี้ยว เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างกรดแลคติกทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสในนมให้เป็นกรดแลคติก ทำให้อาหารมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ซึ่งจะยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ส่งผลให้สามารถเก็บผลิตภัณฑ์ได้เป็นเวลานาน

โยเกิร์ต คือ ผลิตภัณฑ์ที่หมักจากนมวัว ซึ่งเกิดจาการหมักด้วยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์จำเพาะกลุ่ม แลคโตบาซิลลัส และสเตรปโตคอกคัส มีลักษณะจับตัวกันเป็นลิ่ม การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกเพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น โดยใช้เกณฑ์จากอัตราการผลิตกรด ความสามารถในการผลิตสาร โพลีแซคคาไรด์ ลักษณะการย่อยโปรตีน (เนื่องจากอาจทำให้เกิดสารเปปไทด์ที่มีรสขม) การผลิตสารให้กลิ่น การเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ เช่น วิตามิน และให้ผลดีต่อสุขภาพ (ปิ่นมณี ขวัญเมือง , 2546)

2.1.2 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์ผสมในปัจจุบันมีเพียงไม่กี่สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียที่สำคัญ เช่น แบคทีเรียแลคติก ในนมเปรี้ยว แหนม เชื้อยีสต์ที่สำคัญ เช่น ยีสต์ขนมปัง ยีสต์ทำไวน์ เบียร์ และเชื้อราที่สำคัญ เช่น ราทำซีอิ้ว เต้าเจี้ยว โดยเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้มีอยู่ทั่วไปในอากาศ ดิน น้ำ และอาจปนเปื้อนเข้ามาในวัตถุดิบ เช่น ผัก เนื้อ แป้ง เนย และในวัตถุดิบอื่นๆ ซึ่งเอนไซม์จากจุลินทรีย์ต่างๆ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบหลักของอาหาร โดยเอนไซม์ชนิดที่ย่อยโปรตีน จะเปลี่ยนโปรตีนที่อยู่ในวัตถุดิบไปเป็นเปปไทด์ และกรดอะมิโน เอนไซม์ชนิดที่ย่อยไขมันจะเปลี่ยนไขมันที่อยู่ในวัตถุดิบไปเป็นกรดอะมิโน และกลีเซอรอล และเอนไซม์ชนิดที่ย่อยคาร์โบไฮเดรต จะเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในวัตถุดิบไปเป็น กรดอินทรีย์ และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งสารต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นเหล่านี้มีบทบาททำให้สี กลิ่น รส และเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์แตกต่างกันไป นำไปสู่ความหลากหลายของผลิตภัณฑ์อาหารหมัก (ไบโอเทค Thailand, 2547) จะเห็นได้ว่าขบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทีย์เหล่านี้เป็นกระบวนการย่อยสลาย (catabolic process) คือจุลินทรีย์จะใช้สารประกอบอินทรีย์ในอาหารเป็นพลังงานเพื่อการเจริญเติบโต กระบวนการเหล่านี้ค่อนข้างจะซับซ้อนขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในแต่ละกระบวนการ (อรพิน ภูมิภมร, 2526) ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญต่อการหมักผลิตภัณฑ์ผสมจะเป็นแบคทีเรียชนิดที่ผลิตกรดแลคติค และกรดอะซีติค ยีสต์ชนิดที่ผลิตแอลกอฮอล์ และเชื้อราชนิดที่ผลิตเอนไซม์

2.1.2.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมัก ที่พบทั่วไปในธรรมชาติและพบมากในน้ำนม เนื้อสด ส่วนในพืชพบบ้างเล็กน้อย แบคทีเรียแลคติกนอกจากจะมีบทบาทในการแปรรูปอาหารหมักดองแล้วยังมีผลในการยับยั้งการเจริญ และทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียรวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค ในปัจจุบันผู้บริโภคเอาใจใส่ต่อสุขภาพมากขึ้น และพยายามหลีกเลี่ยงการใช้สารในการถนอมอาหาร ทำให้มีความสนใจในการนำสารมายับยั้งจากธรรมชาติมาใช้เป็นสารกันเสียอาหาร (Larsen et al., 1993; Nettle และ Barfoot, 1993)

แบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมาจากผลิตผลทางการเกษตร และเครื่องมือที่เกี่ยวข้องกับทางการเกษตร ปัจจุบันได้มีการพัฒนาถึงการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตอาหารหมักหลากหลายชนิด เช่น ไส้กรอกหมัก ผลิตภัณฑ์นมหมักจากเทคนิคการผลิตกล้าเชื้อจุลินทรีย์ มีผลทำให้เกิดการพัฒนากระบวนการหมักผลิตภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ โดยการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อให้มีลักษณะที่ดี แบคทีเรียแลคติกมีบทบาทที่สำคัญมากเพราะกิจกรรมหลัก

ของแบคทีเรียแลคติกต่อผลิตภันฑ์อาหาร คือ เปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตในส่วนของอาหารให้เป็นน้ำตาล นอกจากนี้ยังมีสารชนิดหนึ่งที่ต่อต้านสารจุลินทรีย์ เช่น แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

แบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ สารประกอบที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมีดังนี้

1. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นได้ โดยแบคทีเรียแลคติสามารถทำปฏิกิริยากับ endogenous thiocyanate ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดย lactoperoxidase เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ Intermediary oxidation ซึ่งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ สามารถนำไปใช้ในการเก็บรักษานมสดได้โดยไม่ต้องแช่ตู้เย็น

2. Diacety(2,3 -butanedione)เป็นผลจากการย่อยสารอาหารจากแบคทีเรียแลคติกบางสปีชีส์ เป็นสารให้กลิ่นในผลิตภัณฑ์นมหมัก และยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ แต่ต้องใช้ในปริมาณมาก และทำให้มีกลิ่นรบกวน

3. Reuterin เป็นสารที่มีโมเลกุลต่ำที่ไม่ใช้โปรตีนและสามารถละลายน้ำได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เช่น ยีสต์ รา รวมทั้งโปรโตซัว จึงสามารถนำไปใช้ในการถนอมอาหารเพื่อเพิ่มจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และทำให้อาหารเน่าเสีย

4. Microgard สามารถต่อต้านแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรา แต่ไม่ต่อต้านแบคทีเรียแกรมบวก ประกอบด้วย กรดโพรพิโอนิก ไดอะซิติล กรดอะซิติด และกรดแลคติก

5. แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) เป็นสารที่มีผลในการยับยั้งในช่วงแคบ เป็นแบคทีเรียที่ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียในจีนัสเดียวกัน และยับยั้งในช่วงกว้าง เป็นแบคทีเรียที่มีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (Dasechel, 1989)

แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria, LAB) ถูกนำมาใช้ในการเตรียมและถนอมอาหารมาเป็นเวลานาน และเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่ามีความปลอดภัย (generally recognized as safe; GPRS) โดยได้นำแบคทีเรียแลคติกไปใช้ในการผลิตอาหารหมักจากผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์สัตว์ เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ผลิตภัณฑ์ปลา เช่น ปลาร้า ปลาส้ม ผลิตภัณฑ์ผักและผลิตภัณฑ์ผลไม้ดอง เช่น ผักกาดดอง ผลิตภัณฑ์นม เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต และนอกจากนี้มีการทำ

หญ้าหมัก เพื่อให้ได้คุณภาพดี มีคุณค่าสูง เหมาะกับการเลี้ยงสัตว์ ตัวอย่างแบคทีเรียแลคติกที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง ได้แก่

แบคทีเรียแลคติกที่เกี่ยวข้องกับการหมักแหนม ได้แก่ *Lactobacillus sp.* และ *Pediococcus sp.* ซึ่งเป็นเชื้อที่ใช้ในทางการค้าของผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก (Swetwiwthana และคณะ, 2003) แบคทีเรียที่พบในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก ได้แก่ *Lactobacillus farcimnis L.pentosu L.plantaru Lactobacillus sp.และ Leuconostos sp.* ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีต้องทนเกลือได้ดี และเจริญได้เล็กน้อยในระหว่างการหมัก จึงจะมีการช่วยเสริมรสชาติของการหมักได้เป็นอย่างดี (Tanasupawat และคณะ, 1998) เชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโยเกิร์ต ได้แก่ *Streptococcus salivayius* subsp. *Thermophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Guzel-seydim และคณะ, 2000; Beshkova และคณะ, 2002)

2.1.2.2 ยีสต์

ชนิดของยีสต์ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมหมักนั้นอยู่ใน Class *Ascomycetes* โดยจีนัสที่สำคัญ คือ

1. จีนัส S*accharomyces* ยีสต์ในจีนัสนี้มีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคส แมนโนส และน้ำตาลชนิดอื่น ๆ อีก

2. จีนัส *Pichia* และ *Hansenula* ยีสต์ในสองจีนัสนี้เป็นที่รู้กันว่าทำให้ alcoholic liquors เสื่อมเสีย

3. จีนัส *Candida* ยีสต์ในจีนัสนี้ที่สำคัญต่ออุตสาหกรรมหมักคือ Candida utilis เป็นที่รู้จักกันว่าเป็น food yeast เป็นยีสต์ที่มีส่วนประกอบโปรตีนอยู่สูง และไวตามินบี มีความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคส แซคคาโรส ราฟฟิโนส และยังใช้ในเตรทได้ด้วย

2.1.2.3 รา

เชื้อราที่มีความสำคัญต่ออาหารนั้นมีอยู่ 2 Class คือ

1. Class *Phycomycetes* เชื้อราที่อยู่ในชั้นนี้ที่เกี่ยวข้องกับอาหาร เป็นเชื้อราที่มีส้นใย ไม่มีผนังกั้น (non – septate mycelium)

2. Class *Fungi Imperfect* ลักษณะของเชื้อราในชั้นนี้คือ ผนังของเส้นใยจะไม่มีผนังกั้น

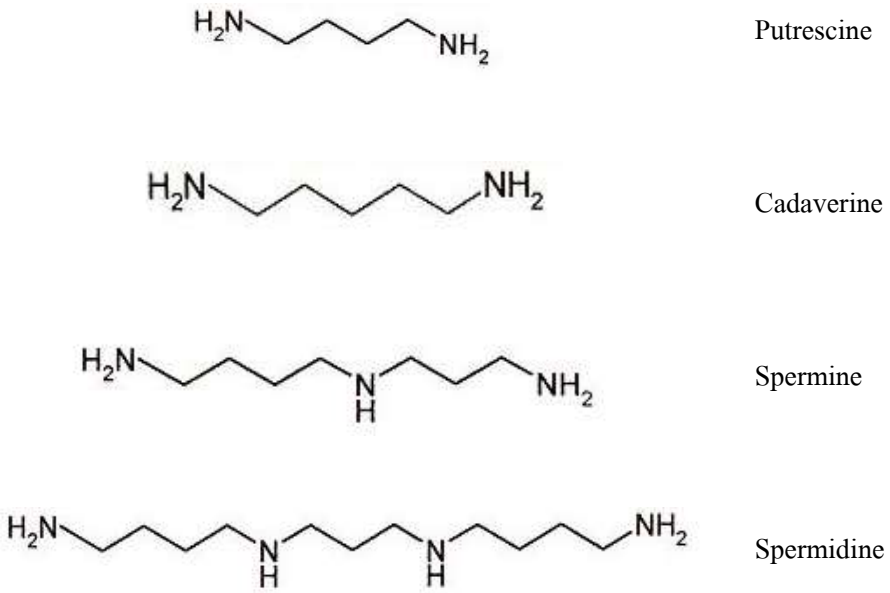
2.2 สารประกอบเอมีน (Biogenic amines)

สารประกอบเอมีน (Biogenic amines) คือ สารที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ เกิดจากปฏิกิริยา decarboxylation ของกรดอะมิโนอิสระ หรือโดยปฏิกิริยา amination และ transamination ของ aldehydes และ ketones (Askar และ Treptow, 1986; Maijala และคณะ, 1993) สารประกอบเอมีนเป็นสารอินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และถูกสังเคราะห์โดยกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ พืช และสัตว์ (Brink และคณะ, 1990)

2.2.1 ชนิดของสารประกอบเอมีน

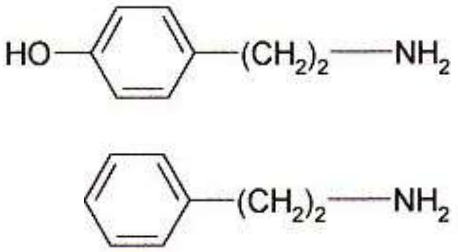
สารประกอบเอมีนสามารถแบ่งชนิดได้ตามโครงสร้างทางเคมี ดังนี้

2.2.1.1 Aliphatic เช่น putrescine cadaverine spermine และ spermidine เป็นต้น โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบเอมีนชนิดที่มีโครงสร้างเป็นแบบ Aliphatic

2.2.1.2 Aromatic ได้แก่ tyramine และ ß-phenylethylamine โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.2

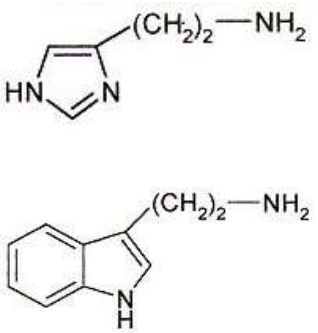


Tyramine

β-Phenylethylamine

รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบเอมีนชนิดที่มีโครงสร้างเป็นแบบ Aromatic

2.2.1.3 Heterocyclic ได้แก่ histamine และ tryptamine โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.3



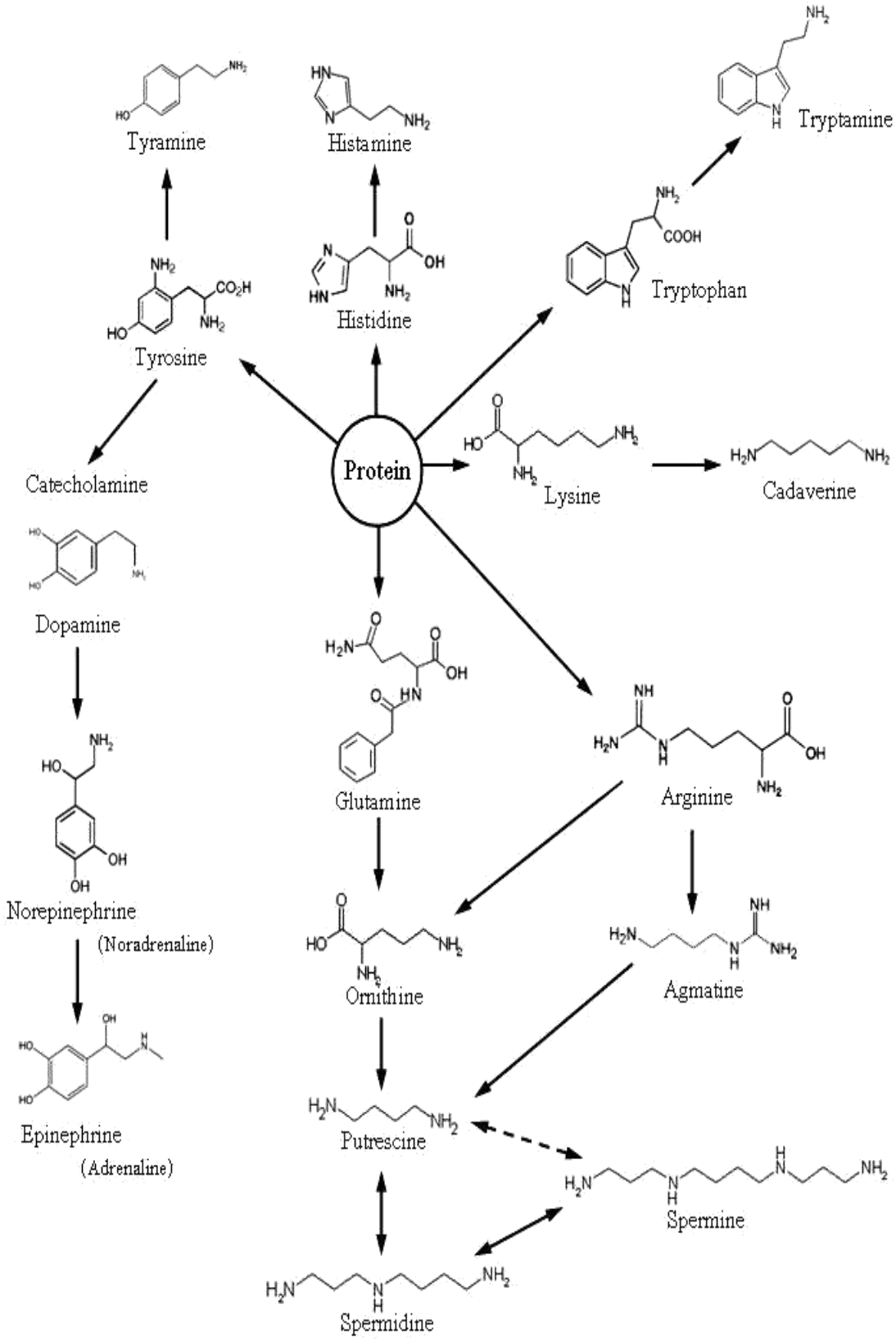
Histamine

Tryptamine

รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบเอมีนชนิดที่มีโครงสร้างเป็นแบบ Heterocyclic

2.2.2 กลไกการเกิดสารประกอบเอมีน

สารประกอบเอมีนส่วนใหญ่เกิดจากปฏิกิริยา decarboxylation ของกรดอะมิโนอิสระ โดยการทำงานของเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสที่มาจากเชื้อแบคทีเรีย โดยการย้ายหมู่ α-carboxyl ออกแล้วแทนที่ด้วยหมู่เอมีน (Shalaby, 1996) สำหรับ precursors ส่วนใหญ่ของการเกิดสารประกอบเอมีนซึ่งเป็นสารมีพิษในอาหารได้แก่ histidine tyrosine hydroxytrpytophane tryptophane lysine ornithine arginine และ spermidine ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์คือ histamine tyramine serotonin tryptamine cadaverine putrescine spermine และ spermidine ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างการเกิดสารประกอบเอมีนโดยเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส แสดงดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 กลไกการเกิดสารประกอบเอมีนโดยเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส (Halász และคณะ, 1994)

2.2.3 การผลิตสารประกอบเอมีนในอาหาร

การผลิตสารประกอบเอมีนในอาหารโดยจุลินทรีย์นั้น ในอาหารจำเป็นต้องมีกรดกรดอะมิโนอิสระที่เพียงพอ แต่ไม่จำเป็นว่ากรดอะมิโนนั้นจะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบเอมีนทั้งหมด (Markilnder และ Lonner, 1992) สำหรับ precursors ส่วนใหญ่ของการเกิดสารประกอบเอมีนซึ่งเป็นสารมีพิษในอาหารได้แก่ histidine tyrosine hydroxytrpytophane tryptophane lysine ornithine arginine และ spermidine ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์คือ histamine tyramine serotonin tryptamine cadaverine putrescine spermine และ spermidine ตามลำดับ จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดสารประกอบเอมีนได้จะต้องผลิตเอนไซม์ decarxylase ได้ (Tiecco และคณะ, 1986; Brink และคณะ, 1990; Huis in't Veld และคณะ, 1990) ส่วนสภาวะของอาหารก็ต้องเหมาะสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ การสังเคราะห์เอนไซม์ decarxylase ด้วย (Brink และคณะ, 1990) รวมถึงชนิดของซับสเตรต พีเอช ความเข้มข้นของเกลือ และอุณหภูมิที่ใช้ก็มีผลต่อการผลิตเอมีนด้วยเช่นกัน (Shalaby, 1996)

2.2.4 ระดับที่เป็นพิษของสารประกอบเอมีน

การกำหนดระดับความเป็นพิษของสารประกอบเอมีนนั้นเป็นไปได้ยาก เนื่องจากขึ้นอยู่กับคุณลักษณะเฉพาะของแต่ละชนิด และการเข้าทำงานร่วมกันของสารประกอบเอมีนชนิดอื่นด้วย ทางด้านกฎหมายได้กำหนดให้มีปริมาณของ histamine ได้ไม่เกิน 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของอาหาร และสำหรับเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ให้มี histamine ได้ไม่เกิน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีรายงานว่าระดับของ tyramine ที่ 100-800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ phenylehylamine ที่ระดับ 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมจะทำให้เกิดพิษในอาหารได้ (Brink และคณะ, 1990; Halasz และคณะ, 1994) การบริโภคอาหารที่มี histamine ในระดับปกติจะทำให้ไม่เกิดปัญหาต่อร่างกาย Sandler และคณะ (1974) ได้รายงานไว้ว่า ปริมาณของ phenylehylamine ที่ 3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของอาหาร เป็นสาเหตุของการเกิดโรคปวดหัวไมเกรนในคนที่มีร่างกายอ่อนแอ ในขณะที่ปริมาณของ tyramine 6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของอาหารที่ได้รับเข้าไป ถูกรายงานไว้ว่าเป็นระดับที่อันตรายต่อผู้ป่วยที่ได้รับสารยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส (Shalaby, 1993) ระดับของสารประกอบเอมีน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของอาหาร ถูกพิจารณาว่าเป็นระดับที่อันตรายต่อสุขภาพ ระดับนี้ถูกคำนวณโดยหลักของปริมาณ histamine ที่ทำให้เกิดอาการมึนเมากับความเข้มข้นของสารประกอบเอมีนในอาหาร (Taylor, 1985) ความแตกต่างของระดับความเป็นพิษของ histamine ในอาหารนั้น อาจเกิดเนื่องจากมาจากการปรากฏหรือไม่ปรากฏของสารประกอบเอมีนชนิดอื่นที่ทำงานร่วมกัน ดังเช่น putrescine และ cadaverine สำหรับในยุโรปนั้นได้เสนอว่าระดับเฉลี่ยของ histamine ควรจะไม่เกิน 10-20 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเนื้อปลา (Luten และคณะ, 1992)

2.2.5 ระดับของสารประกอบเอมีนที่สามารถยอมรับได้

ปริมาณของสารประกอบเอมีนที่บริโภคต่อมื้อมากกว่า 40 มิลลิกรัม จะเป็นพิษต่อร่างกาย (Ayres และคณะ, 1980) จาก Good Manufacturing Practice (GMP) กำหนดปริมาณของ histamine tyramine และ β-phenyethylamine ในระดับที่ยอมรับได้ไว้ที่ 50-100 100-800 และ 30 ppm ตามลำดับ หรือปริมาณสารประกอบเอมีนทั้งหมดกำหนดไว้ที่ 100-200 ppm ถูกควบคุมเพื่อให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ (Nout, 1994) ปริมาณระดับของสารประกอบเอมีนในอาหารที่สามารถยอมรับได้ในอาหารชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ปริมาณระดับของสารประกอบเอมีนในอาหารที่สามารถยอมรับได้ (Shalaby, 1996)

Food	**Maximum amounts (mg/kg)**					
	HIS	**CAD**	**PUT**	**TYR**	**PHE**	**total**
General	-	-	-	-	-	40[a]
	5-100	-	-	100-8-00	30	-
	-	-	-	-	3	-
	-	-	-	6	-	-
Fish	-	-	-	-	-	300[b]
Canned tuna	-	0.5	-	-	-	-
Cheese	-	-	-	-	-	900[c]
sauerkraut	10	25	50	20	5	-

หมายเหตุ : [a] As total biogenic amines per meal

[b] Sum of histamine + cadaverine + putrescine

[c] Sum of histamine + cadaverine + putrescine + tyramine

HIS = Histamine TYR = Tyramine

CAD = Cadaverine PHE = β-phenyethylamine

PUT = Putrescine

2.3 เอมีนออกซิเดส (Amine oxidase)

2.3.1 ชนิดของเอมีนออกซิเดส

เอมีนออกซิเดสสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มหลัก ๆ ตามชนิดของโคแฟคเตอร์ ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย Flavin adenine dinucleotide (FAD) ได้แก่ โมโนเอมีนออกซิเดส (Monoamine oxidase: MAO) ซึ่งมี 2 ชนิด คือ MAO A และ MAO B และโพลีเอมีนออกซิเดส (Polyamine oxidase: PAO)

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย copper (Cu) และ 2,4,5-trihydroxyphenethylamine quinine (TPQ) ทำหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์อยู่ที่ active site ได้แก่ ไดเอมีนออกซิเดส (Diamine oxidase: DAO) (Floris และ Agro, 2004)

2.3.2 แหล่งของเอมีนออกซิเดส

เอมีนออกซิเดสสามารถพบได้ในระบบของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ซึ่งจะพบได้ในบริเวณที่มีการควบคุมระดับของสารประกอบเอมีน โดยเอมีนออกซิเดสที่มีอยู่ ได้แก่ mono-, di- และ polyamines ในเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะพบว่าประกอบด้วยโมโนเอมีนออกซิเดส MAO A (รกของคนและต่อมไทรอยด์ของวัว) และเนื้อเยื่ออื่น ๆ จะประกอบด้วยโมโนออกซิเดส MAO B (เกล็ดเลือดของคนและตับและไตของวัว) ส่วนไดเอมีนออกซิเดสพบได้ในจุลินทรีย์ (ราและแบคทีเรีย) พืช และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น จากไตและลำไส้เล็กของหมูและจากรกของคน (Argento-Ceru และคณะ, 1985) สำหรับโพลีเอมีนออกซิเดสพบอยู่ในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและในพืช เช่น ข้าวโอ๊ต ข้าวโพด ข้าวบาเลย์ ข้าวสาลี และข้าวไรย์ เป็นต้น (Floris และ Agro, 2004)

แหล่งของเอมีนออกซิเดสที่พบในพืชจะ มีอยู่ในส่วนต่างๆ เช่น ใบ เมล็ดที่กำลังงอก ยาง ต้นอ่อน ใบเลี้ยงที่กำลังงอก และ ยอด

1. เอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่พบจากใบ ได้แก่ *Onobrychis viciifolia* (ต้นกก) *Trifolium subterraneum*(clover), *Vicia faba* (horse bean) *Thea sinesis* (ชาเขียว) *Avena sativa* (ข้าวโอ๊ต)และ *Hordeum vulgare* (ข้าวบาร์เลย์) เป็นต้น

2. เอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่พบในเมล็ดที่กำลังงอก ได้แก่ *Cicer arietinum* (chickpea) *Glycine max* (ถั่วเหลือง) *Lathyrus cicera* (red vetching) *Lathyrus sativus* (chickling) *Lens esculenta Lupinus luteus* (yellow lupin) *Phaseolus vulgaris* (ถั่วฝักยาว) *Pisum sativum* (ถั่วลันเตา) *Vicia faba* (horse bean) *Hordeum vulgare* (ข้าวบาร์เลย์) และ *Zea mays* (ข้าวโพด)

3. เอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่พบในส่วนของยาง ได้แก่ *Euphorbia characias* ต้นอ่อน เช่น *Pisum sativum* (ถั่วลันเตา) และ *Oryza sativa* (ข้าว) ใบเลี้ยงกำลังงอกเช่น *Pisum sativum* (ถั่วลันเตา) ส่วนยอด (shoot) เช่น *Zea mays* (ข้าวโพด)

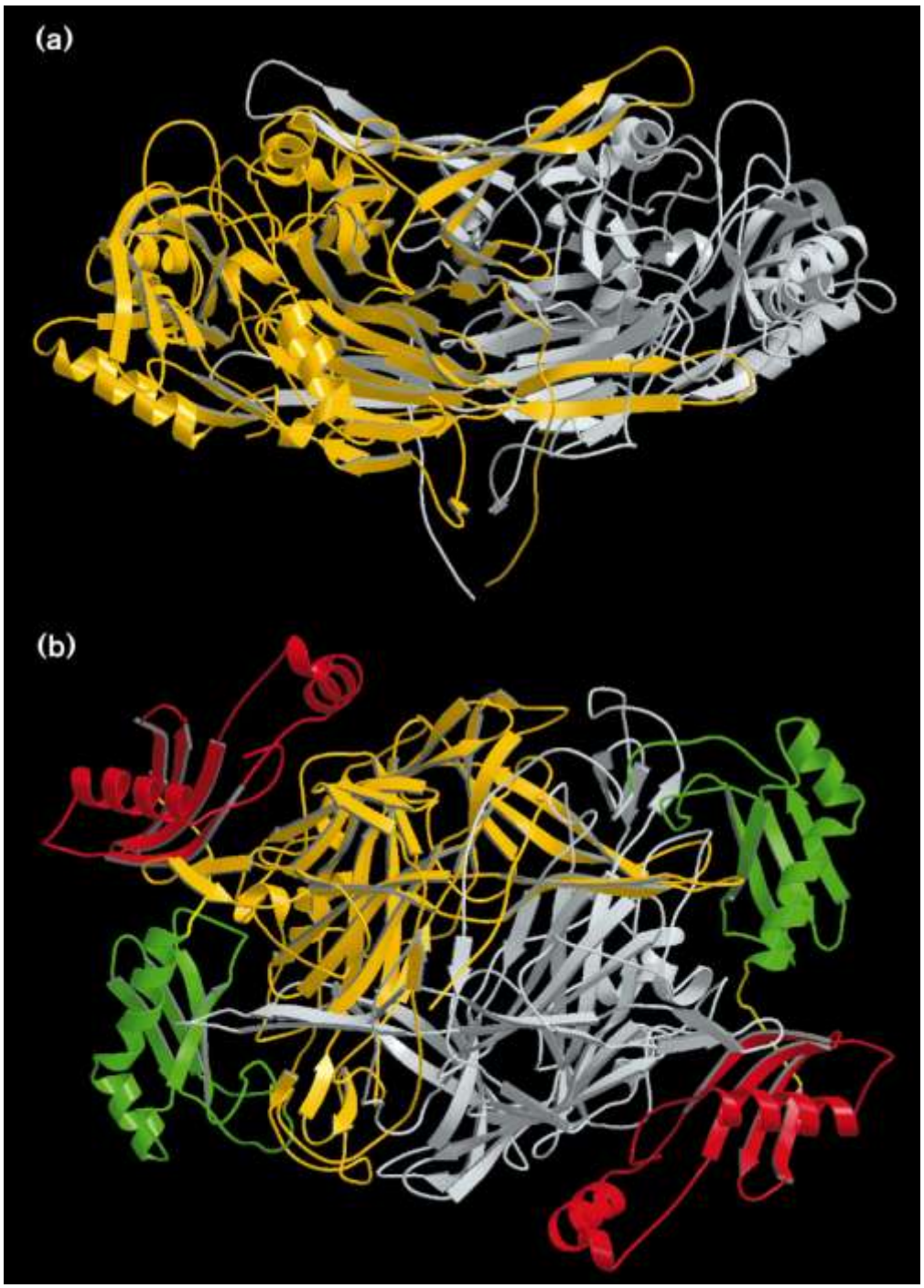
4. เอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่พบได้บริเวณ membranes และ cell walls ของใบ ในรากพบได้ที่ xylem ส่วน cotyledons พบเอมีนออกซิเดสได้ที่ plasma membranes (Medda และคณะ, 1995; Rosaria และคณะ, 1995)

2.3.3 การทำงานของเอมีนออกซิเดส

เอมีนออกซิเดสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา deamination ของ mono- di- และ polyamines ซึ่งมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกันออกไปขึ้นกับความจำเพาะต่อสับสเตรทและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ได้แก่ aldehydes ammonia และ hydrogen peroxide แสดงดังสมการที่ 1 โมโนเอมีนออกซิเดส MAO A จำเพาะกับ dopamine noradrenaline และ serotonin ส่วนโมโนเอมีนออกซิเดส MAO B จำเพาะกับ bezylamineและ phenylethylamine ส่วนซับสเตรตที่เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดสามารถใช้ได้คือ adrenaline kynuramine tyramine และ tryptamine ไดเอมีนออกซิเดสทำปฏิกิริยากับซับสเตรตพวก diamines ที่มีลักษณะเป็น aliphatic สายสั้นๆ เช่น putrescine (1,4 diaminobutane) และ cadaverine (diaminopentane) และสำหรับโพลีเอมีนออกซิเดสจะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโพลีเอมีนที่ secondary amino group ซึ่งโพลีเอมีนออกซิเดสที่มาจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจำเพาะกับ acetyl spermine และ acetyl spermidine โดยได้ผลิตภัณฑ์คือ spermidine และ putrescine ตามลำดับ และยังมี 3-aminopropamal และ hydrogen peroxide เกิดขึ้นอีกด้วย ส่วนโพลีเอมีนออกซิเดสที่มาจากพืชจะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยได้ 1,3-diaminopropane, hydrogen peroxide และ 1-(3-aminooropyl)-4-aminobutanal เป็นผลิตภัณฑ์ (Floris และ Agro, 2004)

$$R\text{-}CH_2NH_2 + O_2 + H_2O \longrightarrow R\text{-}CHO + NH_3 + H_2O_2 \qquad (1)$$

ตัวอย่างโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เอมีนออกซิเดส แสดงดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เอมีนออกซิเดส (copper-containing amine oxidase) จากเมล็ดถั่วลันเตาที่กำลังงอก (PSAO) (a) โครงสร้างไดเมอร์ (dimer) ของเอนไซม์ PSAO ที่มองในแนวตั้งฉากกับแกนของโมเลกุล จากรูปประกอบด้วย หน่วยย่อยสองหน่วย ซึ่งแสดงด้วย สีส้ม และสีขาว ตามลำดับ และ (b) โครงสร้างของเอนไซม์ PSAO ที่มองในแนวเดียวกับแกนของโมเลกุล (EC 1.4.3.21) (Kumar และคณะ, 1996)

2.4 โบรโมเปอร์ออกซิเดส (Bromoperoxidase)

โบรโมเปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มฮาโลเปอร์ออกซิเดสชนิดหนึ่ง ซึ่งฮาโลเปอร์ออกซิเดสนั้นจัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเปอร์ออกซิเดสชนิดหนึ่งที่สามารถเร่งปฏิกิริยา peroxidative halogenation ของสารประกอบอินทรีย์ เมื่อมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เฮไลด์ไอออน (Cl^-, Br^- และ I^-) และ halogen receptor ฮาโลเปอร์ออกซิเดสจึงจัดเป็น H_2O_2-oxidoreductase group และได้ผลิตภัณฑ์เป็น halogenated product (Itoh และคณะ, 1988) ดังแสดงในปฏิกิริยาต่อไปนี้

$$AH + X^- + H_2O_2 + 2H^+ \xrightarrow{\text{haloperoxidase}} AX + 2H_2O$$

AH = สารประกอบอินทรีย์

X^- = Cl^-, Br^- และ I^-

AX = halogenated product

ฮาโลเปอร์ออกซิเดสแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามความสามารถในการเติมเฮไลด์ไอออนเข้าสู่สารอินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ชนิดของฮาโลเปอร์ออกซิเดส (Itoh และคณะ, 1988)

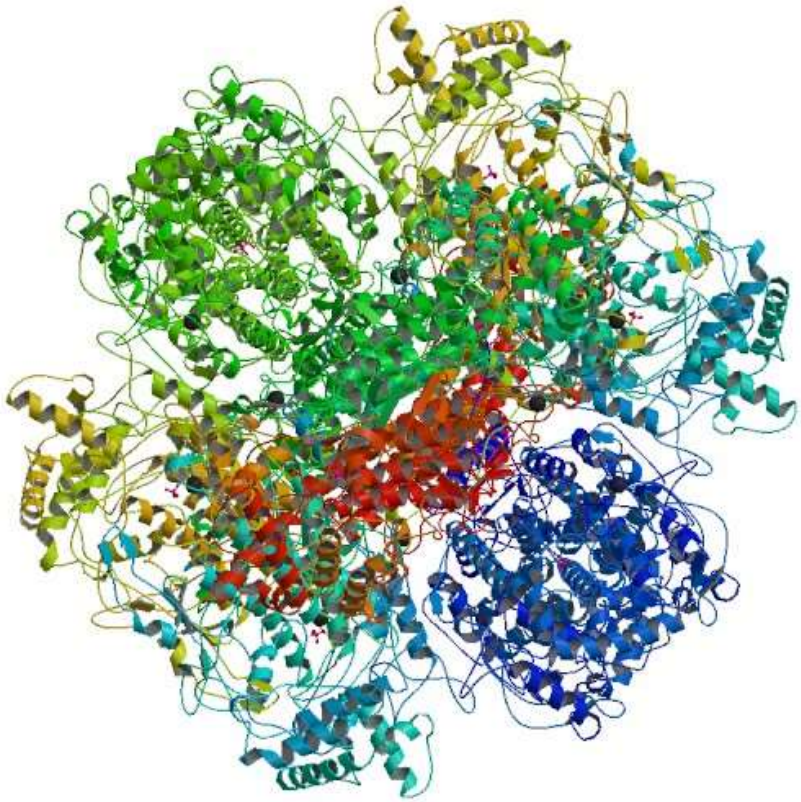
ชนิดของฮาโลเปอร์ออกซิเดส	เฮไลด์ไอออน
คลอโรเปอร์ออกซิเดส	Cl^-, Br^-, I^-
โบรโมเปอร์ออกซิเดส	Br^-, I^-
ไอโอโดเปอร์ออกซิเดส	I^-

คลอโรเปอร์ออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่คลอไรด์ไอออน โบรไมด์ไอออน และไอโอไดด์ไอออนเข้าสู่สารประกอบอินทรีย์ คลอโรเปอร์ออกซิเดสสามารถสกัดได้จากจุลินทรีย์ เช่น *Caldariomyces fumago* และ myeloperoxidase ซึ่งเป็นคลอโรเปอร์ออกซิเดสชนิดหนึ่งที่สกัดได้จาก human leukocytes (Morris และ Hager, 1986) ส่วนโบรโมเปอร์ออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่โบรไมด์ไอออน และไอโอไดด์ไอออน ซึ่งสกัดได้จากไข่ของ sea urchin (Deits และคณะ, 1984) น้ำนมในรูปของแลคโตเปอร์ออกซิเดส (Nichol และคณะ, 1987) สาหร่ายทะเล (Baden และ Corbett, 1980; Manthey และ Hager, 1981; Itoh และคณะ, 1985) และจากจุลินทรีย์ เช่น *Streptomysis areofacience*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Caldariomyces fumago* (Vanpee และ Lingen, 1985; Vanpee และ

Lingen, 1987) และ Eosinophil peroxidase จากเซลล์เม็ดเลือดขาว (Carlson และคณะ, 1985) และไอโอโดเปอร์ออกซิเดส ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ไอโอไดด์ไอออนเข้าสู่สารประกอบอินทรีย์ สกัดได้จากต่อมไธรอยด์ (Alexander, 1959) และรากของพืชในตระกูลมะรุม (horseradish) (Shannon และคณะ, 1966)

Itho และคณะ (1985) ได้แบ่งโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ พวกที่มี heme เป็น prosthetic group (heme type) และพวกที่ไม่มี heme เป็น prosthetic group (non-heme type) โดยโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่สกัดจากสาหร่ายทะเล มักเป็นเอนไซม์ที่มี heme เป็น prosthetic group (Manthey และ Hager, 1981; Itoh และคณะ, 1985) และพบโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่สกัดจากสาหร่ายทะเลหลายชนิดเป็นพวกที่ไม่มี heme เป็น prosthetic group เช่น โบรโมเปอร์ออกซิเดสที่สกัดจาก *Corallina pilulifera* มี Fe^{3+} เป็น prosthetic group มีมวลโมเลกุลประมาณ 790,000 ดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาด 64,000 ดาลตัน กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 6.0 และมีความคงทนต่ออุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในเวลา 30 นาที (Itoh และคณะ, 1985) ตัวอย่างโครงสร้างสามมิติของโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายสีแดงสายพันธุ์ *Coralline pilulifera* แสดงดังรูปที่ 2.6, *Ascophyllum nodosum* มี vanadium (V^{+5}) เป็น prosthetic group มวลโมเลกุลประมาณ 90,000 ดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาด 40,000 ดาลตัน กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 5.5 และมีความคงทนต่ออุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสในเวลา 1 ชั่วโมง (Deboer และคณะ, 1986), Laminaria digitata มี vanadium (V^{+5}) เป็น proathetic group มีมวลโมเลกุลประมาณ 260,000 ดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาด 60,000 ดาลตัน กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 6.5 และมีความคงทนต่ออุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในเวลา 30 นาที (Jordan และ Vilter, 1991) และ *Ceramium rubrum* มี vanadium (V^{+5}) เป็น prosthetic group มีมวลโมเลกุล 240,000 ดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาด 50,000 ดาลตัน กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 7.5 และมีความคงทนต่ออุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสในเวลา 1 ชั่วโมง (Klenn และคณะ, 1987)

โบรโมเปอร์ออกซิเดสถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1978 ในสาหร่ายสีแดงชนิด Bonnemaisonia hamifera (Theiler และคณะ, 1978) หลังจากนั้นจึงมีการค้นพบแหล่งของโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้แก่ จุลินทรีย์ สัตว์ทะเล ไลเคนบางชนิด สาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสีแดง และสาหร่ายสีน้ำตาล ในประเทศไทยได้มีการสำรวจเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสในสาหร่ายทะเลในแถบชายฝั่งทะเลของจังหวัดตราด ตรัง สงขลา และพังงา พบว่าสามารถสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสได้จากสาหร่ายสีแดง (Rhodophyta) เช่น สาหร่ายเขากวาง และสาหร่ายผมนาง



รูปที่ 2.6 โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส (recombinant vanadium-dependent bromoperoxidase) จากสาหร่ายสีแดงสายพันธุ์ *Coralline pilulifera* ซึ่งมี Fe^{3+} เป็น prosthetic group มีมวลโมเลกุล ประมาณ 790,000 ดาลตัน และประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาด 64,000 ดาลตัน ทั้งหมด 12 หน่วย (EC 1.11.1.10) (Isupov และคณะ, 2002)

2.5 Enzyme coupling assay

Enzyme coupling assay เป็นเทคนิคที่ใช้เอนไซม์โดยตรงตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร ซึ่งในเทคนิคนี้จะอาศัยคุณสมบัติของเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อซับสเตรตเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของซับสเตรต ทั้งนี้โดยควบคู่ปฏิกิริยานี้กับปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสี โดยอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ในการตรวจวัดซับสเตรตที่มีอยู่ในตัวอย่าง (มนตรี จุฬาวัฒนทน และคณะ, 2542) โดยที่เอนไซม์ตัวแรกจะทำการเปลี่ยนสารที่ต้องการตรวจวัดได้เป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นซับสเตรตของเอนไซม์ตัวต่อมา และมีการเติมซับสเตรตตัวอื่นที่สามารถเกิดสีได้หลังจากเกิดการเปลี่ยนแปลง ทำให้สามารถหาปริมาณของสารที่ต้องการตรวจวัดในตัวอย่างได้ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งข้อดีของวิธี enzyme couling assay คือสามารถวิเคราะห์สารได้อย่างรวดเร็วและจำนวนมาก เป็นวิธีที่ง่ายไม่ซับซ้อน และราคาของเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ไม่สูงมากนัก เหมาะสำหรับงานวิเคราะห์ประจำ (Badolo และคณะ, 1999)

Raba และคณะ (1995) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณของกลูโคสในซีรัมโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ glucose oxidase และ peroxidase ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดังแสดงในรูปที่ 2.7 โดยเริ่มปฏิกิริยาจากการทำงานของ glucose oxidase ซึ่งจะเปลี่ยน β-D-glucose ให้กลายเป็น gluconic acid และจะได้ H_2O_2 เป็นผลิตภัณฑ์ออกมาด้วย จากนั้นจะให้ peroxidase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ *o*-dianisidine (3,3-dimethoxybenzidine) ซึ่งเป็นซับสเตรตที่เติมลงไปกับ H_2O_2 ซึ่งเป็นซับสเตรตที่เกิดจากปฏิกิริยาของ glucose oxidase ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ *o*-dianisidine ซึ่งอยู่ในรูป oxidized form สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตรได้

$$\beta\text{-D-glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Glucose oxidase}} \text{gluconic acid} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + o\text{-dianisidine} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} o\text{-dianisidine (oxidized)} + 2H_2O$$

รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยาการวิเคราะห์หาปริมาณ glucose ในซีรัม โดยอาศัยการทำงานร่วมกันของ glucose oxidase และ peroxidase (Raba และคณะ, 1995)

Suman (2003) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณของ cholesterol ในซีรัม ด้วยวิธี enzyme coupling assay โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ cholesterol esterase, cholesterol oxidase และ peroxidase โดยเริ่มปฏิกิริยาจากการทำงานของ cholesterol esterase ซึ่งจะไปเปลี่ยน cholesteryl acetate ในรูปของเอสเทอร์ให้กลายเป็น cholesterol ซึ่งอยู่ในรูปแอลกอฮอล์ จากนั้น cholesterol oxidase จะเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน cholesterol ให้อยู่ในรูปของคีโตน คือกลายเป็น cholestenone จากนั้น peroxidase ก็จะใช้ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นเป็นซับสเตรตร่วมกับซับสเตรตที่เติมลงไปคือ phenol และ 4-aminophenazone เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น quinonemine ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงดังรูปที่ 2.8

$$\text{cholesteryl acetate} + H_2O \xrightarrow{\text{Cholesterol esterase}} \text{cholesterol} + \text{acetic acid}$$

$$\text{cholesterol} + O_2 \xrightarrow{\text{Cholesterol oxidase}} \Delta\text{-chloestenone} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{phenol} + \text{4-aminophenazone} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{quinonemine dye} + 4H_2O$$

รูปที่ 2.8 ปฏิกิริยาการวิเคราะห์หาปริมาณของ cholesterol ในซีรัม ด้วยวิธี enzyme coupling assay โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ cholesterol esterase cholesterol oxidase และ peroxidase (Suman, 2003)

สำหรับการใช้วิธี enzyme coupling assay ในการวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ได้มีงานวิจัยของ Yeh และคณะ (2006) ทำการวิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบเอมีนที่มีอยู่ในตัวอย่างเนื้อปลาทอดกรอบของประเทศไต้หวัน โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ diamine oxidase และ peroxidase ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเริ่มจากการทำงานของ diamine oxidase โดยจะเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนสารประกอบเอมีนที่มีอยู่ในตัวอย่างให้ได้อัลดีไฮด์ แอมโมเนีย และ H_2O_2 จากนั้น peroxidase จะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ phenol และ 4-aminoantipyrine ซึ่งเป็นซับสเตรตที่เติมลงไปกับ H_2O_2 ที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจาก diamine oxidase ดังที่กล่าวมาข้างต้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ quinoneimine dye ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ ที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงดังรูปที่ 2.9

$$R\text{-}CH_2NH_2 + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Diamine oxidase}} R\text{-}CHO + NH_3 + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{phenol} + \text{4-aminoantipyrine} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{quinoneimine dye} + 4H_2O$$

รูปที่ 2.9 ปฏิกิริยาการวิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบเอมีน ด้วยวิธี enzyme coupling assay โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ diamine oxidase และ peroxidase (Yeh และคณะ, 2006)

รุ่งนภา ช่อทองดี (2549) ได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนด้วยวิธี enzyme coupling assay ซึ่งได้ใช้เอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดส (diamine oxidase) ย่อยสารประกอบเอมีนในตัวอย่างอาหาร และได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์ จากนั้นจึงนำมาทำงานร่วมกับเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส (bromoperoxidase) ที่ได้จากสาหร่ายทะเล ซึ่งทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันพวกเฮไลด์-ไอออน (Br^- และ I^-) ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ทำให้เกิดสีขึ้นหลังจากเกิดการเปลี่ยนแปลง และสามารถนำไปหาปริมาณของสารประกอบเอมีนในตัวอย่างอาหารได้ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไป ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงดังรูปที่ 2.10

$$R\text{-}CH_2NH_2 + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Diamine oxidase}} R\text{-}CHO + NH_3 + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + Br^- + \text{Dye (reduced)} \xrightarrow{\text{Bromoperoxidase}} Br^-\text{Dye (oxidized)} + H_2O$$

รูปที่ 2.10 ปฏิกิริยาการวิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบเอมีน ด้วยวิธี enzyme coupling assay โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ diamine oxidase และ bromoperoxidase

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์สารประกอบเอมีน

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนในอาหารมีอยู่ 2 เหตุผลหลักๆ ด้วยกัน คือ เพื่อทราบความเป็นพิษที่อยู่อาหาร และสามารถใช้ค่าที่ได้บอกถึงคุณภาพของอาหารชนิดนั้น ๆ ผลการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสามารถนำไปใช้ควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบ ส่วนประกอบ และผลิตภัณฑ์สุดท้าย นอกจากนี้ยังควบคุมกระบวนการหมัก ควบคุมกระบวนการผลิต รวมทั้งการวิจัยและพัฒนา (önal, 2007) วิธีการหลายวิธีถูกพัฒนาสำหรับใช้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนในอาหาร ได้แก่

2.6.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC เป็นเทคนิคการแยกสารประกอบ (substances) โดยอาศัยหลักการความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบใน stationary phase ของคอลัมน์โดยมี mobile Phase เป็นตัวพาไป เมื่อต่อเข้ากับ detector จะสามารถตรวจวัดสารที่ออกมาจากคอลัมน์ (analytes or solutes) ได้อย่างต่อเนื่อง สามารถตรวจวัดทั้งเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) และเชิงปริมาณ (quantitative analysis) ส่วนใหญ่นิยมใช้วิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยยาก (low volatile substation) หรือน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight compounds)

HPLC เป็นวิธีการที่มีการใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารกันอย่างมาก เนื่องจากมีข้อดีคือ ไวต่อปริมาณตัวอย่างที่มีน้อย วิเคราะห์สารได้หลายชนิด (Badolo และคณะ, 1999) แต่ก็ยังมีข้อจำกัดของเทคนิคอยู่ คือ ในการระบุชนิดของสารประกอบถูกจำกัด โดยจำเป็นต้องมีสารมาตรฐานเทียบเคียงเสมอ ยกเว้นในกรณีที่มีการต่อเชื่อมกับเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี (MS) ซึ่งความสามารถในการแยกถูกจำกัดในกรณีที่สารตัวอย่างมีความซับซ้อน เวลาในการวิเคราะห์ค่อนข้างนาน อาจใช้เวลาถึง 2 ชั่วโมง

จำเป็นต้องเตรียมตัวอย่างก่อนวิเคราะห์ และเครื่อง HPLC ที่ใช้มีราคาสูงมาก อีกทั้งจำนวนตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ได้ต่อวันก็ทำได้น้อย

ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมักดอง ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ได้แก่

Riebroy และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาปริมาณสารประกอบเอมีนในส้มฟัก โดยมีวิธีการทดลองดังนี้ คือ การสกัดสารประกอบเอมีนจากตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างส้มฟัก 4 กรัม ผสมกับกรดไตรคลอโรอะซิติก ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปบดให้ละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Ultra Turrax homogenizer ที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000xg (4 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไว้ จากนั้นก็นำตะกอนไปสกัดซ้ำอีกครั้ง ด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำส่วนใสมารวมกันแล้วปรับให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาทำการเตรียมตัวอย่างสารประกอบเอมีนที่สกัดได้จากส้มฟัก โดยนำสารสกัดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาผสมกับ 1,7 diaminoheptane เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งเป็น internal standard แล้วเติม 2 นอร์มอล NaOH sodium bicarbonate ที่อิ่มตัว และ dansyl chloride เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 150 ไมโครลิตร และ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นกำจัด dansyl chloride ที่เหลือ โดยการเติม ammonia 25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500xg เป็นเวลา 30 นาที และนำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วทำการปรับปริมาตรให้เป็น 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ที่ใช้คอลัมน์ชนิด Hypersil BDS C18 มี mobile phase คือ methanol และ nanopure distilled water โดยใช้ระบบการชะแบบ gradient ที่มีการปรับอัตราส่วนของ mobile phase ในระหว่างการชะ ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่า ตัวอย่างส้มฟักมีปริมาณของสารประกอบเอมีนชนิด putrescine และ cadaverine มากที่สุด รองลงมา คือ tryptamine

Limsuwan (2004) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับผลของต้นเชื้อและอุณหภูมิต่อการเกิดสารประกอบเอมีนในระหว่างกระบวนการหมักและการเก็บรักษาแหนม ซึ่งในการทดลองได้สกัดสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างแหนม โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.1 นอร์มอล และวิเคราะห์สารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นโดยเครื่อง HPLC ที่ใช้คอลัมน์ชนิด Hypersil BDS C18 (200 mm x 4.6 mm i.d.; 5 µm particle size) และทำการชะแบบ gradient ที่มีการปรับอัตราส่วนของ mobile phase ระหว่าง methanol และน้ำกลั่น ซึ่งจากการตรวจสอบสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักแหนม พบเฉพาะสารประกอบ

เอมีนชนิด cadaverine tyramine และ putrescine เท่านั้น และปริมาณของสารประกอบเอมีนเหล่านี้จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก และอุณหภูมิการเก็บที่สูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ต้นเชื้อในการหมักแหนมจะช่วยลดปริมาณของสารประกอบเอมีนได้

Yongmei และคณะ (2007) ได้ทำการสำรวจปริมาณของสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในไวน์ข้าวที่ผลิตขึ้นในแต่ละแหล่งของประเทศจีน โดยวิเคราะห์สารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นโดยใช้ HPLC คอลัมน์ Agilent 1100 C18 (4.6 cm x 150 mm i.d.; 7 μm particle size) และใช้ diode array เป็นตัวตรวจวัดสารประกอบเอมีนที่แยกได้ ซึ่งมีการชะ mobile phase แบบ gradient ที่มีการปรับอัตราส่วนของ acetonitrile และน้ำ ที่ใช้เป็น mobile phase จากการวิเคราะห์ไวน์ข้าวของจีนพบว่าประกอบไปด้วยสารประกอบเอมีน 5 ชนิด ได้แก่ histamine tyramine cadaverine spermine และ spermidine โดยจะพบ histamine ในตัวอย่างทั้ง 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาพบ spermine ในตัวอย่าง 93 เปอร์เซ็นต์ cadaverine พบในตัวอย่าง 87 เปอร์เซ็นต์ และ tyramine และ spermidine พบในตัวอย่าง 79 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณของสารประกอบเอมีนเฉลี่ยที่พบในตัวอย่างคือ 107 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับที่อาจส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้

Latorre-Moratalla และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาการเกิดสารประกอบเอมีนในไส้กรอกหมักของประเทศในแถบยุโรป โดยได้ทำการสกัดสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างไส้กรอกหมักด้วยกรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 0.6 นอร์มอล และวิเคราะห์สารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นด้วยวิธี ion-pair reverse-phase high performance liquid chromatography คอลัมน์ C18 และ derivatization คอลัมน์ก่อนด้วย *o*-phthalaldehyde (OPA) โดยใช้ spectrofluorimetric (excitation wavelength: 340 nm และ emission wavelength: 445 nm) เป็นตัวตรวจวัดสารประกอบเอมีนที่แยกได้ จากการวิเคราะห์พบว่าไส้กรอกหมักของยุโรปจะมีสารประกอบเอมีนชนิด tyramine มากที่สุด รองลงมาคือ putrescine และ cadaverine

Marques และคณะ (2008) ได้ศึกษาผลกระทบของปัจจัยการผลิตที่มีอิทธิผลต่อปริมาณของสารประกอบเอมีนในไวน์ ซึ่งทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนในตัวอย่างไวน์ ได้แก่ histamine tyramine putrescine cadaverine phenylethylamine และ isoamylamine โดยใช้วิธี reverse-phase high-pressure liquid chromatography (RP-HPLC) และใช้ fluorescence (excitation wavelength: 340 nm และ emission wavelength: 425 nm) เป็นเครื่องมือในการตรวจวัดสารประกอบเอมีนที่แยกได้ โดยในการวิเคราะห์ครั้งนี้ใช้คอลัมน์ Waters Nova-Pack C18 และทำการ derivatization ด้วย *o*-phtaldialdehyde/2-mercaptoethanol (OPA/MCE) จากการวิเคราะห์พบว่า

สารประกอบเอมีนชนิดที่พบมากในตัวอย่างไวน์ที่ทำการศึกษา คือ tyramine isoamylamine และ phenylethylamine

Saaid และคณะ (2009) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนในตัวอย่างอาหารหมักดองพื้นบ้านชนิดต่างๆ ของประเทศมาเลเซีย ได้แก่ ‘‘budu” และ ‘‘cincalok” ซึ่งเป็นอาหารหมักพื้นเมืองประเภทปลา นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ canned fish salt-cured fish meat products fruit juice canned vegetables/fruits และ soy bean products โดยหลังจากสกัดสารประกอบเอมีนออกจากตัวอย่าง แล้วจึงนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีน โดยการ derivatised ด้วย dansyl chloride จากนั้นทำการวิเคราะห์โดยใช้ reversed phase HPLC ที่มี UV เป็น detection ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่า ค่าเฉลี่ยของสารประกอบเอมีนชนิด TRP PUT HIS TYR และ SPD ที่พบในตัวอย่าง budu ทั้ง 8 ตัวอย่าง เท่ากับ 82.7 38.1 187.7 174.7 และ 5.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และชนิดของสารประกอบเอมีนหลักที่พบในตัวอย่าง cincalok คือ PUT HIS และ TYR ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 330.7 126.1 และ 448.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างอาหารหมักชนิดอื่นๆพบสารประกอบเอมีนในปริมาณน้อยมากจนถึงไม่สามารถตรวจพบได้

2.6.2 Thin Layer Chromatography (TLC)

Thin Layer Chromatography (TLC) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสาร โดยสามารถบอกจำนวนองค์ประกอบในสารผสมได้ เทคนิคการแยกสารแบบนี้เป็นวิธีที่มีความสะดวกรวดเร็ว ให้ผลดี นิยมใช้มากกรณีที่มีสารตัวอย่างน้อย และ ใช้ได้ดีกับสารระเหยยาก เช่น Lipid Thin Layer Chromatography จัดเป็น Solid - Liquid adsorption โดยมี stationary phase เป็นตัวดูดซับ จำพวก SiO_2 หรือ Al_2O_3 ฉาบบนกระจก หรือ อะลูมิเนียม ส่วน mobile phase เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดเดียว หรือ หลายชนิดผสมก็ได้ โดยที่นิยมมาก เช่น hexane acetone methanol ethanol เป็นต้น โดยอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ขึ้นอยู่กับความสามารถของการละลาย และการดูดซับ ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับความมีขั้วของสาร

วิธี Thin Layer Chromatography (TLC) เป็นวิธีที่มีความว่องไวในการตรวจวิเคราะห์ค่อนข้างดี แต่ก็ยังมีข้อจำกัดอยู่คือ ใช้เวลาในการวิเคราะห์ค่อนข้างช้า และสามารถเกิดผลิตภัณฑ์ตัวอื่นที่ไม่ต้องการ ซึ่งทำให้ต้องทำการกำจัดโดยการทำ pre-chromatography บนคอลัมน์ siliga gel ก่อน (Badolo และคณะ, 1999)

ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมักดอง ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) ได้แก่

Shakila และคณะ (2001) ได้ทำการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในตัวอย่างปลาที่ผ่านการดองเกลือ ได้แก่ mackerel sardine seerfish และ shrimp โดยใช้วิธี Thin Layer Chromatography (TLC) โดยสารประกอบเอมีนจะถูกแยกบน TLC plate ที่ coate ด้วย silica gel GF_{254} (หนา 0.25 มิลลิเมตร 5 x 20 และ 20 x 20)และใช้สารผสมระหว่าง chloroform และ triehylamine ในอัตราส่วน 100 : 25 เป็นตัวพาสาร แล้วนำ plate ที่ได้ไปฉีดด้วยสารผสมระหว่าง isopropanol และ triethanolamine ในอัตราส่วน 8 : 2 เพื่อเพิ่มการเกิดแสง fluorescence จากนั้นนำไปตรวจวัดจุดของสารประกอบเอมีนภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร และนำไปหาปริมาณของสารประกอบเอมีนโดยใช้เครื่อง computerized scanning densitometer ผลจากการวิเคราะห์พบว่า ในปลาดองเค็มจะมีปริมาณของสารประกอบเอมีนสูง ได้แก่ ชนิด putrescine cadaverine histamine และ tyramine ซึ่งพบว่าปลา mackerel และ sardine มีระดับของ histamine สูงเกินระดับของ DAL (defect action level) ที่กำหนดว่าถ้าปริมาณของสารประกอบเอมีนเกินกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ต่อมิลลิกรัมจะทำให้เกิดความเป็นพิษได้

Lapa-Guimaraes และ Pickova (2004) ได้ทำการพัฒนาเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) โดยใช้ระบบสารละลายอัตราส่วนของ chloraformdiethyl ether-triethylamine (6:4:1) ตามด้วย chloroform-triethylamine (6:1) สำหรับการแยกและการวัดอนุพันธ์ของ dansyl ของสารประกอบเอมีน สำหรับเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) ใช้สำหรับแยกสารประกอบเอมีน 8 ชนิด โดยการวัดปริมาณของเอมีนถูกแสดงโดยวิธี densitometry ที่ 254 นาโนเมตร

2.6.3 Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay (ELISA)

เทคนิค Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay หรือ ELISA เป็นการควบคู่ปฏิกิริยาเอนไซม์ที่ทำให้เกิดสีกับปฏิกิริยาทางด้านอิมมูโนวิทยา โดยจะใช้แอนติบอดีทำปฏิกิริยาจับกับสารที่ต้องการวิเคราะห์อย่างจำเพาะ ทั้งนี้ปริมาณของแอนติบอดีที่จับได้จะขึ้นกับปริมาณสารที่มีอยู่ จากนั้นเนื่องจากแอนติบอดีที่ใช้มีเอนไซม์ติดฉลากอยู่ เช่น peroxidase alkaline phosphatase ดังนั้นปริมาณของสารที่จะวิเคราะห์สามารถนำไปวัดได้จากสีที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาของเอนไซม์ เทคนิคของ ELISA สามารถนำมาวิเคราะห์สารได้หลายประเภท ถ้าหากมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารนั้นๆ เช่น alpha fetoprotein ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงมะเร็ง เป็นต้น (มนตรี จุฬาวัฒนทน และคณะ, 2542)

ELISA เป็นเทคนิคที่มีการวิเคราะห์หลายแบบ โดยทั่วไปจะเป็นการวิเคราะห์แบบ indirect ELISA ซึ่งทำโดยเคลือบหลุมบนถาดพลาสติก (micro plate) ด้วยแอนติเจนของไวรัส แล้วใส่ซีรัมทดสอบลงไป ถ้าซีรัมมีแอนติบอดีจำเพาะจะเกาะกับแอนติเจนและส่วนที่เหลือจะถูกล้างออกไป ตรวจดู antigen-antibody complex โดยเติมแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งปิดสลากด้วยเอนไซม์ (anti–human

Ig-conjugated enzyme) ลงไป จากนั้นล้างแล้วเติมซับสเตรตสำหรับเอนไซม์ เมื่อซับสเตรตถูกย่อยจะเกิดสารมีสีซึ่งละลายน้ำได้ขึ้นมา อ่านความเข้มของสีด้วยตาเปล่า หรือด้วยเครื่อง spectrophotometer ถ้ามีสีเข้มมากแสดงว่ามีแอนติบอดีจำเพาะในปริมาณมาก

วิธี ELISA แม้ว่าจะเป็นวิธีที่มีความจำเพาะกับสารที่ทำการวัดสูงมาก แต่ก็ยังมีข้อจำกัดอยู่คือ สามารถวิเคราะห์สารได้เพียงชนิดเดียวต่อครั้ง ต้องการห้องทดลองที่เฉพาะเพื่อเตรียม antiboby ต้องเลือกเอนไซม์ที่นำมาใช้ให้มีความจำเพาะกับ antibody หรือ antigen เพื่อใช้ในการติดฉลาก และต้องการผู้ที่มีความชำนวญในการใช้อีกด้วย
ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมักดอง ด้วยวิธี Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay (ELISA) ได้แก่

Aygün และคณะ (1999) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบเอมีนในตัวอย่างเนย 3 ชนิด ได้แก่ hard cheese semihard cheese และ soft cheese ซึ่งทำการทดลองโดยนำตัวอย่างเนย 2 กรัม ผสมกับ PBS (พีเอช 7.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์เพื่อแยกเก็บส่วนใส จากนั้นนำไปวิเคราะห์ โดยการนำ well plate ซึ่งใส่ anti-histamine antiserum ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อ well ไปบ่มข้ามคืน ต่อจากนั้นทำการ block bining site ของโปรตีนอิสระด้วยการเติม sodium caseinate ใน PBS เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ต่อ well ลงไปเป็นเวลา 30 นาที และล้าง plate 3 ครั้งด้วยสารละลายที่เตรียมได้จากการผสม Nacl 0.85 กรัม และ Tween 20 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตรในน้ำกลั่นปริมาตรรวม 1 ลิตร จากนั้นเทสารละลายทิ้งและเติมสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างสกัดที่อยู่ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อ well และเติมสารละลาย histamine ที่เชื่อมอยู่กับเอนไซม์ HPR (Horseradish peroxidase) ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง จากนั้นล้าง plate อีกครั้งและเติมสารละลายซับสเตรตหรือสารละลาย chromogen ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อ well บ่มไว้ 15 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย 1 M H_2SO_4 โดยเติม 100 ไมโครลิตรต่อ well แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ผลจากการวิเคราะห์พบว่า ตัวอย่างเนยทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ hard cheese semihard cheese และ soft cheese มีสารประกอบเอมีนชนิด histamine เท่ากับ 322 33 และ 73 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

2.6.4 งานวิจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์สารประกอบเอมีน

Fernandas และ Ferreira (2000) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในพอร์ทไวน์ ด้วยวิธี gas chromatographic-mass spectrophotometric (GC-MS) โดยได้เลือกใช้โหลดการวัดด้วยไอออน ซึ่งจะ

ใช้ heptafluorbutyric anhydride เป็นสารสำหรับ derivatization สำหรับเพิ่มการตรวจวัดของปริมาณสารประกอบเอมีนในตัวอย่าง โดยเครื่องใช้เวลา 18 นาที ตัวอย่างจะถูกสกัดสารประกอบเอมีนด้วยสาร ion-pairing คือ bis-2-ethyl-hexylphosphate ละลายใน chloroform ตามด้วยสกัดกลับด้วยกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 0.1 โมลาร์

Su และคณะ (2000) ได้พัฒนาวิธี MECC สำหรับใช้ในการตรวจวัดสารประกอบเอมีน โดยการทำ benzoylating ด้วย benzoyl chloride โดยใช้การตรวจวัดด้วย UV ในตัวอย่างปลาเส้นทอด 2 ชนิด และรวมถึงตัวอย่าง ปลาทะเล ปลาน้ำจืด ปลาทูน่า ปลาแมคคอร์เรล และผลิตภัณฑ์จากตลาดทั่วไป 10 ตัวอย่าง วิธีการ MECC อื่น ๆ ถูกพัฒนาสำหรับใช้แยกสารประกอบเอมีนในอาหารในรูป *N*-substituted benzamides โดยใช้คอลัมน์ที่ไม่ได้เคลือบด้วย silica (Krizek และ Pelikanova, 1998)

Lista และคณะ (2001) พัฒนาวิธีการใหม่เพื่อแยกและวัดเอมีนที่ระเหยได้ (trimethylamone และเอมีนที่มีความสัมพันธ์อื่นๆ) โดยตรงในตัวอย่างปลาโดยการควบคู่วิธี continuous flow system (CFS) กับเครื่อง capillary electrophoresis (CE) โดยการดึงตัวอย่างการสกัดก๊าซรวมเข้าเป็นส่วนเดียวกันใน CFS ควบคู่กับเครื่อง CE

Lange และคณะ (2002) พัฒนาวิธีการ capillary electrophoresis (CE) โดยการวัดตัวนำสำหรับการตรวจวัดปริมาณสารประกอบเอมีนในผลิตภัณฑ์อาหาร ได้แก่ salami cheese wine และ beer วิธีการ CE และ HPLC สำหรับการวัดปริมาณสารประกอบเอมีนในอาหารถูกเปรียบเทียบกันโดยด้วยวิธี CE ถูกแยกในเวลาที่ต่ำกว่า 9 นาที ส่วนสำหรับวิธี HPLC ใช้เวลาต่ำกว่า 20 นาที

Kalac และคณะ (2002) ได้ทำการตรวจสารประกอบเอมีนในตัวอย่างอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ ไวน์ ซาลามิ และต้นหอม โดยใช้วิธี MECC ที่ถูกพัฒนาขึ้น (Kovacs และคณะ, 1999) การทำอนุพันธ์ของเอมีนถูกแสดงโดยใช้สาร 6-aminoquinolyl-*N*-hudroxysuccinimidyl carbamate การแยกสารประกอบเอมีน 7 ชนิด สามารถวิเคราะห์ภายในเวลา 25 - 30 นาที วิธีการตรวจวัดโดยการเชื่อมระบบ chemiluminescence detector กับคอมพิวเตอร์ด้วย capillary eletrophoresis สำหรับสารประกอบเอมีน (diaminopropane putrescine cadaverine และ diaminohexane) ติดฉลากด้วย *N*-(4-aminobutyl)-*N*-ethyllisoluminol

Karpas และคณะ (2002) ได้ทำการหาปริมาณการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์อาหารประเภทเนื้อ โดยการวัดสารประกอบเอมีนที่ระเหยได้จากบนอาหารประเภทเนื้อ นั่นคือเนื้อจากแหล่งที่หลากหลาย ได้แก่ เนื้อไก่ ไก่งวง เนื้อวัว เนื้อหมู และเนื้อปลา และเอมีนถูกวัดโดยวิธี ion mobility spectrometry

Hwang และคณะ (2003) พัฒนาวิธี gas chromatography (GC) ซึ่งสามารถลดเวลาในการตรวจวัด histamine ในปลาและผลิตภัณฑ์จากปลาได้น้อยกว่า 20 นาที โดยมีวิธี gas chromatography ที่แตกต่างไปจากแบบดั้งเดิม คือ histamine ในตัวอย่างจะถูกสกัดออกมาก่อนด้วย alkaline methanol และ ถูกฉีดเข้าสู่คมลัมน์เพื่อวิเคราะห์โดยไม่มีการ derivatization

Ruiz-jimenez และ Luque de Castro (2006) ทำการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในตัวอย่างอาหารแข็ง 9 ชนิด โดยใช้วิธีการควบคุมแบบอัตโนมัติทั้งหมดภายใต้พื้นฐานการทำให้เป็นไอก่อนการควบคุมโดยคอมพิวเตอร์ด้วย capillary electrophoresis และ indirect UV detection capillary electrophoresis ซึ่งถูกเชื่อมโยงต่อกัน โดย FI จำลองที่เหมาะสม การพัฒนาได้สำเร็จโดยใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนแบบอัตโนมัติในตัวอย่างของแข็ง ทำให้สามารถหลีกเลี่ยงปัญหาที่เพิ่มขึ้นจากตัวอย่างที่ซับซ้อนและระดับความเข้มข้นของสารประกอบเอมีนที่ต่ำ

Cortacero-Ramirez และคณะ (2007) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในเบียร์และตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการกลั่นหลังจากการทำเป็นอนุพันธ์ด้วย fluorescein isothiocianate (FITC) ซึ่งนำไปวิเคราะห์สารประกอบเอมีนด้วยวิธี capillary zone electrophoresis (CZE) โดยการใช้อะซิโตนเป็นสารอินทรีย์ในการดัดแปลง และใช้ Laser-induced fluorescence (LIF) เป็น detector ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่า สามารถตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนได้ในระดับไมโครกรัมต่อลิตร โดยวิเคราะห์ ethylamine ได้ 0.3 ไมโครกรัมต่อลิตร และ1,6-hexanodiamine ได้ 11.9 ไมโครกรัมต่อลิตร

Hernández-Borges (2007) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน 10 ชนิดในไวน์ ได้แก่ ชนิด ethanolamine methylamine tryptamine 2-phenylethylamine putrescine cadaverine histamine tyramine spermidine และ spermine ด้วยวิธี nano-liquid chromatography (nano-LC) โดยใช้ UV เป็น detector และใช้คอลัมน์ capillary bidentate C_{18} column 100 μm I.D. ซึ่งตัวอย่างไวน์จะนำไป derivatized ด้วย dansyl-chloride (Dns-Cl) ก่อนนำไปวิเคราะห์ โดยสาร derivatizing และองค์ประกอบอื่นๆในตัวอย่างที่เหลือจะถูกกำจัดออกด้วย C_{18} trapping column ส่วน mobile phase ที่ใช้ คือ acetonitrile water acetic acid และ triethylamine (TEA) จากการวิเคราะห์พบว่า สามารถวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของสารประกอบเอมีนในตัวอย่างได้ คือ 18.3 และ 48.3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Gianotti และคณะ (2008) ได้ทำการวิเคราะห์สารประกอบเอมีน 7 ชนิด ได้แก่ cadaverine histamine putrescine spermidine spermine tryptamine และ tyramine ในตัวอย่าง cheese โดยใช้วิธี new hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry (HILIC-PI APCI MS/MS)

วิธี HILIC-PI APCI MS/MS เป็นวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นใหม่ และมีความไวในการตรวจสารประกอบเอมีนทั้ง 7 ชนิดนี้ ซึ่งวิธีนี้ใช้ Waters Atlantis HILIC (150.0 mm x 2.1mm i.d., 3 μm) เป็น stationary phase และใช้ mobile phase คือ acetonitrile และ ammonium formate เข้มข้น 50.0 มิลลิโมลาร์ ใน ultrapure water แล้วปรับให้มี pH 4.00 ด้วย formic acid โดยมีการ flow ภายใต้สภาวะ gradient ที่มีการปรับอัตราส่วนของ mobile phase ในระหว่างการวิเคราะห์ จากการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในตัวอย่าง Castelmagno cheese พบว่ามี cadaverine histamine putrescine spermidine spermine tryptamine และ tyramine เท่ากับ 203.5 ± 21.2 75.2 ± 7.2 60.5 ± 6.4 34.5 ± 3.5 1.9 ± 0.2 557.5 ± 54.7 และ 2,599.5 ± 261.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

Dadáková และคณะ (2009) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีน (putrescine cadaverine spermidine spermine phenylethylamine histamine tyramine และ tryptamine) ในตัวอย่างอาหาร ได้แก่ เนื้อหมู เนื้อวัว เนื้อปลา และเห็ดชนิดที่รับประทานได้ โดยใช้วิธี ultra-performance liquid chromatographic (UPLC) ซึ่งมีการ derivatize ตัวอย่างด้วย dansyl chloride ก่อนนำไปแยกในคอลัมน์ Agilent Zorbax Eclipse XDB – C18 column (50 x 4.6 mm ID, 1.8 μm) โดยทำการชะสารแบบ gradient ที่มีการใช้ acetonitrile และน้ำ ด้วย flow rate 1.0 ml/min และทำการตรวจวัดสารที่แยกออกจากคมลัมภ์โดยใช้ UV ที่ความยาวคลื่น 225 นาโนเมตร จากการทดลองพบว่าตัวอย่างเนื้อปลา (European catfish, Silurus glanis) มีปริมาณสารประกอบเอมีนชนิด PUT CAD TYM SPD และ SPM เท่ากับ 7.44 3.38 8.29 10.9 และ 6.85 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และตัวอย่างเนื้อไก่ มีปริมาณสารประกอบเอมีนชนิด PUT HIM SPD และ SPM เท่ากับ 2.19 2.28 11.1 และ 27.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

García-Villar และคณะ (2009) ได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนชนิด histamine putrescine cadaverine tryptamine phenylethylamine tyramine และ serotonin ในตัวอย่างไวน์แดง ซึ่งพัฒนาการวิเคราะห์สารแบบ HPLC ร่วมกับการใช้ mass spectrometry และมีการทำ pre-column amine derivatization ด้วย 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ pH 9.2 เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งทำการแยกในคอลัมภ์ C18 โดยใช้การชะแบบ gradient ด้วยการเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของ methanol จากการทดลอง พบว่า ในตัวอย่างไวน์ที่ผลิตในปีต่างๆมีปริมาณเฉลี่ยของสารประกอบเอมีนชนิด histamine putrescine cadaverine phenylethylamine และ tyramine เท่ากับ 7.16 13.34 0.30 0.40 และ 4.12 มิลลิกรัมต่อลิตร

บทที่ 3
อุปกรณ์และระเบียบวิธีวิจัย

3.1 อุปกรณ์ สารเคมี และเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

1. ถั่วเหลือง (Soybean, *Glycine max* (L.) Merrill)
2. สาหร่ายสีแดงพันธุ์ *Gracilaria changii* จากเกาะยอ จังหวัดสงขลา ประเทศไทย
3. ตัวอย่างอาหารหมักดองประเภทเนื้อสัตว์ 9 ตัวอย่าง ได้แก่ แหนมหมู ไส้กรอกเปรี้ยว ปลาร้าหอยดอง ไส้กรอกซาลามิ เบคอนยัดไส้ น้ำบูดู ไตปลาดอง และแหนมปลากราย
4. ตัวอย่างอาหารหมักดองประเภทนม และผลิตภัณฑ์นม 6 ตัวอย่าง ได้แก่ บลูชีส (blue cheese) มอสซาเรลลาชีส (mozzarella cheese) นมเปรี้ยวยี่ห้อโฟร์โมสต์ และยี่ห้อเมจิ (รสธรรมชาติ) โยเกิร์ตยี่ห้อดัชชี่ และยี่ห้อเดลี่โฮม (รสธรรมชาติ)
5. ตัวอย่างอาหารหมักดองประเภทผัก และธัญพืช 4 ตัวอย่าง ได้แก่ ข้าวหมาก ผักเสี้ยนดอง หน่อเหรียงดอง และสะตอดอง
6. ตัวอย่างอาหารหมักดองประเภทเครื่องดื่ม 5 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำกระชาย น้ำหมักชีวภาพ (ยี่ห้อจตุผล) น้ำมะรุม ไวน์แอปเปิ้ล (ผลิตโดยกลุ่มเกษตรกรทำนาตำบลสรอย จังหวัดแพร่) และไวน์กระชายดำ (ผลิตโดยกลุ่มแม่บ้านเกษตรกรสุภัทรภิบาล)

3.1.2 เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง

ไดเอมีนออกซิเดส (EC 1.4.3.6) จากไตหมู (0.16 U/mg solid) (Sigma Chemical, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องบดละเอียด (Blender)
2. เครื่องปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง (RS-SC plus, Sorvall Dupont Ltd., ประเทศสหรัฐอเมริกา)
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (UV-visible spectrophotometer, Shimadz Model UV-160, ประเทศญี่ปุ่น)
4. Vortex mixer (Vortex-genie2, Scienctific Industries Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา)

5. Stirrer (PMC, Barnstead/Thermolyne, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
6. โกร่ง (mortar)
7. เครื่องตรวจวัดค่าพีเอช (pH meter, model 420 A, origin research Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา)
8. ตู้เย็นสำหรับเก็บเอนไซม์และวัตถุดิบที่อุณหภูมิ -80 -20 -4 10 และ 4 องศาเซลเซียส
9. ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส
10. กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1
11. อุปกรณ์และเครื่องมือพื้นฐานอื่นๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการด้านเทคโนโลยีชีวภาพและเทคโนโลยีชีวเคมี เช่น ขวดน้ำกลั่น บีกเกอร์ หลอดทดลอง ปิเปต ไมโครปิเปต ลูกยางหลอดหยด ที่วางหลอดทดลอง เครื่องชั่งสาร ช้อนตักสาร กระบอกตวง ขวดรูปชมพู กรวย ผ้าขาวบาง และนาฬิกาจับเวลา

3.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Bromophenol blue (Bio-Red Laboratories, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
2. Cadaverine dihydrochloride (Sigma chemical, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
3. Cupper sulfate (Carloerba Co., Ltd, ประเทศอิตาลี)
4. Folin-ciocalteu's reagent (Merck KGaA, ประเทศเยอรมัน)
5. Glycerol (Ajax Finechem Pty Ltd, ประเทศออสเตเลีย)
6. Histamine dihydrochloride (Sigma chemical, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
7. Hydrogenperoxide (Carloerba Co., Ltd, ประเทศอิตาลี)
8. Hydrochloric acid (Carloerba Co., Ltd, ประเทศอิตาลี)
9. Phenol red (Carloerba Co., Ltd, ประเทศอิตาลี)
10. ß-Phenylethylamine hydrochloride(Sigma chemical, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
11. Polyethylene glycolที่มีน้ำหนักโมเลกุล 6000 (Sigma chemical, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
12. Potassium bromide (Fisher chemical, ประเทศอังกฤษ)
13. Putrescine dihydrochloride (Sigma chemical, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
14. Sodium hydroxide (Merck, ประเทศเยอรมัน)
15. Trytamine hydrochloride (Sigma chemical, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
16. Tris-hydroxymethyl-methyamine (Asia Pacific Specialty Chemicals Limited, ประเทศออสเตเลีย)
17. Tyramine hydrochloride (Sigma chemical, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.2 ระเบียบวิธีวิจัย

3.2.1 การสกัดเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส

3.2.2.1 สกัดเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายเขากวาง (ดัดแปลงจากวิธีของรุ่งนภา ช่อทองดี (2549))

ทำการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่าย *Gracilaria changii* (สาหร่ายเขากวาง) โดยการนำสาหร่ายหนัก 10 กรัม มาแช่ใน Tris-HCl buffer (พีเอช 7) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำสาหร่ายที่ผ่านการแช่ด้วยบัฟเฟอร์แล้วมาหั่นให้ละเอียด และนำไปบดด้วยโกร่ง (mortar) ให้เป็นเนื้อเดียวกับบัฟเฟอร์ที่ใช้แช่ แล้วนำไปกรองด้วยผ้าขาวบางและนำส่วนที่กรองได้ไปปั่นแยกเซลล์ที่ 10,000*g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อแยกเก็บส่วนใสซึ่งเป็น crude enzyme ออกมาตรวจวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry และคณะ (1951) (แสดงในภาคผนวก ก) และทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดส (ดังแสดงในหัวข้อ 3.2.2.2)

3.2.2.2 การทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดส (ดัดแปลงจากวิธีของรุ่งนภา ช่อทองดี (2549))

ตรวจสอบกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสโดยอาศัยความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา peroxidative halogenation ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส ที่เร่งการเติมหมู่โบรไมด์เข้าสู่ฟีนอลเรด โดยมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้าร่วมในปฏิกิริยา เกิดผลิตภัณฑ์ halogenated product ซึ่งดูดกลืนคลื่นแสงที่ 590 นาโนเมตร ซึ่งมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

1. นำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ 50 ไมโครลิตร เติมสารละลายฟีนอลเรด 0.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ Tris-HCl buffer (พีเอช 7) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
2. เริ่มปฏิกิริยาโดยการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน assay mixture แล้วเขย่าให้เข้ากัน
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
4. แช่ assay mixture ในอ่างน้ำแข็งเพื่อชะลอการเกิดปฏิกิริยา
5. นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

6. คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบกับโบรโมฟีนอลบลูที่ใช้เป็นกราฟมาตรฐาน
7. ทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ

กำหนดให้ 1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที (ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

3.2.2.1 การศึกษาความเข้มข้นของฟีนอลเรดที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ศึกษาความเข้มข้นของฟีนอลเรดที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 2.55 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0 1.11 2.22 3.33 4.44 5.56 7.78 10.00 12.22 14.44 16.67 และ 30.00 ไมโครโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 5.56 มิลลิโมลาร์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 50 ไมโครโมลาร์ และ Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 11.11 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรรวมทั้งหมด 450 ไมโครลิตร และผสมกับน้ำกลั่น ปริมาตร 450 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ (1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.2.2 การศึกษาความเข้มข้นของโปตัสเซียมโบร์ไมด์ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ศึกษาความเข้มข้นของโปตัสเซียมโบร์ไมด์ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 2.55 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 27.78 ไมโครโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 0 0.22 0.44 0.67 0.89 1.11 1.56 2.00 2.44 2.89 3.33 และ 6.00 มิลลิโมลาร์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 50 ไมโครโมลาร์ และ Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 11.11

มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรรวมทั้งหมด 450 ไมโครลิตร และผสมกับน้ำกลั่น ปริมาตร 450 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ (1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.2.3 การศึกษาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ศึกษาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 2.55 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 27.78 ไมโครโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 5.56 มิลลิโมลาร์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.005 0.012 0.016 0.025 0.049 0.098 0.490 และ 0.980 มิลลิโมลาร์ และ Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 11.11 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรรวมทั้งหมด 450 ไมโครลิตร และผสมกับน้ำกลั่น ปริมาตร 450 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ (1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.3 การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยการหาค่าคงที่ของมิเคลิส (K_m) และค่าอัตราความเร็วสูงสุด (V_{max}) ของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นซับสเตรต โดยทำการศึกษาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส จากสาหร่ายทะเล 2.55 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 27.78 ไมโครโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 5.56 มิลลิโมลาร์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.012 0.016 0.025 0.049 0.098 0.490 และ 0.980 มิลลิโมลาร์ และ Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 11.11 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรรวมทั้งหมด 450 ไมโครลิตร และผสมกับน้ำกลั่น ปริมาตร 450 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยคำนวณหาค่า K_m และ

V_{max} ได้จากจุดตัดบนแกนตั้งหรือแกนนอน และความชัน (slope) ของเส้นตรง ของกราฟที่เขียนระหว่างค่าส่วนกลับของอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา (1/V) และค่าส่วนกลับของความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (1/[S]) ซึ่งเรียกว่า Lineweaver-Burk plot โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ (1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.4 การศึกษาปริมาณของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

3.2.4.1 การศึกษาปริมาณของเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay

ศึกษาปริมาณของเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยสารละลายเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า 0.01 0.02 0.04 0.08 0.12 0.16 0.20 0.31 และ 0.41 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 9.18 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ สารประกอบเอมีนมาตรฐาน (putrescine) 45.38 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ไมโครลิตร โดยการปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 50 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ (1 ยูนิต (U) ของไดเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณไดเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7.2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.4.2 การศึกษาปริมาณของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay

ศึกษาปริมาณของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลที่เหมาะสม โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยสารละลายเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า (ปริมาณเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าที่เหมาะสม ซึ่งได้จากการทดลองที่ 3.2.4.1) สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 0.92 1.84 3.67 5.51 7.34 9.18 11.02 14.69 18.36 และ 27.54 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ สารประกอบเอมีนมาตรฐาน (putrescine) 45.38 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ไมโครลิตร โดยการปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 50 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ (1 ยูนิต (U) ของไดเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณไดเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7.2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.5 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยสารละลายเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 11.02 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 28 มิลลิโมลาร์ และสารประกอบเอมีนมาตรฐาน (putrescine) 45.38 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 2 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้น ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ (1 ยูนิต (U) ของไดเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณไดเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7.2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส

หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.6 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบเอมีนชนิดต่างๆ สำหรับการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมักดอง ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ศึกษาความสามารถในการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนมาตรฐานได้แก่ putrescine cadaverine histamine tryptamine tyramine และ β - phenylethylamine เพื่อสร้างเป็นกราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 11.02 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ สารประกอบเอมีนมาตรฐาน 0 – 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ไมโครลิตร โดยการปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 50 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ (1 ยูนิต (U) ของไดเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณไดเอมีนออกซิเดส ที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7.2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 1ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.7 การพัฒนาการสกัดสารประกอบเอมีนจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง

ทำการศึกษาประสิทธิภาพของกระบวนการสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดองพื้นบ้านของไทยชนิดต่างๆ ได้แก่ แหนมหมู ไส้กรอกเปรี้ยว ข้าวหมาก ปลาร้า และหอยดอง ที่มีแหล่งผลิตจากตลาดสดภายในท้องถิ่น โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3.2.7.1 การศึกษาชนิดของกรดที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดอง

ทดลองชนิดของกรดที่นำมาใช้ในการสกัดสารประกอบเอมีน ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 4 โมลาร์ กรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 0.6 1.5 และ 3 โมลาร์ ซึ่งทำการสกัดตามวิธีการของรุ่งนภา ช่อทองดี (2549) โดยชั่งตัวอย่างอาหารหมักดอง ได้แก่ แหนมหมู ไส้กรอกเปรี้ยว ข้าวหมาก ปลาร้า และหอยดอง หนัก 20 กรัม แล้วทำการบดด้วยเครื่องบด ให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ผสมกับสารละลายกรดชนิดต่างๆ ปริมาตร15 มิลลิลิตร และเริ่มการสกัดด้วยการกวนนาน 30 นาที ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเก็บส่วนใสที่ลอยอยู่ด้านบนที่แรงเหวี่ยง 8,000*g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำตะกอนที่ได้มาสกัดซ้ำด้วยสารละลายกรด ปริมาตร15 มิลลิลิตร อีกครั้ง แล้วจึงนำส่วนใสมารวมกัน ปรับให้สารที่ได้มีพีเอชเป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 โมลาร์ จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดไปทดสอบหาปริมาณสารประกอบเอมีนด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยสารละลายเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 11.02 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างสารสกัด 300 ไมโครลิตร ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ไมโครลิตร โดยการปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 50 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่างอาหารหมักดองที่ทำการสกัดด้วยกรดชนิดต่าง ๆ (1 ยูนิต (U) ของไดเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณไดเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7.2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.7.2 การศึกษาอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างและกรดที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดอง

ทดลองปริมาณของตัวอย่างอาหารหมักดองและกรดที่นำมาใช้ในการสกัดสารประกอบเอมีน โดยศึกษาอัตราส่วนระหว่างอาหารหมักดองที่ใช้เป็นตัวอย่างกับกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 4 โมลาร์ ที่ใช้เป็นสารละลายสกัด ในอัตราส่วน ดังนี้ 1 : 0.75 1 : 1 1 : 1.5 1 : 2 และ1 : 2.5 ซึ่งทำการสกัดตาม

วิธีการของรุ่งนภา ช่อทองดี (2549) โดยชั่งตัวอย่างอาหารหมักดอง ได้แก่ แหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว หนัก 20 กรัม แล้วทำการบดด้วยเครื่องบด ให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ผสมกับกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 4 โมลาร์ ปริมาตร15 มิลลิลิตร และเริ่มการสกัดด้วยการกวนนาน 30 นาที ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเก็บส่วนใสที่ลอยอยู่ด้านบนที่แรงเหวี่ยง 8,000*g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำตะกอนที่ได้มาสกัดซ้ำด้วยสารละลายกรด ปริมาตร15 มิลลิลิตร อีกครั้งแล้วจึงนำส่วนใสมารวมกัน ปรับให้สารที่ได้มีพีเอชเป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 4 โมลาร์ จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดไปทดสอบหาปริมาณสารประกอบเอมีนด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 11.02 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างสารสกัด 300 ไมโครลิตร ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ไมโครลิตร โดยการปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 50 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่างอาหารหมักดองที่ทำการสกัดด้วยอัตราส่วนต่างๆ ระหว่างตัวอย่างและกรดที่ใช้สกัด (1 ยูนิต (U) ของไดเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณไดเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7.2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.7.3 การศึกษาจำนวนครั้งในการสกัดที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดอง

ทดลองจำนวนครั้งที่ใช้ในการสกัดสารประกอบเอมีน ได้แก่ การสกัด 1 2 3 และ 4 ครั้ง ซึ่งทำการสกัดตามวิธีการของรุ่งนภา ช่อทองดี (2549) โดยชั่งตัวอย่างอาหารหมักดอง ได้แก่ แหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว หนัก 20 กรัม แล้วทำการบดด้วยเครื่องบดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ผสมกับกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 4 โมลาร์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และเริ่มการสกัดด้วยการกวนนาน 30 นาที ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเก็บส่วนใสที่ลอยอยู่ด้านบนที่แรงเหวี่ยง 8,000*g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำส่วนใสที่ได้มาปรับให้มีพีเอชเป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 4 โมลาร์ จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ก็จะได้สารสกัด 1 ซ้ำ นำสารสกัด

ที่ได้ไปทดสอบหาปริมาณสารประกอบเอมีน โดยเปรียบเทียบกับสารประกอบเอมีนที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างที่ได้ทำการสกัดซ้ำอีก 1 2 หรือ 3 ครั้งด้วยสารละลายกรด ปริมาตร15 มิลลิลิตร ซึ่งทดสอบหาปริมาณสารประกอบเอมีนด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 11.02 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างสารสกัด 300 ไมโครลิตร ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ไมโครลิตร โดยการปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 50 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ (1 ยูนิต (U) ของไดเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณไดเอมีนออกซิเดส ที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7.2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.7.4 การสกัดและการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดองด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

นำตัวอย่างอาหารหมักดอง ได้แก่ แหนมหมู ไส้กรอกเปรี้ยว ข้าวหมาก ปลาร้า และหอยดอง ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มาบดด้วยเครื่องบดจนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ผสมกับสารละลายกรดชนิดที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.6.1 ในอัตราส่วนที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.6.2 โดยเริ่มการสกัดด้วยการกวนนาน 30 นาที ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเก็บส่วนใสที่ลอยอยู่ด้านบนที่แรงเหวี่ยง 8,000*g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยทำการสกัดตามจำนวนซ้ำที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.6.3 แล้วจึงนำส่วนใสที่ได้มาปรับให้มีพีเอชเป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 4 โมลาร์ จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดไปทดสอบหาปริมาณสารประกอบเอมีนด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 11.02 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างสารสกัด 300 ไมโครลิตร ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ไมโครลิตร โดยการปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 50

มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ (1 ยูนิต (U) ของไดเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณไดเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7.2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.7.5 การหาค่าเปอร์เซ็นต์การสกัดสารประกอบเอมีน (% recovery)

นำตัวอย่างอาหารหมักดอง ได้แก่ แหนมหมู ไส้กรอกเปรี้ยว ข้าวหมาก ปลาร้า และหอยดอง มาทำการเติมสารประกอบเอมีนมาตรฐานได้แก่ putrescine cadaverine หรือ histamine เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของตัวอย่าง จากนั้นนำไปสกัดตามการทดลองที่ 3.2.6.4 โดยสารสกัดที่ได้ทั้งหมดนำไปทดสอบหาปริมาณสารประกอบเอมีนด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 11.02 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างสารสกัด 300 ไมโครลิตร ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ไมโครลิตร โดยการปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 50 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร (1 ยูนิต (U) ของไดเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณไดเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7.2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ) โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ จากนั้นทำการคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การสกัดสารประกอบเอมีน (% recovery) จากสูตร

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

กำหนดให้ ; BA_1 = ปริมาณสารประกอบเอมีนก่อนการเติม (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

BA_2 = ปริมาณสารประกอบเอมีนหลังการเติม (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

BA_3 = สารประกอบเอมีนที่เติมลงไป (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

3.2.8 การศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในอาหารหมักดอง

ศึกษาปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในอาหารหมักดองได้แก่ แหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 3 5 และ 7 วัน โดยชั่งตัวอย่างอาหารหมักดองหนัก 20 กรัม แล้วทำการบดด้วยเครื่องบดจนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ผสมกับกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 4 โมลาร์ ปริมาตร15 มิลลิลิตร และเริ่มการสกัดด้วยการกวนนาน 30 นาที ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเก็บส่วนใสที่ลอยอยู่ด้านบนที่แรงเหวี่ยง 8,000g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำตะกอนที่ได้มาสกัดซ้ำด้วยสารละลายกรด ปริมาตร15 มิลลิลิตร อีกครั้ง แล้วจึงนำส่วนใสมารวมกัน ปรับให้สารที่ได้มีพีเอชเป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 4 โมลาร์ จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดไปทดสอบหาปริมาณสารประกอบเอมีนด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 11.02 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างสารสกัด 300 ไมโครลิตร ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ไมโครลิตร โดยการปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 50 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่างอาหารหมักดองที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นระยะเวลาต่าง ๆ (1 ยูนิต (U) ของไดเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณไดเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7.2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.9 การศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในอาหารหมักดอง

ศึกษาปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในอาหารหมักดองได้แก่ แหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -4 4 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยชั่งตัวอย่างอาหารหมักดองหนัก 20 กรัม แล้วทำการบดด้วยเครื่องบดจนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ผสมกับกรด

ไฮโดรคลอริก เข้มข้น 4 โมลาร์ ปริมาตร15 มิลลิลิตร และเริ่มการสกัดด้วยการกวนนาน 30 นาที ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเก็บส่วนใสที่ลอยอยู่ด้านบนที่แรงเหวี่ยง 8,000g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำตะกอนที่ได้มาสกัดซ้ำด้วยสารละลายกรด ปริมาตร 15 มิลลิลิตร อีกครั้ง แล้วจึงนำส่วนใสมารวมกัน ปรับให้สารที่ได้มีพีเอชเป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 4 โมลาร์ จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดไปทดสอบหาปริมาณสารประกอบเอมีนด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 11.02 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างสารสกัด 300 ไมโครลิตร ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ไมโครลิตร โดยการปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 50 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่างอาหารหมักดองที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ (1 ยูนิต (U) ของไดเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณไดเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7.2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.10 การศึกษาการทำปฏิกิริยา โดยการใช้สารยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

3.2.10.1 การศึกษาการทำปฏิกิริยาโบรมิเนชัน โดยการใช้สารยับยั้งปฏิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ศึกษาการทำปฏิกิริยาโบรมิเนชันของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส โดยการผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 11.02 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ และ Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 30 มิลลิโมลาร์ ซึ่งทำการเริ่มปฏิกิริยาโดยเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.04 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรรวม 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร จากนั้นศึกษาการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส

โดยการเติมสารยับยั้ง 2 ชนิด ได้แก่ โพแทสเซียมไซยาไนด์ และโซเดียมเอไซด์ เข้มข้น 0.2 0.4 0.8 1.2 1.6 2.0 และ 2.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลายปฏิกิริยา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร (1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.10.2 การศึกษาการทำปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยการใช้สารยับยั้งปฏิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส

การศึกษาการทำปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยการผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 11.02 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 28 มิลลิโมลาร์ ซึ่งทำการเริ่มปฏิกิริยาโดยเติมสารประกอบเอมีนมาตรฐาน (putrescine) 4.54 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร จากนั้นศึกษาการยับยั้งปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยการเติมสารยับยั้ง 2 ชนิด ได้แก่ โพแทสเซียมไซยาไนด์ และโซเดียมเอไซด์ ความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งได้จากการทดลองที่ 3.4.1 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร (1 ยูนิต (U) ของ ไดเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณไดเอมีนออกซิเดสที่ ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7.2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.11 การตรวจสอบคุณภาพของการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ทำการตรวจสอบคุณภาพของการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า 0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 9.18 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 22 มิลลิโมลาร์ และสารประกอบเอมีนมาตรฐาน (putrescine) 45.38 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการตรวจวิเคราะห์ทั้งหมด 60 ซ้ำ (1 ยูนิต (U) ของไดเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณไดเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7.2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.12 การสกัดเอนไซม์เอมีนออกซิเดส

3.2.12.1 การสกัดเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง

นำตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองมาแช่ในน้ำ เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนำมาเพาะในกระดาษทิชชูที่เปียกน้ำ ในที่มืด เป็นเวลา 7 วัน โดยมีการรดน้ำต้นถั่วหลืองอย่างสม่ำเสมอ เมื่อต้นถั่วเหลืองเจริญเติบโตจนครบตามกำหนดเวลา แล้วจึงนำมาตัดเอาเฉพาะส่วนรากและส่วนลำต้น โดยชั่งน้ำหนักส่วนรากของต้นถั่วเหลือง 240 กรัม และส่วนลำต้นของต้นถั่วเหลือง 420 กรัม มาทำการสกัดเอนไซม์ โดยนำมาบดด้วยโกร่งให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันกับ Tris-HCl buffer (พีเอช 7) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปคั่นและกรองเอาเฉพาะส่วนของของเหลวด้วยผ้าขาวบาง และนำส่วนที่กรองได้ไปปั่นแยกตะกอนเซลล์ที่แรงเหวี่ยง 10,000g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเก็บเอาส่วนใสซึ่งเป็น crude enzyme ออกมา แล้วทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น โดยการทำแห้ง ด้วยเครื่อง freeze dryer เมื่อเอนไซม์ที่สกัดได้แห้งแล้วจึงนำไปละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 35 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำการ dialyse ด้วย Tris-HCl buffer (พีเอช 7) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 ลิตร

ทั้งหมด 3 ครั้ง ตรวจวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry และคณะ (1951) (แสดงในภาคผนวก ข) และทดสอบหากิจกรรมของเอมีนออกซิเดส ที่สกัดได้จากส่วนต่างๆของต้นอ่อนของเมล็ดถั่วเหลืองงอก (ดังแสดงในหัวข้อ 3.2.12.2)

3.2.12.2 การทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์เอมีนออกซิเดส

ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เอมีนออกซิเดส โดยปฏิกิริยาควบคู่กับเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล ซึ่งอาศัยความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา peroxidative halogenation ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส ที่เร่งการเติมหมู่โบรไมด์เข้าสู่ฟีนอลเรด โดยมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของเอมีนออกซิเดส เมื่อใช้สารประกอบเอมีนชนิด putrescine เป็นสารตั้งต้น เข้าร่วมในปฏิกิริยา เกิดผลิตภัณฑ์ halogenated product ซึ่งดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

1. นำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ 20 ไมโครลิตร เติมสารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล ที่สกัดได้จากการทดลองที่ 3.2.2.1 100 ไมโครลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ Tris-HCl buffer (พีเอช 7) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร
2. เริ่มปฏิกิริยาโดยการเติมสารประกอบเอมีนชนิด putrescine เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน assay mixture แล้วเขย่าให้เข้ากัน
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. แช่ assay mixture ในอ่างน้ำแข็งเพื่อชะลอการเกิดปฏิกิริยา
5. นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร
6. คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบกับโบรโมฟีนอลบลูที่ใช้เป็นกราฟมาตรฐาน
8. ทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ

<u>กำหนดให้</u> 1 ยูนิต (U) ของเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

3.2.13 การศึกษาปริมาณของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

3.2.13.1 การศึกษาปริมาณของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay

ศึกษาปริมาณของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยสารละลายเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง 0 0.37 1.48 3.70 5.55 7.40 11.10 14.80 และ 18.50 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 9.18 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ สารประกอบเอมีนมาตรฐาน (putrescine) 45.38 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ไมโครลิตร โดยการปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 50 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ (1 ยูนิต (U) ของเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.13.2 การศึกษาปริมาณของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay

ศึกษาปริมาณของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลที่เหมาะสม โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยสารละลายเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง (ปริมาณเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองที่เหมาะสม ซึ่งได้จากการทดลองที่ 3.2.13.1) สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 0 0.92 1.84 3.67 5.51 7.34 9.18 11.02 14.69 และ 18.36 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ และสารประกอบเอมีนมาตรฐาน (putrescine) 45.38 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ไมโครลิตร โดยการปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 50 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่

เกิดขึ้นด้วยเครื่อง สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ (1 ยูนิต (U) ของเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.14 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยสารละลายเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง 7.34 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 9.18 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 30 มิลลิโมลาร์ และสารประกอบเอมีนมาตรฐาน (putrescine) 45.38 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 2 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ (1 ยูนิต (U) ของเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.15 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบเอมีนชนิดต่างๆ สำหรับการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมักดอง ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ศึกษาความสามารถในการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนมาตรฐานได้แก่ putrescine cadaverine histamine tryptamine tyramine และ ß - phenylethylamine เพื่อสร้างเป็นกราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง 7.4 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์

โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 5.51 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ และสารประกอบเอมีนมาตรฐาน 0 – 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ไมโครลิตร โดยการปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 50 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ (1 ยูนิต (U) ของเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.16 การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง

ศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง โดยการหาค่าคงที่ของมิเคลิส (K_m) และค่าอัตราความเร็วสูงสุด (V_{max}) ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ที่มีสารประกอบเอมีนชนิด putrescine cadaverine histamine tryptamine tyramine และ ß - phenylethylamine เป็นซับสเตรต โดยทำการศึกษาความเข้มข้นของสารประกอบเอมีนมาตรฐานในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่สารละลายเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง 7.4 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 5.51 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ และสารประกอบเอมีนมาตรฐาน 0 – 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ไมโครลิตร โดยการปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 50 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ซึ่งสามารถคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} ได้จากจุดตัดบนแกนตั้งหรือแกนนอน และความชัน (slope) ของเส้นตรงของกราฟที่เขียนระหว่างค่าส่วนกลับของอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา (1/V) และค่าส่วนกลับของความเข้มข้นของสารประกอบเอมีนมาตรฐาน (1/[S]) ซึ่งเรียกว่า Lineweaver-Burk plot โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ (1 ยูนิต (U) ของเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.17 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเอมีนจากแหนมหมู ไส้กรอกเปรี้ยว ข้าวหมาก ปลาร้า และหอยดอง ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

นำตัวอย่างสารสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดอง ได้แก่ แหนมหมู ไส้กรอกเปรี้ยว ข้าวหมาก ปลาร้า และหอยดอง ที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.6.4 มาทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนโดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง 7.4 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 5.51 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ และสารสกัดจากตัวอย่าง 300 ไมโครลิตร ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ไมโครลิตร โดยการปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 50 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ (1 ยูนิต (U) ของเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.18 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดองประเภทต่างๆ

ทำการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดอง 4 ประเภท ได้แก่ อาหารหมักดองประเภทเนื้อสัตว์ 5 ตัวอย่าง คือ ไส้กรอกซาลามิ เบคอนยัดไส้ น้ำบูดู ไตปลาดอง และแหนมปลากราย ซึ่งไส้กรอกซาลามิ และเบคอนยัดไส้ มีแหล่งผลิตจากประเทศอิตาลี ส่วนน้ำบูดู ไตปลาดอง และแหนมปลากราย มีแหล่งผลิตจากตลาดสดภายในท้องถิ่น ของจังหวัดสุราษฎร์ธานี อาหารหมักดองประเภทนม และผลิตภัณฑ์นม 6 ตัวอย่าง คือ บลูชีส (blue cheese) มอสซาเรลลาชีส (mozzarella cheese) ซึ่งมีแหล่งผลิตจากประเทศเดนมาร์ก และประเทศออสเตเรีย ตามลำดับ นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม 2 ยี่ห้อ คือ ยี่ห้อโฟร์โมสต์ และยี่ห้อเมจิ และโยเกิร์ต 2 ยี่ห้อ คือ ยี่ห้อดัชชี่ และยี่ห้อเดลี่โฮม อาหารหมักดองประเภทผัก 3 ตัวอย่าง คือ ผักเสี้ยนดอง หน่อเหรียงดอง และสะตอดอง ที่มีแหล่งผลิตจากตลาดสดภายในท้องถิ่น ของจังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยเก็บรักษาตัวอย่างทั้งหมดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนนำไปสกัดสารประกอบเอมีน และอาหารหมักดองประเภทเครื่องดื่ม 5 ตัวอย่าง คือ น้ำกระชาย น้ำหมักชีวภาพ (ยี่ห้อจตุผล) น้ำมะรุม ไวน์แอปเปิ้ล และไวน์กระชายดำ ที่มีแหล่งผลิตจากตลาดสดภายในท้องถิ่น

3.2.18.1 การสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดองประเภทเนื้อสัตว์

ทำการสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดองประเภทเนื้อสัตว์ ได้แก่ ไส้กรอกซาลามิ เบคอนยัดไส้ น้ำบูดู ไตปลาดอง และแหนมปลากราย โดยนำตัวอย่างอาหารหมักดอง มาบดด้วยเครื่องบดจนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน โดยไส้กรอกซาลามิ และเบคอนยัดไส้ ทำการสกัดตามงานวิจัยของ Hernandez-Jover และคณะ (1996) โดยชั่งตัวอย่างหนัก 5 กรัมผสมกับสารละลายกรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 0.6 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยเริ่มการสกัดด้วยการกวนนาน 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเก็บส่วนใสที่ลอยอยู่ด้านบนที่แรงเหวี่ยง 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที โดยทำการสกัดทั้งหมด 3 ซ้ำ ส่วนน้ำบูดู ไตปลาดอง และแหนมปลากราย ทำการสกัดโดยใช้กรดชนิดที่เหมาะสมกับการสกัดตัวอย่างประเภทปลา ซึ่งได้จากการทดลองที่ 3.2.6.1 ในอัตราส่วนที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.6.2 โดยเริ่มการสกัดด้วยการกวนนาน 30 นาที ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเก็บส่วนใสที่ลอยอยู่ด้านบนที่แรงเหวี่ยง 8,000*g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยทำการสกัดตามจำนวนซ้ำที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.6.3 แล้วจึงนำส่วนใสที่ได้จากการสกัดจากตัวอย่างทั้งหมดมาปรับให้มีพีเอชเป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 4 นอร์มอล จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเอมีน

3.2.18.2 การสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดองประเภทนม และผลิตภัณฑ์นม

ทำการสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดองประเภทนม และผลิตภัณฑ์นม 6 ตัวอย่าง ได้แก่ บลูชีส (blue cheese) มอสซาเรลลาชีส (mozzarella cheese) นมเปรี้ยวพร้อมดื่มยี่ห้อโฟร์โมสต์ และยี่ห้อเมจิ โยเกิร์ตยี่ห้อดัชชี่ และยี่ห้อเดลี่โฮม โดยนำตัวอย่างอาหารหมักดอง มาบดด้วยเครื่องบดจนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการสกัดตามงานวิจัยของ Novella-Rodríguez และคณะ (2000) โดยชั่งตัวอย่างบลูชีส และมอร์ทาเดลลาชีส หนัก 5 กรัม นมเปรี้ยว และโยเกิร์ต หนัก 10 กรัม ผสมกับสารละลายกรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 0.6 โมลาร์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร โดยเริ่มการสกัดด้วยการกวนนาน 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเก็บส่วนใสที่ลอยอยู่ด้านบนที่แรงเหวี่ยง 10,000*g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นทำการสกัดซ้ำ โดยใช้สารละลายกรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 0.6 โมลาร์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร แล้วจึงนำส่วนใสที่ได้จากการสกัดจากตัวอย่างทั้งหมดมาปรับให้มีพีเอชเป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 4 นอร์มอล จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเอมีน

3.2.18.3 การสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดองประเภทผัก

ทำการสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดองประเภทผัก ได้แก่ ผักเสี้ยนดอง หน่อเหรียงดอง และสะตอดอง โดยนำตัวอย่างอาหารหมักดอง มาบดด้วยเครื่องบดจนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการสกัดโดยใช้กรดชนิดที่เหมาะสมกับการสกัดตัวอย่างประเภทผัก ซึ่งได้จากการทดลองที่ 3.2.6.1 ในอัตราส่วนที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.6.2 โดยเริ่มการสกัดด้วยการกวนนาน 30 นาที ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเก็บส่วนใสที่ลอยอยู่ด้านบนที่แรงเหวี่ยง 8,000*g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยทำการสกัดตามจำนวนซ้ำที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.6.3 แล้วจึงนำส่วนใสที่ได้จากการสกัดจากตัวอย่างทั้งหมดมาปรับให้มีพีเอชเป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 นอร์มอล จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเอมีน

3.2.18.4 การสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดองประเภทเครื่องดื่ม

ทำการสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดองประเภทเครื่องดื่ม 5 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำกระชาย น้ำหมักชีวภาพ ยี่ห้อจตุผล น้ำมะรุม ไวน์แอปเปิ้ล และไวน์กระชายดำ โดยนำตัวอย่างเครื่องดื่มไปปั่นเหวี่ยงแยกเก็บส่วนใสที่ลอยอยู่ด้านบนที่แรงเหวี่ยง 10,000g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดมาปรับให้มีพีเอชเป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 4 นอร์มอล จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเอมีน

3.2.18.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ทดสอบหาปริมาณสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดอง 4 ประเภท ได้แก่ อาหารหมักดองประเภทเนื้อสัตว์ 5 ตัวอย่าง คือ ไส้กรอกซาลามิ เบคอนยัดไส้ น้ำบูดู ไตปลาดอง และแหนมปลากราย อาหารหมักดองประเภทนม และผลิตภัณฑ์นม 6 ตัวอย่าง คือ บลูชีส มอสซาเรลลาชีส นมเปรี้ยวพร้อมดื่มยี่ห้อโฟร์โมสต์ และยี่ห้อเมจิ และโยเกิร์ตยี่ห้อดัชชี่ และยี่ห้อเดลี่โฮม อาหารหมักดองประเภทผัก 3 ตัวอย่าง คือ ผักเสี้ยนดอง หน่อเหรียงดอง และสะตอ และอาหารหมักดองประเภทเครื่องดื่ม 5 ตัวอย่าง คือ น้ำกระชาย น้ำหมักชีวภาพ ยี่ห้อจตุผล น้ำมะรุม ไวน์แอปเปิ้ล และไวน์กระชายดำ ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยสารละลายเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า 0.2

ยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 11.02 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างสารสกัด 300 ไมโครลิตร ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ไมโครลิตร โดยการปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 50 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ (1 ยูนิต (U) ของไดเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณไดเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7.2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.18.6 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ทดสอบหาปริมาณสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดอง 4 ประเภท ได้แก่ อาหารหมักดองประเภทเนื้อสัตว์ 5 ตัวอย่าง คือ ไส้กรอกซาลามิ เบคอนยัดไส้ น้ำบูดู ไตปลาดอง และแหนมปลากราย อาหารหมักดองประเภทนม และผลิตภัณฑ์นม 6 ตัวอย่าง คือ บลูชีส มอสซาเรลลาชีส นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม ยี่ห้อโฟร์โมสต์ และยี่ห้อเมจิ และโยเกิร์ตยี่ห้อดัชชี่ และยี่ห้อเดลี่โฮม อาหารหมักดองประเภทผัก 3 ตัวอย่าง คือ ผักเสี้ยนดอง หน่อเหรียงดอง และสะตอ และอาหารหมักดองประเภทเครื่องดื่ม 5 ตัวอย่าง คือ น้ำกระชาย น้ำหมักชีวภาพ ยี่ห้อจตุผล น้ำมะรุม ไวน์แอปเปิ้ล และไวน์กระชายดำ ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยผสมสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยสารละลายเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง 7.4 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 5.51 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ และตัวอย่างสารสกัด 300 ไมโครลิตร ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ไมโครลิตร โดยการปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 50 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ (1 ยูนิต (U) ของเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.19 การศึกษาเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป

3.2.19.1 การศึกษาความเข้มข้นของ stabilizers ที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการรักษาเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป

ทำการผสมน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป 2 ชนิด ชนิดที่ 1 ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 11.02 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ และชนิดที่ 2 ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง 7.4 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 5.51 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำน้ำยาตรวจวิเคราะห์ทั้งสองชนิดมาเติมกลีเซอรอล 2 4 6 8 10 12 14 16 18 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) หรือเติมโพลีเอทีลีนไกลคอล 1 2 3 4 5 และ6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วนำน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปทั้งหมดมาวิเคราะห์ โดยการเติมสารประกอบเอมีนมาตรฐาน (putrescine) 4.54 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีการปรับปริมาตรรวมให้ได้ 500 ไมโครลิตร โดยใช้สารละลาย Tris-HCl buffer (พีเอช 7) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร (1 ยูนิต (U) ของไดเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณไดเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7.2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ยูนิต (U) ของเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณเอมีนออกซิเดส ที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.19.2 การศึกษาผลของการใช้ stabilizers ต่อเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป

ทำการผสมน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปที่ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 18.36 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 20 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 ไมโครลิตร

และผสมน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปเช่นเดียวกับข้างต้นแต่มีการเติมสารกลีเซอรอล 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) หรือเติมสารโพลีเอทีลีนไกลคอล 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วนำน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปทั้งหมดมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์ โดยการเติมสารประกอบเอมีนมาตรฐาน (putrescine) 4.54 มิลลิโมลาร์ ลงในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปทั้ง 3 ชนิด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการตรวจเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์ ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลาทั้งหมด 30 สัปดาห์

ทำการผสมน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปที่ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง 7.4 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 5.51 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 34 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 มิลลิลิตรและผสมน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปเช่นเดียวกับข้างต้นแต่มีการเติมสารกลีเซอรอล 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) หรือเติมสารโพลีเอทีลีนไกลคอล 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วนำน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปทั้งหมดมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์ โดยการเติมสารประกอบเอมีนมาตรฐาน (putrescine) 45.38 มิลลิโมลาร์ ลงในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปทั้ง 3 ชนิด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการตรวจเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์ ทุกๆ 1 สัปดาห์ เป็นระยะเวลาทั้งหมด 12 สัปดาห์ (1 ยูนิต (U) ของไดเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณไดเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7.2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ยูนิต (U) ของเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.19.3 การศึกษาผลของการทำแห้ง ต่อเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป

ทำการผสมน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปที่ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 18.36 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 20 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำมาทำแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer จนได้น้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปที่มีลักษณะเป็นผงแห้ง แล้วจึงนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์ โดยเติมสารประกอบเอมีนมาตรฐาน (putrescine) 4.54 มิลลิโมลาร์ ลงในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป ที่ผ่านการละลายด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวมทั้งหมด 500 มิลลิลิตรแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการตรวจเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์ ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลาทั้งหมด 20 สัปดาห์

ทำการผสมน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปที่ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง 7.4 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 5.51 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 34 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำมาทำแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer จนได้น้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปที่มีลักษณะเป็นผงแห้ง แล้วจึงนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์ โดยการเติมสารประกอบเอมีนมาตรฐาน (putrescine) 45.38 มิลลิโมลาร์ ลงในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป ที่ผ่านการละลายด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวมทั้งหมด 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการตรวจเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์ ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลาทั้งหมด 12 สัปดาห์ (1 ยูนิต (U) ของไดเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณไดเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7.2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ยูนิต (U) ของเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.19.4 การศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษา ต่อเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป

ทำการผสมน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป 2 แบบ แบบที่ 1 คือ น้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปแบบสารละลาย โดยการผสมสารละลายปฏิกิริยา 6 ชนิด ชนิดที่ 1 ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 11.02 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 28 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 มิลลิลิตร น้ำยาชนิดที่ 2 และ 3 ทำการผสมน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปเช่นเดียวกับน้ำยาชนิดที่ 1 แต่มีการเติมสารกลีเซอรอล 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) หรือเติมสารโพลีเอทีลีนไกลคอล 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) น้ำยาชนิดที่ 4 ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง 7.4 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 5.51 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 34 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรรวมทั้งหมด 500 มิลลิลิตร และน้ำยาชนิดที่ 4 และ 5 ทำการผสมน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปเช่นเดียวกับน้ำยาชนิดที่ 4 แต่มีการเติมสารกลีเซอรอล 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) หรือเติมสารโพลีเอทีลีนไกลคอล 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ส่วนน้ำยาตรวจวิเคราะห์แบบที่ 2 คือ น้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปแบบผงแห้ง โดยการผสมสารละลายปฏิกิริยา 2 ชนิด ชนิดที่ 1 ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 11.02 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 28 มิลลิโมลาร์ ชนิดที่ 2 ประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง 7.4 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 11.02 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 34 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำน้ำยาทั้งสองชนิดมาทำแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer จนได้น้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปที่มีลักษณะเป็นผงแห้ง แล้วจึงนำน้ำยาตรวจวิเคราะห์ทั้งหมดมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 10 และ 25 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์ โดยการเติมสารประกอบเอมีนมาตรฐาน (putrescine) 4.54 มิลลิโมลาร์ ลงในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยทำการตรวจเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์ ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลาทั้งหมด 8 สัปดาห์ (1 ยูนิต (U) ของไดเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณไดเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อ

ชั่วโมง ที่พีเอช 7.2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ยูนิต (U) ของเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

3.2.20 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองทั้งหมดด้วยโปรแกรม SPSS V.15.0 ซึ่งทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล โดยใช้ ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้การทดสอบแบบ Duncan test หรือ Tukey Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การสกัดเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส

จากการสกัดเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่าย *Gracilaria changii* (สาหร่ายเขากวาง) แล้วทำการตรวจวัดปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry (แสดงในภาคผนวก ข) ซึ่งคำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานซีรัมอัลบูมิน แสดงดังรูปที่ ข.1 และทดสอบกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดส ในสารละลายสกัด โดยคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์จากการเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นกับโบรโมฟีนอลบลูที่ใช้เป็นกราฟมาตรฐาน แสดงดังรูปที่ ข.2 จากการทดลองพบว่า เอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากสาหร่ายสายพันธุ์ *Gracilaria changii* (สาหร่ายเขากวาง) ใน crude enzyme มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสเท่ากับ 45.90 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร และค่า specific activity เท่ากับ 0.22 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1 และตารางที่ ก.1 และ ก.2

ตารางที่ 4.1 ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสารละลายสกัดจากสาหร่ายทะเล

เอนไซม์	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	กิจกรรม (มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิลิตร)
โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล	0.212 ± 0.005	45.90 ± 2.164	0.22 ± 0.01

หมายเหตุ : ผลการทดลองเท่ากับ mean ± SD n = 2 และ 1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที (ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

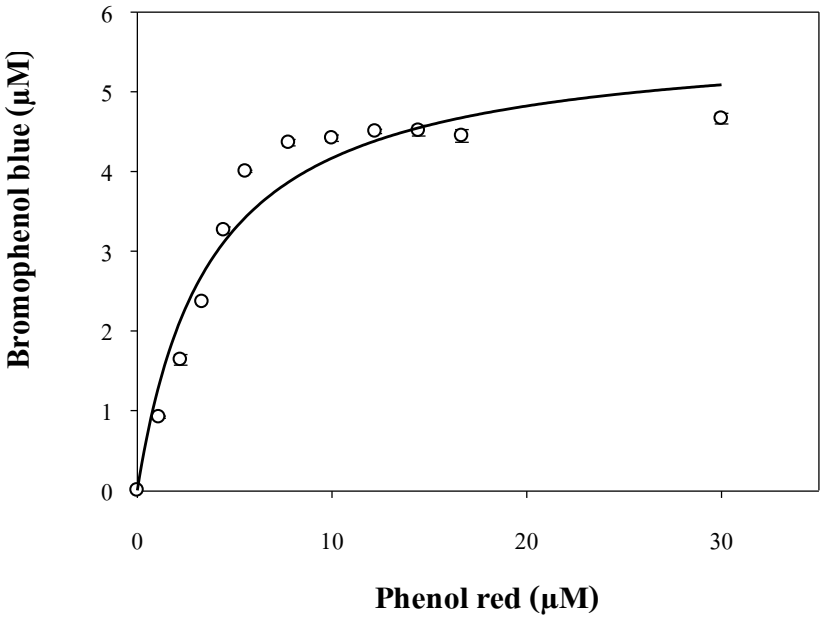
ในงานวิจัยนี้ได้ดัดแปลงวิธีการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสมาจากงานวิจัยของรุ่งนภา ช่อทองดี (2549) ซึ่งได้ทำการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายสายพันธุ์ *Gracilaria changii* (สาหร่ายเขากวาง) เนื่องจากเป็นสาหร่ายสายพันธุ์เดียวกันจึงได้ดัดแปลงวิธีการสกัดมาใช้ในงานวิจัยนี้ โดยเอนไซม์ที่ได้เป็นการสกัดด้วยวิธีการแช่สาหร่ายด้วยบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 5 จากนั้นบดเซลล์ให้แตก และใช้

บัฟเฟอร์ที่แช่ชะเอนไซม์ออกมา ซึ่งเอนไซม์ที่ได้อยู่ในรูป crude enzyme และค่อนข้างเจือจาง เนื่องจากใช้บัฟเฟอร์ในการสกัดมาก ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จึงไม่สูงมากนัก ถ้าต้องการให้เอนไซม์มีกิจกรรมที่สูงขึ้น อาจทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้นโดยลดปริมาณของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด และทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วยวิธีต่างๆ เช่น การตกตะกอนโปรตีน ion-exchange chromatography gel filtration chromatography เป็นต้น

4.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

4.2.1 การศึกษาความเข้มข้นของฟีนอลเรดที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

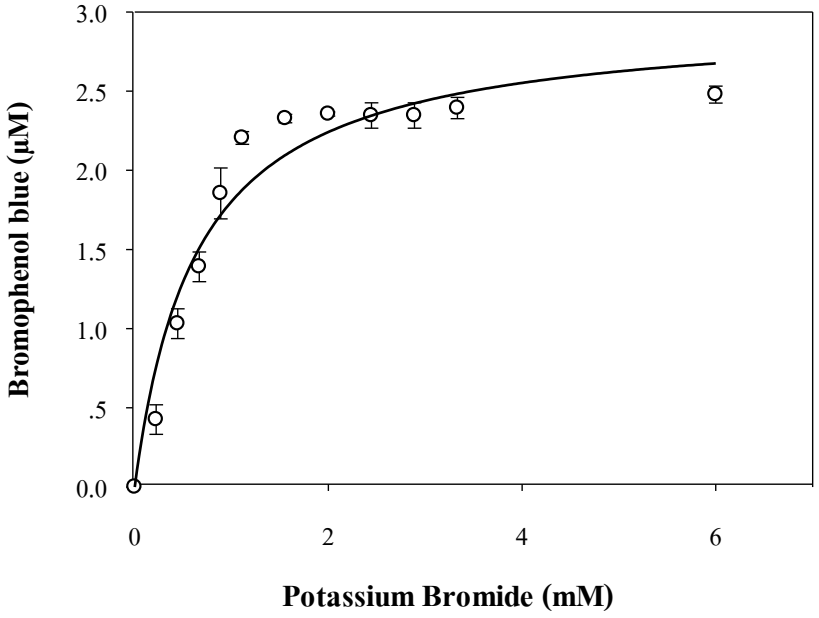
จากการศึกษาความเข้มข้นของฟีนอลเรด (0 1.11 2.22 3.33 4.44 5.56 7.78 10.00 12.22 14.44 16.67 และ 30.00 ไมโครโมลาร์) ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่า อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงของสารละลายฟีนอลเรดเข้มข้น 0 – 5.56 ไมโคลโมลาร์ ซึ่งความเข้มข้นของฟีนอลเรดที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 5.56 ไมโคลโมลาร์ เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่สามารถผลิตโบรโมฟีนอลบลูได้สูงสุด โดยเมื่อใช้ฟีนอลเรดมากกว่า 5.56 ไมโคลโมลาร์ขึ้นไป อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่ ผลแสดงในรูปที่ 4.1 และตารางที่ ก.3 ดังนั้นความเข้มข้นของฟีนอลเรดที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล คือ ไม่ควรเกิน 5.56 ไมโคลโมลาร์



รูปที่ 4.1 ผลของความเข้มข้นของฟีนอลเรดต่อปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยใช้ฟีนอลเรดเข้มข้น 0 – 30 ไมโคลโมลาร์ และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

4.2.2 การศึกษาความเข้มข้นของโปตัสเซียมโบร์ไมด์ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

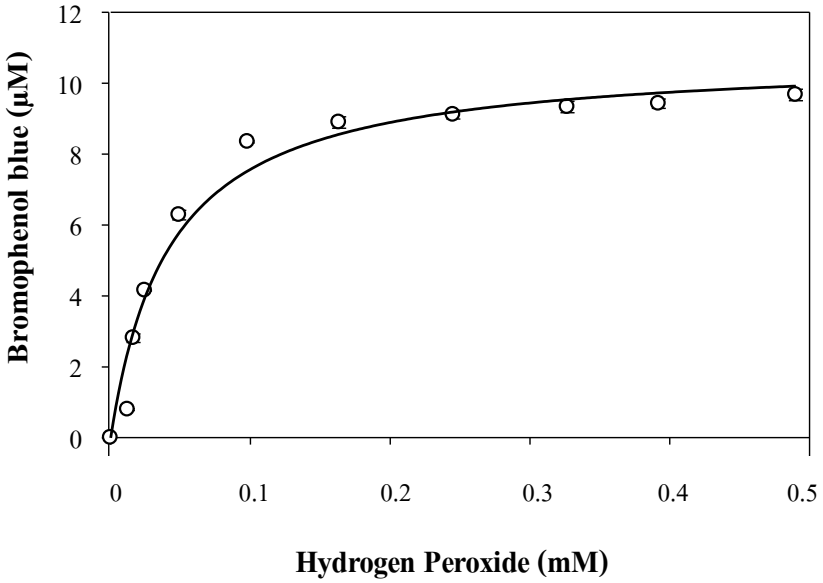
จากการศึกษาความเข้มข้นของโปตัสเซียมโบร์ไมด์ (0 0.22 0.44 0.67 0.89 1.11 1.56 2.00 2.44 2.89 3.33 และ 6.00 มิลลิโมลาร์) ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่า อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงของสารละลายโปตัสเซียมโบร์ไมด์เข้มข้น 0 – 1.11 มิลลิโมลาร์ ซึ่งความเข้มข้นของโปตัสเซียมโบร์ไมด์ ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 1.11 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่สามารถผลิตโบรโมฟีนอลบลูได้สูงสุด โดยเมื่อใช้โปตัสเซียมโบร์ไมด์ มากกว่า 1.11 มิลลิโมลาร์ขึ้นไป อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่ ผลแสดงในรูปที่ 4.2 และตารางที่ ก.4 ดังนั้นความเข้มข้นของโปตัสเซียมโบร์ไมด์ที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล คือ ไม่ควรเกิน 1.11 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 4.2 ผลของความเข้มข้นของโปตัสเซียมโบร์ไมด์ต่อปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยใช้โปตัสเซียมโบร์ไมด์ เข้มข้น 0 – 6.00 มิลลิโมลาร์ และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

4.2.3 การศึกษาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

จากการศึกษาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (0 0.012 0.016 0.025 0.049 0.098 0.163 0.245 0.327 0.392 และ 0.490 มิลลิโมลาร์) ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่า อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 0 – 0.098 มิลลิโมลาร์ ซึ่งความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 0.098 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่สามารถผลิตโบรโมฟีนอลบลูได้สูงสุด โดยเมื่อใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากกว่า 0.098 มิลลิโมลาร์ขึ้นไป อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่ ผลแสดงในรูปที่ 4.3 และตารางที่ ก.5 ดังนั้นความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล คือ ไม่ควรเกิน 0.098 มิลลิโมลาร์

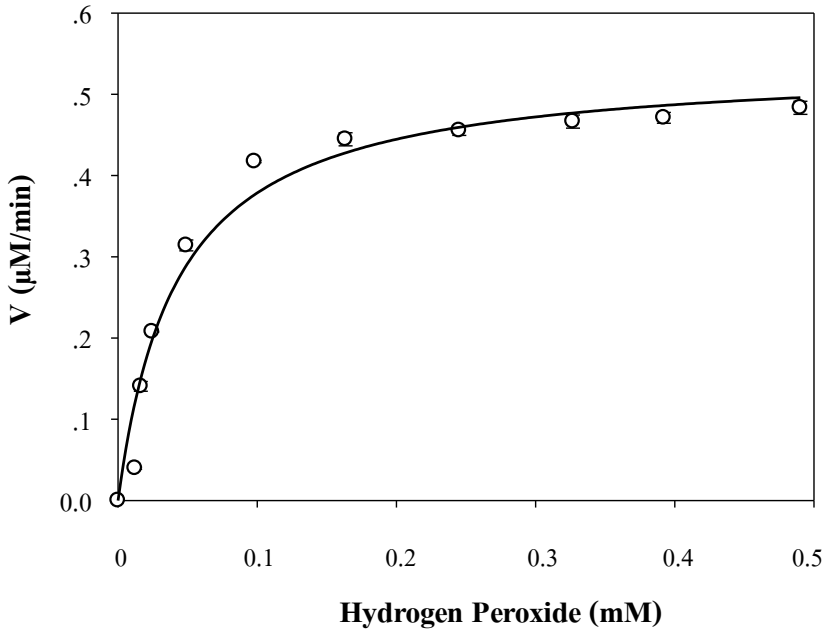


รูปที่ 4.3 ผลของความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 0 – 0.98 มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิลิตร และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

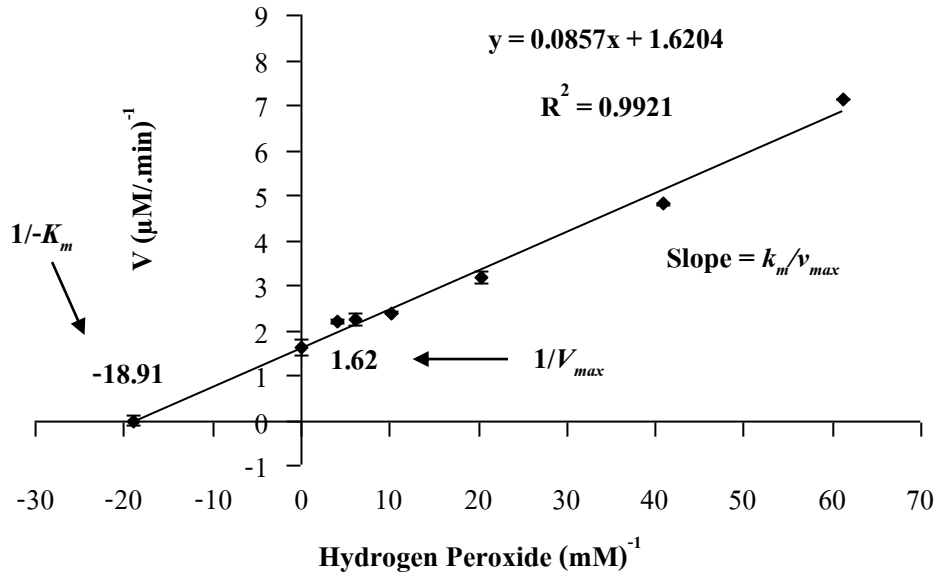
4.3 การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

จากการศึกษาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (0 0.012 0.016 0.025 0.049 0.098 0.163 0.245 0.327 0.392 และ 0.490 มิลลิโมลาร์) ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่า เอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาอยู่ในช่วงความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0 – 0.049 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นช่วงที่ปฏิกิริยาของเอนไซม์เกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอ โดยได้กราฟเป็นเส้นตรง ผลแสดงในรูปที่ 4.4 และตารางที่ ก.6 และเมื่อนำไปสร้างกราฟระหว่างค่าส่วนกลับของอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา (1/V) และค่าส่วนกลับของความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (1/[S]) ซึ่งเรียกว่า Lineweaver-Burk plot จะสามารถคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} ได้จากจุดตัดบนแกนตั้งหรือแกนนอน และความชัน (slope) ของเส้นตรง ซึ่งจากกราฟพบว่าการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส จากสาหร่ายทะเลโดยมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นซับสเตรตมีค่าอัตราความเร็วสูงสุด (V_{max}) เท่ากับ 0.617 ไมโคลโมลาร์ต่อนาที และมีค่าคงที่ของมิเคลิส (K_m) เท่ากับ 0.053 มิลลิโมลาร์ ผลแสดงในรูปที่ 4.5 ซึ่งค่า V_{max} เป็นค่าที่แสดงให้เห็นถึงอัตราความเร็วในการสลายตัวของ enzyme substrate complex ได้เป็นเอนไซม์กับผลิตภัณฑ์หรือกลับไปเป็นเอนไซม์กับซับสเตรต ส่วนค่า K_m เป็นค่าที่แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์สามารถ

จับกับซับสเตรตได้ดีเพียงใด โดยถ้าค่า K_m น้อยเอนไซม์จะจับกับซับสเตรตได้ดี ซึ่งจากการทดลองพบว่าเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลสามารถจับกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ดี เนื่องจากมีค่า K_m น้อย แสดงว่าสารประกอบอื่นๆ ที่ปะปนอยู่ในเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากสาหร่ายสายพันธุ์ *Gracilaria changii* (สาหร่ายเขากวาง) ซึ่งเป็น crude enzyme ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ และจากงานวิจัยของ Kamenarska และคณะ (2007) ซึ่งได้ศึกษาการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากสาหร่ายสีแดงสายพันธุ์ *Kappaphycus alvarezii* พบว่า เมื่อใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นซับสเตรตเอนไซม์มีค่า K_m เท่ากับ 0.085 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า K_m ที่ได้จากการทดลอง



รูปที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่ออัตราการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 0 – 0.49 มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิลิตร และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร



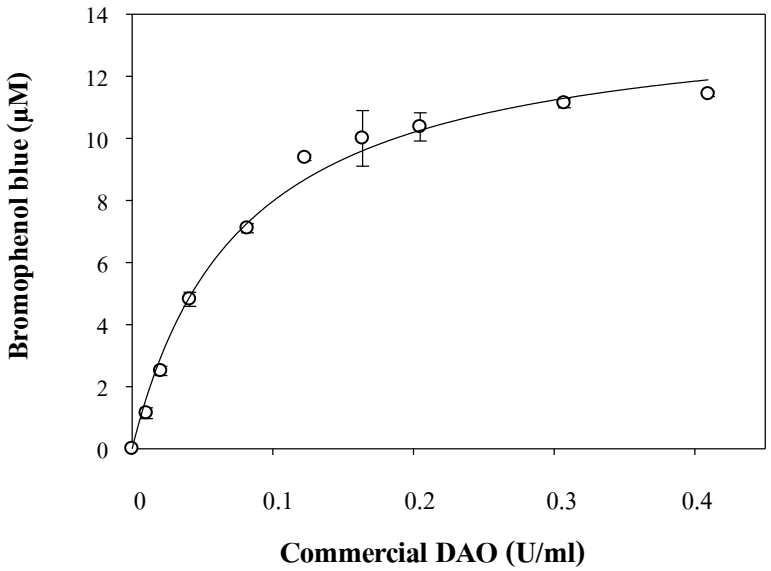
รูปที่ 4.5 การหาค่า K_m และ V_{max}ของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นซับสเตรต โดยคำนวณจาก Lineweaver-Burk plot

4.4 การศึกษาปริมาณของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

4.4.1 การศึกษาปริมาณของเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay

จากการศึกษาปริมาณของเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า (0 0.01 0.02 0.04 0.08 0.12 0.16 0.20, 0.31 และ 0.41 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ร่วมกับเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงของเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดส 0 – 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งปริมาณของเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน คือ เอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าที่มีกิจกรรม 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเป็นปริมาณเอนไซม์ที่สามารถผลิตโบรโมฟีนอลบลูได้สูงสุด โดยเมื่อใช้เอนไซม์มากกว่า 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตรขึ้นไป อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่ ผลแสดงในรูปที่ 4.6 และตารางที่ ก.7

ดังนั้นปริมาณของเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ ไม่ควรเกิน 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เพื่อเป็นการประหยัดปริมาณของเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าที่ใช้ (1 ยูนิต (U) ของไดเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณไดเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมล ต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7.2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

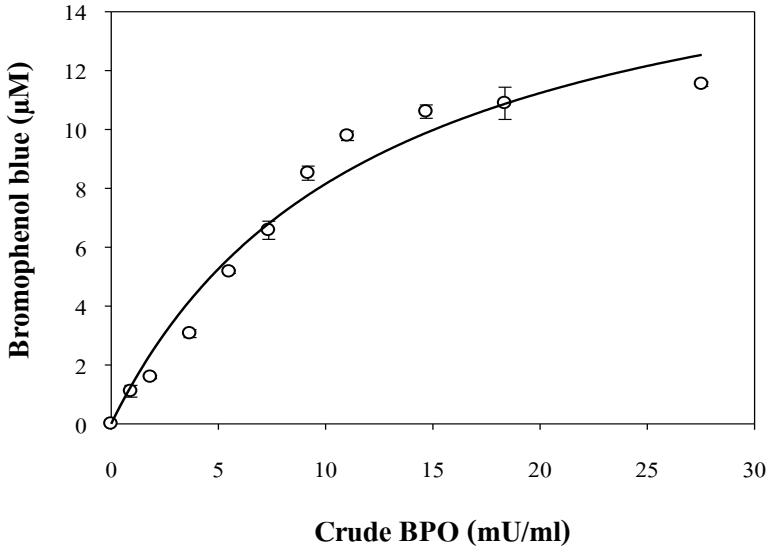


รูปที่ 4.6 ผลของปริมาณไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าต่อปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา enzyme coupling assay ร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล ในช่วงความเข้มข้น 0 – 0.41 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

4.4.2 การศึกษาปริมาณของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay

จากการศึกษาปริมาณของโบรโมเปอร์ออกซิเดส (0 0.92 1.84 3.67 5.51 7.34 9.18 11.02 14.69 18.36 และ 27.54 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร) ที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ร่วมกับไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า พบว่า อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส 0 – 11.02 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งปริมาณของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน คือเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสที่มีกิจกรรม 11.02 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเป็นปริมาณเอนไซม์ที่

สามารถผลิตโบรโมฟีนอลบลูได้สูงสุด ซึ่งเมื่อใช้เอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสมากกว่า 11.02 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตรขึ้นไป อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่ ผลแสดงในรูปที่ 4.7 และตารางที่ ก.8 ดังนั้นปริมาณของเอนไซม์ โบรโมเปอร์ออกซิเดสที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ ไม่ควรเกิน 11.02 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เพื่อเป็นการประหยัดปริมาณของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ใช้ (1 ยูนิต (U) ของไดเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณไดเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมล ต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7.2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

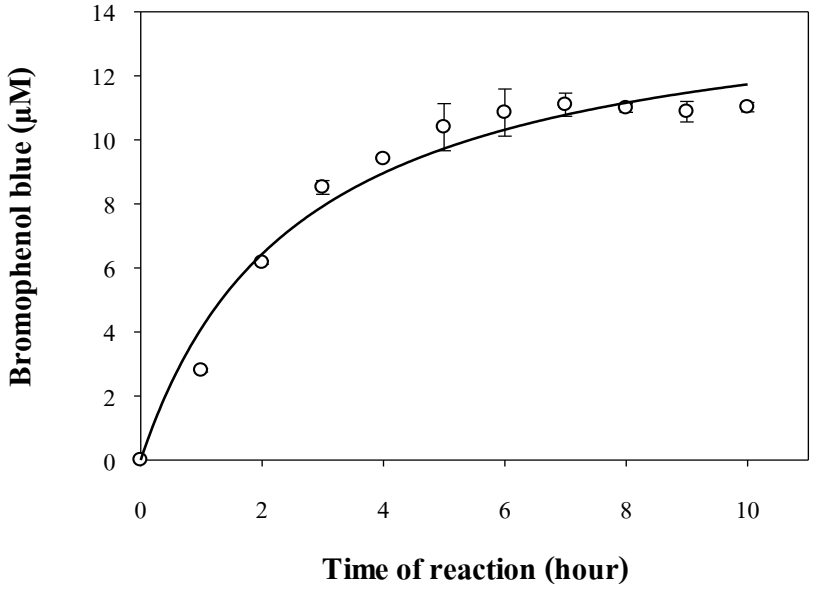


รูปที่ 4.7 ผลของปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลต่อปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา enzyme coupling assay ร่วมกับไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า ในช่วงความเข้มข้น 0 – 27.54 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

4.5 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

จากการศึกษาระยะเวลา (1 2 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 ชั่วโมง) ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่า อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงเวลา 0-3

ชั่วโมง ซึ่งระยะเวลาในการบ่มสารละลายปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนที่เหมาะสม คือ ช่วงเวลา 3 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่เอนไซม์สามารถผลิตโบรโมฟีนอลบลูได้สูงสุด โดยเมื่อบ่มสารละลายปฏิกิริยามากกว่า 3 ชั่วโมงขึ้นไป อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่ ผลแสดงในรูปที่ 4.8 และตารางที่ ก.9 ดังนั้นระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลที่เหมาะสม คือ ไม่ควรเกิน 3 ชั่วโมง เพื่อเป็นการประหยัดเวลา และได้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.1-1.0

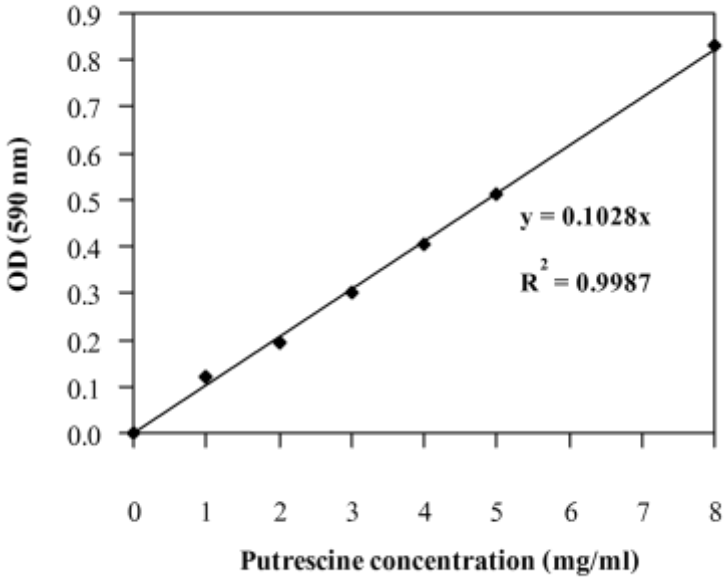


รูปที่ 4.8 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในบ่มสารละลายปฏิกิริยาต่อปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้น จากปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล ในช่วงระยะเวลา 0 – 10 ชั่วโมง โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

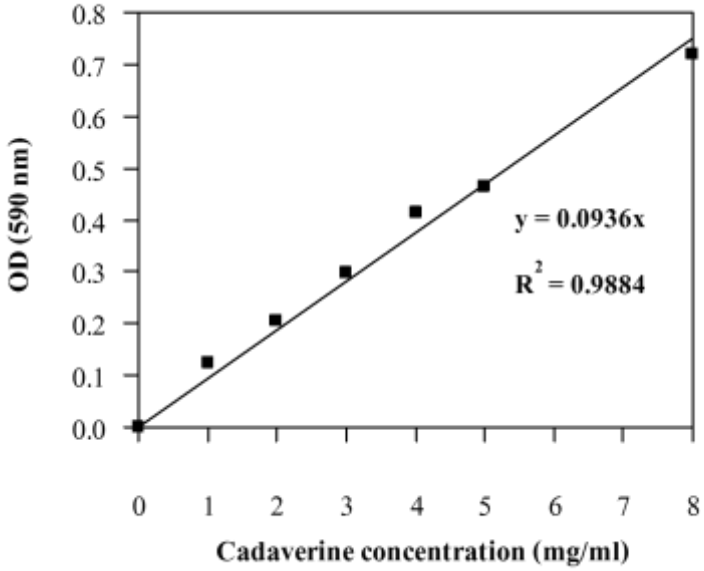
4.6 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบเอมีนชนิดต่าง ๆ สำหรับการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมักดอง ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

จากการศึกษาความสามารถในการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนมาตรฐานได้แก่ putrescine cadaverine histamine tryptamine tyramine และ ß - phenylethylamine ด้วยปฏิกิริยา Enzyme coupling assay

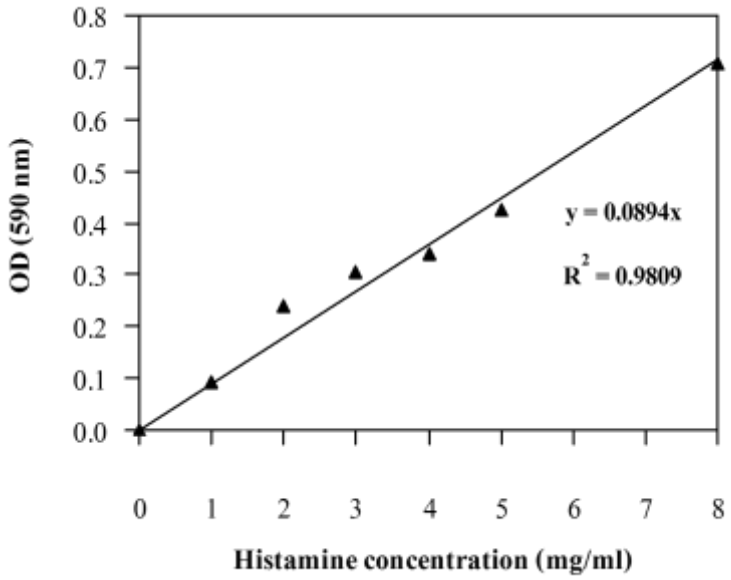
ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่า สามารถนำไปสร้างเป็นกราฟมาตรฐานของสารประกอบเอมีนชนิดต่างๆ เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างอาหารหมักดอง แสดงดังรูปที่ 4.9 4.10 4.11 4.12 4.13 4.14 และ 4.15 และตารางที่ ก.10 ก.11 ก.12 ก.13 ก.14 และก.15 ซึ่งสามารถตรวจวัดสารประกอบเอมีนชนิด putrescine cadaverine และ histamine ได้ในช่วงความเข้มข้น 0 – 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารประกอบเอมีนชนิด tryptamine ในช่วงความเข้มข้น 0 – 14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารประกอบเอมีนชนิด tyramine ในช่วงความเข้มข้น 0 – 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารประกอบเอมีนชนิด ß - phenylethylamine ในช่วงความเข้มข้น 0 – 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสมการเส้นตรง และค่า R^2 ที่ได้สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.2 ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมจากงานวิจัยของรุ่งนภา ช่อทองดี (2549) ที่ได้ศึกษาการตรวจวัดสารประกอบเอมีนด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่าสามารถสร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบเอมีนได้เพียง 3 ชนิด เท่านั้นคือ putrescine cadaverine และ histamine โดยสามารถวัดได้ในช่วงความเข้มข้น 0 - 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าในงานวิจัยนี้สามารถพัฒนาการตรวจวัดสารประกอบเอมีน โดยสามารถเพิ่มความจำเพาะของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล ซึ่งสามารถตรวจวัดสารประกอบเอมีนได้เพิ่มอีก 3 ชนิด คือ tryptamine tyramine และ ß - phenylethylamine ทั้งนี้อาจเกิดขึ้นเนื่องจากมีการปรับสัดส่วนของเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล รวมทั้งสัดส่วนของสารละลายปฏิกิริยาอื่นๆ ได้แก่ ฟีนอลเรด และโปตัสเซียมโบร์ไมด์ ให้มีปริมาณที่เหมาะสมกับการเกิดปฏิกิริยา และมีการเพิ่มระยะเวลาในการบ่มสารละลายปฏิกิริยาจึงอาจทำให้ปฏิกิกิริยาเกิดได้ดีขึ้น ซึ่งการตรวจวัดสารประกอบเอมีนที่ได้พัฒนาขึ้นนี้จัดเป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบ semi - quantitative คือ สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบเอมีนชนิดต่างๆในอาหารหมักดองได้ เมื่อทราบชนิดของสารประกอบเอมีนที่เป็นองค์ประกอบในอาหารหมักดองแต่ละประเภท โดยคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของสารประกอบเอมีนชนิดต่างๆ ซึ่งวิธีนี้ไม่สามารถระบุชนิดของสารประกอบเอมีนที่อยู่ในอาหารหมักดองได้ เนื่องจากเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับสารประกอบเอมีนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาชนิดใดชนิดหนึ่ง ดังนั้นเพื่อความถูกต้องของข้อมูลที่วิเคราะห์ได้ จากการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมักดอง ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงชนิดของสารประกอบเอมีนหลักที่พบในอาหารหมักดองแต่ละประเภทก่อนที่จะนำมาคำนวณหาปริมาณของสารประกอบเอมีน โดยใช้กราฟมาตรฐานของสารประกอบเอมีนชนิดนั้นๆ



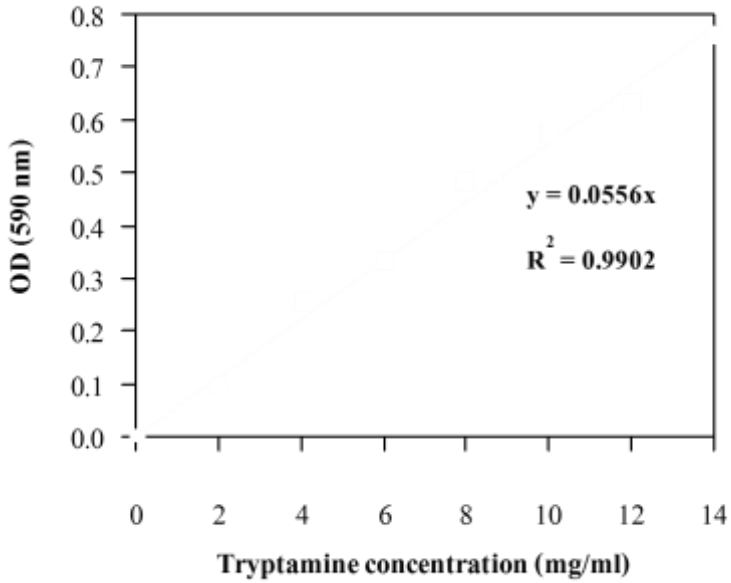
รูปที่ 4.9 กราฟมาตรฐาน putrescine ในช่วงความเข้มข้น 0–8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร



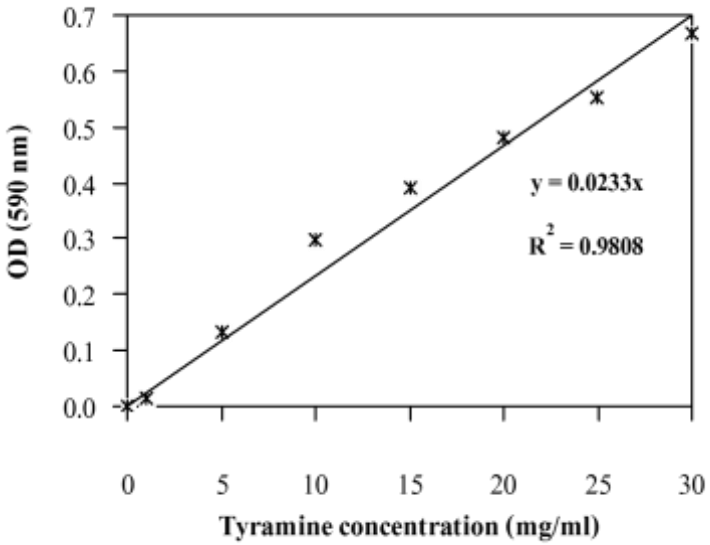
รูปที่ 4.10 กราฟมาตรฐาน cadaverine ในช่วงความเข้มข้น 0–8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร



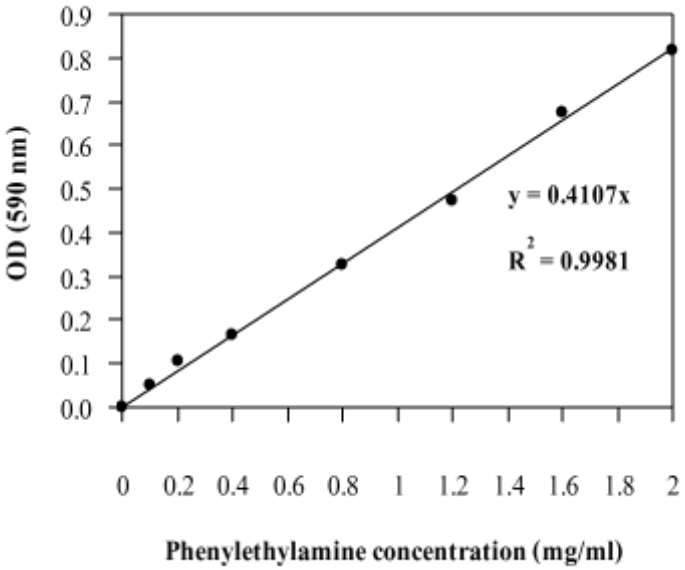
รูปที่ 4.11 กราฟมาตรฐาน histamine ในช่วงความเข้มข้น 0–8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร



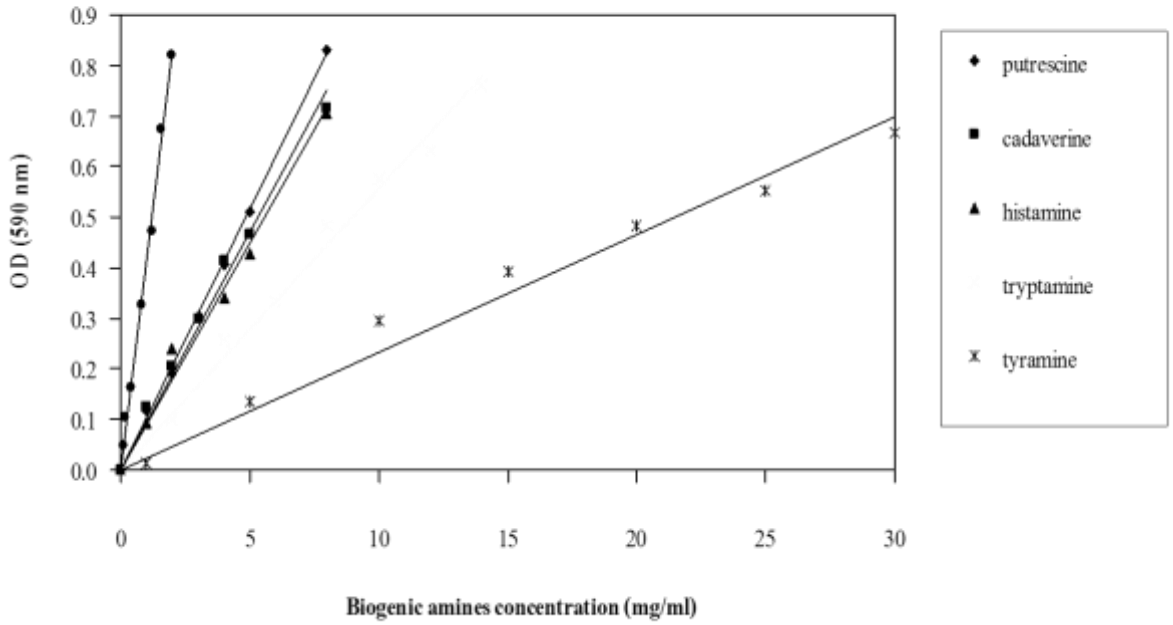
รูปที่ 4.12 กราฟมาตรฐาน tryptamine ในช่วงความเข้มข้น 0–14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร



รูปที่ 4.13 กราฟมาตรฐาน tyramine ในช่วงความเข้มข้น 0–30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร



รูปที่ 4.14 กราฟมาตรฐาน ß - phenylethylamine ในช่วงความเข้มข้น 0–8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร



รูปที่ 4.15 กราฟมาตรฐานสารประกอบเอมีน 6 ชนิด ได้แก่ putrescine cadaverine histamine tryptamine tyramine และ ß - phenylethylamine ในช่วงความเข้มข้น 0–30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

ตารางที่ 4.2 สมการเส้นตรง และค่า R^2 ของกราฟมาตรฐานของสารประกอบเอมีน 6 ชนิด ได้แก่ putrescine cadaverine histamine tryptamine tyramine และ ß-phenylethylamine โดยทำการตรวจวิเคราะห์ ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

Biogenic amines	Equation	R^2
putrescine	y = 0.1028x	0.9987
cadaverine	y = 0.0936x	0.9884
histamine	y = 0.0894x	0.9809
tryptamine	y = 0.0556x	0.9902
tyramine	y = 0.0233x	0.9808
ß -phenylethylamine	y = 0.4107x	0.9981

4.7 การพัฒนาการสกัดสารประกอบเอมีนจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง

4.7.1 การศึกษาชนิดของกรดที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดอง

จากการทดลองชนิดของกรด ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 4 โมลาร์ กรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 0.6 1.5 และ 3 โมลาร์ ที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการสกัดสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างอาหารหมักดอง ได้แก่ แหนมหมู ไส้กรอกเปรี้ยว ข้าวหมาก ปลาร้า และหอยดอง โดยทำการวิเคราะห์ผลจากค่าสารประกอบเอมีนที่ตรวจวัดได้จากสารสกัด แสดงดังตารางที่ 4.3 พบว่า ในการสกัดแหนมหมูและไส้กรอกเปรี้ยว ด้วยกรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 3 โมลาร์ สามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกมามากที่สุด รองลงมา คือ กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 4 โมลาร์ กรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 1.5 และ 0.6 โมลาร์ ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.16 และ 4.17 และตารางที่ ก.16 และ ก.17 จากการสกัดข้าวหมาก พบว่า เมื่อสกัดด้วยกรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 1.5 โมลาร์ สามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกมามากที่สุด รองลงมา คือ กรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 3 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 4 โมลาร์ กรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 0.6 โมลาร์ ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.18 และตารางที่ ก.18 จากการสกัดปลาร้า พบว่า เมื่อสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 4 โมลาร์ สามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกมามากที่สุด รองลงมา คือ กรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 3 โมลาร์ และกรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 0.6 และ 1.5 โมลาร์ ซึ่งมีความสามารถในการสกัดไม่แตกต่างกัน ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.19 และตารางที่ ก.19 และจากการสกัดหอยดอง พบว่า เมื่อสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 4 โมลาร์ สามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกมามากที่สุด รองลงมา คือ กรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 0.6 1.5 และ 3 โมลาร์ ซึ่งมีความสามารถในการสกัดไม่แตกต่างกัน ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.20 และตารางที่ ก.20

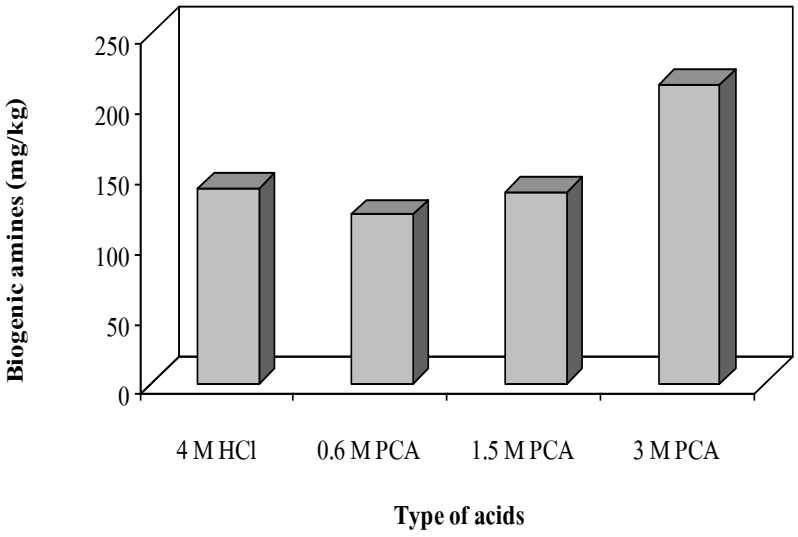
ดังนั้น กรดที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารประกอบเอมีน โดยเป็นกรดที่สามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกจากตัวอย่างออกมาได้มากที่สุด คือ กรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 3 โมลาร์ เป็นกรดที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบเอมีนจากแหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยหลายงานที่ได้ทำการศึกษาสารประกอบเอมีนในผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์ โดยการสกัดด้วยกรดเปอร์คลอริก ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Latorre-Moratalla และคณะ (2008) ได้ทำการสกัดตัวอย่างไส้กรอกหมักของประเทศต่างๆในแถบทวีปยุโรป โดยใช้กรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถวิเคราะห์สารประกอบเอมีนได้มากที่สุดจากตัวอย่างไส้กรอกหมักของประเทศสเปน ปริมาณเท่ากับ 1,467.61 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตัวอย่างแห้ง นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ

Ansorena และคณะ (2002) ได้ทำการสกัดตัวอย่างไส้กรอกหมักของยุโรปด้วยกรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ โดยสามารถวิเคราะห์สารประกอบเอมีนได้มากที่สุดในไส้กรอกหมักของประเทศเบลเยียม ปริมาณเท่ากับ 409 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของตัวอย่าง และมีงานวิจัยของ Limsuwan (2004) ได้ทำการศึกษาชนิดของกรดที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบเอมีนในตัวอย่างแหนม พบว่า การสกัดแหนมด้วยกรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการสกัด (% recover) สารประกอบเอมีนชนิด tryptamine phenlethylamine putrescine cadaverine และ tyramine ได้มากกว่าการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.1 นอร์มอล และกรดไตรคลอโรอะซิติก เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดลองกรดที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบเอมีนจากข้าวหมาก คือ กรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 1.5 โมลาร์ และกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นกรดที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบเอมีนจากปลาร้า และหอยดอง โดยเมื่อพิจารณาจากงานวิจัยของรุ่งนภา ช่อทองดี (2549) ที่ได้ทำการศึกษากรดที่เหมาะสมในการสกัดส้มฟัก ซึ่งเป็นอาหารหมักดองประเภทปลา พบว่ากรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 4 โมลาร์ ก็เป็นกรดที่สามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกจากตัวอย่างได้มากที่สุด ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่ากรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นกรดที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบเอมีนจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองประเภทเนื้อปลา หรืออาหารทะเลชนิดอื่นๆ และจากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า ชนิดและความเข้มข้นของกรดที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดอง ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างที่นำมาสกัดว่าเป็นอาหารหมักดองที่ผลิตจากวัตถุดิบประเภทใด เช่น ประเภทเนื้อสัตว์ เนื้อปลา หรือพืชต่างๆ เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้แต่ละชนิดมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน ดังนั้น การสกัดสารประกอบเอมีนที่อยู่ภายในจึงต้องใช้สารละลายในการสกัดที่แตกต่างกันด้วย

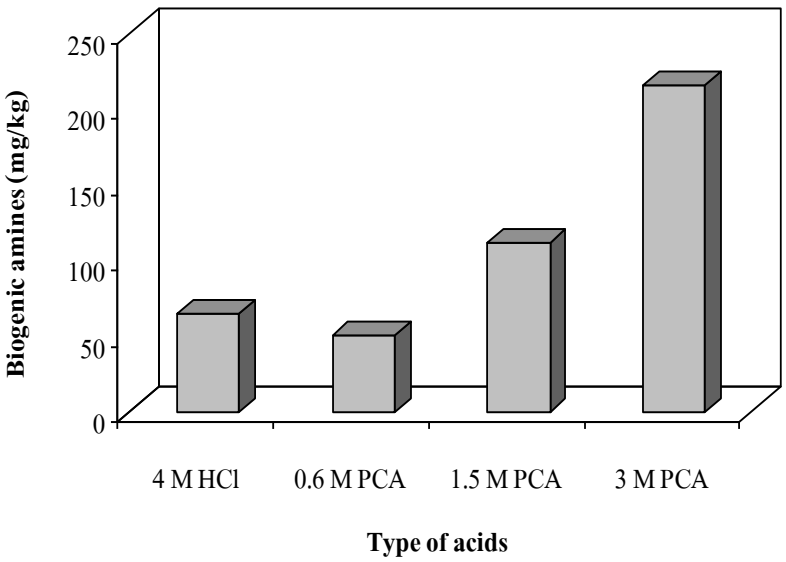
ตารางที่ 4.3 ผลของชนิดของกรดที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในอาหารหมักดอง ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

ตัวอย่าง	สารประกอบเอมีน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)			
	4 M HCl	0.6 M PCA	1.5 M PCA	3 M PCA
แหนมหมู	139.20 ± 6.19^{b}	120.14 ± 6.19^{c}	136.15 ± 8.94^{ab}	212.39 ± 3.44^{a}
ไส้กรอกเปรี้ยว	64.14 ± 2.11^{c}	50.65 ± 1.01^{d}	111.28 ± 2.02^{b}	215.81 ± 8.05^{a}
ข้าวหมาก	88.85 ± 6.42^{c}	38.91 ± 3.67^{d}	148.51 ± 0.92^{a}	124.51 ± 11.01^{b}
ปลาร้า	360.57 ± 13.45^{a}	204.06 ± 2.45^{c}	198.01 ± 13.45^{c}	255.35 ± 10.32^{b}
หอยดอง	286.42 ± 22.93^{a}	219.41 ± 16.81^{b}	225.90 ± 10.70^{b}	210.12 ± 22.01^{b}

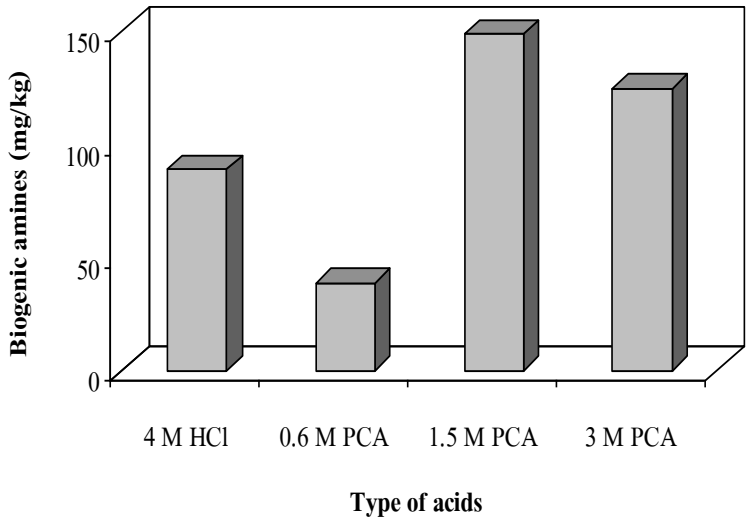
หมายเหตุ : ผลการทดลองเท่ากับ mean ± SD n = 2 และ ^{abcd} หมายถึง ค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล โดยใช้ ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในตัวอย่างแต่ละชนิด โดยใช้การทดสอบแบบ Duncan Test



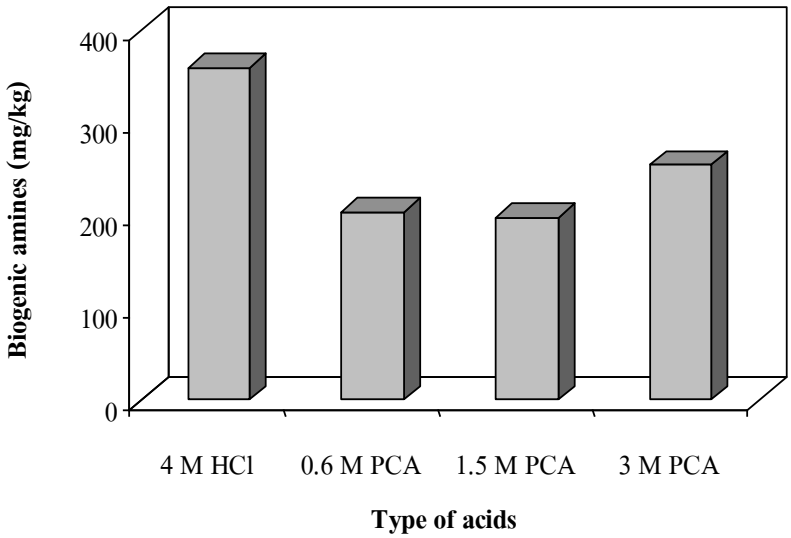
รูปที่ 4.16 ผลของชนิดของกรดที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่างแหนมหมู ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร



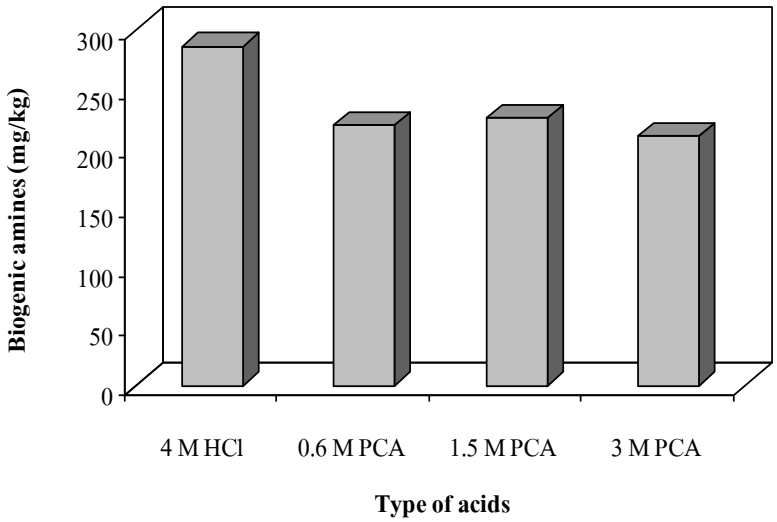
รูปที่ 4.17 ผลของชนิดของกรดที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่างไส้กรอกเปรี้ยว ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร



รูปที่ 4.18 ผลของชนิดของกรดที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่างข้าวหมาก ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร



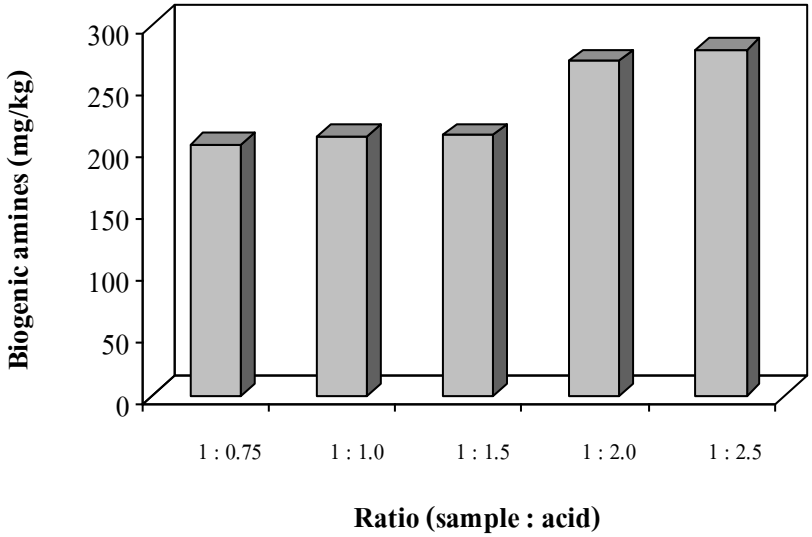
รูปที่ 4.19 ผลของชนิดของกรดที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่างปลาร้า ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร



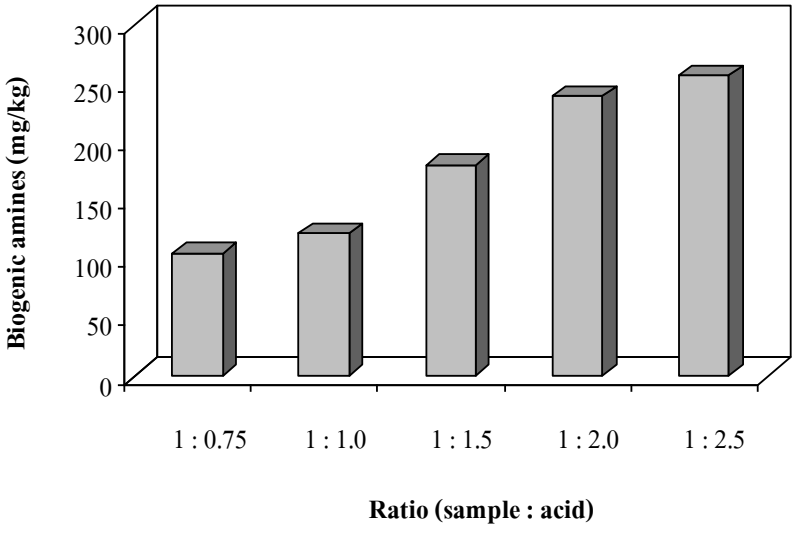
รูปที่ 4.20 ผลของชนิดของกรดที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่างหอยดอง ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

4.7.2 การศึกษาอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างและกรดที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดอง

จากการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการสกัดระหว่างตัวอย่างอาหารหมักดอง ได้แก่ แหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของอาหารหมักดองชนิดอื่นๆ กับกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 4 โมลาร์ ที่ใช้เป็นสารละลายสกัด ในอัตราส่วน 1 : 0.75 1 : 1 1 : 1.5 1 : 2 และ1 : 2.5 พบว่า การสกัดที่ใช้อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับสารละลายสกัด 1 : 2 และ 1 : 2.5 สามารถสกัดสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างแหนมหมูออกมามากที่สุด รองลงมาคือ 1 : 0.75 1 : 1 และ 1 : 1.5 ซึ่งสามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกมาใกล้เคียงกัน ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.21 และตาราง ก.21 ส่วนในการสกัดสารประกอบเอมีนจากไส้กรอกเปรี้ยว พบว่า การสกัดในอัตราส่วน1 : 2 และ 1 : 2.5 สามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกมามากที่สุด รองลงมากคือ 1 : 1.5 และการสกัดในอัตราส่วน 1 : 0.75 และ 1 : 1 สามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกจากตัวอย่างได้น้อยที่สุด ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.22 และตาราง ก.21 ดังนั้นในการสกัดสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างแหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว ควรใช้ปริมาณตัวอย่างต่อสารละลายสกัด ในอัตราส่วน 1 : 2 เนื่องจากสามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกจากตัวอย่างได้มากที่สุด และใช้ปริมาตรของสารละลายสกัดน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดในอัตราส่วน 1 : 2.5 ซึ่งสามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกมาได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน จากการทดลองสรุปได้ว่า อัตราส่วนของปริมาณตัวอย่างต่อสารละลายกรดที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่วิเคราะห์ได้ โดยปริมาตรของกรดที่ใช้จะส่งผลต่อความหนืดในขณะทำการสกัด ซึ่งถ้าใช้กรดปริมาณน้อยเกินไป สารสกัดจะมีความหนืดสูง ทำให้สกัดได้ยาก สารประกอบเอมีนจึงออกมาน้อย แต่ถ้าใช้กรดปริมาณมากเกินไป อาจจะไม่มีผลต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่สกัดได้ อีกทั้งยังเป็นการสิ้นเปลืองสารละลายกรดที่ใช้อีกด้วย ซึ่งสังเกตได้จากผลการทดลองที่เมื่อสกัดด้วยอัตราส่วนของตัวอย่างต่อสารละลายกรด 1 : 2 สามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกจากตัวอย่างได้ในปริมาณไม่แตกต่างจากการสกัดด้วยอัตราส่วน 1 : 2.5 ดังนั้น วิธีการสกัดสารประกอบเอมีนออกจากตัวอย่างอาหารหมักดองให้มีประสิทธิภาพ ควรต้องใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาณตัวอย่างและสารละลายสกัดที่เหมาะสมไม่น้อยหรือมากจนเกินไป ซึ่งถ้าการสกัดมีประสิทธิภาพสูง เมื่อเวลานำสารสกัดไปวิเคราะห์สารประกอบเอมีนก็จะทำให้ได้ผลการทดลองที่มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น



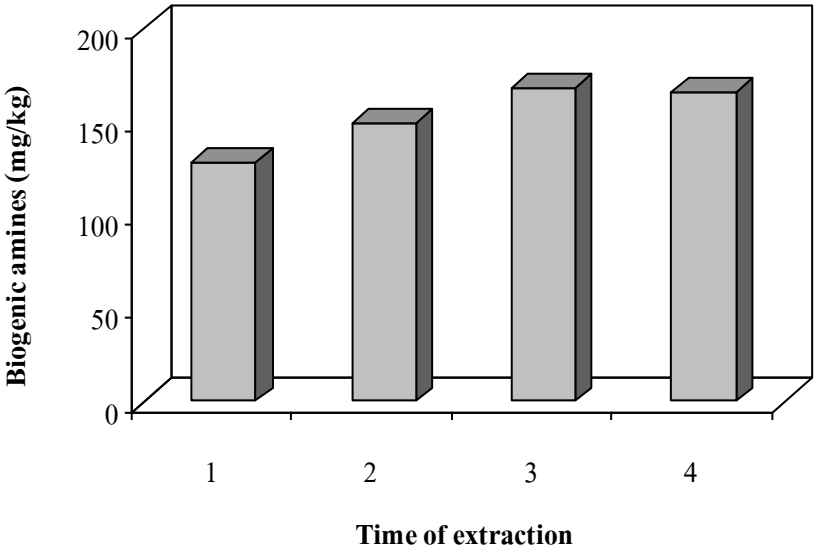
รูปที่ 4.21 ผลของอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างและกรดที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่างแหนมหมู ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร



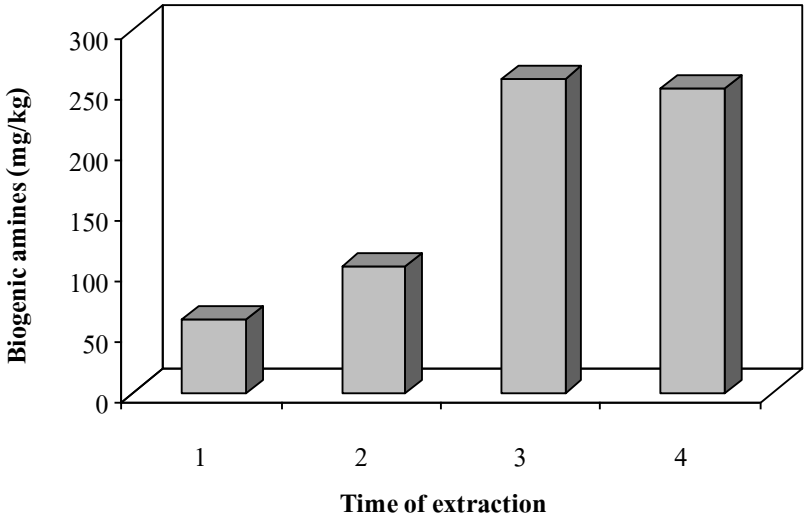
รูปที่ 4.22 ผลของอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างและกรดที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่างไส้กรอกเปรี้ยว ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

4.7.3 การศึกษาจำนวนครั้งในการสกัดที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดอง

จากการทดลองจำนวนครั้งในการสกัด ได้แก่ การสกัด 1 2 3 และ 4 ครั้งที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดอง ได้แก่ แหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว ซึ่งใช้เป็นตัวแทนอาหารหมักดองชนิดอื่นๆ พบว่า เมื่อทำการสกัดสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างแหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว ทั้งหมด 3 และ 4 ครั้ง สามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกมาได้มากที่สุด รองลงมาคือการสกัด 2 ครั้ง และการสกัดเพียง 1 ครั้ง สามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกจากตัวอย่างทั้งสองได้น้อยที่สุด ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.23 และ 4.24 และตาราง ก.22 ดังนั้น ในการสกัดสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างอาหารหมักดอง ควรทำการสกัดทั้งหมด 3 ครั้ง เนื่องจากสามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกจากตัวอย่างได้มากที่สุด และ สิ้นเปลืองเวลา และสารละลายสกัดน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการสกัด 4 ครั้ง ที่สามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกมาได้ไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Iucci และคณะ (2007) ซึ่งได้ทำการวัดปริมาณสารประกอบเอมีนในตัวอย่างไส้กรอกหมักแบบแห้ง โดยการสกัดตัวอย่างด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ทั้งหมด 3 ครั้ง และจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าจำนวนซ้ำที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่วิเคราะห์ได้ โดยในการสกัดสารประกอบเอมีนในแต่ละครั้งอาจจะไม่สามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกมาได้หมดภายในครั้งเดียว ดังนั้น การใช้การสกัดตัวอย่างซ้ำจึงเป็นการช่วยทำให้สารประกอบเอมีนที่เหลืออยู่ในตัวอย่างออกมาได้มากยิ่งขึ้น ซึ่งจำนวนครั้งที่ใช้ในการสกัดควรมีความเหมาะสมไม่มากหรือน้อยจนเกินไป โดยถ้าทำการสกัดเพียงครั้งเดียวหรือน้อยครั้งเกินไป ปริมาณสารประกอบเอมีนที่วิเคราะห์ได้อาจน้อยกว่าความเป็นจริง เนื่องจากไม่สามารถสกัดสารประกอบเอมีนออกมาได้หมด แต่ในขณะที่ถ้าใช้การสกัดซ้ำหลายครั้งจนเกินไป ก็อาจจะไม่มีผลต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่สกัดออกมาได้ ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองเวลา และปริมาณของสารละลายกรดที่ใช้ อีกทั้งยังทำให้การวิเคราะห์สารประกอบเอมีนเป็นไปได้ยาก เนื่องจากปริมาณกรดที่มากเกินไปจะไปเจือจางสารประกอบเอมีนที่สกัดได้ ทำให้ต้องใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์ที่มีความไว (sensitivity) สูงถึงจะวิเคราะห์ได้



รูปที่ 4.23 ผลของจำนวนครั้งที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่างแหนมหมู ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร



รูปที่ 4.24 ผลของจำนวนครั้งที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่างไส้กรอกเปรี้ยว ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

4.7.4 การสกัดและการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดอง

จากการสกัดสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างอาหารหมักดอง ได้แก่ แหนมหมู ไส้กรอกเปรี้ยว ข้าวหมาก ปลาร้า และหอยดอง ด้วยสารละลายกรดที่เหมาะสม คือ ในการสกัดสารประกอบเอมีนจากแหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว ใช้กรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 3 โมลาร์ สกัดสารประกอบเอมีนจากข้าวหมาก ใช้กรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 1.5 โมลาร์ และสกัดสารประกอบเอมีนจากปลาร้า และหอยดอง ใช้กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 4 โมลาร์ (จากผลการทดลองที่ 4.2.1) โดยในการสกัดใช้ปริมาณตัวอย่างและสารละลายสกัดในอัตรส่วน 1 : 2 (จากผลการทดลองที่ 4.2.2) และทำการสกัดทั้งหมด 3 ซ้ำ (จากผลการทดลองที่ 4.2.3) สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างอาหารหมักดองแต่ละชนิดแสดงดังตารางที่ 4.4 ซึ่งเมื่อนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบหาปริมาณสารประกอบเอมีนด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยคำนวณปริมาณของสารประกอบเอมีนจากกราฟมาตรฐานของ putrescine เนื่องจากสารประกอบเอมีนชนิดนี้พบมากในตัวอย่างอาหารหมักดองแต่ละชนิด และกราฟมาตรฐานของ putrescine ก็ใกล้เคียงกับกราฟมาตรฐานของ cadaverine และ histamine ค่อนข้างมาก ดังนั้นจึงเลือกใช้กราฟมาตรฐานของ putrescine มาคำนวณปริมาณสารประกอบเอมีนรวมในตัวอย่างอาหารหมักดอง ซึ่งจากการทดลอง พบว่า ตัวอย่างอาหารหมักดองแต่ละชนิดมีปริมาณสารประกอบเอมีนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือ ตัวอย่างปลาร้ามีปริมาณสารประกอบเอมีนสูงที่สุด รองลงมาคือตัวอย่างหอยดอง ไส้กรอกเปรี้ยว แหนมหมู ตามลำดับ และข้าวหมากมีปริมาณสารประกอบเอมีนน้อยที่สุด ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.5 และ ก.23 ซึ่งปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่างอาหารหมักดองแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับปริมาณโปรตีนในอาหาร คือถ้าอาหารมีปริมาณโปรตีนสูงก็สามารถสลายตัวได้เป็นกรดอะมิโนอิสระได้มาก ซึ่งกรดอะมิโนอิสระเป็นสารตั้งต้นในการเกิดสารประกอบเอมีน นอกจากนี้ปัจจัยอื่นๆที่ทำให้เกิดสารประกอบเอมีนในอาหารหมักดอง คือ ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารหมักดองที่สามารถผลิตเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส (decarboxylase - positive microorganisms) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเอมีน รวมทั้งปัจจัยในเรื่องของสภาวะของอาหารหมักดองที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย การสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส และการทำกิจกรรมของเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส (Silla, 1996) จากปัจจัยการเกิดสารประกอบเอมีนต่างๆ เหล่านี้ จะเห็นได้ว่าอาหารหมักดองที่มีวัตถุดิบและกระบวนการผลิต รวมทั้งการมีสุขลักษณะในการผลิตที่แตกต่างกัน จะส่งผลโดยตรงต่อปริมาณของสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้น ดังนั้นจึงทำให้อาหารหมักดองแต่ละชนิดมีปริมาณของสารประกอบเอมีนที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.4 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างอาหารหมักดองแต่ละชนิด

ตัวอย่าง	สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบเอมีน		
	ชนิดและความเข้มข้นของกรด	อัตราส่วนระหว่างอาหารหมักต่อกรด	จำนวนครั้งที่ใช้ในการสกัด
แหนมหมู	3 M PCA	1 : 2.0	3
ไส้กรอกเปรี้ยว	3 M PCA	1 : 2.0	3
ข้าวหมาก	1.5 M PCA	1 : 2.0[a]	3*
ปลาร้า	4 M HCl	1 : 2.0 [a]	3*
หอยดอง	4 M HCl	1 : 2.0 [a]	3*

หมายเหตุ : [a] หมายถึง อ้างอิงจากผลการทดลองของการสกัดแหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว

ตารางที่ 4.5 ปริมาณสารประกอบเอมีนที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารหมักดองชนิดต่าง ๆ ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

ตัวอย่าง	สารประกอบเอมีน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
แหนมหมู	247.41 ± 9.63^{c}
ไส้กรอกเปรี้ยว	204.28 ± 6.42^{d}
ข้าวหมาก	128.40 ± 11.01^{e}
ปลาร้า	346.30 ± 5.50^{a}
หอยดอง	284.05 ± 22.01^{b}

หมายเหตุ : ผลการทดลองเท่ากับ mean ± SD n = 2 และ [abcd] หมายถึง ค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล โดยใช้ ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้การทดสอบแบบ Duncan Test

4.7.5 การหาค่าเปอร์เซ็นต์การสกัดสารประกอบเอมีน (% recovery)

จากการวิเคราะห์หาค่าเปอร์เซ็นต์การสกัดสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างอาหารหมักดอง ได้แก่ แหนมหมู ไส้กรอกเปรี้ยว ข้าวหมาก ปลาร้า และหอยดอง จากการสกัดด้วยวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ พบว่า ในการสกัดตัวอย่างแหนมหมูมีค่าเปอร์เซ็นต์การสกัด putrscine และ cadaverine ไม่แตกต่างอย่างนัยสำคัญ คือมีค่าเท่ากับ 72.63 และ 68.30 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และมีค่าเปอร์เซ็นต์การสกัด histamine เท่ากับ 45.94 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่าสารประกอบเอมีนมาตรฐานทั้งสองชนิด เช่นเดียวกันกับสกัดสารประกอบเอมีนจากไส้กรอกเปรี้ยว คือ มีเปอร์เซ็นต์การสกัด putrscine และ cadaverine ไม่แตกต่างอย่างนัยสำคัญ คือ 76.49 และ 75.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่าเปอร์เซ็นต์การสกัด histamine เท่ากับ 55.59 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในการสกัดตัวอย่างข้าวหมากและปลาร้า มีแนวโน้มของค่าเปอร์เซ็นต์การสกัดที่เหมือนกัน คือ มีค่าเปอร์เซ็นต์การสกัด putrscine สูงสุด คือ 70.04 และ 80.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ cadaverine และ histamine ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การสกัดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือสำหรับข้าวหมาก เท่ากับ 52.99 และ 52.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนปลาร้า มีค่าเท่ากับ 60.68 และ 60.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในการสกัดหอยดอง พบว่า มีค่าเปอร์เซ็นต์การสกัดสารประกอบเอมีนทั้งสามชนิดแตกต่างกัน คือ มีค่าเปอร์เซ็นต์การสกัด putrecine สูงสุดเท่ากับ 74.51 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ cadaverine เท่ากับ 66.24 เปอร์เซ็นต์ และ histamine น้อยสุดเท่ากับ 38.03 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.6 และ ก.24

จากการทดลองหาค่าเปอร์เซ็นต์การสกัดสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างอาหารหมักดองแต่ละชนิด พบว่า กรดและวิธีการที่ใช้ในการสกัดสารประกอบเอมีน ซึ่งได้พัฒนาขึ้นมีประสิทธิในสกัดสารประกอบเอมีนชนิด putrescine มากที่สุด รองลงมาคือ cadaverine และ histamine ตามลำดับ โดยค่าเปอร์เซ็นต์การสกัด putrescine ของตัวอย่างทุกชนิดมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 74.80 เปอร์เซ็นต์ และค่าเปอร์เซ็นต์การสกัด cadaverine มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 64.65 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่ค่อนข้างสูง ส่วนค่าเปอร์เซ็นต์การสกัด histamine มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 50.60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นค่าที่ไม่สูงมากนัก ดังนั้นวิธีการสกัดสารประกอบเอมีนที่ได้พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในการสกัดสารประกอบเอมีนชนิด putrescine และ cadaverine จากตัวอย่างอาหารหมักดองได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ไม่เหมาะสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในการสกัดสารประกอบเอมีนชนิด histamine ทั้งนี้เนื่องจาก histamine ไม่ค่อยเสถียร โดยอาจเกิดการสลายตัวเมื่อโดนความร้อน เมื่อพิจารณาจากงานวิจัยที่ผ่านมาของรุ่งนภา ช่อทองดี (2546) ที่ได้ทำการศึกษาหาค่าเปอร์เซ็นต์การสกัดสารประกอบเอมีนชนิด cadaverine จากตัวอย่างส้มฟัก พบว่า มีค่าเปอร์เซ็นต์การสกัดเท่ากับ 79.85 เปอร์เซ็นต์ และในงานของ Limsuwan (2004) ได้ทำการหาค่าเปอร์เซ็นต์การสกัดสารประกอบเอมีนในตัวอย่างแหนมโดยใช้กรดไตรคลอโรอะซิติก เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ในการสกัด พบว่า มีค่าเปอร์เซ็นต์การสกัด

สารประกอบเอมีนชนิด tryptamine phenlethylamine putrescine cadaverine และ tyramine เท่ากับ 60.74 61.13 67.63 68.04 67.69 และ 71.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าเปอร์เซ็นต์ในการสกัดสารประกอบ เอมีนจากตัวอย่างอาหารหมักดอง มีค่าที่แตกต่างจากงานวิจัยนี้เล็กน้อย เนื่องจากในการทดลองมีความแตกต่างกันในเรื่องของชนิดของสารละลายสกัดที่ใช้ วิธีการสกัด และการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้น รวมทั้งตัวอย่างที่นำมาทดลอง ดังนั้นจึงทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การสกัดที่คำนวณได้มีค่าแตกต่างกันแล้วแต่สภาวะที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งจะเห็นได้จากในงานวิจัยที่พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การสกัดสารประกอบเอมีนชนิด putrescine cadaverine และ histamineจากตัวอย่างอาหารหมักดองแต่ละชนิดก็มีค่าแตกต่างกัน โดยค่าเปอร์เซ็นต์การสกัด putrescine สูงสุดพบในการสกัดตัวอย่างปลาร้า คือเท่ากับ 80.35 เปอร์เซ็นต์ ค่าเปอร์เซ็นต์การสกัด cadaverine สูงสุด พบในตัวอย่างไส้กรอกเปรี้ยว คือเท่ากับ 75.04 เปอร์เซ็นต์ และค่าเปอร์เซ็นต์การสกัด histamine สูงสุด พบในตัวอย่างปลาร้า คือเท่ากับ 60.63 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.6 ค่าเปอร์เซ็นต์การสกัดสารประกอบเอมีนชนิดต่าง ๆ (% recovery) ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

ตัวอย่าง	% Recovery		
	putrescine	cadaverine	histamine
แหนมหมู	72.63 ± 0.64^{a}	68.30 ± 4.94^{a}	45.94 ± 2.21^{b}
ไส้กรอกเปรี้ยว	76.49 ± 0.32^{a}	75.04 ± 1.06^{a}	55.59 ± 3.32^{b}
ข้าวหมาก	70.04 ± 0.00^{a}	52.99 ± 0.60^{b}	52.80 ± 3.16^{b}
ปลาร้า	80.35 ± 6.33^{a}	60.68 ± 1.21^{b}	60.63 ± 5.38^{b}
หอยดอง	74.51 ± 0.83^{a}	66.24 ± 1.21^{b}	38.03 ± 3.80^{c}

หมายเหตุ : ผลการทดลองเท่ากับ mean ± SD n = 2 และ ^{abc} หมายถึง ค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล โดยใช้ ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในตัวอย่างแต่ละชนิดโดยใช้การทดสอบแบบ Duncan Test

เมื่อนำค่าเปอร์เซ็นต์การสกัดสารประกอบเอมีนชนิด putrescine ของตัวอย่างอาหารหมักดองแต่ละชนิดมาคำนวณเพื่อหาปริมาณสารประกอบเอมีนที่น่าจะมีอยู่จริงในอาหารหมักดองแต่ละชนิด พบว่าตัวอย่างปลาร้ามีปริมาณสารประกอบเอมีนมากที่สุด คือ 432.06 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม รองลงมาคือ หอยดอง แหนมหมู ไส้กรอกเปรี้ยว และข้าวหมาก ตามลำดับ โดยมีปริมาณสารประกอบเอมีน เท่ากับ 381.06 340.70 267.21 และ 183.33 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.25 และจากงานวิจัยของ Limsuwan (2004) ที่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนในแหนมที่หมักโดยไม่ใช้กล้าเชื้อ ซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่า แหนมมีปริมาณสารประกอบเอมีนชนิด putrescine cadaverine และ tyramine รวมทั้งหมด 383.89 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของตัวอย่างแห้ง ซึ่งปริมาณสารประกอบเอมีนที่วิเคราะห์มีค่าใกล้เคียงกับผลการทดลองที่วิเคราะห์ตัวอย่างแหนมหมูด้วยวิธี enzyme coupling assay ดังนั้นการวัดปริมาณสารประกอบเอมีนด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลน่าจะมีความถูกต้องแม่นยำ สามารถเชื่อถือได้เช่นเดียวกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอื่นๆ ทั้งนี้ควรจะต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องของปริมาณสารประกอบเอมีนที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างอาหารหมักดองชนิดต่างๆ อีกครั้งกับวิธี HPLC ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง โดยเปรียบเทียบการตรวจวัดสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างที่มีแหล่งผลิตเดียวกัน อายุการหมักเท่ากัน เพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องของวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้น

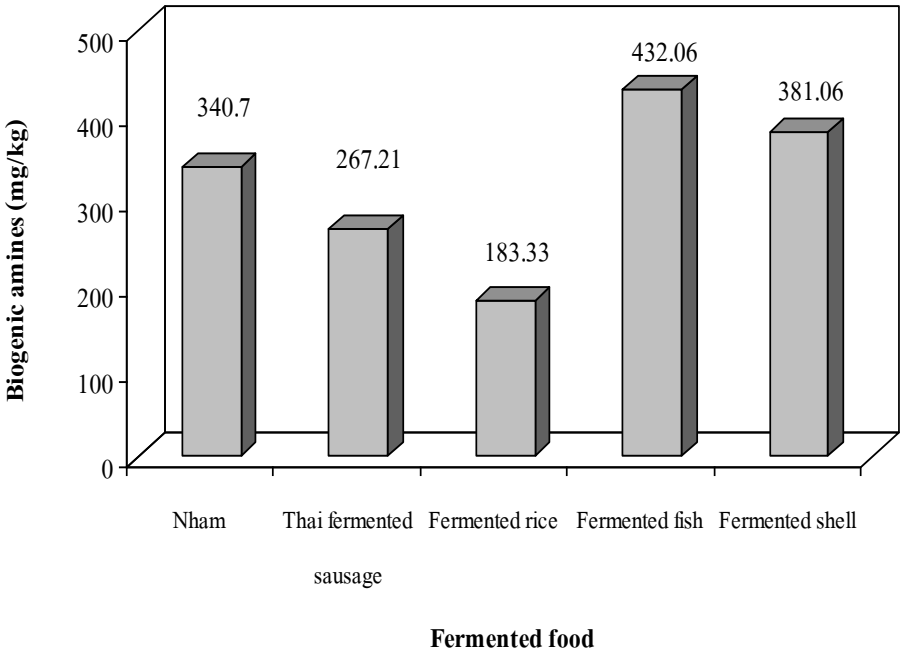
จากงานวิจัยของ Spanjer และ Van Roode (1991) ได้กำหนดปริมาณของสารประกอบเอมีนที่เป็นผลรวมของสารประกอบเอมีนชนิด putrescine cadaverine และ histamine ที่พบในตัวอย่างเนื้อปลาหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเนื้อปลา ไม่ควรเกิน 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จะไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ซึ่งจากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนในปลาร้า พบว่า มีปริมาณเกินกว่าที่กำหนดไว้ ดังนั้นตัวอย่างปลาร้าที่นำมาตรวจวิเคราะห์จึงไม่ปลอดภัยต่อการบริโภค และจาก Good Manufacturing Practice (GMP) ได้กำหนดปริมาณของ histamine tyramine และ ß-phenyethylamine ในระดับที่ยอมรับได้ไว้ที่ 50-100 100-800 และ 30 ppm ตามลำดับ หรือปริมาณสารประกอบเอมีนทั้งหมดกำหนดไว้ที่ 100-200 ppm (Nout, 1994) ดังนั้นจากปริมาณสารประกอบเอมีนที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ แหนมหมู ไส้กรอกเปรี้ยว ข้าวหมาก ปลาร้า และหอยดอง จึงไม่ผ่านมาตรฐานของ GMP ซึ่งเสี่ยงต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค แต่ได้มีงานวิจัยของ Taylor (1985) ได้กำหนดปริมาณของสารประกอบเอมีนทั้งหมดที่ตรวจพบในอาหาร ไม่ควรเกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นระดับที่คำนวณโดยมีพื้นฐานมาจากการเกิดอาการโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากพิษของ histamine ที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารประกอบเอมีนในอาหาร ซึ่งถ้ายึดข้อกำหนดนี้จะ

พบว่า ตัวอย่างอาหารหมักดองนำมาตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ แหนมหมู ไส้กรอกเปรี้ยว ข้าวหมาก ปลาร้า และหอยดอง มีปริมาณสารประกอบเอมีนไม่เกินกำหนด ดังนั้น การบริโภคตัวอย่างอาหารหมักดองเหล่านี้จึงไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ทั้งนี้ความอันตรายหรือความเป็นพิษของสารประกอบเอมีนในอาหารก็ขึ้นอยู่กับความไวของแต่ละบุคคล รวมทั้งชนิดของสารประกอบเอมีนที่อยู่ในอาหารว่ามีการเสริมฤทธิ์กันหรือไม่ ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะกำหนดระดับความเป็นพิษของสารประกอบเอมีนได้อย่างถูกต้องแน่นอน

ตารางที่ 4.7 ปริมาณสารประกอบเอมีนที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารหมักดองชนิดต่างๆ โดยคิดจากค่าเปอร์เซ็นต์การสกัด ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

ตัวอย่าง	สารประกอบเอมีน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
แหนมหมู	340.70 ± 16.27^{b}
ไส้กรอกเปรี้ยว	267.21 ± 14.00^{c}
ข้าวหมาก	183.33 ± 15.71^{d}
ปลาร้า	432.06 ± 27.18^{a}
หอยดอง	381.06 ± 25.32^{ab}

<u>หมายเหตุ</u> : ผลการทดลองเท่ากับ mean ± SD n = 2 และ ^{abcd} หมายถึง ค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล โดยใช้ ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้การทดสอบแบบ Duncan Test

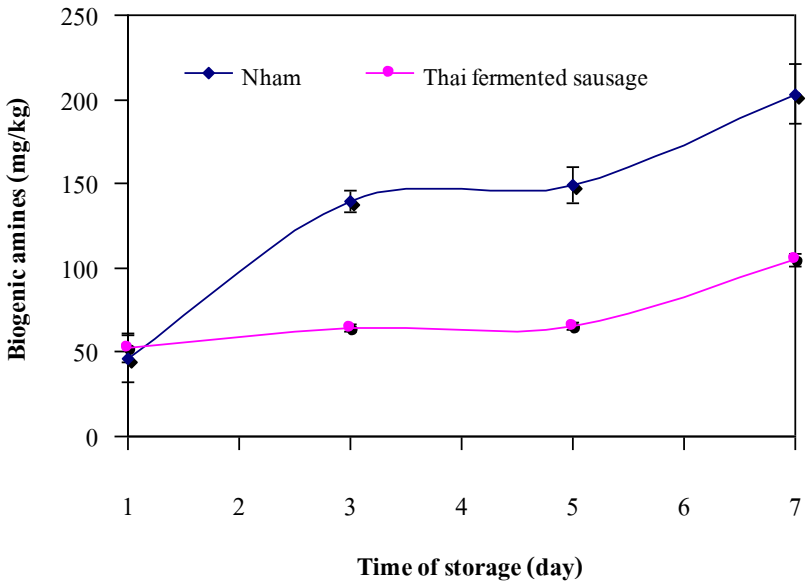


รูปที่ 4.25 ปริมาณสารประกอบเอมีนที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารหมักดองชนิดต่างๆ โดยคิดจากค่าเปอร์เซ็นต์การสกัด ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

4.8 การศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในอาหารหมักดอง

จากการศึกษาปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในอาหารหมักดอง ได้แก่ แหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 3 5 และ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้น ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่า เมื่อทำการเก็บรักษาตัวอย่างแหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยวเป็นเวลานานขึ้นจะทำให้เกิดสารประกอบเอมีนสูงขึ้น โดยในตัวอย่างแหนมหมูเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 1 วัน มีสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นเท่ากับ 45.95 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 7 วัน พบว่า มีปริมาณสารประกอบเอมีนสูงขึ้นเป็น 203.31 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนไส้กรอกเปรี้ยวเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 1 วัน มีสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้น เท่ากับ 52.53 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 7 วัน พบว่า มีปริมาณสารประกอบเอมีนสูงขึ้นเป็น 104.73 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.26 และตารางที่

ก.25 ดังนั้นระยะเวลาในการเก็บรักษามีผลต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในอาหารหมักดอง เนื่องจากเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานขึ้นจะเกิดการสลายตัวของโปรตีนในอาหารไปเป็นกรดอะมิโนอิสระมากขึ้น โดยกรดอะมิโนอิสระนี้เป็นสารตั้งต้นในการเกิดสารประกอบเอมีน และเมื่อเก็บรักษานานขึ้นเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส ก็จะทำหน้าที่เร่งการผลิตสารประกอบเอมีนได้มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Visessanguan และคณะ (2004) ที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบ และคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของแหนม พบว่า เมื่อหมักแหนมเป็นเวลานานขึ้นจะเกิดการสลายตัวของโปรตีนไปเป็นเปปไทด์ และกรดอะมิโนอิสระมากขึ้นตามระยะเวลาในการหมักหรือการเก็บรักษา

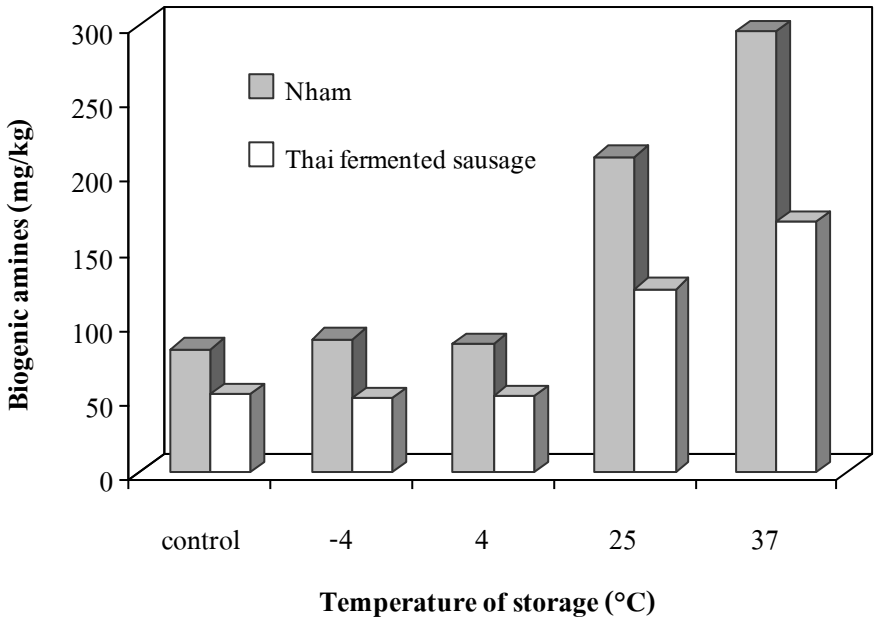


รูปที่ 4.26 ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในแหนม และไส้กรอกเปรี้ยว ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

4.9 การศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในอาหารหมักดอง

จากการศึกษาปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในอาหารหมักดองได้แก่ แหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -4 4 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้น ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay

ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่า ตัวอย่างแหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยวก่อนการเก็บรักษามีปริมาณสารประกอบเอมีนเท่ากับ 82.68 และ 52.53 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเก็บรักษาตัวอย่างแหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว ที่อุณหภูมิ -4 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ปริมาณของสารประกอบเอมีนในตัวอย่างไม่แตกต่างจากปริมาณสารประกอบเอมีนที่มีอยู่ในตัวอย่างเริ่มต้น คือแหนมหมูมีปริมาณสารประกอบเอมีนเท่ากับ 89.49 และ 86.09 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนไส้กรอกเปรี้ยวมีปริมาณสารประกอบเอมีนเท่ากับ 50.10 และ 51.07 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ แต่เมื่อเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่า ตรวจพบปริมาณสารประกอบเอมีนเพิ่มสูงขึ้นจากปริมาณสารประกอบเอมีนที่พบในตัวอย่างก่อนผ่านการเก็บรักษา โดยตัวอย่างแหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยวที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีปริมาณสารประกอบเอมีนเท่ากับ 212.06 และ 123.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และตัวอย่างที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีปริมาณสารประกอบเอมีนเท่ากับ 296.21 และ 168.29 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 27 และตารางที่ ก.26 ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อเก็บรักษาตัวอย่างอาหารหมักดองที่อุณหภูมิสูงขึ้น ปริมาณสารประกอบเอมีนที่ตรวจพบในตัวอย่างก็จะเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากที่อุณหภูมิ -4 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นช่วงอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนกรดอะมิโนอิสระที่อยู่ในตัวอย่างอาหารหมักดองไปเป็นสารประกอบเอมีนชนิดต่างๆ ดังนั้นตัวอย่างอาหารหมักดองที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ-4 และ 4 องศาเซลเซียส จึงมีปริมาณสารประกอบเอมีนคงที่ ในขณะที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโต และการทำงานของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส ทำให้เมื่อเก็บตัวอย่างอาหารหมักดองที่ช่วงอุณหภูมินี้ปริมาณสารประกอบที่ตรวจพบจึงเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen และคณะ (1994) ที่ได้ทำการทดลองโดยการเก็บรักษาเนื้อหมูไว้ที่อุณหภูมิ -18 4 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อเก็บเนื้อหมูไว้ที่อุณหณภูมิ -18 องศาเซลเซียส ปริมาณสารประกอบเอมีนที่ตรวจพบคงที่ เมื่อเก็บไว้เป็นเวลานานถึง 9 เดือน ในขณะที่เนื้อหมูที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะตรวจพบปริมาณสารประกอบเอมีนสูงกว่าที่ 4 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของรุ่งนภา ช่อทองดี (2549) ที่ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิการเก็บรักษาต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่างส้มฟัก พบว่า เมื่อเก็บรักษาตัวอย่างส้มฟักที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ปริมาณสารประกอบที่เกิดขึ้นในตัวอย่างเพิ่มสูงขึ้น แต่ตัวอย่างที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นกลับคงที่



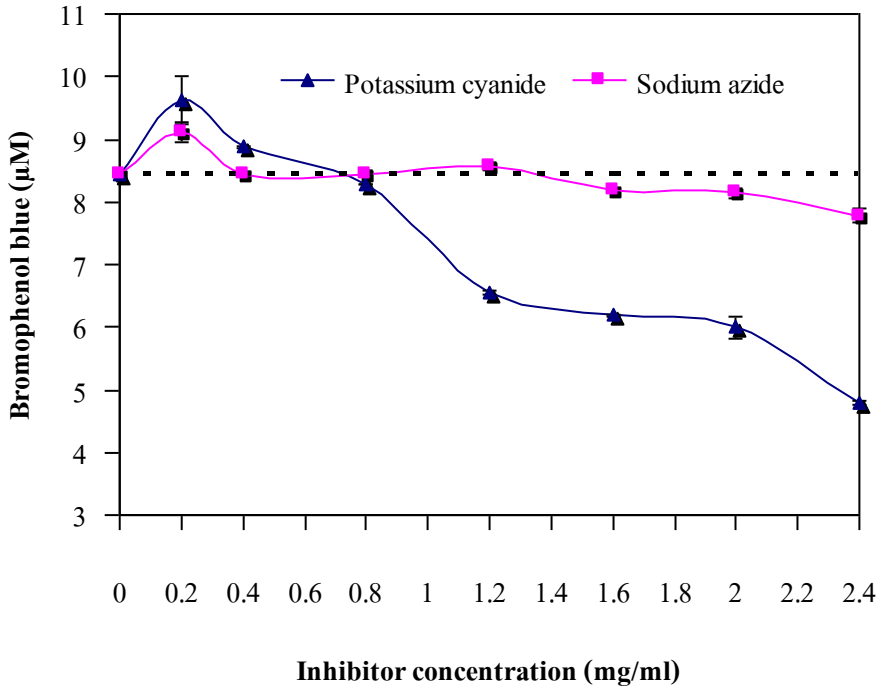
รูปที่ 4.27 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในแหนมและไส้กรอกเปรี้ยว ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

4.10 การศึกษาการทำปฏิกิริยา โดยการใช้สารยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

4.10.1 การศึกษาการทำปฏิกิริยาโบรมิเนชัน โดยการใช้สารยับยั้งปฏิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

จากการศึกษาการทำปฏิกิริยาโบรมิเนชันของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยการใช้สารยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส 2 ชนิด ได้แก่ โพแทสเซียมไซยาไนด์ (KCN) และโซเดียมเอไซด์ (NaN_3) เข้มข้น 0.2 0.4 0.8 1.2 1.6 2.0 และ 2.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลายปฏิกิริยา พบว่า โพแทสเซียมไซยาไนด์ ในช่วงความเข้มข้น 0.2 – 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสได้ เนื่องจากเมื่อบ่มทิ้งไว้ปฏิกิริยายังคงเกิดขึ้น โดยสามารถผลิตโบรโมฟีนอลบลูได้เพิ่มขึ้น ส่วนโพแทสเซียมไซยาไนด์ ในช่วงความเข้มข้น 1.2 – 2.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากจะไม่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสได้แล้ว ยังทำให้โบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก

โพแทสเซียมไซยาไนด์ที่ความเข้มข้นสูง ๆ อาจจะไปรบกวนสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ลดลง ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการหยุดปฏิกิริยาโบรมิเนชัน คือ โพแทสเซียมไซยาไนด์ เข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลายปฏิกิริยา เนื่องจากสามารถยับยั้งปฏิกิริยาโบรมิเนชันที่เกิดขึ้นจากเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสได้ โดยไม่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงไป จึงสามารถนำไปใช้ในการหยุดปฏิกิริยาโบรมิเนชัน เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป และจากการทดลอง พบว่า โซเดียมเอไซด์ เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสได้ เนื่องจากเมื่อบ่มทิ้งไว้ปฏิกิริยายังคงเกิดขึ้น โดยเอนไซม์สามารถผลิตโบรโมฟีนอลบลูได้เพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมเอไซด์ ในช่วง 0.4 – 2.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลายปฏิกิริยา สามารถยับยั้งปฏิกิริยาโบรมิเนชันที่เกิดขึ้นจากเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสได้ โดยไม่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นเพื่อเป็นการประหยัดสารเคมี การใช้โซเดียมเอไซด์ เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลายปฏิกิริยา ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุด จึงเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการหยุดปฏิกิริยาโบรมิเนชัน เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.28 และตารางที่ ก. 27



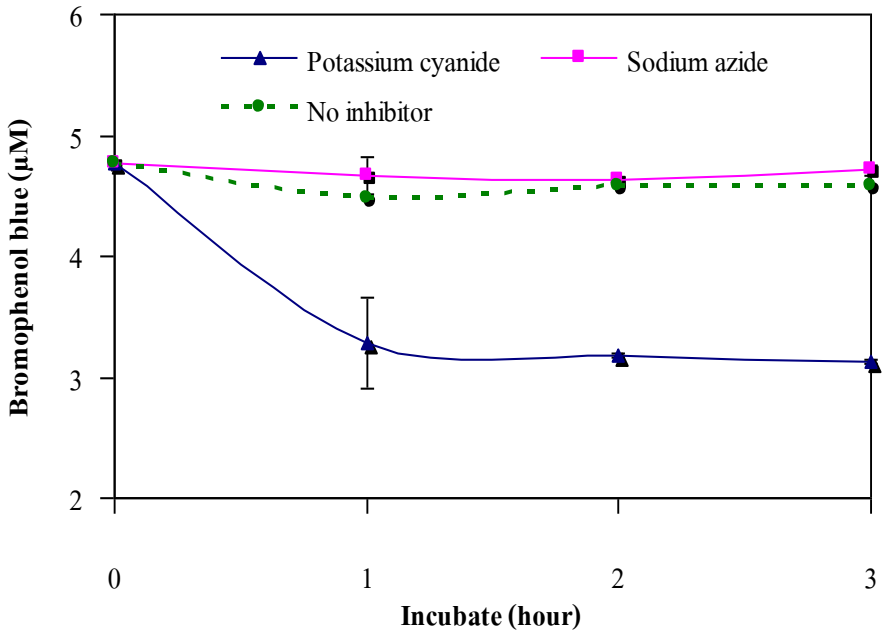
รูปที่ 4.28 ผลของการใช้โพแทสเซียมไซยาไนด์ (KCN) และโซเดียมเอไซด์ (NaN_3) เข้มข้น 0.2 - 2.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลายปฏิกิริยา ต่อปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาโบรมิเนชันของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

4.10.2 การศึกษาการทำปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยการใช้สารยับยั้งปฏิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

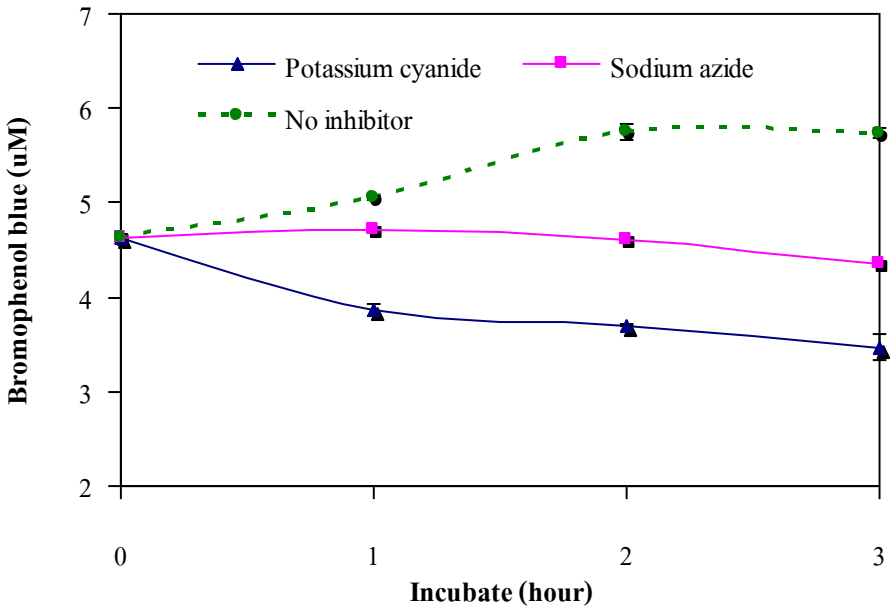
จากการศึกษาการทำปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยการเติมสารยับยั้ง 2 ชนิด ได้แก่ โพแทสเซียมไซยาไนด์ (KCN) และโซเดียมเอไซด์ (NaN_3) เข้มข้น 0.8 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลายปฏิกิริยาตามลำดับ (จากผลการทดลองที่ 4.10.1) เมื่อเติมและไม่เติมสารยับยั้งแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ พบว่า ตัวอย่างที่ไม่เติมสารยับยั้งในปฏิกิริยามีโบรโมฟีนอลบลูเกิดขึ้นคงที่ ทั้งนี้เนื่องจากที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะแก่การทำงานของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ เช่นเดียวกับตัวอย่างที่มีการเติมโซเดียมเอไซด์ ดังนั้น การใช้โซเดียมเอไซด์ เป็นสารยับยั้งที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ไม่มีผลที่เป็นนัยสำคัญ เนื่องการเติมหรือไม่เติมโซเดียมเอไซด์ ก็ได้ผลไม่แตกต่างกัน ส่วนตัวอย่างที่เติมโพแทสเซียมไซยาไนด์ แล้วบ่มไว้ 1 ชั่วโมง ทำให้โบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นลดลง และจะคงที่เมื่อบ่มไว้ 2 และ 3 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเกิดจากโพแทสเซียมไซยาไนด์ ไปรบกวนสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ลดลง ดังนั้นจึงไม่ควรใช้โพแทสเซียมไซยาไนด์เป็นสารยับยั้ง เนื่องจากทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เกิดการคลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริง ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.29 และตารางที่ ก.28

จากการทดลองเติมและไม่เติมสารยับยั้งแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ พบว่าตัวอย่างที่ไม่เติมสารยับยั้งมีโบรโมฟีนอลบลูเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะแก่การทำงานของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดี ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่เมื่อบ่มต่ออีกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เนื่องจากสับสเตรทในการเกิดปฏิกิริยาหมด ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจึงคงที่ ส่วนตัวอย่างที่เติมโพแทสเซียมไซยาไนด์ แล้วบ่มไว้ 1 ชั่วโมง ปรากฏว่ามีโบรโมฟีนอลบลูลดลง และจะคงที่เมื่อบ่มไว้ 2 และ 3 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเกิดจากโพแทสเซียมไซยาไนด์ไปรบกวนสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ลดลง ดังนั้นจึงไม่ควรใช้โพแทสเซียมไซยาไนด์เป็นสารยับยั้ง เนื่องจากทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เกิดการคลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริง ในขณะที่ตัวอย่างที่มีการเติมโซเดียมเอไซด์ เมื่อทำการบ่มไว้ที่เวลาต่างๆ พบว่าปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นคงที่ ดังนั้น การเติมโซเดียมเอไซด์ลงในสารละลายปฏิกิริยาสามารถยับยั้งปฏิกิริยาโบรมิเนชันที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยไม่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงไป จึงเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการหยุดปฏิกิริยาโบรมิเนชัน ในปฏิกิริยา

ร่วมระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay โดยมีข้อดีคือสามารถตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้สารละลายปฏิกิริยาได้ครั้งละมากๆ เนื่องจากการใช้สารยับยั้งปฏิกิริยามีผลในการลดความคลาดเคลื่อนของการตรวจวิเคราะห์อันเนื่องมาจากเวลาได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้ในการศึกษาปฏิกิริยาของเอนไซม์แบบ end point determination ได้อีกด้วย ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.30 และตารางที่ ก.29



รูปที่ 4.29 ผลของการเติมสารยับยั้งเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส ได้แก่ โพแทสเซียมไซยาไนด์ และโซเดียมเอไซด์ เข้มข้น 0.8 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลายปฏิกิริยา ตามลำดับ ต่อปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

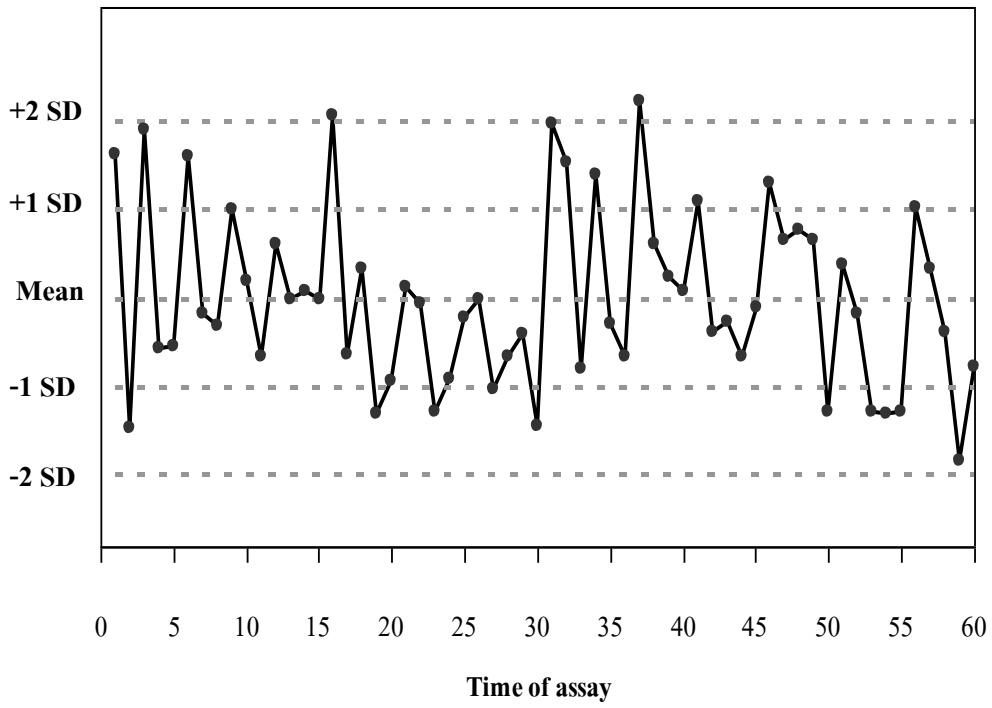


รูปที่ 4.30 ผลของการเติมสารยับยั้งเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส ได้แก่ โพแทสเซียมไซยาไนด์ และโซเดียมเอไซด์ เข้มข้น 0.8 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลายปฏิกิริยา ตามลำดับ ต่อปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

4.11 การตรวจสอบคุณภาพของการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

จากการตรวจสอบคุณภาพของการตรวจวัด เพื่อวิเคราะห์ความแม่นยำของที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นในสารละลายปฏิกิริยา (สารละลายเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า 0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 9.18 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร สารละลายฟีนอลเรด 0.2 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer (พีเอช 7) 24 มิลลิโมลาร์ และสารประกอบเอมีนชนิด putrescine 45.38 มิลลิโมลาร์ ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 60 ครั้ง พบว่า ค่าเฉลี่ย (mean) ของค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 0.488 โดยมีค่า

เบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) เท่ากับ ± 0.049 ซึ่งพบว่ามีความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์อยู่ในระดับที่ดี เนื่องจากข้อมูลส่วนใหญ่มีค่าใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ย แต่ในการวิเคราะห์ก็ยังมีข้อผิดพลาด เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงที่ทำการตรวจวัดได้ในบางครั้งมีค่าคลาดเคลื่อนไปจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ผลแสดงดังรูปที่ 4.31 และตารางที่ ก.30 ทั้งนี้อาจเกิดจากความคลาดเคลื่อนที่มาจากตัวผู้วิจัยเอง หรือเกิดจากความคลาดเคลื่อนของเครื่องมือ ได้แก่ เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ใช้ในการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง และเครื่องมือที่ใช้ในการชั่ง หรือตวง สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ซึ่งความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาโดยการผสมน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์ เพื่อลดขั้นตอนของการชั่งตวงสารเคมีให้น้อยลง และเพื่อให้สามารถนำวิธีการตรวจวัดสารประกอบเอมีนด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล มาประยุกต์ใช้ได้อย่างสะดวกรวดเร็ว และมีความแม่นยำในการวิเคราะห์สูง



รูปที่ 4.31 การตรวจสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร (ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.488 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ ±0.049)

4.12 การสกัดเอนไซม์เอมีนออกซิเดส

จากการสกัดเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากต้นอ่อนของเมล็ดถั่วเหลืองงอก แล้วทำการตรวจวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (แสดงในภาคผนวก ข) ซึ่งคำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานซีรัมอัลบูมิน แสดงดังรูปที่ ข.1 และคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสในสารละลายสกัดโดยอาศัยปฏิกิริยาควบคู่กับเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลในการเร่งปฏิกิริยา peroxidative halogenation ที่เร่งการเติมหมู่โบรไมด์เข้าสู่ฟีนอลเรด โดยมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของเอมีนออกซิเดส เมื่อใช้สารประกอบเอมีนชนิด putrescine เป็นสารตั้งต้นเข้าร่วมในปฏิกิริยาเกิดผลิตภัณฑ์ halogenated product คือโบรโมรฟีนอลบลู ซึ่งจากการเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นกับโบรโมฟีนอลบลูที่ใช้เป็นกราฟมาตรฐาน แสดงดังรูปที่ ข.2 พบว่าเอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่สกัดได้จากส่วนราก และส่วนลำต้นของต้นอ่อนของเมล็ดถั่วเหลืองงอก ใน crude enzyme มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 7.905 และ 7.470 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มีค่ากิจกรรมของเอมีนออกซิเดสเท่ากับ 0.111 และ 0.116 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอมีนออกซิเดสเท่ากับ 0.014 และ 0.015 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ซึ่งหลังนำ crude enzyme ทั้งสองชนิดไปทำการ dialysis พบว่ามีปริมาณโปรตีน เท่ากับ 2.90 และ 2.69 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มีค่ากิจกรรมของเอมีนออกซิเดสเท่ากับ 0.185 และ 0.163 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอมีนออกซิเดสเท่ากับ 0.065 และ 0.062 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.8 และตารางที่ ก.31 และ ก.32

จากงานวิจัยของ เก่งหทัย ยืนยงสุวรรณ (2548) ที่ได้ทำการศึกษาเอมีนออกซิเดสจากเมล็ดธัญญาพืช ได้แก่ ถั่วเหลือง ข้าวโพด และถั่วเขียว พบว่า เอมีนออกซิเดสที่สกัดได้สามารถออกซิไดส์เอธิลเอมีนและพูเทสซีน ได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยปฏิกิริยาควบคู่กับเปอร์ออกซิเดส โดยมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สำหรับเอธิลเอมีนคิดเป็น 1.43 1.26 และ0.33 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สำหรับพูเทสซีนคิดเป็น 2.94 1.43 และ 0.70 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ จากการศึกษานี้ พบว่า เอนไซม์เอมีนออกซิเดสสามารถสกัดได้ในถั่วเหลืองมากกว่าในเมล็ดข้าวโพด และถั่วเขียว ซึ่งจากงานวิจัยนี้จึงนำได้แหล่งของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัย โดยเลือกใช้ถั่วเหลืองมาเป็นแหล่งของเอมีนออกซิเดส เนื่องจากมีกิจกรรมเอนไซม์เอมีนออกซิเดสมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับธัญญาพืชชนิดอื่นๆ และเอนไซม์ที่สกัดได้ก็มีทั้งมีเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส และไดเอมีนออกซิเดส แต่ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอมีนออกซิเดสที่วิเคราะห์ได้แตกต่างจากงานวิจัยในครั้งนี้ ทั้งนี้เนื่องจากวิธีการวิเคราะห์กิจกรรมมีความแตกต่างกัน โดยในงานวิจัยของเก่งหทัย ยืนยงสุวรรณ (2548) ทำการตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยปฏิกิริยาควบคู่กับเปอร์ออกซิเดส

แต่ในงานวิจัยนี้ตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยปฏิกิริยาควบคู่กับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล นอกจากนี้สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ก็มีความแตกต่างกันด้วย

ตารางที่ 4.8 ปริมาณโปรตีน และกิจกรรมของเอมีนออกซิเดสจากสารละลายสกัดจากส่วนต่างๆของต้นอ่อนของเมล็ดถั่วเหลืองงอก

แหล่งของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากต้นอ่อนของเมล็ดถั่วเหลืองงอก	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	กิจกรรม (ยูนิต/มิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัม)
ส่วนราก (ก่อนทำ dialysis)	7.905 ± 0.078	0.111 ± 0.003	0.014 ± 0.014
ส่วนลำต้น(ก่อนทำ dialysis)	7.470 ± 0.042	0.116 ± 0.008	0.015 ± 0.016
ส่วนราก (หลังทำ dialysis)	2.900 ± 0.014	0.185 ± 0.005	0.065 ± 0.064
ส่วนลำต้น(หลังทำ dialysis)	2.690 ± 0.042	0.163 ± 0.004	0.062 ± 0.061

หมายเหตุ : ผลการทดลองเท่ากับ mean ± SD n = 2 และ 1 ยูนิต (U) ของเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

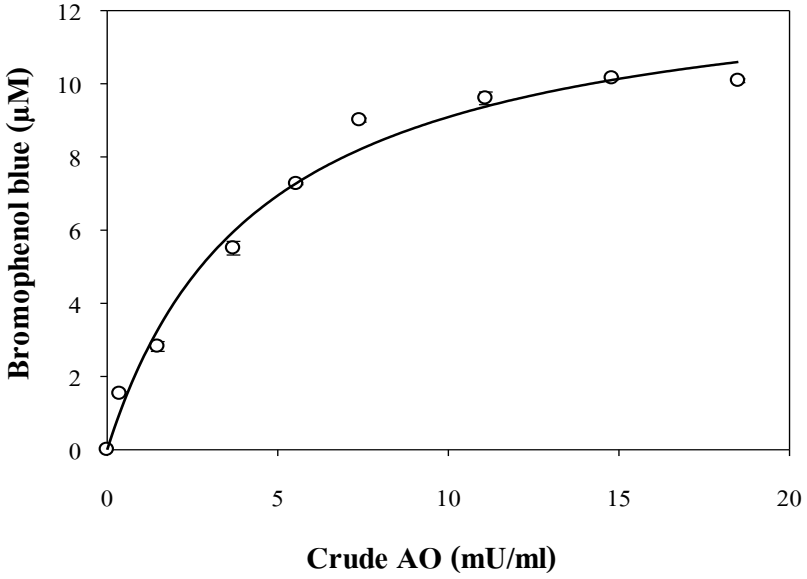
จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สารละลายสกัดของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองก่อนการทำ dialysis มีปริมาณโปรตีนต่อปริมาตรของเอนไซม์สูงกว่าสารละลายสกัดของเอนไซม์หลังทำ dialysis เนื่องจากการทำ dialysis ซึ่งเป็นขั้นตอนในการแยกสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ที่ปะปนอยู่ใน crude enzyme โดยอาศัยการแพร่ผ่านเมมเบรนของถุง dialysis ที่มีขนาด 12 - 14 กิโลดาลตัน ทำให้ในขั้นตอนการทำ dialysis มีการแพร่ผ่านของบัฟเฟอร์ที่อยู่ภายนอกถุงเข้ามาภายในถุง จึงส่งผลให้ crude enzyme มีปริมาตรเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้น ปริมาณโปรตีนต่อปริมาตรที่ตรวจวัดได้ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองภายหลังจากการทำ dialysis จะมีค่าลดลง แต่ในทางกลับกัน พบว่า หลังจากการทำ dialysis เอนไซม์เอมีนออกซิเดส มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการทำ dialysis ช่วยลดสารบางอย่างที่รบกวนการทำงานของเอนไซม์ หรือสารที่อาจจะไปยับยั้งการทำปฏิกิริยา enzyme coupling assay ทำให้เอนไซม์เอมีนออกซิเดสทำงานได้ดีขึ้น และจากการศึกษาส่วนต่างๆ ของต้นอ่อนของเมล็ดถั่วเหลืองงอกที่นำมาสกัดเอนไซม์เอมีนออกซิเดส พบว่า ทั้งส่วนรากและส่วนลำต้นของต้นถั่วเหลืองงอก เมื่อนำไปสกัดเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ใกล้เคียงกันมาก โดยส่วนรากของต้นอ่อนของเมล็ดถั่วเหลืองงอก มีกิจกรรมของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสมากกว่าส่วนลำต้นเล็กน้อย แต่เมื่อคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่อน้ำหนักของต้นถั่วเหลืองส่วนที่ใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่สกัดจากรากของต้นถั่วเหลืองมีกิจกรรมของ

เอนไซม์ต่อหน่วยน้ำหนักสูงกว่าเอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่สกัดจากลำต้นของต้นถั่วเหลือง คือมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากรากและลำต้นของต้นอ่อนของเมล็ดถั่วเหลืองงอกเท่ากับ 0.77 และ 0.39 มิลลิยูนิตต่อกรัม ตามลำดับ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ส่วนรากของต้นถั่วเหลืองเพื่อนำมาทำการสกัดเอนไซม์เอมีนออกซิเดส โดยเมื่อนำมาสกัดเอนไซม์เอมีนออกซิเดส พบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.185 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งถ้าต้องการให้เอนไซม์เอมีนออกซิเดส มีกิจกรรมที่สูงขึ้นอาจทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้นโดยลดปริมาณของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด และทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วยวิธีต่างๆ เช่น การตกตะกอนโปรตีน ion-exchange chromatography gel filtration chromatography เป็นต้น

4.13 การศึกษาปริมาณของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

4.13.1 การศึกษาปริมาณของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay

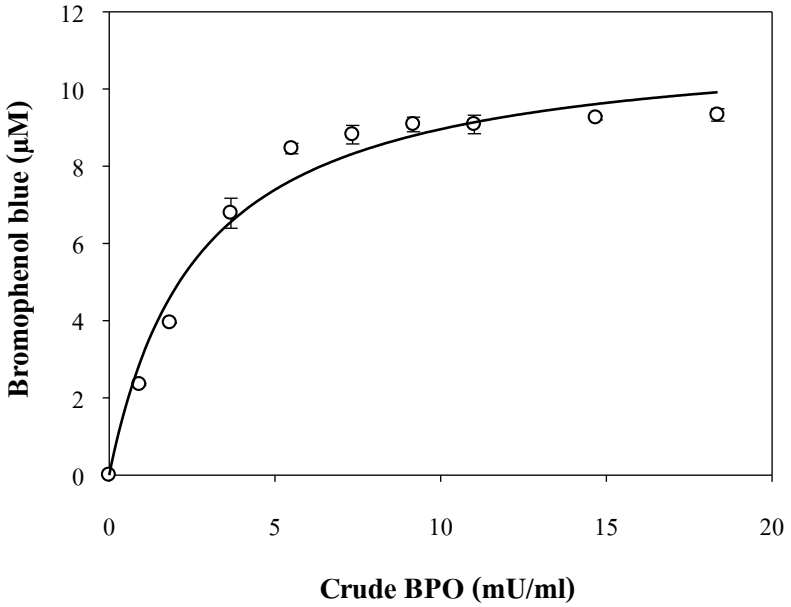
จากการศึกษาปริมาณของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง (0 0.37 1.48 3.70 5.55 7.40 11.10 14.80 และ 18.50 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร) ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ร่วมกับเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงของเอนไซม์เอมีนออกซิเดส 0 – 7.40 มิลลิยูนิต ต่อมิลลิลิตร ซึ่งปริมาณของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน คือ เอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองที่มีกิจกรรม 7.40 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเป็นปริมาณเอนไซม์ที่สามารถผลิตโบรโมฟีนอลบลูได้สูงสุด โดยเมื่อใช้เอนไซม์มากกว่า 7.40 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตรขึ้นไป อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่ ผลแสดงในรูปที่ 4.32 และตารางที่ ก.33 ดังนั้นปริมาณของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ ไม่ควรเกิน 7.40 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เพื่อเป็นการประหยัดปริมาณของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองที่ใช้ (1 ยูนิต (U) ของเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)



รูปที่ 4.32 ผลของปริมาณเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองต่อปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา enzyme coupling assay ร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลในช่วงความเข้มข้น 0 – 18.50 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

4.13.2 การศึกษาปริมาณของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay

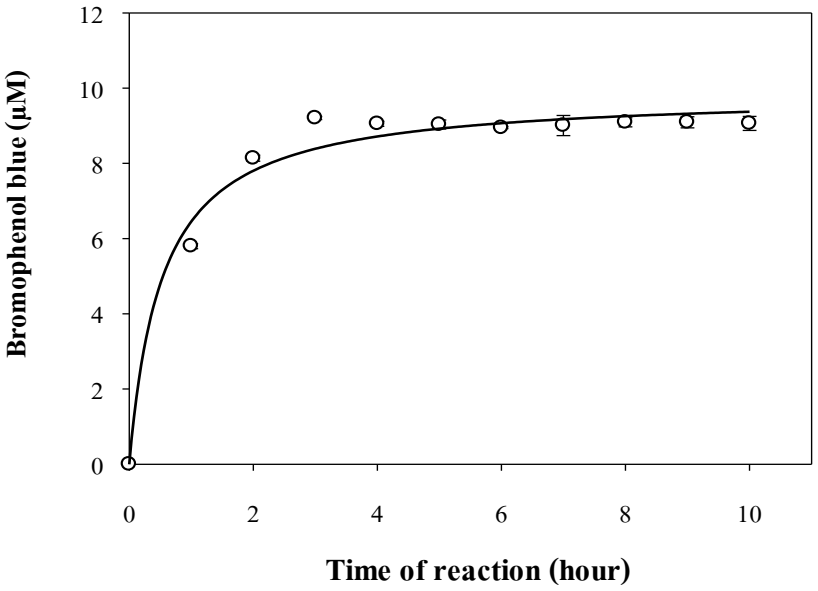
จากการศึกษาปริมาณของโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล (0 0.92 1.84 3.67 5.51 7.34 9.18 11.02 14.69 และ 18.36) ที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ร่วมกับเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง พบว่า อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส 0 – 5.51 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งปริมาณของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน คือ เอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสที่มีกิจกรรม 5.51 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเป็นปริมาณเอนไซม์ที่สามารถผลิตโบรโมฟีนอลบลูได้สูงสุด ซึ่งเมื่อใช้เอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสมากกว่า 5.51 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตรขึ้นไป อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่ ผลแสดงในรูปที่ 4.33 และตารางที่ ก.34 ดังนั้นปริมาณของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ ไม่ควรเกิน 5.51 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เพื่อเป็นการประหยัดปริมาณของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ใช้ (1 ยูนิต (U) ของเอมีนออกซิเดส หมายถึง ปริมาณเอมีนออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ putrescine 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่พีเอช 7 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโคลโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)



รูปที่ 4.33 ผลของปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลต่อปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา enzyme coupling assay ร่วมกับเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ในช่วงความเข้มข้น 0 – 18.36 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

4.14 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบ-เอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

จากการศึกษาระยะเวลา(1 2 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 ชั่วโมง) ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่า อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงเวลา 0-3 ชั่วโมง ซึ่งระยะเวลาในการบ่มสารละลายปฏิกิริยาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนที่เหมาะสม คือ ช่วงเวลา 3 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่เอนไซม์สามารถผลิตโบรโมฟีนอลบลูได้สูงสุด โดยเมื่อบ่มสารละลายปฏิกิริยามากกว่า 3 ชั่วโมงขึ้นไป อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่ ผลแสดงในรูปที่ 4.34 และตารางที่ ก.35 ดังนั้นระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลที่เหมาะสม คือ ไม่ควรเกิน 3 ชั่วโมง เพื่อเป็นการประหยัดเวลา และได้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.1-1.0

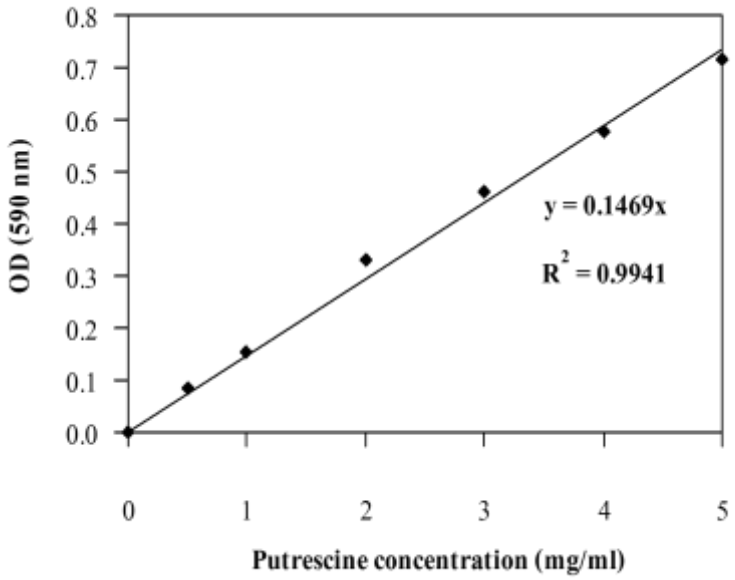


รูปที่ 4.34 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มสารละลายปฏิกิริยาต่อปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสสาหร่ายทะเล ในช่วงระยะเวลา 0 – 10 ชั่วโมง โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

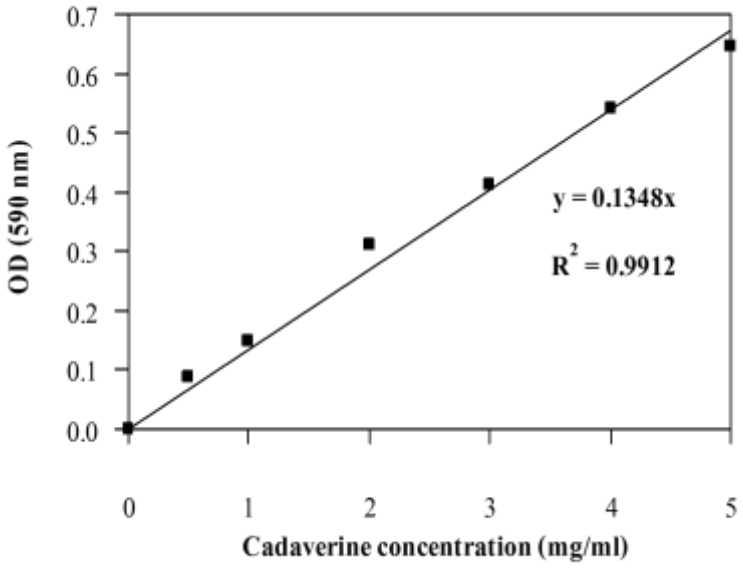
4.15 การสร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบเอมีนชนิดต่าง ๆ สำหรับการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมักดอง ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

จากการศึกษาความสามารถในการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนมาตรฐานได้แก่ putrescine cadaverine histamine tryptamine tyramine และ ß - phenylethylamine ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่า สามารถนำไปสร้างเป็นกราฟมาตรฐานของสารประกอบเอมีนชนิดต่าง ๆ เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างอาหารหมักดอง แสดงดังรูปที่ 4.35 4.36 4.37 4.38 4.39 4.40 และ 4.41 และตารางที่ ก.36 ก.37 ก.38 ก.39 ก.40 และ ก.41 ซึ่งสามารถตรวจวัดสารประกอบเอมีนชนิด putrescine cadaverine และ histamine ได้ในช่วงความเข้มข้น 0 – 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารประกอบเอมีนชนิด tryptamine ในช่วงความเข้มข้น 0 – 14 มิลลิกรัมต่อ และสารประกอบเอมีน

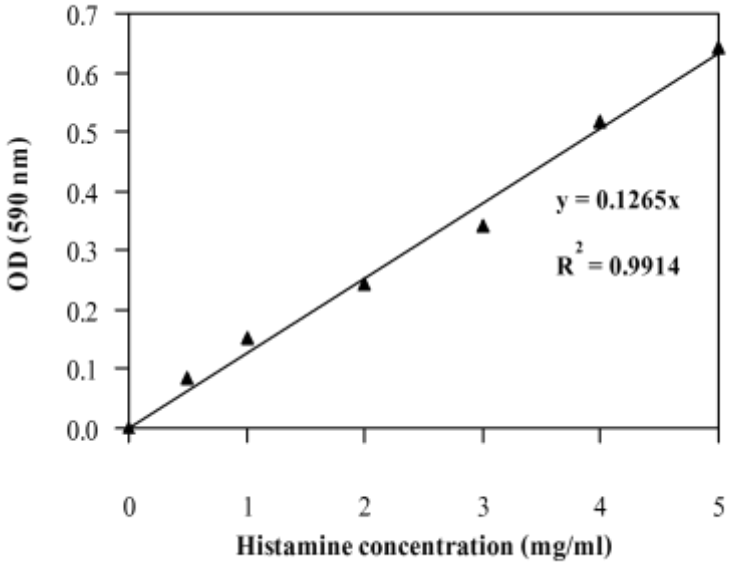
ชนิด tyramine และ ß - phenylethylamine ในช่วงความเข้มข้น 0 – 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสมการเส้นตรง และค่า R^2 ที่ได้สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.9 ซึ่งจากการศึกษาการตรวจวัดสารประกอบเอมีนด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล (จากผลการทดลองที่ 4.6) พบว่า สามารถตรวจวัดสารประกอบเอมีนชนิด putrescine cadaverine และ histamine ได้ในช่วงความเข้มข้น 0 – 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารประกอบเอมีนชนิด tryptamine ในช่วงความเข้มข้น 0 – 14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารประกอบเอมีนชนิด tyramine ในช่วงความเข้มข้น 0 – 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารประกอบเอมีนชนิด ß - phenylethylamine ในช่วงความเข้มข้น 0 – 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นว่ากราฟมาตรฐานของสารประกอบเอมีนแต่ละชนิดมีความสามารถในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเอมีนได้ในช่วงความเข้มข้นที่แตกต่างจากการตรวจวัด โดยใช้ปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยสามารถตรวจวัดสารประกอบเอมีนชนิด putrescine cadaverine และ histamine ได้ในช่วงความเข้มข้นที่แคบกว่า และสามารถตรวจวัดสารประกอบเอมีนชนิด tyramine ในช่วงความเข้มข้นที่น้อยกว่ามาก ซึ่งเป็นช่วงเดียวกับการตรวจวัดสารประกอบเอมีนชนิด ชนิด ß - phenylethylamine แสดงว่าเอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่สกัดได้จากถั่วเหลืองมีความสามารถในการจับจำเพาะได้มากกับสารประกอบเอมีนมาตรฐานชนิดที่มีโครงสร้างแบบ aromatic คือ สารประกอบเอมีนชนิด tyramine และ ß - phenylethylamine และจากการทดลอง พบว่า เอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่สกัดจากถั่วเหลืองสามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบเอมีนหลายชนิดทั้งโมโนเอมีน (tyramine และ ß - phenylethylamine) ไดเอมีน (putrescine cadaverine และ tryptamine) และ โพลีเอมีน (histamine) แสดงว่าถั่วเหลืองที่นำมาสกัดประกอบไปด้วยเอนไซม์เอมีนออกซิเดส ชนิดโมโนเอมีนออกซิเดส ไดเอมีนออกซิเดส และโพลีเอมีนออกซิเดส ทำให้สามารถจับจำเพาะกับสารประกอบเอมีนชนิดต่างๆได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ เก่งหทัย ยืนยงสุวรรณ (2548) ที่ได้ทำการศึกษาเอมีนออกซิเดสจากเมล็ดธัญญพืช ได้แก่ ถั่วเหลือง ข้าวโพด และถั่วเขียว พบว่า เอมีนออกซิเดสที่สกัดได้สามารถออกซิไดส์เอธิลเอมีน และพูเทสซีน ได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยปฏิกิริยาควบคู่กับเปอร์ออกซิเดส ซึ่งจากการศึกษานี้แสดงว่าเมล็ดที่กำลังงอกมีทั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส และไดเอมีนออกซิเดส



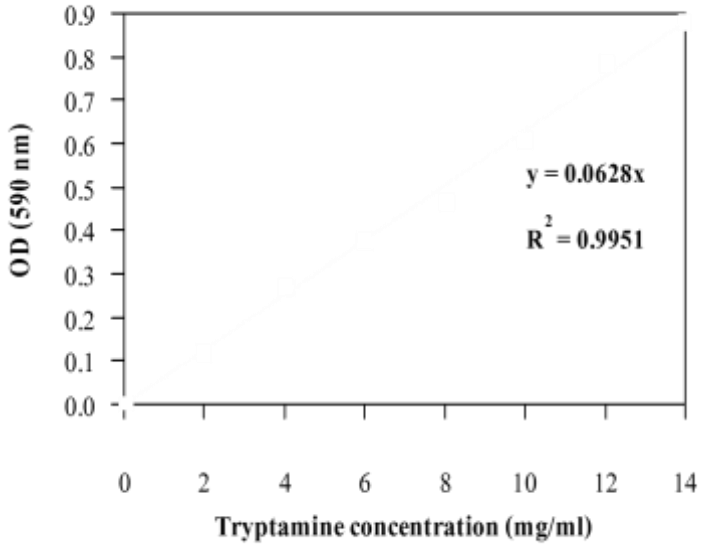
รูปที่ 4.35 กราฟมาตรฐาน putrescine ในช่วงความเข้มข้น 0–5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร



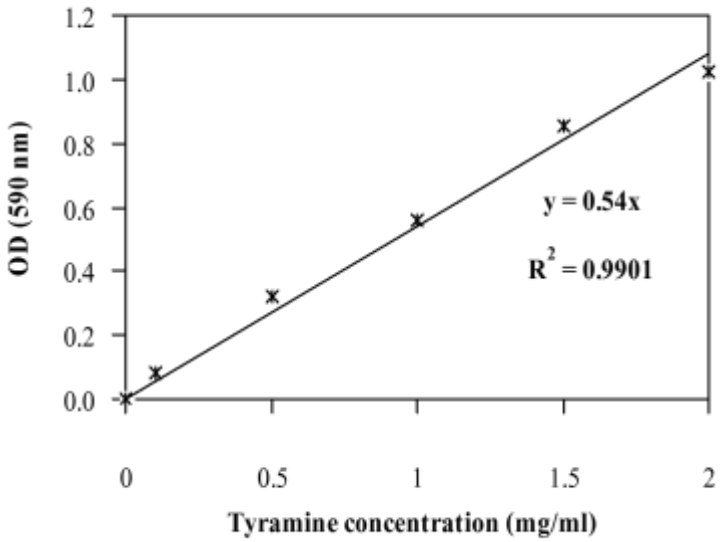
รูปที่ 4.36 กราฟมาตรฐาน cadaverine ในช่วงความเข้มข้น 0–5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร



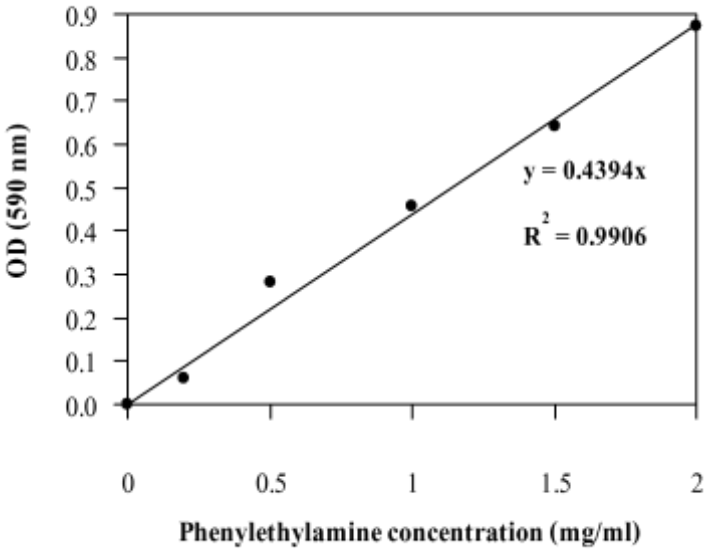
รูปที่ 4.37 กราฟมาตรฐาน histamine ในช่วงความเข้มข้น 0–5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร



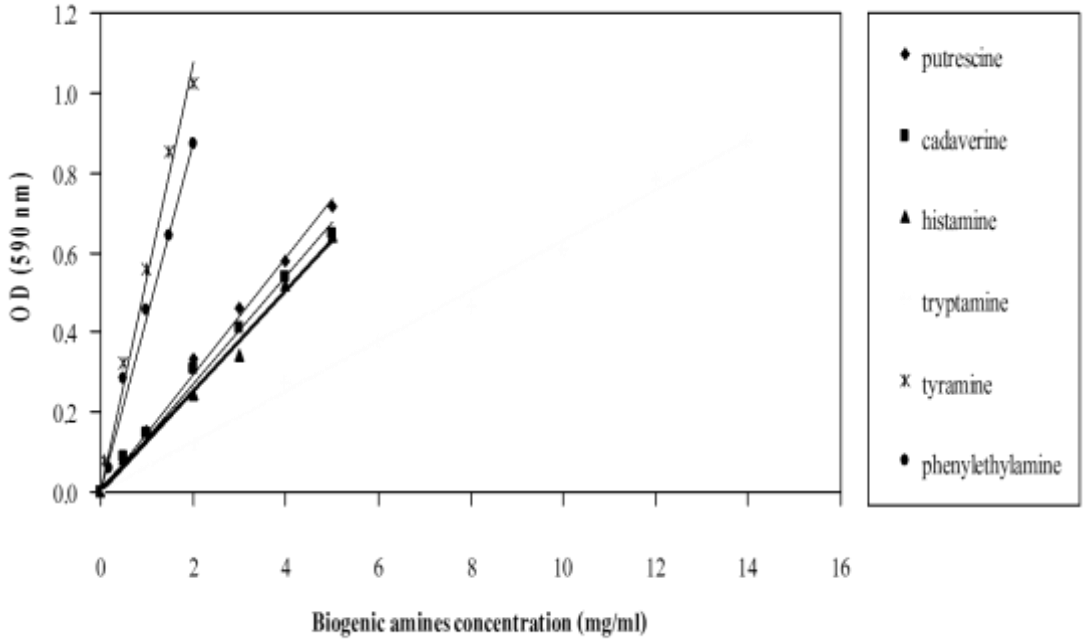
รูปที่ 4.38 กราฟมาตรฐาน tryptamine ในช่วงความเข้มข้น 0–14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร



รูปที่ 4.39 กราฟมาตรฐาน tyramine ในช่วงความเข้มข้น 0–2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร



รูปที่ 4.40 กราฟมาตรฐาน ß - phenylethylamine ในช่วงความเข้มข้น 0–2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร



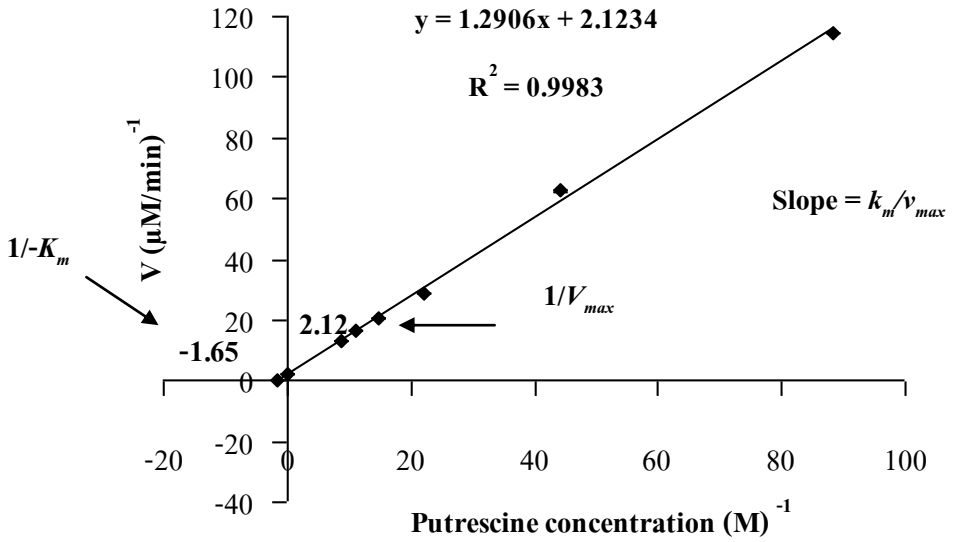
รูปที่ 4.41 กราฟมาตรฐานสารประกอบเอมีน 6 ชนิด ได้แก่ putrescine cadaverine histamine tryptamine tyramine และ ß - phenylethylamine ในช่วงความเข้มข้น 0–14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

ตารางที่ 4.9 สมการเส้นตรง และค่า R^2 ของกราฟมาตรฐานของสารประกอบเอมีน 6 ชนิด ได้แก่ putrescine cadaverine histamine tryptamine tyramine และ ß-phenylethylamine โดยทำการตรวจวิเคราะห์ ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

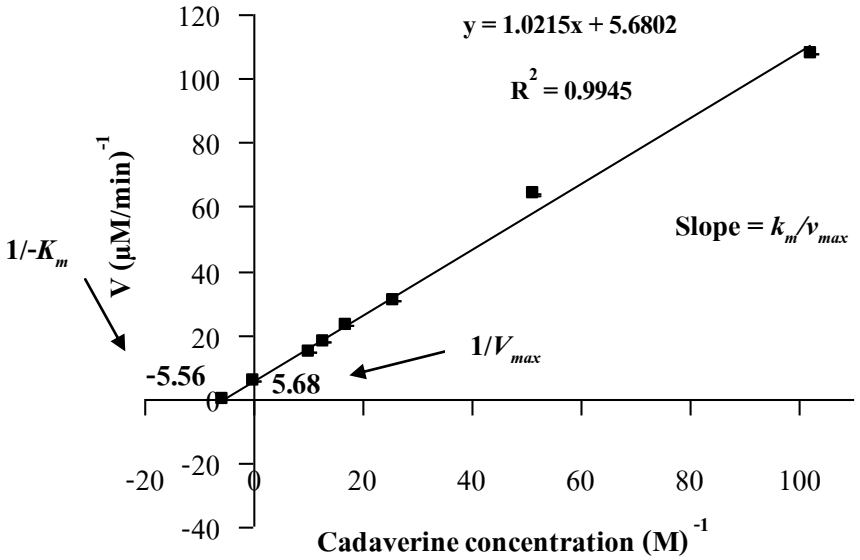
Biogenic amines	Equation	R^2
putrescine	y = 0.1469x	0.9941
cadaverine	y = 0.1348x	0.9912
histamine	y = 0.1265x	0.9914
tryptamine	y = 0.0628x	0.9951
tyramine	y = 0.5400x	0.9901
ß-phenylethylamine	y = 0.4394x	0.9906

4.16 การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง

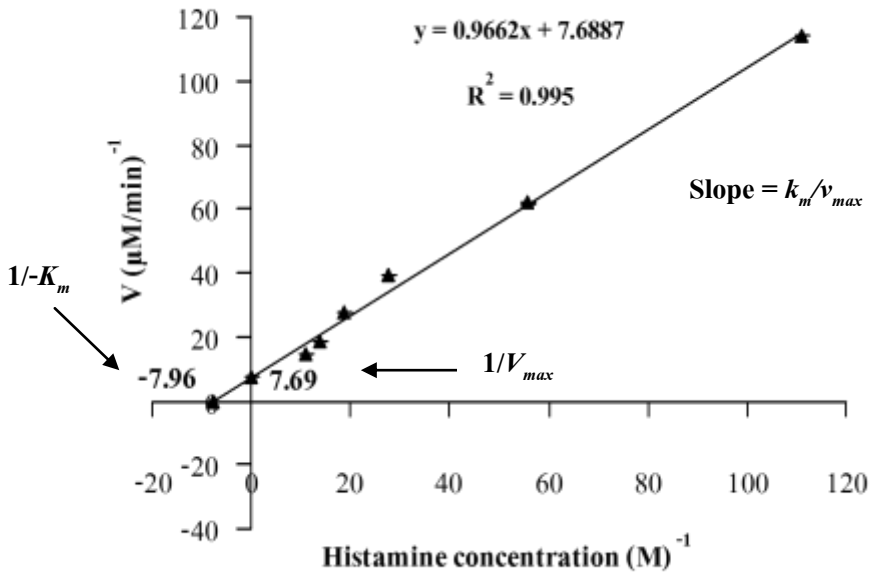
จากการศึกษาความเข้มข้นของสารประกอบเอมีนมาตรฐานได้แก่ putrescine cadaverine histamine tryptamine tyramine และ ß - phenylethylamine ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่า อัตราการเกิดปฏิกิริยาช่วงที่เป็นเส้นตรง อยู่ในช่วงความเข้มข้นของสารประกอบเอมีนชนิด putrescine cadaverine และ histamine ในช่วงความเข้มข้น 0 – 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารประกอบเอมีนชนิด tryptamine ในช่วงความเข้มข้น 0 – 14 มิลลิกรัมต่อ และสารประกอบเอมีนชนิด tyramine และ ß - phenylethylamine ในช่วงความเข้มข้น 0 – 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (จากผลการทดลองที่ 4.15) ซึ่งสามารถใช้เป็นกราฟมาตรฐานสำหรับการคำนวณปริมาณสารประกอบเอมีนในตัวอย่างอาหารหมักดอง และเมื่อนำไปสร้างกราฟระหว่างค่าส่วนกลับของอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา (1/V) และค่าส่วนกลับของความเข้มข้นของสารประกอบเอมีนมาตรฐาน (1/[S]) ซึ่งเรียกว่า Lineweaver-Burk plot จะสามารถคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} ได้จากจุดตัดบนแกนตั้งหรือแกนนอน และความชัน (slope) ของเส้นตรง พบว่า ค่าอัตราความเร็วสูงสุด (V_{max}) ของปฏิกิริยาของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง โดยมีสารประกอบเอมีนมาตรฐานได้แก่ putrescine cadaverine histamine tryptamine tyramine และ ß - phenylethylamine เป็นซับสเตรตมีค่า เท่ากับ 0.471 0.176 0.130 0.517 0.385 และ 0.211 ไมโครโมลาร์ต่อนาที ตามลำดับ และมีค่าคงที่ของมิเคลิส (K_m) เท่ากับ 0.608 0.180 0.126 0.868 0.077 และ 0.051 โมลาร์ ตามลำดับ ผลแสดงในรูปที่ 4.42 4.43 4.44 4.45 4.46 และ 4.47 และตารางที่ 4.10 ก.42 ก.43 ก.44 ก.45 ก.46 และ ก.47



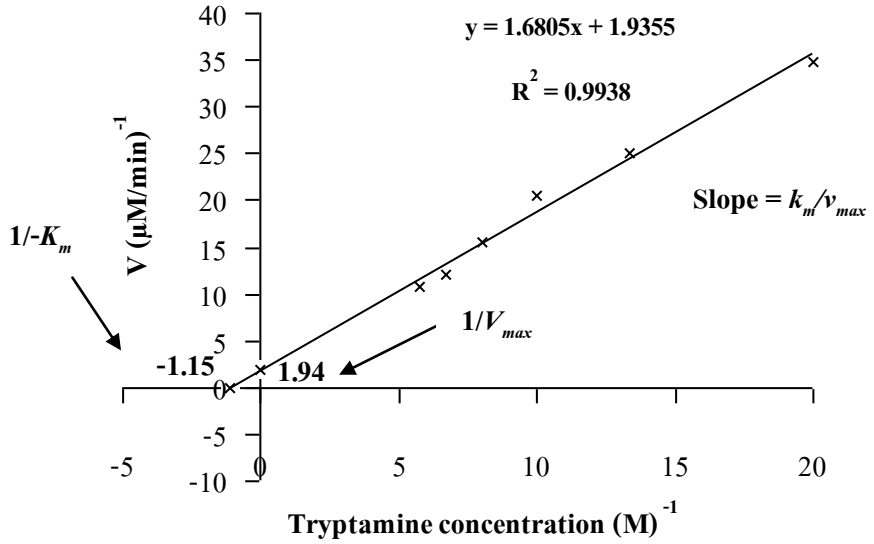
รูปที่ 4.42 การหาค่า K_m และ V_{max}ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ที่มีสารประกอบเอมีนมาตรฐานชนิด putrescine เป็นซับสเตรต โดยคำนวณจาก Lineweaver-Burk plot



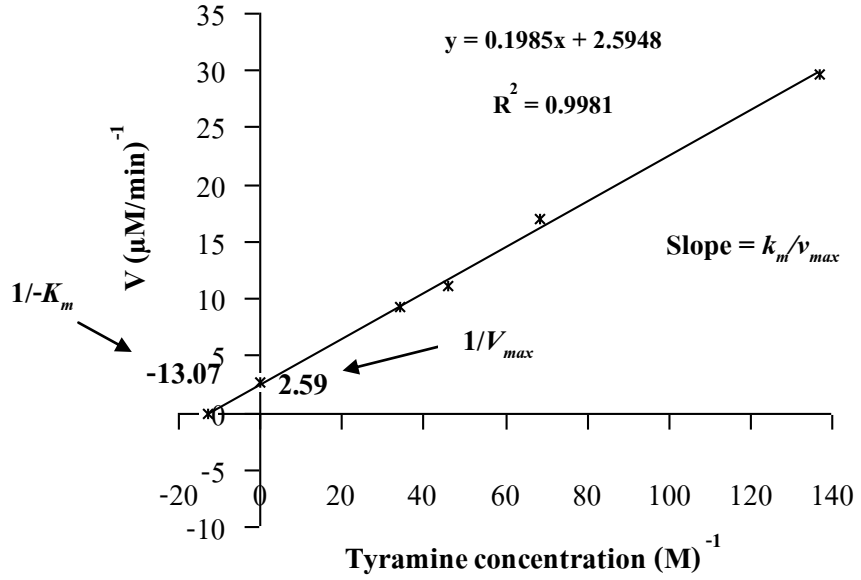
รูปที่ 4.43 การหาค่า K_m และ V_{max}ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ที่มีสารประกอบเอมีนมาตรฐานชนิด cadaverine เป็นซับสเตรต โดยคำนวณจาก Lineweaver-Burk plot



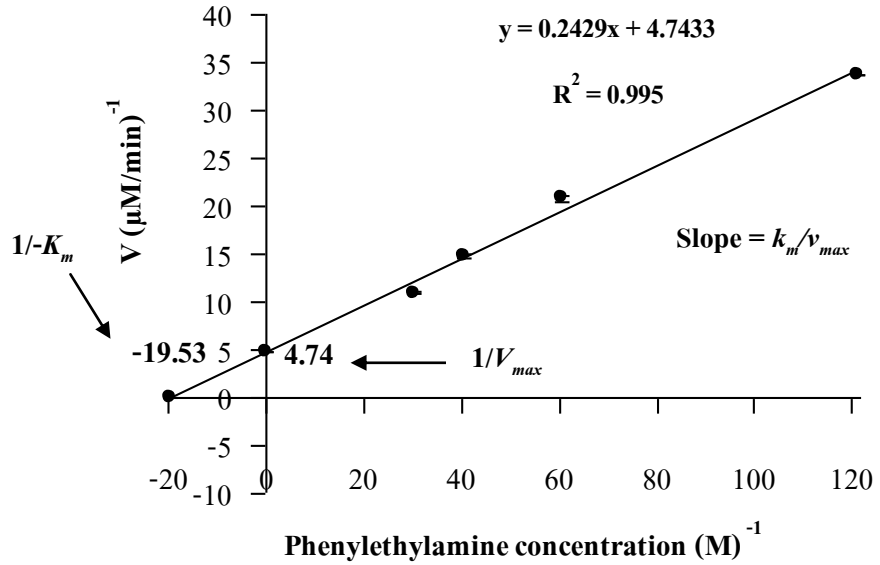
รูปที่ 4.44 การหาค่า K_m และ V_{max}ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ที่มีสารประกอบเอมีนมาตรฐานชนิด histamine เป็นซับสเตรต โดยคำนวณจาก Lineweaver-Burk plot



รูปที่ 4.45 การหาค่า K_m และ V_{max}ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ที่มีสารประกอบเอมีนมาตรฐานชนิด tryptamine เป็นซับสเตรต โดยคำนวณจาก Lineweaver-Burk plot



รูปที่ 4.46 การหาค่า K_m และ V_{max}ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ที่มีสารประกอบเอมีนมาตรฐานชนิด tyramine เป็นซับสเตรต โดยคำนวณจาก Lineweaver-Burk plot



รูปที่ 4.47 การหาค่า K_m และ V_{max}ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ที่มีสารประกอบเอมีนมาตรฐานชนิด ß - phenylethylamine เป็นซับสเตรต โดยคำนวณจาก Lineweaver-Burk plot

ตารางที่ 4.10 ค่า K_m และ V_{max}ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ที่มีสารประกอบเอมีนมาตรฐานได้แก่ putrescine cadaverine histamine tryptamine tyramine และ ß -phenylethylamine เป็นซับสเตรต โดยคำนวณจาก Lineweaver-Burk plot

ซับสเตรตในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เอมีนออกซิเดส	V_{max} ($\mu M.min^{-1}$)	K_m (M)
putrescine	0.471	0.608
cadaverine	0.176	0.180
histamine	0.130	0.126
tryptamine	0.517	0.868
tyramine	0.385	0.077
ß-phenylethylamine	0.211	0.051

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าค่า V_{max} ซึ่งเป็นค่าที่แสดงให้เห็นถึงอัตราความเร็วในการสลายตัวของ enzyme substrate complex ได้เป็นเอนไซม์กับผลิตภัณฑ์หรือกลับไปเป็นเอนไซม์กับซับสเตรต ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง โดยมี tryptamine เป็นสับสเตรทมีค่า V_{max} สูงที่สุด รองลงคือ putrescine tyramine ß-phenylethylamine cadaverine และ histamine ตามลำดับ แสดงว่าเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองมีอัตราความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด เมื่อใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐานชนิด tryptamine เป็นซับสเตรต ซึ่งค่า V_{max} ของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นไม่มีความสัมพันธ์กับค่า K_m หรือค่าที่แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์สามารถจับกับซับสเตรตได้ดีเพียงใด โดยถ้าค่า K_m น้อยก็แสดงว่าเอนไซม์สามารถจับกับซับสเตรตได้ดี ซึ่งจากการทดลองพบว่าเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองสามารถจับกับสับสเตรทที่เป็นสารประกอบเอมีนมาตรฐานชนิด ß-phenylethylamine ได้ดีที่สุด เนื่องจากมีค่า K_m น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารประกอบเอมีนมาตรฐานชนิดอื่นๆ รองลงมาคือ tyramine histamine cadaverine putrescine และ tryptamine ตามลำดับ ดังนั้นแสดงว่าเอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่สกัดได้จากถั่วเหลืองมีกิจกรรมของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดสมากที่สุด เนื่องจากเอนไซม์สามารถจับสารประกอบเอมีนชนิดโมโนเอมีน ได้แก่ ß-phenylethylamine และ tyramine ได้ดีกว่าสารประกอบเอมีนชนิดอื่น

จากงานวิจัยของ Pietrangeli และคณะ (2007) ซึ่งได้ทำการศึกษาความจำเพาะกับซับสเตรตของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่สกัดจากพืช โดยได้ศึกษาตัวแปรต่างๆทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่สกัดได้จากเมล็ดถั่วแดง และถั่วลันเตา พบว่า เอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่สกัดได้จาก

ถั่วแดงมีความสามารถในการจับจำเพาะกับสารประกอบเอมีนชนิด putrescine cadaverine spermidine agmatine tyramine spermine phenylethylamine histamine 3-aminomethylpyridine benzylamine 4-aminomethylpyridine 2-aminoethylpyridine และ2-aminomethylpyridine โดยมีค่า K_m ที่ pH 7.2 เท่ากับ 2.7×10^{-4} 1.0×10^{-4} 2.1×10^{-3} 4.9×10^{-4} 3.1×10^{-3} 6.3×10^{-4} 1.2×10^{-3} 7.9×10^{-4} 5.8×10^{-4} 2.9×10^{-4} 1.0×10^{-4} 1.6×10^{-4} และ 3.1×10^{-5} โมลาร์ตามลำดับ ส่วนเอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่สกัดได้จากถั่วลันเตามีความสามารถในการจับจำเพาะกับสารประกอบเอมีนชนิด putrescine spermidine tyramine phenylethylamine benzylamine และ4-aminomethylpyridine โดยมีค่า K_m ที่ pH 7.2 เท่ากับ 4.3×10^{-4} 2.9×10^{-3} 2.3×10^{-3} 8.2×10^{-4} 2.8×10^{-4} และ 9.6×10^{-5} โมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่า K_m กับเอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่สกัดจากถั่วเหลืองในงานวิจัยนี้ (ผลแสดงในตารางที่ 4.11) พบว่า มีค่าที่แตกต่างกันค่อนข้างมาก โดยเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองมีค่า K_m มากกว่าเอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่สกัดได้จากพืชทั้งสองชนิด แสดงว่าเอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่สกัดได้ในงานวิจัยนี้มีความสามารถในการจับกับซับสเตรตที่เป็นสารประกอบเอมีนชนิดต่างๆได้น้อยกว่า ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่สกัดได้ในงานวิจัยเป็น crude enzyme ที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมค่อนข้างน้อย อีกทั้งวิธีการในการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ก็แตกต่างกันด้วย ซึ่งในงานวิจัยของ Pietrangeli และคณะ (2007) ได้วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยตรงจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เอมีนออกซิเดส เมื่อมีสารประกอบเอมีนชนิดต่างๆเป็นซับสเตรต แต่ในงานวิจัยนี้ได้วัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์เอมีนออกซิเดส โดยอาศัยปฏิกิริยาควบคู่กับเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลในการเร่งปฏิกิริยา peroxidative halogenation ที่เร่งการเติมหมู่โบรไมด์เข้าสู่ฟีนอลเรด โดยมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของเอมีนออกซิเดส เมื่อใช้สารประกอบเอมีนชนิดต่างๆเป็นซับสเตรต เข้าร่วมในปฏิกิริยา ซึ่งได้โบรโมรฟีนอลบลูเป็นผลิตภัณฑ์ แล้วจึงทำการวัดโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้น นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจากชนิดของซับสเตรต พบว่า เอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองสามารถจับจำเพาะได้กับสารประกอบเอมีนชนิด tryptamine ในขณะที่เอนไซม์ที่สกัดได้จากถั่วแดงและถั่วลันเตาไม่จำเพาะกับสารประกอบเอมีนชนิดนี้

ตารางที่ 4.11 การเปรียบเทียบค่า K_m ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่สกัดได้จากเมล็ดถั่วเหลืองงอก ถั่วแดง และถั่วลันเตา เมื่อใช้สารประกอบเอมีนชนิดต่างๆ เป็นซับสเตรต

สับสเตรทในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เอมีนออกซิเดส	K_m (M)		
	SBAO	LCAO[a]	PSAO[a]
putrescine	6.08×10^{-1}	2.7×10^{-4}	4.3×10^{-4}
cadaverine	1.80×10^{-1}	1.0×10^{-4}	NR
histamine	1.26×10^{-1}	7.9×10^{-4}	NR
tryptamine	8.68×10^{-1}	NR	NR
tyramine	7.70×10^{-2}	3.1×10^{-3}	2.3×10^{-3}
phenylethylamine	5.10×10^{-2}	1.2×10^{-3}	8.2×10^{-4}

หมายเหตุ : SBAO หมายถึง เอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง
LCAO หมายถึง เอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วแดง
PSAO หมายถึง เอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วลันเตา
NR หมายถึง เอนไซม์ไม่จำเพาะกับซับสเตรต (no reaction)
[a] หมายถึง อ้างอิงจากงานวิจัยของ Pietrangeli และคณะ (2007)

4.17 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเอมีนจากแหนมหมู ไส้กรอกเปรี้ยว ข้าวหมาก ปลาร้า และหอยดอง ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดส จากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

จากการทดสอบหาปริมาณสารประกอบเอมีนในตัวอย่างอาหารหมักดอง ได้แก่ แหนมหมู ไส้กรอกเปรี้ยว ข้าวหมาก ปลาร้า และหอยดอง ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยคำนวณปริมาณของสารประกอบเอมีนรวมจากกราฟมาตรฐานของ putrescine พบว่า ตัวอย่างอาหารหมักดองแต่ละชนิดมีปริมาณสารประกอบเอมีนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือ ตัวอย่างแหนมหมู ไส้กรอกเปรี้ยว ข้าวหมาก ปลาร้า และหอยดอง มีปริมาณสารประกอบเอมีนเท่ากับ 207.34 183.19 93.49 381.82 และ 344.15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.12 และ ก.48 ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าปริมาณสารประกอบเอมีนในตัวอย่างอาหารหมักดองชนิดต่างๆ ที่

วิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล มีค่าใกล้เคียงกับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล ดังนั้นในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay สามารถใช้เอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่สกัดได้จากถั่วเหลืองแทนเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าได้ โดยมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนที่ไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้เป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในการซื้อเอนไซม์ ไดเอมีนออกซิเดสจากต่างประเทศ โดยสามารถใช้เอนไซม์ที่สกัดจากพืชที่มีอยู่ในท้องถิ่นมาใช้ทดแทนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 4.12 ปริมาณสารประกอบเอมีนที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารหมักดองชนิดต่าง ๆ ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

ตัวอย่าง	ปริมาณสารประกอบเอมีน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
แหนมหมู	207.34 ± 1.20^{c}
ไส้กรอกเปรี้ยว	183.19 ± 3.47^{d}
ข้าวหมาก	93.49 ± 5.13^{e}
ปลาร้า	381.82 ± 5.99^{a}
หอยดอง	344.15 ± 1.07^{b}

หมายเหตุ : ผลการทดลองเท่ากับ mean ± SD n = 2 และ ^{abcde} หมายถึง ค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล โดยใช้ ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้การทดสอบแบบ Duncan Test

4.18 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดองประเภทต่างๆ

จากการสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดอง 4 ประเภท ได้แก่ อาหารหมักดองประเภทเนื้อสัตว์ 5 ตัวอย่าง คือ ไส้กรอกซาลามิ เบคอนยัดไส้ น้ำบูดู ไตปลาดอง และแหนมปลากราย อาหารหมักดองประเภทนม และผลิตภัณฑ์นม 6 ตัวอย่าง คือ บลูชีส มอสซาเรลลาชีส นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม ยี่ห้อโฟร์โมสต์ และยี่ห้อเมจิ และโยเกิร์ตยี่ห้อดัชชี่ และยี่ห้อเดลี่โฮม อาหารหมักดองประเภทผัก 3 ตัวอย่าง คือ ผักเสี้ยนดอง หน่อเหรียงดอง และสะตอ และอาหารหมักดองประเภทเครื่องดื่ม 5 ตัวอย่าง คือ น้ำกระชาย น้ำหมักชีวภาพ ยี่ห้อจตุผล น้ำมะรุม ไวน์แอปเปิ้ล และไวน์กระชายดำ แล้วนำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล และระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่า ปริมาณสารประกอบเอมีนที่วิเคราะห์ได้จากการวิเคราะห์ โดยใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.13 และ ก.49 แสดงว่าเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองมีประสิทธิภาพสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ไม่แตกต่างจากเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า ดังนั้นในการวิเคราะห์หาสารประกอบเอมีนในอาหารหมักดอง ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay สามารถใช้เอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองแทนเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าได้ เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในการนำเข้าเอนไซม์จากต่างประเทศ

เมื่อพิจารณาจากปริมาณสารประกอบเอมีนเฉลี่ยในตัวอย่างอาหารหมักดองประเภทต่างๆ พบว่าอาหารหมักดองประเภทเนื้อสัตว์ มีปริมาณสารประกอบเอมีนสูงกว่าอาหารหมักดองประเภทอื่นๆ เนื่องจากเนื้อสัตว์เป็นอาหารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณมาก ซึ่งโปรตีนสามารถสลายตัวกลายเป็นกรดอะมิโนอิสระที่เป็นสารตั้งต้นในการเกิดสารประกอบเอมีน ดังนั้นทำให้อาหารหมักดองประเภทเนื้อสัตว์มีโอกาสในการเกิดสารประกอบเอมีนมากกว่าอาหารหมักดองประเภทอื่นๆ ที่มีปริมาณโปรตีนเป็นองค์ประกอบน้อยกว่า นอกจากนี้การเกิดสารประกอบเอมีนในอาหารหมักดองยังขึ้นอยู่กับชนิด และปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในอาหาร รวมทั้งระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก โดยปัจจัยในเรื่องของเชื้อจุลินทรีย์นี้เกี่ยวข้องกับสุขลักษณะในการผลิต การเก็บรักษา และการมีอยู่ของส่วนประกอบอื่นๆที่อยู่ในอาหารหมักดอง ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส โดยสังเกตได้จากผลการทดลอง พบว่า อาหารหมักดองประเภทผัก และเครื่องดื่ม มีปริมาณสารประกอบเอมีนสูงกว่าอาหารหมักดองประเภทนม และผลิตภัณฑ์นม ซึ่งถึงแม้ว่าอาหารหมักดองประเภทผัก และเครื่องดื่ม มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าอาหารหมักดองประเภทนม

และผลิตภัณฑ์นม แต่เนื่องจากปัจจัยในเรื่องของสุขลักษณะในการผลิตที่แตกต่างกัน โดยอาหารหมักดองประเภทผัก และเครื่องดื่ม เป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นในท้องถิ่น ซึ่งไม่ค่อยมีการควบคุมการผลิตที่ถูกสุขลักษณะ ทั้งในขั้นตอนการผลิตที่อาจส่งผลให้อาหารหมักดองเหล่านี้เกิดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จากภายนอกได้ และในขั้นตอนของการเก็บรักษา ก็อาจมีสภาวะในเรื่องของอุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสมส่งผลให้เกิดการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดสารประกอบเอมีน ในขณะที่อาหารหมักดองประเภทนม และผลิตภัณฑ์นม เป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นในระดับอุตสาหกรรมที่มีการควบคุมการผลิต และการเก็บรักษาที่ถูกสุขลักษณะ ดังนั้นโอกาสที่เกิดสารประกอบเอมีนขึ้นในอาหารจึงมีค่อนข้างน้อย ทั้งนี้สารประกอบเอมีนก็อาจเพิ่มขึ้นได้ เมื่อเก็บอาหารหมักดองไว้เป็นระยะเวลานานๆ หรือนำมาเก็บรักษาไม่ถูกสุขลักษณะ

ตารางที่ 4.13 ปริมาณสารประกอบเอมีนที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารหมักดองประเภทต่าง ๆ ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร

ประเภทของอาหารหมักดอง	ตัวอย่าง	ปริมาณสารประกอบเอมีน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
		commercial DAO[A]	crude AO[B]
เนื้อสัตว์	ไส้กรอกซาลามิ	258.75 ± 8.25[d]	269.93 ± 17.93[d]
	ไส้กรอกเบคอนยัดไส้	496.11 ± 2.75[a]	471.01 ± 5.12[a]
	น้ำบูดู	367.22 ± 10.32[c]	372.13 ± 5.34[c]
	ไตปลาดอง	394.78 ± 3.44[bc]	418.18 ± 4.27[b]
	แหนมปลา	417.48 ± 14.90[b]	424.21 ± 10.67[b]
นม และผลิตภัณฑ์นม	บลูชีส	66.15 ± 2.75[c]	74.28 ± 10.25[c]
	มอสซาเรลลาชีส	121.60 ± 1.38[a]	106.88 ± 5.12[b]
	โยเกิร์ต ยี่ห้อดัชชี่	ND	ND
	โยเกิร์ต ยี่ห้อเดลี่โฮม	ND	ND
	นมเปรี้ยว ยี่ห้อโฟร์โมสต์	ND	24.15 ± 3.42[d]
	นมเปรี้ยว ยี่ห้อเมจิ	ND	ND
ผัก	ผักเสี้ยนดอง	107.81 ± 5.73[bc]	120.79 ± 1.57[c]
	หน่อเหรียงดอง	138.29 ± 2.06[abc]	145.17 ± 10.97[a]
	สะตอดอง	142.51 ± 1.60[a]	147.38 ± 4.70[ab]

ประเภทของอาหารหมักดอง	ตัวอย่าง	ปริมาณสารประกอบเอมีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
		commercial DAO[A]	crude AO[B]
เครื่องดื่ม	น้ำกระชาย	45.40 ± 5.50[bc]	39.01 ± 1.25[bc]
	น้ำหมักชีวภาพ ยี่ห้อจตุผล	105.06 ± 1.83[a]	109.49 ± 13.16[a]
	น้ำมะรุม	12.32 ± 0.55[de]	31.47 ± 4.39[cd]
	ไวน์แอปเปิ้ล	ND	ND
	ไวน์กระชายดำ	54.15 ± 2.29[b]	49.65 ± 1.25[bc]

หมายเหตุ : ผลการทดลองเท่ากับ mean ± SD n = 2 [abcd] หมายถึง ค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล โดยใช้ ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณสารประกอบเอมีนในตัวอย่างอาหารหมักดองแต่ละประเภท โดยใช้การทดสอบแบบ Tukey Test [A] หมายถึง การตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล [B] หมายถึง การตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล และ ND หมายถึง ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (not detected)

จากการทดลองสามารถคำนวณปริมาณสารประกอบเอมีนที่มีอยู่จริงในอาหาร โดยคิดจากปริมาณสารประกอบเอมีนเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล และระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยมีการคิดค่าเปอร์เซ็นต์ของการสกัด putrescine ที่ใช้เป็นกราฟมาตรฐานสำหรับการคำนวณปริมาณสารประกอบเอมีน ซึ่งได้จากผลการทดลองที่ 4.7.5 โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การสกัด putrescine เฉลี่ยของตัวอย่างทุกชนิดเท่ากับ 74.80 เปอร์เซ็นต์ ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ปริมาณสารประกอบเอมีนเฉลี่ยที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารหมักดองประเภทต่าง ๆ ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่าย-ทะเล โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร และคำนวณโดยคิดจากค่าเปอร์เซ็นต์การสกัด

ประเภทของอาหารหมักดอง	ตัวอย่าง	ปริมาณสารประกอบเอมีน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
เนื้อสัตว์	ไส้กรอกซาลามิ	353.38 ± 17.51[d]
	ไส้กรอกเบคอนยัดไส้	646.44 ± 19.88[a]
	น้ำบูดู	494.19 ± 9.73[c]
	ไตปลาดอง	543.39 ± 18.55[b]
	แหนมปลา	562.60 ± 15.07[b]
นม และผลิตภัณฑ์นม	บลูชีส	93.86 ± 10.32[b]
	มอสซาเรลลาชีส	152.72 ± 12.07[a]
	โยเกิร์ต ยี่ห้อดัชชี่	ND
	โยเกิร์ต ยี่ห้อเดลี่โฮม	ND
	นมเปรี้ยว ยี่ห้อโฟร์โมสต์	16.15 ± 18.83[c]
	นมเปรี้ยว ยี่ห้อเมจิ	ND
ผัก	ผักเสี้ยนดอง	152.80 ± 11.01[b]
	หน่อเหรียงดอง	189.47 ± 10.12[a]
	สะตอดอง	193.77 ± 5.37[a]
เครื่องดื่ม[A]	น้ำกระชาย	56.42 ± 6.58[b]
	น้ำหมักชีวภาพ ยี่ห้อจตุผล	143.40 ± 10.81[a]
	น้ำมะรุม	29.27 ± 15.17[c]
	ไวน์แอปเปิ้ล	ND
	ไวน์กระชายดำ	69.38 ± 4.02[b]

หมายเหตุ : ผลการทดลองเท่ากับ mean ± SD n = 2 [abcd] หมายถึง ค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล โดยใช้ ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณสารประกอบเอมีนในตัวอย่างอาหารหมักดองแต่ละประเภท

โดยใช้การทดสอบแบบ Tukey Test [A] หมายถึง คำนวณปริมาณสารประกอบเอมีนในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร และ ND หมายถึง ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (not detected)

ในงานวิจัยนี้สามารถเปรียบเทียบผลของการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในตัวอย่างอาหารหมักดอง ด้วยวิธี enzyme coupling assay กับวิธีมาตรฐาน คือ การวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ที่ยอมรับว่ามีความถูกต้องแม่นยำสูงในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน แสดงดังตารางที่ 4.15 และ 4.16 โดยจากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนในอาหารหมักดองประเภทเนื้อสัตว์ ได้มีงานวิจัยของ Hernández-Jover และคณะ (1996) ได้ทำการวิเคราะห์ ripened meat product ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง พบว่า มีปริมาณสารประกอบเอมีนที่เป็นผลรวมของ putrescine cadaverine histamine tyramine tryptamine ß-phenylethylamine agmatine spermidine และ spermine 577.15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม Ansorena และคณะ (2002) ได้ทำการวิเคราะห์ Italian sausage ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง พบว่า มีปริมาณสารประกอบเอมีนเฉลี่ย 395 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นผลรวมของสารประกอบเอมีนชนิด putrescine cadaverine tyramine tryptamine ß-phenylethylamine spermidine และ spermine นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Latorre-Moratalla และคณะ (2008) ได้ทำการวิเคราะห์ Italian sausage ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง พบว่า มีปริมาณสารประกอบเอมีนที่เป็นผลรวมของ putrescine cadaverine histamine tyramine tryptamine และ ß-phenylethylamine เท่ากับ 468.39 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากงานวิจัยทั้งสาม พบว่า สารประกอบเอมีนที่พบมากในตัวอย่างไส้กรอกหมัก คือ สารประกอบเอมีนชนิด tyramine putrescine และ cadaverine และปริมาณสารประกอบเอมีนที่วิเคราะห์มีค่าระหว่าง 395 – 577 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณสารประกอบเอมีนที่วิเคราะห์ในตัวอย่างไส้กรอกซาลามิ และเบคอนยัดไส้ของประเทศอิตาลีในงานวิจัยนี้ ที่มีปริมาณสารประกอบเอมีนอยู่ในช่วง 353 – 646 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

งานวิจัยของ Saaid และคณะ (2009) ได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำบูดูทั้งหมด 8 ตัวอย่าง พบว่า มีปริมาณสารประกอบเอมีนชนิด putrescine histamine tyramine tryptamine และ spermidine รวมทั้งหมด 488.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยสารประกอบเอมีนที่พบมาก คือ ชนิด histamine และ tyramine ซึ่งในงานวิจัยนี้ก็ได้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนในตัวอย่างน้ำบูดูได้ปริมาณเท่ากับ 494.19 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จะเห็นได้ว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Saaid และคณะ (2009) และเมื่อพิจารณาปริมาณสารประกอบเอมีนที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างน้ำบูดู ไตปลาดอง และแหนมปลา พบว่า มีปริมาณเกินกว่า 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งจากงานวิจัยของ Spanjer และ Van Roode (1991) ได้กำหนดปริมาณของสารประกอบเอมีนที่เป็นผลรวมของสารประกอบเอมีนชนิด putrescine cadaverine และ histamine ที่พบในตัวอย่างเนื้อปลาหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเนื้อปลา ไม่ควรเกิน 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นตัวอย่างน้ำบูดู ไตปลาดอง และแหนมปลา จึงไม่ปลอดภัยต่อการ

บริโภค ซึ่งจะเห็นได้ว่า น้ำบูดู และไตปลาดอง เป็นอาหารประเภทปลาที่ผ่านการหมักเป็นระยะเวลานาน 40 - 60 วัน ทำให้เกิดการสลายตัวของโปรตีนเป็นกรดอะมิโนอิสระได้มาก และยังมีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารหมักดองเป็นจำนวนมาก ส่วนแหนมปลาอาจเกิดจากขั้นตอนการผลิตที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จากภายนอก ส่งผลให้เกิดมีปริมาณสารประกอบเอมีนในอาหารค่อนข้างสูง

ในงานวิจัยของ Novella-Rodríguez และคณะ(2000) ซึ่งได้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนในนมและ ผลิตภัณฑ์จากนมชนิดต่างๆ ด้วยวิธี HPLC พบว่า จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง ripened cheeses ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง โยเกิร์ต 5 ตัวอย่าง และ นม 5 ตัวอย่าง มีค่าเฉลี่ยปริมาณสารประกอบเอมีนชนิด putrescine cadaverine histamine tyramine tryptamine ß-phenylethylamine agmatine spermidine และ spermine เท่ากับ 98.96 0.63 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยสารประกอบเอมีนที่พบมากคือ ชนิด tyramine putrescine และcadaverine ซึ่งผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนในตัวอย่างอาหารหมักดองประเภทนม และผลิตภัณฑ์นม มีค่าใกล้เคียงกับผลการทดลองในงานวิจัยนี้ โดยจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ในตัวอย่างโยเกิร์ต และนมเปรี้ยว มีปริมาณสารประกอบเอมีนน้อยมากจนถึงไม่สามารถตรวจพบได้เลย แสดงว่าในการผลิตโยเกิร์ตและนมเปรี้ยว มีการควบคุมการผลิตที่ดี โดยในอุตสาหกรรมการผลิตนั้นมักมีการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักเพื่อให้เกิดกรดแลคติกที่เป็นกลิ่นรสเฉพาะตัวของผลิตภัณฑ์ประเภทนี้ ซึ่งการใช้หัวเชื้อในการหมักแทนการปล่อยให้เกิดการหมักเองตามธรรมชาติจะเป็นการช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆที่ทำให้เกิดสารประกอบเอมีน และนอกจากนี้ในกระบวนการผลิตจะมีการควบคุมอุณหภูมิในการหมัก การเก็บรักษา รวมถึงการขนส่ง ซึ่งเป็นการช่วยชะลอการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ จากปัจจัยต่างๆเหล่านี้จึงส่งผลให้อาหารหมักดองประเภทโยเกิร์ตและนมเปรี้ยว มีปริมาณสารประกอบเอมีนในผลิตภัณฑ์อยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำมาก ผู้บริโภคจึงไม่ต้องกังวลในเรื่องของความปลอดภัยในการบริโภคอาหารหมักดองประเภทนี้

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนในอาหารหมักดองประเภทผัก ได้มีงานวิจัยของ Moret และคณะ (2005) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนในกระหล่ำปลีดอง ด้วยวิธี HPLC พบว่า ตัวอย่างกระหล่ำปลีดองมีปริมาณสารประกอบเอมีนเท่ากับ 201 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ผลรวมของ putrescine cadaverine histamine tyramine spermidine และ spermine) ซึ่งสารประกอบเอมีนที่พบมากคือ ชนิด putrescine cadaverine และ tyramine และจากงานวิจัยของ Kalac และคณะ (1999) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนในกระหล่ำปลีดอง 121 ตัวอย่าง ด้วยวิธี micellar electrokinetic capillary chromatography พบว่า มีปริมาณเฉลี่ยของสารประกอบเอมีนชนิด tyramine putrescine และ cadaverine เท่ากับ 174 146 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งในงานวิจัยนี้สามารถ

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนในตัวอย่างผักเสี้ยนดอง หน่อเหรียงดอง และสะตอดอง เฉลี่ยเท่ากับ 180.48 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยทั้งสอง พบว่า ปริมาณสารประกอบเอมีนที่วิเคราะห์ได้จากอาหารหมักดองประเภทผักมีค่าน้อยกว่า ทั้งนี้อาจเกิดขึ้นเนื่องจากความแตกต่างกันในเรื่องของชนิดของผักที่ใช้เป็นวัตถุดิบ กระบวนการผลิต รวมทั้งส่วนผสมอื่นๆที่ใช้ในการหมัก เช่น ปริมาณเกลือ หรือกรดที่อาจเติมเพิ่มลงไป เช่น กรดซิตริก กรดมาลิก หรือกรดซัคซินิก ซึ่งกรดเหล่านี้มีผลให้การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ histidine decarboxylase (Kang และ Park, 1984) รวมทั้งผลของการใช้สารกันบูดต่างๆ เช่น potassium sorbate หรือ sodium hexametaphosphate ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ส่งผลให้มีการเกิดสารประกอบเอมีนน้อยลงได้ (Taylor และ Speckhard, 1984)

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนในอาหารหมักดองประเภทเครื่องดื่ม ได้มีงานวิจัยของ Yongmei และคณะ (2007) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนในตัวอย่างไวน์ข้าว 14 ตัวอย่าง ด้วยวิธี HPLC พบว่า มีปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 107.05 มิลลิกรัมต่อลิตร (ผลรวมของ putrescine cadaverine histamine agmatine spermidine และ spermine) ซึ่งสารประกอบเอมีนที่พบมากคือ ชนิด tyramine cadaverine และ histamine และ García-Villar และคณะ (2009) ได้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนในตัวอย่างไวน์แดงทั้งหมด 8 ตัวอย่าง พบว่า มีค่าเฉลี่ยของปริมาณสารประกอบเอมีนชนิด putrescine cadaverine histamine tyramine และ ß-phenylethylamine เท่ากับ 25.32 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสารประกอบเอมีนที่พบมากคือ ชนิด putrescine histamine และ tyramine โดยเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารประกอบเอมีนที่วิเคราะห์จากตัวอย่างไวน์กระชายดำในงานวิจัยนี้ พบว่าปริมาณสารประกอบเอมีนที่ตรวจพบในไวน์แต่ละชนิดมีค่าแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเกิดขึ้นเนื่องจากไวน์แต่ละชนิดใช้วัตถุดิบในการผลิตที่ไม่เหมือนกัน คือ ใช้ข้าว องุ่นแดง หรือ กระชายดำ ซึ่งพืชแต่ละมีองค์ประกอบทางเคมีหรือปริมาณโปรตีน รวมทั้งไวน์แต่ละชนิดใช้เวลาในการบ่มที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่างไวน์แต่ละชนิดมีค่าแตกต่างกันด้วย

เมื่อพิจารณาจากผลการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนจากตัวอย่างอาหารหมักดองประเภทต่างๆด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่า ค่าที่วิเคราะห์ได้มีความใกล้เคียงกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ค่อนข้างมาก แสดงให้เห็นว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้ไม่เป็นการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกินกว่าค่าจริง (over estimation) ดังนั้นการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมักดอง ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลมีความถูกต้องแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งสามารถเชื่อถือได้เช่นเดียวกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี

HPLC ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง และเพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องของวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ ควรนำตัวอย่างอาหารหมักดองชนิดต่างๆ มาทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นอีกครั้งด้วยวิธี HPLC โดยเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างเดียวกัน ที่มีแหล่งผลิตเหมือนกัน อายุการหมักเท่ากัน

ตารางที่ 4.15 การเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนในตัวอย่างอาหารหมักดองประเภทต่างๆ ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) กับวิธี enzyme coupling assay

วิธีการตรวจวิเคราะห์	อาหารหมักดอง	สารประกอบเอมีน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	แหล่งอ้างอิง
HPLC	ripened meat product	577.15	Hernández-Jover et al.(1996)
	Italian sausage	395	Ansorena et al. (2002)
	Italian sausage	468.39	Latorre-Moratalla et al. (2008)
Enzyme coupling assay	ไส้กรอกซาลามิ	353.38	ในงานวิจัยนี้
	ไส้กรอกเบคอนยัดไส้	646.44	
HPLC	budu	488.3	Saaid et al. (2009)
Enzyme coupling assay	น้ำบูดู	494.19	ในงานวิจัยนี้
	ไตปลาดอง	543.39	
HPLC	ripened cheese	98.96	Novella-Rodríguez et al. (2000)
	yogurt	0.63	
	milk	0.25	
Enzyme coupling assay	บลูชีส	93.86	ในงานวิจัยนี้
	มอสซาเรลลาชีส	152.72	
	โยเกิร์ต ยี่ห้อดัชชี่	ND	
	โยเกิร์ต ยี่ห้อเดลี่โฮม	ND	
	นมเปรี้ยว ยี่ห้อโฟร์โมสต์	16.15	
	นมเปรี้ยว ยี่ห้อเมจิ	ND	

วิธีการตรวจวิเคราะห์	อาหารหมักดอง	สารประกอบเอมีน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	แหล่งอ้างอิง
Enzyme coupling assay	ผักเสี้ยนดอง	152.80	ในงานวิจัยนี้
	หน่อเหรียงดอง	189.47	
	สะตอดอง	193.77	
HPLC	rice wine[A]	107.05	Yongmei et al. (2007)
	red wine[A]	25.32	García-Villar et al. (2009)
Enzyme coupling assay	ไวน์แอปเปิ้ล[A]	ND	ในงานวิจัยนี้
	ไวน์กระชายดำ[A]	69.38	

หมายเหตุ [A] หมายถึง ปริมาณสารประกอบเอมีนในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร และ ND หมายถึง ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (not detected)

ตารางที่ 4.16 ปริมาณสารประกอบเอมีนในตัวอย่างอาหารหมักดองประเภทต่างๆ ซึ่งทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

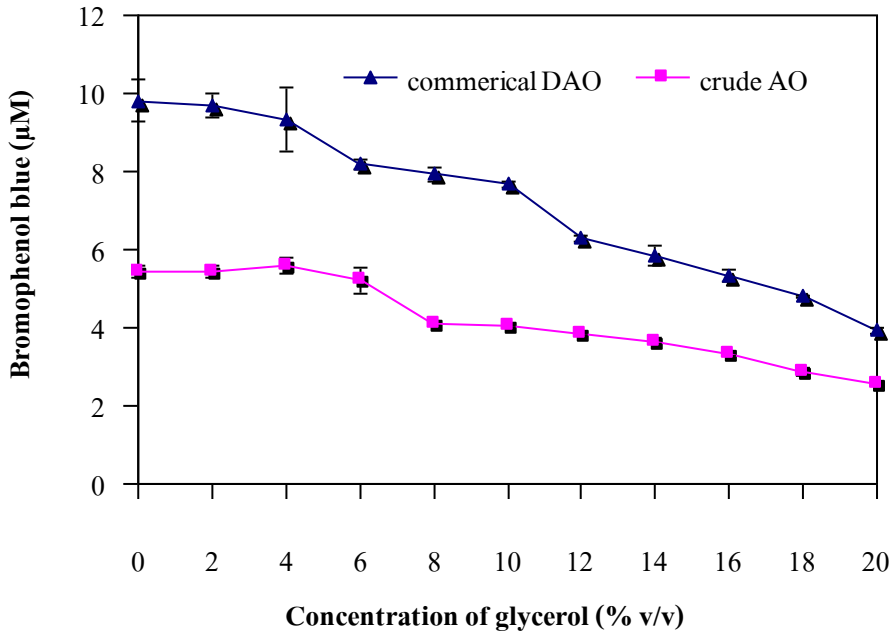
อาหารหมักดอง (จำนวนตัวอย่าง)	ปริมาณสารประกอบเอมีนเฉลี่ย (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)										แหล่งอ้างอิง
	PU	CA	HI	TY	TR	PHE	AG	SD	SM	รวมทั้งหมด	
ripened meat product (n = 10)	145.25	22.65	29.90	312.35	34.00	10.35	0.80	3.80	18.05	577.15	Hernández-Jover และคณะ (1996)
Italian sausage (n =5)	125	1	0	187	19	39	ND	6	18	395	Ansorena และคณะ (2002)
Italian sausage (n =10)	124.87	150.42	1.45	180.2	5.17	6.28	ND	ND	ND	468.39	Latorre-Moratalla และคณะ (2008)
budu (n = 8)	38.1	ND	187.7	174.7	82.7	ND	ND	5.1	ND	488.3	Saaid และคณะ (2009)
ripened cheese (n =10)	14.16	11.08	5.62	44.29	0	6.45	4.02	11.17	2.17	98.96	Novella-Rodríguez และคณะ (2000)
yogurt (n = 5)	ND	0.11	ND	ND	ND	ND	0.16	0.21	0.15	0.63	
milk (n = 5)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.08	0.17	ND	0.25	
sauerkraut	92	39	15	48	ND	ND	ND	5	2	201	Moret และคณะ (2005)
rice wine[a] (n = 14)	ND	25.42	22.06	33.98	ND	ND	ND	8.06	17.53	107.05	Yongmei และคณะ (2007)
red wine[a] (n = 8)	13.34	0.3	7.16	4.12	ND	0.4	ND	ND	ND	25.32	García-Villar และคณะ (2009)

หมายเหตุ : PU = putrescine CA = cadaverine HI = histamine TY = tyramine TR = tryptamine PHE = ß-phenylethylamine AG = agmatine SD = spermidine SM= spermine [a] หมายถึง ปริมาณสารประกอบเอมีนในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร และ ND หมายถึง ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (not detected)

4.19 การศึกษาเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป

4.19.1 การศึกษาความเข้มข้นของ stabilizer ที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการรักษาเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป

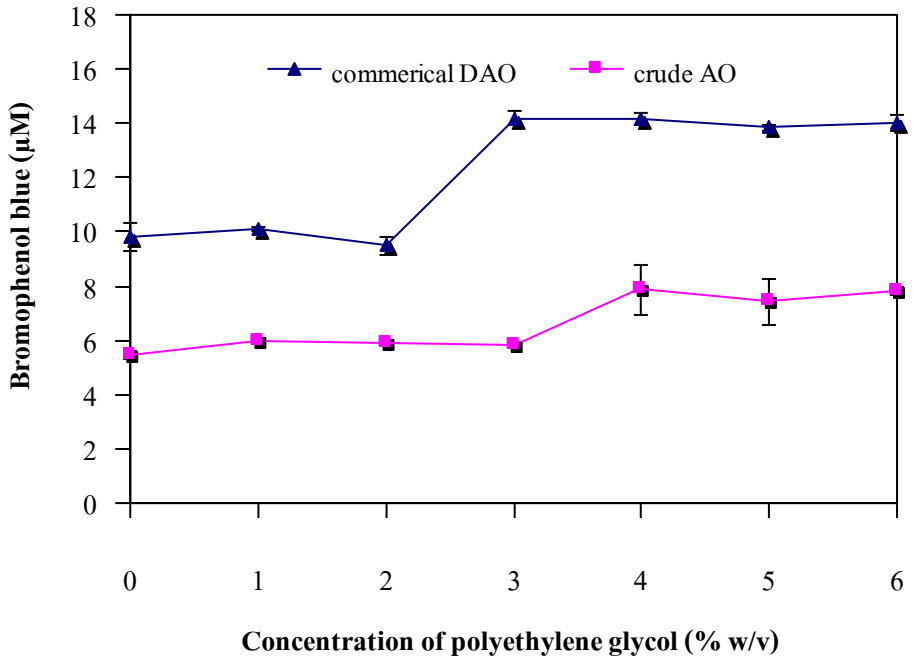
จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของ stabilizer ได้แก่ กลีเซอรอล เข้มข้น 2 4 6 8 10 12 14 16 18 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) หรือเติมโพลีเอทีลีนไกลคอล เข้มข้น 1 2 3 4 5 และ 6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา enzyme coupling assay ของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป 2 ชนิด คือ ชนิดที่อาศัยการทำงานของเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า ร่วมกับเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล และชนิดที่อาศัยการทำงานของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล เมื่อใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐานชนิด putrescine เป็นสารตั้งต้น พบว่า เมื่อเติมกลีเซอรอล เข้มข้น 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในน้ำยาตรวจวิเคราะห์ชนิดที่มีการใช้เอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า ปริมาณของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นไม่แตกต่างจากน้ำยาตรวจวิเคราะห์ที่ไม่มีการเติมกลีเซอรอล แต่เมื่อเติมกลีเซอรอล เข้มข้น 6 - 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาณของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นค่อยๆลดลง ส่วนน้ำยาตรวจวิเคราะห์ชนิดที่มีการใช้เอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง พบว่า เมื่อเติมกลีเซอรอล เข้มข้น 2 - 6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาณของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นไม่เปลี่ยนแปลง แต่เมื่อเติมกลีเซอรอล เข้มข้น 8 - 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาณของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นก็ค่อยๆลดลงเช่นเดียวกัน ผลแสดงดังรูปที่ 4.48 และตารางที่ ก.50 ทั้งนี้เนื่องจากการเติมกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นสูงๆ อาจมีผลในการรบกวนสีของโบรโมฟีนอลบลู ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในสารละลายปฏิกิริยา ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้ลดลง ดังนั้น ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการรักษาเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป ชนิดที่ประกอบด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล และชนิดที่ประกอบด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล คือ กลีเซอรอล เข้มข้น 2 - 4 และ 2 - 6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตามลำดับ



รูปที่ 4.48 ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา enzyme coupling assay ของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป ชนิดที่ใช้เอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และชนิดที่ใช้เอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล เมื่อใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐาน putrescine เป็นสารตั้งต้น โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

เมื่อเติมโพลีเอทีลีนไกลคอล เข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงในน้ำยาตรวจวิเคราะห์ชนิดที่มีการใช้เอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า พบว่า ปริมาณของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นไม่แตกต่างจากน้ำยาตรวจวิเคราะห์ที่ไม่มีการเติมโพลีเอทีลีนไกลคอล แต่เมื่อเติมโพลีเอทีลีนไกลคอล เข้มข้น 3 - 6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นเพิ่มสูงขึ้นมาก ส่วนน้ำยาตรวจวิเคราะห์ชนิดที่มีการใช้เอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง พบว่า เมื่อเติมโพลีเอทีลีนไกลคอล เข้มข้น 1 - 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นไม่เปลี่ยนแปลง แต่เมื่อเติมโพลีเอทีลีนไกลคอล เข้มข้น 4 - 6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณของโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นก็เพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน ผลแสดงดังรูปที่ 4.49 และตารางที่ ก.51 ทั้งนี้เนื่องจากโพลีเอทีลีนไกลคอลที่ความเข้มข้นสูงๆ จะมีความหนืดมาก เมื่อเติมลงในสารละลายปฏิกิริยา ทำให้สารละลายปฏิกิริยามีตะกอนเกิดขึ้น ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้เกิดความเคลื่อนคลาด โดยค่าที่วัดได้สูงกว่าความเป็นจริง ดังนั้น ความเข้มข้นของโพลีเอทีลีนไกลคอล ที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการรักษาเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป ชนิดที่ประกอบด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอนไซม์

ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล และชนิดที่ประกอบด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล คือ โพลีเอทีลีนไกลคอล เข้มข้น 1 - 2 และ 1 - 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ

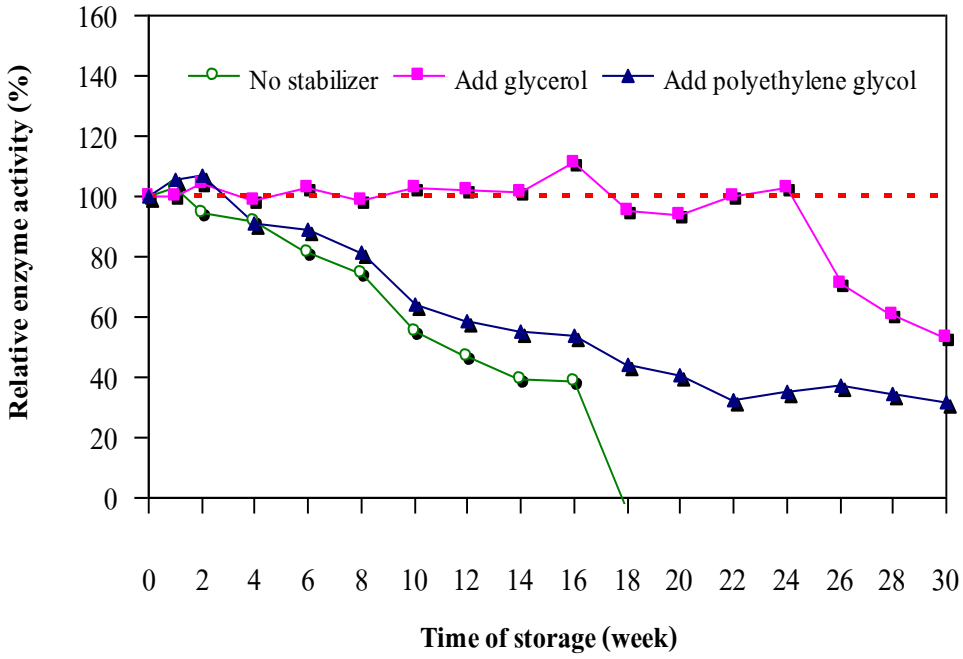


รูปที่ 4.49 ผลของความเข้มข้นของโพลีเอทีลีนไกลคอลต่อปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา enzyme coupling assay ของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป ชนิดที่ใช้เอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และชนิดที่ใช้เอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล เมื่อใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐาน putrescine เป็นสารตั้งต้น โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

4.19.2 การศึกษาผลของการใช้ stabilizer ต่อเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป

จากการศึกษาผลของการใช้ stabilizer ต่อเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป โดยวิเคราะห์ผลจากค่าเปอร์เซ็นต์ Relative activity ของเอนไซม์ เมื่อผ่านการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการศึกษาปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป ที่ประกอบด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 3 ชนิด คือ น้ำยาชนิดที่ไม่มีการเติม stabilizer

(ตัวอย่างควบคุม) น้ำยาชนิดที่มีการเติมกลีเซอรอล เป็น stabilizer และน้ำยาชนิดที่มีการเติมโพลีเอทีลีนไกลคอล เป็น stabilizer พบว่า เมื่อเก็บรักษาน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปเป็นระยะเวลา 30 สัปดาห์ น้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปชนิดที่ไม่มีการเติม stabilizer และน้ำยาชนิดที่เติมโพลีเอทีลีนไกลคอล มีกิจกรรมของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาลดลงมากจนไม่มีกิจกรรมเหลืออยู่เลย โดยน้ำยาตรวจวิเคราะห์ชนิดที่ไม่มีการเติม stabilizer มีอายุการเก็บประมาณ 6 สัปดาห์ (มีเสถียรภาพประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์) ส่วนน้ำยาตรวจวิเคราะห์ที่เติมสารโพลีเอทีลีนไกลคอล เป็น stabilizer มีอายุการเก็บประมาณ 8 สัปดาห์ (มีเสถียรภาพประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์) โดยสามารถยืดอายุการเก็บของน้ำยาตรวจวิเคราะห์ได้เพียง 2 สัปดาห์เท่านั้น ส่วนน้ำยาตรวจวิเคราะห์ชนิดที่มีการเติมกลีเซอรอล พบว่า เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 24 สัปดาห์ เอนไซม์มีกิจกรรมในการทำปฏิกิริยาไม่แตกต่างจากน้ำยาที่ไม่ผ่านการเก็บรักษา และค่อยๆมีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือ 53 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาจนครบ 30 สัปดาห์ ดังแสดงในรูปที่ 4.50 และตารางที่ ก.52 ดังนั้นการเติมกลีเซอรอลในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป ที่ประกอบด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล สามารถยืดอายุการเก็บรักษาของน้ำยาได้ดี โดยทำให้น้ำยาตรวจวิเคราะห์มีอายุการเก็บ 24 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

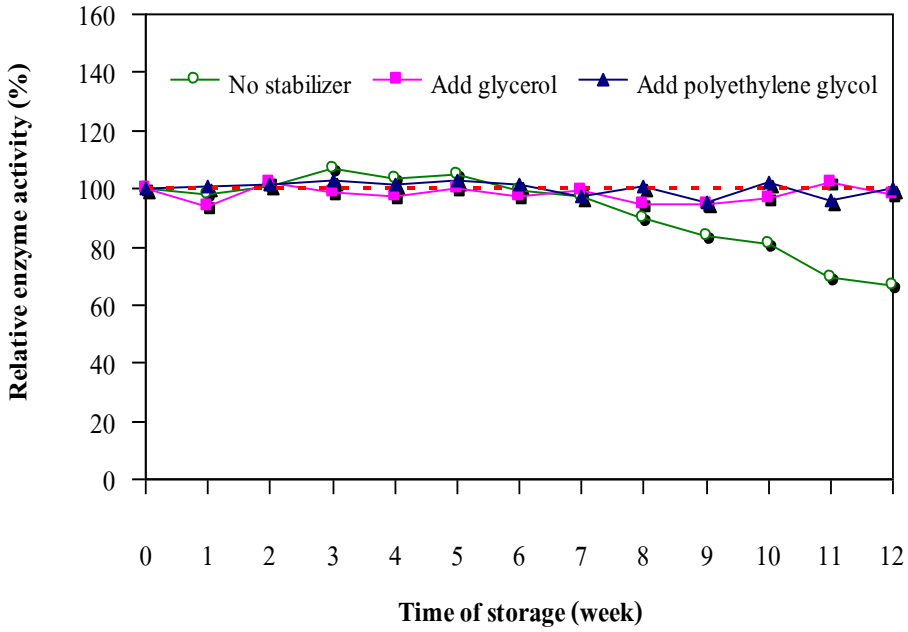


รูปที่ 4.50 ผลของการใช้ stabilizer ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปชนิดที่ประกอบด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล เมื่อใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐาน putrescine เป็นสารตั้งต้น โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

จากการศึกษาปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูป ชนิดที่ประกอบด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล 3 ชนิด คือ น้ำยาชนิดที่ไม่มีการเติม stabilizer (ตัวอย่างควบคุม) น้ำยาชนิดที่มีการเติมกลีเซอรอล เป็น stabilizer และน้ำยาชนิดที่มีการเติมโพลีเอทีลีนไกลคอล เป็น stabilizer พบว่า เมื่อเก็บรักษาน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ น้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปชนิดที่ไม่มีการเติม stabilizer มีกิจกรรมของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาค่อยๆลดลงจนเหลือกิจกรรมของเอนไซม์ประมาณ 67 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาจนครบเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ดังนั้นน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนชนิดที่ไม่มีการเติม stabilizer มีอายุการเก็บรักษาประมาณ 10 สัปดาห์ (มีเสถียรภาพประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในขณะที่น้ำยาตรวจวิเคราะห์ชนิดที่เติมโพลีเอทีลีนไกลคอล และชนิดที่มีการเติมกลีเซอรอล พบว่า เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 12 สัปดาห์ เอนไซม์มีกิจกรรมในการทำปฏิกิริยาไม่แตกต่างจากน้ำยาที่ไม่ผ่านการเก็บรักษา ดังแสดงในรูปที่ 4.51 และตารางที่ ก.53 ดังนั้นการเติมโพลีเอทีลีนไกลคอล และกลีเซอรอลในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป ที่ประกอบด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล สามารถยืดอายุการเก็บรักษาของน้ำยาได้ดี โดยทำให้น้ำยาตรวจวิเคราะห์มีอายุการเก็บอย่างน้อย 12 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งได้มีรายงานว่าโพลีเอทีลีนไกลคอลสามารถใช้เป็นพลาสติไซเซอร์ สารปรับความนุ่ม สารปรับความชุ่มชื้น สารหล่อลื่น วัสดุเคลือบกระดาษ เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางและยา เป็นตัวทำละลาย และเป็นแอดดิทีฟในอาหาร นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Joo และคณะ (1996) ยังได้ใช้โพลีเอทีลีนไกลคอลเป็น stabilizer ของเอนไซม์ในการผลิต Biosensor สำหรับการตรวจวิเคราะห์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสารละลายอินทรีย์ ส่วนกลีเซอรอลได้มีรายงานว่าสามารถช่วยรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ที่ใช้ในสารละลายปฏิกิริยาต่างๆ และช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส นอกจากนี้ยังป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่อาจส่งผลทำให้น้ำยาตรวจวิเคราะห์เสื่อมสภาพลงได้ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วกลีเซอรอลถูกใช้เป็นสารที่เติมในขั้นตอนของการเตรียมเอนไซม์เพื่อช่วยป้องกันการเกิด denature ของโปรตีนระหว่างเกิดการแข็งตัวและการละลาย (Buss และ Stalter, 1978)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า น้ำยาตรวจวิเคราะห์ที่ใช้เอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ชนิดที่ไม่เติม stabilizer และชนิดที่เติมโพลีเอทีลีนไกลคอล มีเสถียรภาพในการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สูงกว่าน้ำยาตรวจวิเคราะห์ชนิดที่ใช้เอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า ทั้งนี้เนื่องจากในการผสมน้ำยาตรวจวิเคราะห์ได้ใช้เอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่เพิ่งสกัดได้จากเมล็ดถั่วเหลือง โดยที่เอนไซม์ไม่ผ่านการเก็บรักษา หรือผ่านขั้นตอนการแข็งตัว (freezing) และการละลาย (thawing) ซึ่งในขั้นตอนเหล่านี้ทำให้เอนไซม์เสียสภาพ และมีความเสถียรลดลงได้ ดังนั้นเอนไซม์

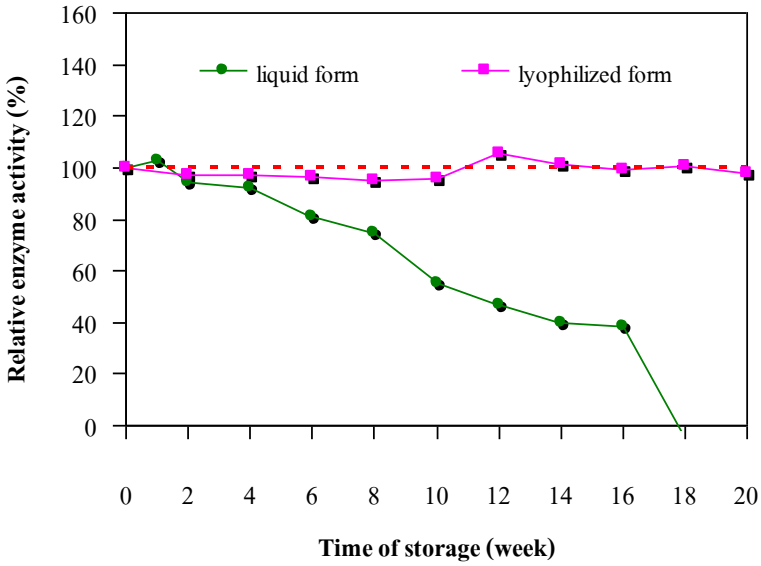
เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองที่ใช้จึงมีเสถียรภาพค่อนข้างดี เมื่อนำไปผสมเป็นน้ำยาตรวจวิเคราะห์จึงสามารถรักษาเสถียรภาพในการตรวจวิเคราะห์ได้ระยะเวลานาน ในขณะที่เอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าได้ผ่านการเก็บรักษาในรูปสารละลายโดยการแช่แข็งมาเป็นระยะเวลาหนึ่ง และเมื่อนำมาใช้ก็ผ่านการละลายซ้ำหลายรอบ หรือเรียกว่า freeze-thaw cycles ทำให้เอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสเสียสภาพลงได้ ดังนั้นเมื่อนำไปผสมเป็นน้ำยาตรวจวิเคราะห์จึงทำให้เสถียรภาพในการตรวจวิเคราะห์ลดน้อยลงด้วย ซึ่งแก้ไขได้โดยการเตรียมเอนไซม์ในปริมาตรที่พอเหมาะกับการเตรียมน้ำยาตรวจวิเคราะห์แต่ละครั้ง โดยให้สามารถใช้เอนไซม์ได้หมดภายในครั้งเดียว (single-use) และเก็บรักษาเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -80 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นการช่วยรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์เอาไว้



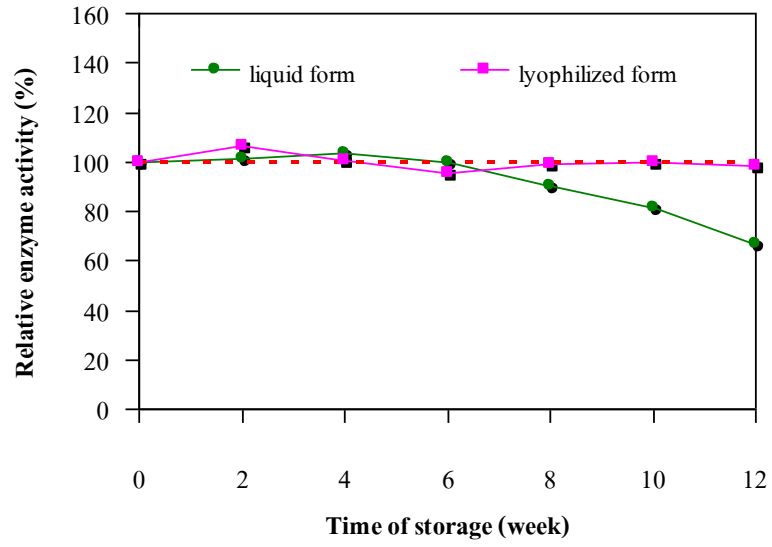
รูปที่ 4.51 ผลของการใช้ stabilizer ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปชนิดที่ประกอบด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล เมื่อใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐาน putrescine เป็นสารตั้งต้น โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

4.19.3 การศึกษาผลของการทำแห้ง ต่อเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป

จากการศึกษาผลของการทำแห้ง ด้วยเครื่อง freeze dryer ต่อเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป โดยวิเคราะห์ผลได้จากค่าเปอร์เซ็นต์ Relative activity ของเอนไซม์ในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนแบบผงแห้ง 2 ชนิด คือ ชนิดที่อาศัยการทำงานของเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า ร่วมกับเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล และชนิดที่อาศัยการทำงานของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล เมื่อใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐานชนิด putrescine เป็นสารตั้งต้น พบว่า น้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปแบบผงแห้ง ชนิดที่ใช้เอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และชนิดที่ใช้เอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง มีกิจกรรมของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาไม่แตกต่างจากน้ำยาตรวจวิเคราะห์สำเร็จรูปที่ไม่ผ่านการทำแห้ง เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 20 และ 12 สัปดาห์ ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.52 และ 4.53 และตารางที่ ก.54 และ ก.55 เนื่องจากการทำแห้งน้ำยาตรวจวิเคราะห์เป็นวิธีการที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ส่งผลให้น้ำยาตรวจวิเคราะห์เสื่อมสภาพได้ และการทำแห้งยังเป็นวิธีการที่ทำให้เกิดการสลายตัวของโปรตีน (proteolytic degradation) หรือเอนไซม์ได้น้อยมาก ดังนั้นวิธีการแห้งน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปชนิดที่ใช้เอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และชนิดที่ใช้เอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง สามารถยืดอายุการเก็บรักษาของน้ำยาได้ดี โดยทำให้น้ำยาตรวจวิเคราะห์ทั้งสองชนิดมีอายุการเก็บรักษาอย่างน้อยที่สุด 20 และ 12 สัปดาห์ ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



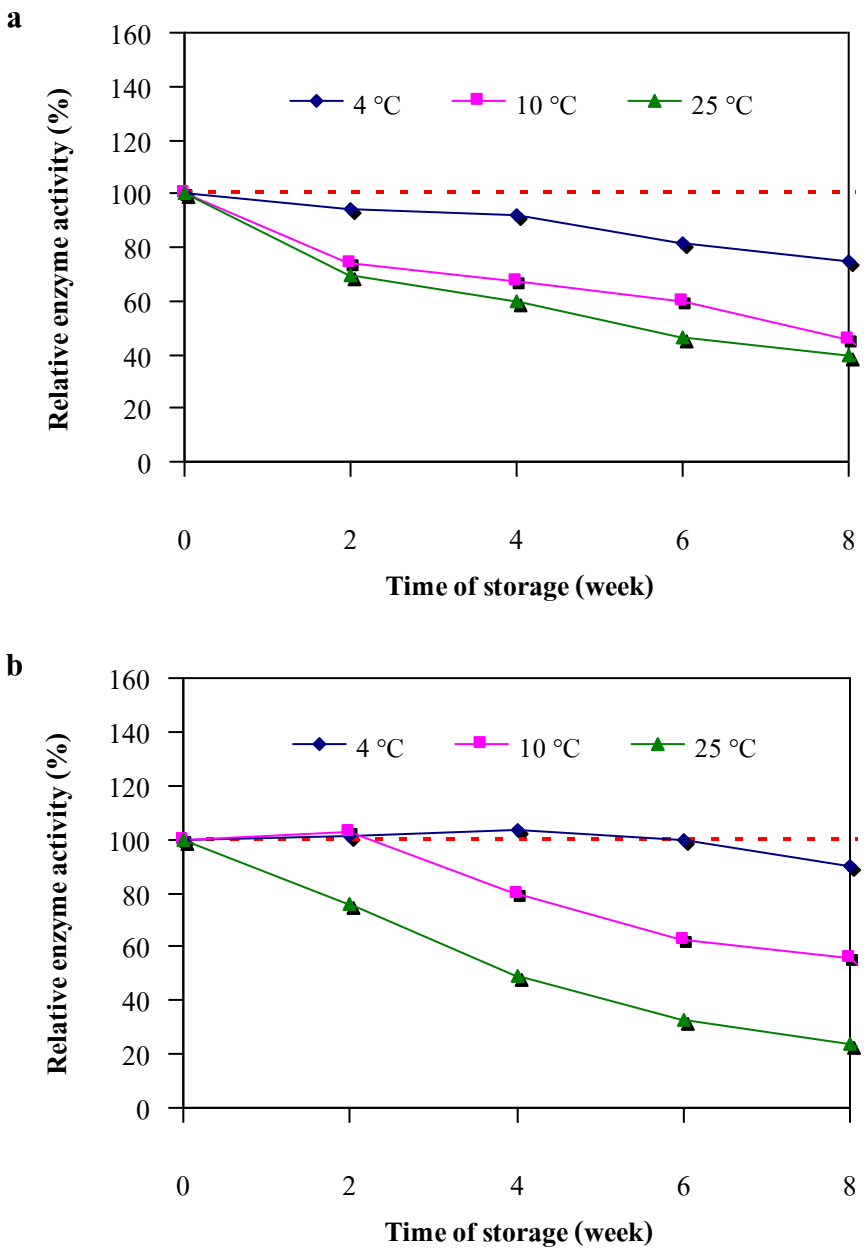
รูปที่ 4.52 ผลของการทำแห้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปชนิดที่ประกอบด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล เมื่อใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐาน putrescine เป็นสารตั้งต้น โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร



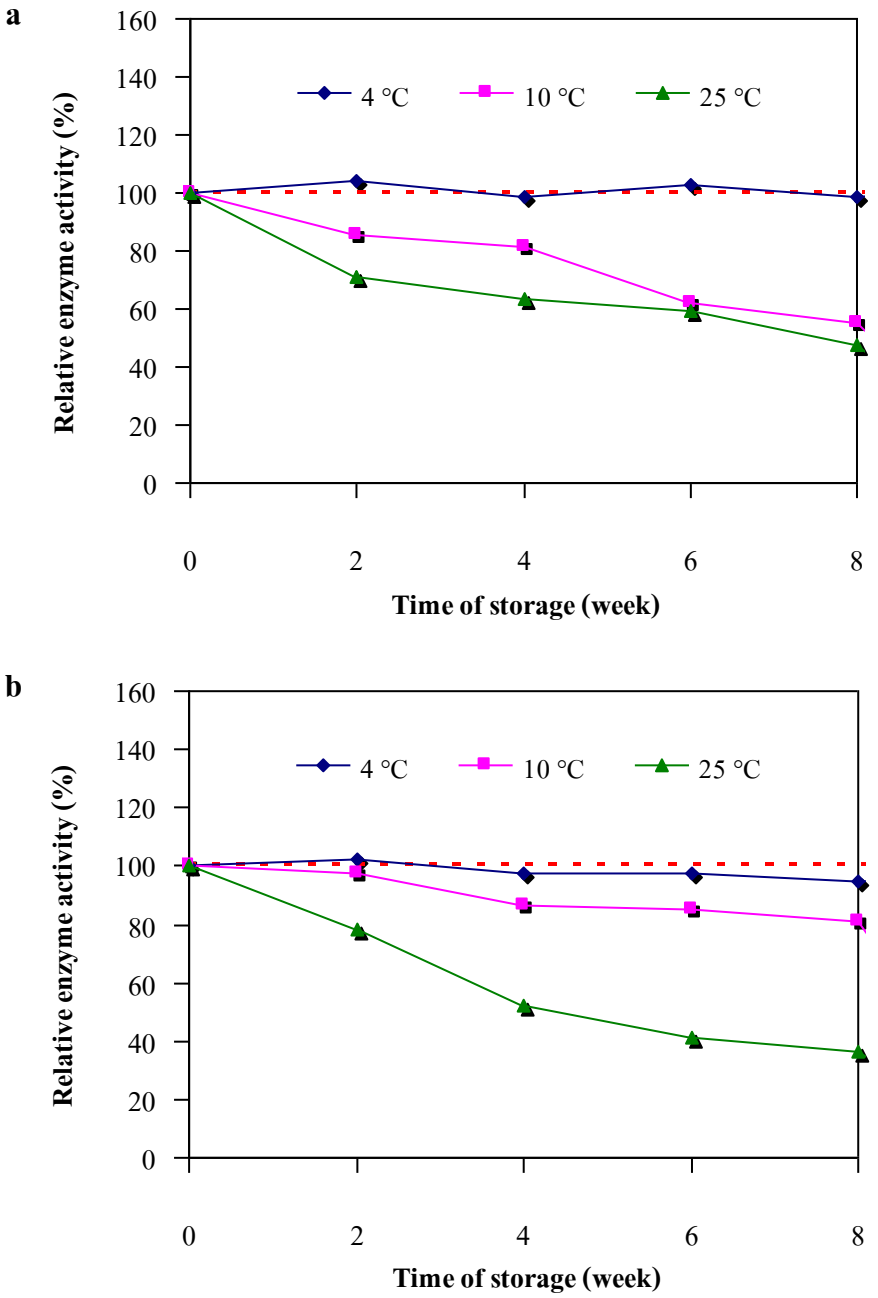
รูปที่ 4.53 ผลของการทำแห้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปชนิดที่ประกอบด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล เมื่อใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐาน putrescine เป็นสารตั้งต้น โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

4.19.4 การศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษา ต่อเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป

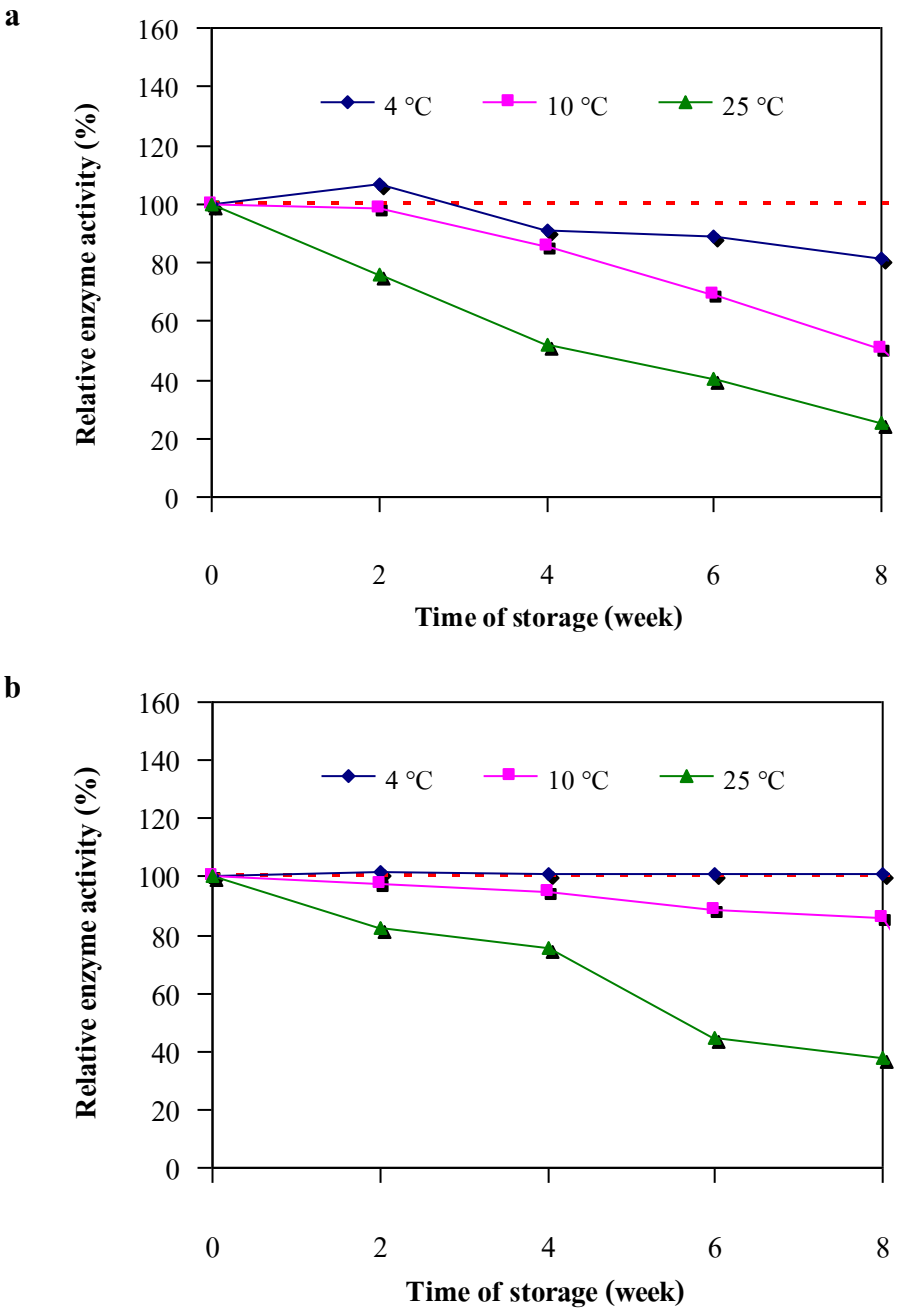
จากการศึกษาผลของอุณหภูมิ (4 10 และ 25 องศาเซลเซียส) ในการเก็บรักษา ต่อเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป โดยวิเคราะห์ผลได้จากค่าเปอร์เซ็นต์ relative activity ของเอนไซม์ในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน 4 ชนิด คือ น้ำยาตรวจวิเคราะห์แบบสารละลาย 3 ชนิด คือ ชนิดที่ 1 ไม่เติม stabilizer ชนิดที่ 2 เติมกลีเซอรอล 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)ชนิดที่ 3 เติมโพลีเอทีลีนไกลคอล 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และชนิดที่ 4 คือ น้ำยาตรวจวิเคราะห์แบบผงแห้ง ซึ่งทำการศึกษาในน้ำยาตรวจวิเคราะห์ 2 ชนิด คือ ชนิดที่อาศัยการทำงานของเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าร่วมกับเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล และชนิดที่อาศัยการทำงานของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองร่วมกับเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยเมื่อนำน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปทุกชนิดที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 10 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนโดยใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐานชนิด putrescine มาทำการตรวจวิเคราะห์ พบว่า การเก็บรักษาน้ำยาตรวจวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำยาตรวจวิเคราะห์ทุกชนิดลดลงน้อยที่สุด รองลงมาคือการเก็บรักษาน้ำยาตรวจวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 10 และ 25 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.54 4.55 4.56 และ 4.57 และตารางที่ ก.56 ก.57 ก.58 ก.59 ก.60 ก.61 ก.62 และ ก.63 ดังนั้นในการเก็บรักษาน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนควรเก็บรักษาอย่างน้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เนื่องจากที่อุณหภูมินี้ช่วยรักษากิจกรรมของเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า หรือเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลที่ใช้เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในน้ำยาตรวจวิเคราะห์ โดยที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการทำงานของเชื้อแบคทีเรีย หรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสที่ส่งผลให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ได้



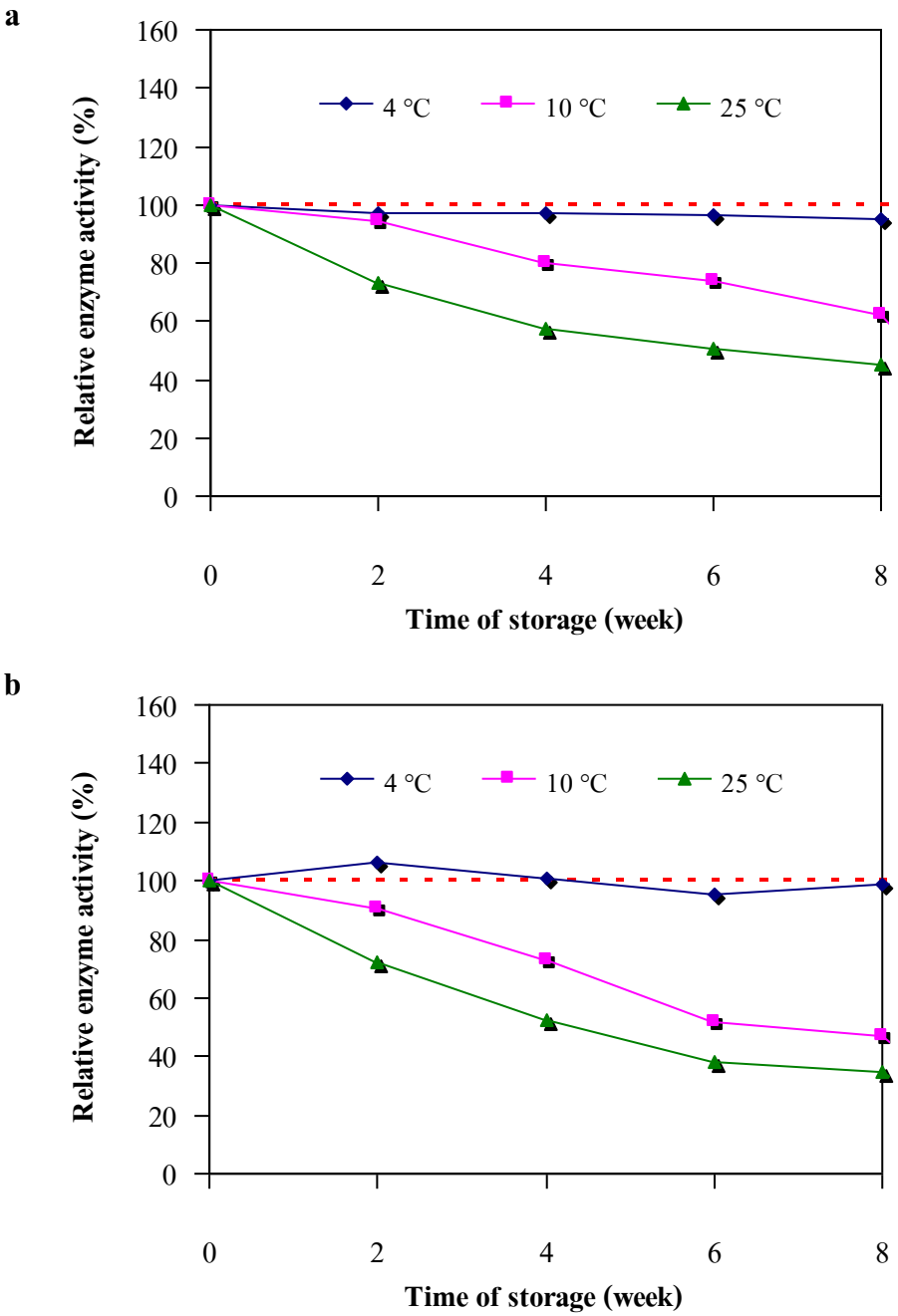
รูปที่ 4.54 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปชนิดสารละลายที่ไม่มีการเติม stabilizer เมื่อใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐาน putrescine เป็นสารตั้งต้น ซึ่งตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยรูป a หมายถึง น้ำยาตรวจวิเคราะห์ ชนิดที่ใช้ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล และรูป b หมายถึงน้ำยาตรวจวิเคราะห์ชนิดที่ใช้เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล



รูปที่ 4.55 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปชนิดสารละลายที่มีการเติมกลีเซอรอล เมื่อใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐาน putrescine เป็นสารตั้งต้น ซึ่งตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยรูป a หมายถึง น้ำยาตรวจวิเคราะห์ ชนิดที่ใช้ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล และรูป b หมายถึงน้ำยาตรวจวิเคราะห์ชนิดที่ใช้เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล



รูปที่ 4.56 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปชนิดสารละลายที่มีการเติมโพลีเอทีลีนไกลคอล เมื่อใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐาน putrescine เป็นสารตั้งต้น ซึ่งตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยรูป a หมายถึง น้ำยาตรวจวิเคราะห์ ชนิดที่ใช้ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล และรูป b หมายถึงน้ำยาตรวจวิเคราะห์ชนิดที่ใช้เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล



รูปที่ 4.57 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปชนิดผงแห้ง เมื่อใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐาน putrescine เป็นสารตั้งต้น ซึ่งตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยรูป a หมายถึง น้ำยาตรวจวิเคราะห์ ชนิดที่ใช้ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล และรูป b หมายถึงน้ำยาตรวจวิเคราะห์ชนิดที่ใช้เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 จากการสกัดเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลสีแดงสายพันธุ์ *Gracilaria changii* พบว่า เอนไซม์มีปริมาณโปรตีน เท่ากับ 0.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่ากิจกรรม เท่ากับ 45.90 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมจำเพาะ เท่ากับ 0.22 ยูนิตต่อมิลลิกรัม

5.1.2 จากการสกัดเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากต้นอ่อนของเมล็ดถั่วเหลืองงอก โดยใช้ส่วนของรากและลำต้น และทำการ dialysis พบว่ามีปริมาณโปรตีน เท่ากับ 2.90 และ 2.69 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มีค่ากิจกรรม เท่ากับ 0.185 และ 0.163 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 0.065 และ 0.062 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ดังนั้นส่วนของต้นอ่อนของเมล็ดถั่วเหลืองงอกที่เหมาะสมสำหรับนำมาสกัดเอนไซม์เอมีนออกซิเดสในงานวิจัยนี้ คือ ส่วนรากของต้นอ่อน

5.1.3 จากการศึกษาปริมาณของซับสเตรตในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของซับสเตรตชนิดต่างๆ คือ ฟีนอลเรด เข้มข้น 5.56 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบร์ไมด์ เข้มข้น 1.11 มิลลิโมลาร์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 9.8 x 10^{-2} มิลลิโมลาร์ และจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส จากสาหร่ายทะเลโดยมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นซับสเตรต มีค่าคงที่ของมิเคลิส (K_m) เท่ากับ 0.047 มิลลิโมลาร์ และมีค่าอัตราความเร็วสูงสุด (V_{max}) เท่ากับ 0.570 ไมโคลโมลาร์ต่อนาที

5.1.4 จากการศึกษาปริมาณของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า ร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่า ปริมาณของเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล คือ 11.02 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร และในการทำปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่า ปริมาณของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองที่เหมาะสมในการทำ

ปฏิกิริยา คือ 7.4 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร และเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล คือ 5.51 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร

5.1.5 จากการศึกษาระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน พบว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล และระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล คือ 3 ชั่วโมง

5.1.6 จากการศึกษาความสามารถในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนมาตรฐาน เพื่อนำไปสร้างเป็นกราฟมาตรฐานสำหรับใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างอาหารหมักดอง ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า ร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่า สามารถตรวจวัดสารประกอบเอมีนชนิด putrescine cadaverine และ histamine ได้ในช่วงความเข้มข้น 0 – 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร tryptamine ในช่วงความเข้มข้น 0 – 14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร tyramine ในช่วงความเข้มข้น 0 – 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ ß - phenylethylamine ในช่วงความเข้มข้น 0 – 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการตรวจวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่า สามารถตรวจวัดสารประกอบเอมีนชนิด putrescine cadaverine และ histamine ได้ในช่วงความเข้มข้น 0 – 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร tryptamine ในช่วงความเข้มข้น 0 – 14 มิลลิกรัมต่อ และ tyramine และ ß - phenylethylamine ในช่วงความเข้มข้น 0 – 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5.1.7 จากการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง พบว่า ค่าอัตราความเร็วสูงสุด (V_{max}) ของปฏิกิริยาของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง โดยมีสารประกอบเอมีนมาตรฐานได้แก่ putrescine cadaverine histamine tryptamine tyramine และ ß - phenylethylamine เป็นซับสเตรตมีค่า เท่ากับ 0.471 0.176 0.130 0.517 0.385 และ 0.211 ไมโครโมลาร์ต่อนาที ตามลำดับ และมีค่าคงที่ของมิเคลิส (K_m) เท่ากับ 0.608 0.180 0.126 0.868 0.077 และ 0.051 โมลาร์ ตามลำดับ

5.1.8. จากการพัฒนาการสกัด พบว่า กรดที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารประกอบเอมีนจากแหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว คือ กรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 3 โมลาร์ ข้าวหมาก คือ กรดเปอร์คลอริก เข้มข้น 1.5 โมลาร์ และ ปลาร้า และหอยดอง คือ กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 4 โมลาร์ โดยอัตราส่วนในการสกัดระหว่างน้ำหนักของอาหารหมักดองต่อปริมาตรของสารละลายสกัด และจำนวนซ้ำที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดอง คือ การสกัดในอัตราส่วน 1 : 2 และทำ

การสกัดทั้งหมด 3 ซ้ำ ซึ่งจากการหาค่าเปอร์เซ็นต์การสกัดสารประกอบเอมีนจากตัวอย่างอาหารหมักดองแต่ละชนิด พบว่า มีค่าเปอร์เซ็นต์การสกัด putrescine มากที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 74.80 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ cadaverine และ histamine โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 64.65 และ 50.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

5.1.9 จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเอมีนในอาหารหมักดอง พบว่า การวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า ร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล และระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล มีความสามารถในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเอมีนในตัวอย่างอาหารหมักดองได้ไม่แตกต่างกัน โดยพบว่า ตัวอย่างปลาร้ามีปริมาณสารประกอบเอมีนมากที่สุด รองลงมาคือ หอยดอง แหนมหมู ไส้กรอกเปรี้ยว และข้าวหมาก และจากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดองประเภทต่างๆ พบว่า อาหารหมักดองประเภทเนื้อสัตว์ มีปริมาณสารประกอบเอมีนมากที่สุด รองลงมาคือ อาหารหมักดองประเภทผัก เครื่องดื่ม และหมักดองประเภทนม และผลิตภัณฑ์นม ตามลำดับ

5.1.10 จากการศึกษาผลของระยะเวลา และอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในอาหารหมักดอง พบว่า ปริมาณสารประกอบเอมีนที่ตรวจพบในตัวอย่างจะเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลา และอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา

5.1.11 จากการศึกษาการทำปฏิกิริยาโบรมิเนชันของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส พบว่า การเติมโพแทสเซียมไซยาไนด์ และโซเดียมเอไซด์ เข้มข้น 0.8 และ0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลายปฏิกิริยา ตามลำดับ สามารถยับยั้งปฏิกิริยาโบรมิเนชันที่เกิดขึ้นจากเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสได้ และจากการศึกษาการทำปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่า การเติมโซเดียมเอไซด์เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลายปฏิกิริยา สามารถยับยั้งปฏิกิริยาโบรมิเนชันที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาได้ โดยไม่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงไป จึงสามารถนำไปใช้ในการหยุดปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล เพื่อใช้ในการศึกษาได้

5.1.12 จากการตรวจสอบประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และเอนไซม์

โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่า เครื่องมือและเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์มีความแม่นยำอยู่ในระดับที่ดี

5.1.13 จากการศึกษาเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป ชนิดที่ประกอบด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า ร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล และระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่า stabilizer ที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการรักษาเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์ คือ กลีเซอรอล เข้มข้น 2 - 4 และ 2 - 6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตามลำดับ และโพลีเอทีลีนไกลคอล เข้มข้น 1 - 2 และ 1 - 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ โดยการเติมกลีเซอรอล และการทำแห้งน้ำยาตรวจวิเคราะห์ชนิดที่ใช้เอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า สามารถยืดอายุการเก็บรักษาของน้ำยาได้ดี โดยทำให้น้ำยาตรวจวิเคราะห์มีอายุการเก็บ 24 สัปดาห์ และอย่างน้อยที่สุด 20 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนน้ำยาตรวจวิเคราะห์ชนิดที่ใช้เอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง พบว่า การเติมกลีเซอรอล โพลีเอทีลีนไกลคอล และการทำแห้ง สามารถยืดอายุการเก็บรักษาของน้ำยาได้ดี โดยทำให้น้ำยาตรวจวิเคราะห์มีอายุการเก็บอย่างน้อยที่สุด 12 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และจากการทดลอง พบว่า การเก็บรักษาน้ำยาตรวจวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำยาตรวจวิเคราะห์ทุกชนิดลดลงน้อยที่สุด รองลงมาคือการเก็บรักษาน้ำยาตรวจวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 10 และ 25 องศาเซลเซียส ดังนั้น อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน คือ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ทำให้เอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่สกัดได้จากต้นอ่อนเของมล็ดถั่วเหลืองงอก และเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล มีความบริสุทธิ์มากขึ้น เพื่อเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยา enzyme coupling assay

5.2.2 ทำการศึกษาสภาวะ ได้แก่ ค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอนไซม์เอมีนออกซิเดสที่สกัดได้จากเมล็ดถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล เพื่อให้เอนไซม์ทั้งสองสามารถทำงานได้ดีที่สุด

5.2.3 เปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมักดองชนิดต่างๆ ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า ร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล และระหว่างเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ร่วมกับเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล กับวิธีมาตรฐาน โดยใช้วิธี high performance liquid chromatography (HPLC) เพื่อเป็นการเปรียบเทียบความถูกต้องของข้อมูลที่วิเคราะห์ได้

5.2.4 เพิ่มระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์เสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป เพื่อให้เห็นแนวโน้มการทำงานของเอนไซม์ในน้ำยาตรวจวิเคราะห์ได้ดีมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

เก่งหทัย ยืนยงสุวรรณ, 2548**, การศึกษาเอมีนออกซิเดสจากเมล็ดธัญพืชและพืชพื้นบ้าน,** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ขวัญแก้ว วัชโรทัย, 2539, **ไวน์**, สำนักพิมพ์อมรินทร์, กรุงเทพฯ, หน้า 3-5.

บุหลัน พิทักษ์ผล, 2551, **การหมักดอง** [Online], Available: http://www. http://guru.sanook.com/search/knowledge_search/ [2008, September 28].

บุหลัน พิทักษ์ผล และทัศนี สรสุชาติ, 2543, “การถนอมผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร**”, นิตยสารเกษตรศาสตร์**, ปีที่ 1, ฉบับที่ 6.

ไบโอเทค Thailand, 2551, **อาหารหมักวิทยาศาสตร์** [Online], Available: http://www.biotec.or.th /biotechnology-th/ [2008, September 28].

ปิ่นมณี ขวัญเมือง, 2546, “แบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง”, **วารสารครุศาสตร์อุตสาหกรรม**, ปีที่ 3, ฉบับที่ 1, หน้า 62-69.

มนตรี จุฬาวัฒนทน, ม.ร.ว. ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์, ยงยุทธ ยุทธวงศ์, ภิญโญ พานิชพันธุ, ประหยัด โกมารทัต, พิณทิพ รื่นวงษา, ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล, บุรชัย สนธยานนท์, สุมาลี ตั้งวประดับกุล และมธุรส พงษ์ลิขิตมงคล, 2542, **ชีวเคมี**, พิมพ์ครั้งที่ 2, ห้างหุ้นส่วนจำกัดจิรรัชการพิมพ์, กรุงเทพฯ, หน้า 125-150.

รุ่งนภา ช่อทองดี, 2549, **การประยุกต์ใช้โบรโมเปอร์ออกซิเดสเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบเอมีนในอาหารหมักดองด้วยวิธี Enzyme Coupling Assay**, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

อรพิน ภูมิภมร, 2526, **จุลินทรีย์ในเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์และอาหารหมักพื้นเมือง**, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, หน้า 1-9.

Alexander, N.M., 1959, " Iodine Peroxidase in Rat thyroid salivary glands and its inhibition by antihyroid compounds", **Journal of Biological Chemistry**, Vol. 234, pp. 1530-1533.

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

Argento-Cerù, M.P., Autuori, F. and Mondovi, B., 1985, **Structure and Functions of Amine oxidase**, In: B. Mondovi (Ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 89-104.

Aygün, O., Schneider, E., Scheuer, R., Usleber, E., Gareis, M. and Märtlbauer, E., 1999, "Camparison of ELISA and HPLC for the determination of histamine in cheese", **Journal of Agriculture Food Chemistry**, Vol. 47, pp. 1961-1964.

Ayres, J.C., Mundt, J.O. and Sandine, W.E., 1980, **Microbiology of Foods**, W.H. Freeman and Co., San Francisco, CA, p. 543.

Baden, D.G. and Corbett, M.D., 1980, "Bromoperoxidase from *Pennicillus*, *Pennicillus lomourouxii*and *Rhipocepharus phoenix*", **Biochemical Journal**, Vol. 187, pp. 205-211.

Badolo, L., Berlamont, V., Cambier, M.H., Hanocq, M., Dubois, J., 1999, "Simple and rapid enzymatic assay of ornithine decarboxylase activity", **Talanta**, Vol. 48, pp. 127-134.

Beshkova, D. M. E. D. Simova, Simov, Z. I., Frengova, G. I. and Spasov, Z.N., 2002, "Pure culture For making kefir", **Food Microbiology**, Vol. 19, pp. 537-544.

Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L.J. and Huis in't Veld, J.H.J., 1990, "Occurrence and formation of biologically active amines in foods", **International Journal of Food Microbial**, Vol. 11, pp. 63-84.

Buss, W.C. and. Stalter, K., 1978, "Stimulation of eukaryotic transcription by glycerol and polyhydroxylic compounds", **Biochemistry**, Vol. 17, pp. 4825-4832.

Carlson, M.G., Peterson, C.G. and Venge, P., 1985, "Human eosinophil peroxidase purification and characterization", **American Journal of Immunology**, Vol. 134, pp. 1875-1879.

Chen, C.M., Lin, L.C. and Yen, G.G., 1994, "Relationship between changes in biogenic amine contents and freshness of pork during storage at different temperatutres", **Journal of Chinese Agricultural and Chemistry Society**, Vol. 32, pp. 47-60.

Cortacero-Ramírez, S., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A., 2007, "Determination of biogenic amines in beers and brewing-process samples by capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection", **Food Chemistry**, Vol. 100, pp. 383–389.

Dadáková, E., Kr˘íz˘ek, M. and Pelikánová, T., 2009, "Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC)", **Food Chemistry**, Vol. 116, pp. 365–370.

Deboer, E., Van Kooyk, Y., Tromp, M.G.M., Plat, H. And Wever, R., 1986, "Bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*: 9 novel class of enzyme containing vanadium as a prosthetic group", **Biochimica et Biophysica Acta**, Vol. 869, pp. 48-53.

Deits, T.M., Farance, M. and Kae, E.S., 1984, "Purification and properties of ovoperoxidase, the enzyme responsible for hardening the fertilization membrane of sea urchin egg", **Jourmal of Biological Chemistry**, Vol. 259, pp. 13525-13533.

Fernandes, J.O. and Ferreira, M.A., 2000, "Combined ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the simultaneous determination of diamines, polyamines and aromatic amines in Port wine and grape juice", **Journal of Chromatography A**, Vol. 886, pp. 183-195.

Floris, G. and Agrò, A.F., 2004, **Encyclopedia Biological Chemistry**, Elsevier Inc. California, USA, pp. 85-89.

García-Villar, N., Hernández-Cassou, S. and Saurina, J., 2009, "Determination of biogenic amines in wines by pre-column derivatization and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry", **Journal of Chromatography A**, Vol. 1216, pp. 6387–6393**.**

Gianotti V., Chiuminatto U., Mazzucco E., Gosetti F., Bottaro M., Frascarolo P.and Gennaro M.C., 2008, "A new hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of seven biogenic amines in cheese", **Journal of Chromatography A**, Vol. 1185, pp. 296–300.

Guzel-seydim, Z.B., Seydim, A.C., Greene, A.K. and Bodin, A.B., 2000, "Determination of Organic acid and andvolatile flavor substances in kefir during fermentation", **J. Food Composition and Analysis**, Vol. 13, pp. 35-43.

Halász, A., Barath, A. and Simon-Sakardi, L., 1994, "Biogenic amines and their production by microganism in food", **Trends in Food Science & Technology**, Vol. 5, pp. 42-49.

Hernández-Borges, J., D'Orazio, G., Aturki, Z. and Fanali, S., 2007, "Nano-liquid chromatography analysis of dansylated biogenic amines in wines", **Journal of Chromatography A**, Vol. 1147, pp. 192–199.

Hernandez-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogue´s, M.T. and Vidal-Carou, M.C., 1996, "Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Biogenic Amines in Meat and Meat Products", **J. Agric. Food Chem**., Vol. 44, pp. 2710-2715.

Hewson, W.D., 1980, "Bromoperoxidase and halogenated lipids in marine algae", **Journal of Phycology**, Vol. 16, pp. 340-345.

Huis in't Veld, H.H.J., Hose, H., Schaafsma, G.J., Silla, H. and Smith, J.E., 1990, **Health aspects of Food Biotechnology**, In: P. Zeuthen, J.C. Cheftel, C. Ericksson, T.R. Gormley, P.Link and K.Paulus (Eds.) Processing and Quality of foods, Vol 2. Food Biotechnology: avenues to healthy and nutritios products, Elsevier Applied Science, London and New York, pp. 2.73-2.97.

Isupov, M.N., Dalby, A.R., Brindley, A.A., Izumi, Y., Tanabe, T., Murshudov, G.N. and Littlechild, J.A., 2000, "Crystal structure of dodecameric vanadium-dependent bromoperoxidase from the red algae *Corallina officinalis*", **J.Mol.Biol.**, Vol. 299. pp. 1035-1049.

Itoh, N., Izumi, Y. and Yamada, H., 1985, "Purification of bromoperoxidase from *Corallina pilulifera*", **Biochemical and Biophysical Research Communication**, Vol. 131, pp. 425-428.

Itoh, N., Izumi, Y. and Yamada, H., 1988, "Substrate specificity, regiospecificity and steriospecificity of halogenation reactions catalized by non heme type bromoperoxidase of *Corallina pilulifera*", **European Journal of Biochemistry**, Vol. 172, pp. 477-484.

Iucci, L., Patrignani, F., Belletti, N., Ndagijimana, M., Guerzoni, M.E., Gardini, F. and Lanciotti, R., 2007, "Role of surface-inoculated Debaryomyces hansenii and Yarrowia lipolytica strains in dried fermented sausage manufacture. Part 2: Evaluation of their effects on sensory quality and biogenic amine conten", **Meat Science**, Vol. 75, pp. 669–675.

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

Jordan, P. and Vilter, H., 1991, "Extraction of proteins from material rich in anionic mucilages: partition and fractionation of vanadate-dependent bromoperoxidase from the brown algae *Laminaria digitat*a in aqueous polymer two-phase system", **Biochimica et Biophysica Acta**, Vol. 1073, pp. 93-106.

Kalac, P., Spicka, J., Krízek, M., Steidlová , S. and Pelikánová, T., 1999, "Concentrations of seven biogenic amines in sauerkraut", **Food Chemistry**, Vol 67, pp. 275-280.

Kalac, P., Savel, J., Krizek, M., Pelikánová, T. And Prokopová, M., 2002, "Biogenic amine formation in bottled beer", **Food Chemistry**, Vol. 79, pp. 431-434.

Kamenarska, Z., Taniguchi, T., Ohsawa, N., Hiraoka, H. and Itoh, N., 2007, "A vanadium-dependent bromoperoxidase in the marine red alga Kappaphycus alvarezii (Doty) Doty displays clear substrate specificity", **Phytochemistry**, Vol. 68, pp. 1358–1366.

Kang, J.K. and Park, Y.H., 1984, "Effect on food additives on the histamine formation during processing and storage of mackerel", **Korean Fishery Society**, Vol. 17, pp. 383.

Karpas, Z., Tliman, B., Gdalevsky, R. and Lorber, A., 2002, "Determination of volatile biogenic amines in muscle food products by ion mobility spectrometry", **Analytica Chimica Acta**, Vol. 463, pp. 155-163.

Klenn, G.E., Plat, H. And Wever, R., 1987, "The Bromoperoxidase from the red Algae *Ceramium rubrum* also containing vanadium as prothetic group", **Biochimica et Biophysica Acta**, Vol. 912, pp. 287-291.

Kovacs, A., Simon-Sarkadi, L. and Ganzler, K., 1999. "Determination of biogenic amines by capillary eletrophoresis", **Journal of Chromatography A**, Vol. 836, pp. 305-313.

Kumar, V., Dooley, D.M., Freeman, H.C., Guss, J.M., Harvey, I., McGuirl, M.A., Wilce, M.C. and Zubak, V.M., 1996, "Crystal structure of a eukaryotic (pea seedling) coppercontaining amine oxidase at 2.2 Å resolution", **Structure**, Vol. 4, pp. 943-955.

Lange, J., Thomas, K. and Wittmann, C., 2002, "Comparison of a capillary electrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples", **Journal of Chromatography B**: Analytical Technology Biomedical Life Science, Vol. 779, pp. 229-239.

Lapa-Guimaraes, J. and Pickova, J., 2004, "New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid", **Journal of Chromatography A**, Vol. 1045, pp. 223-232.

Larsen, A.G.Vogensen, F.K.and Josephen, J., 1993, "Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs : purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produce by lactobacillus bavaricus MI 401", **J.Appl. Bacteriol**, Vol. 75, pp. 113-122.

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

Ligtenbarg, A.G.J., Hage, R. and Feringa, B.L., 2003, "Catalytic oxidations by vanadium complexes", **Coordination Chemistry Reviews**, Vol. 237, pp. 89-101.

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.

Lista, A.G., Arce, L., Rios, A. And Valcarcel, M., 2001, "Analysis of solid samples by capillary electrophoresis using a gas extraction sampling device in a flow system", **Analytica Chimica Acta,** Vol. 438, pp. 315-322.

Luten, J.B., Bouquet, W., Seuren, L.A.J., Burggraaf, M.M., Riekwel-Booy, G., Durand, P., Etienne, M., Gouyou, J.P., Landrein, A., Ritchie, A., Leclerq, M. and Guinet, R., 1992, **Biogenic amines in fishery products: standardization methods within E.C.** In: H.H. Huss (Eds.), Quality Assurance in the Fish Industry, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, pp. 427-439.

Maijala, R.L., Eerola, S.H., Aho, M.A. and Hirn, J.A., 1993, "The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat", **Journal of Food Protein**, Vol. 50, pp. 125-129.

Manthey, J.A. and Hager, L.P., 1981, "Purification and property of bromperoxidase from *Pennicillus capitatus*", **Journal of Biological Chemistry**, Vol. 256, pp. 11232-11238.

Marklinder, I. and Lönner, C., 1992, "Fermentation properties of intestinal strains of *Lactobacillus*, of a sour dough and of a yoghurt starter culture in an oat-based nutritive solution", **Food Microbial**, Vol. 9, pp. 197-205.

Marques, A.P., Leitao, M.C., & San Romao, M.V., 2008, "Biogenic amines in wines: Influence of oenological factors", **Food Chemistry**, Vol. 107, pp. 853–860.

Medda, R., Padiglia, A., Pedersen, J. Z., Finazzi Agro, A., Rotilio, G., and Floris, G., 1997, "Inhibition of copper amine oxidase by haloamines: A killer product mechanism", **Biochemistry** Vol. 36(9), pp. 2595-2602.

Moret, S., Smela, D., Populin, T. and Conte, 2005, "A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables", **Food Chemistry**, Vol. 89, pp. 355-361.

Morris, D.R. and Hager, L.P., 1986, "Chloroperoxidase, isolation and properties of the crystalline glycoprotein", **Journal of Biological Chemistry**, Vol. 241, pp. 1763-1768.

Nettles,C.G.and Barefoot,S.F., 1993, "Biochemical and genetic characteristic of bacteriocin of food associated lactic acid bacteria", **J. Food Prot**, Vol. 56, pp. 335-356.

Nichol, A.W., Angel, L.A., Moon, T. and Clezy, P.S., 1987, "Lactoperoxidase heam, an iron-porphyrin thiol", **Biochemical Journal**, Vol. 247, pp. 147-150.

Nout, M.J.R., 1994, "Fermented foods and food safety", **Food Res. Int.,** Vol. 27, p. 291.

Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogues, M.T. and Vidal-Carou, M.C., 2000, "Biogenic Amines and Polyamines in Milks and Cheeses by Ion-Pair High Performance Liquid Chromatography", **J. Agric. Food Chem**., Vol. 48, pp. 5117-512.

Önal, A., 2007, "A review: current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods", **Food Chemistry**, Vol. 103, pp. 1475-1486.

Pietrangeli, P., Federico, R.,Mondovı, B. and Morpurgo, L., 2007, "Substrate specificity of copper-containing plant amine oxidases", **Journal of Inorganic Biochemistry**, Vol. 101, pp. 997–1004.

Raba, J., Li, S. and Mottola, H.A., 1995, "Spectrophotometric cell comprising parallel rotating and stationary bioreactors: application to the determination of glucose in serum samples", **Analytica Chimica Acta**, Vol. 300, pp. 299-305.

Riebroy, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kijrongrojana, K. and Tanaka, M., 2004, "Some characteristics of commercial Som-fug produced in Thailand", **Food Chemistry**, Vol. 88, pp. 527-535.

Rosaria, M., Alessandra P., and Giovanni, F., 1995, "Plant copper-amine oxidases", **Phytochemistry**, Vol. 39, pp 1-9.

Ruiz-Jiménez, J. and Luque de Castro, M.D., 2006, "Pervaporation as interface between solid samples and capillary electrophoresis: Determination of biogrnic amines in food", **Journal of Chromatography A**, Vol. 1110, pp. 245-253.

Saaid, M., Saad, B., Hashim, N.H., Mohamed Ali, A.S. and Saleh , M.I., 2009, "Determination of biogenic amines in selected Malaysian food", **Food Chemistry**, Vol. 113, pp. 1356–1362.

Shakila, R. J., Vasundhara, T. S. and Kumudavally, K. V., 2001, "A comparison of the TLC densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products", **Food Chem**, Vol. 75, pp. 255-259.

Shalaby, A.R., 1993, "Survey on biogenic amines in Egyptian foods: sausage", **Journal of Scitific Food Agricultural**, Vol. 62, pp. 291-293.

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

Shannon, L.M., Kay, E. and Lew, J.Y., 1966, "Peroxidase isoenzyme from horseradish root", **Journal of Biological Chemistry**, Vol. 264, pp. 22166-22172.

Su, S.C., Chou, S.S., Chang, P.C. and Hwang, D.F., 2000, "Determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning by micellar electrokinetic capillary chromography", **Journal of Chromatography B: Biomedical Science Applications**, Vol. 749, pp. 163-169.

Suman, C.S.P., 2003, "Co-immobilization of cholesterol esterase, cholesterol oxidase and peroxidase onto alkylamine glass beads for measurement of total cholesterol in serum", **Current Applied Physics**, Vol. 3, pp. 129-133.

Swetwiwathana,A., Zendo, T., Lotong, N., Nayamaha, J. and Sonomoto, K., 2003, **Brazillian Congress of Meat Science and Technology**, 49th ed., pp. 322-324.

Tanasupawat,S., Okada, S. and Komagata, K., 1998, **Lactic acid bacteria found in fermented fish in Thailand.**

Taylor, S.L. and Speckhard, 1984, "Inhibition of antimicrobial agents", **Journal of Food Production**, Vol. 47, pp. 508-511.

Taylor, S.L., 1985, "Histamine poisoning associated with fish, cheese and other foods", **World Health Organization**, Vol. WPH/FOS/85(1), pp. 1-47.

Theiler, R., Cock, J.C. and Hager, L.P., 1978, "Halohydrocarbon synthesis by bromoperoxidase", **Science**, Vol. 202, pp. 1094-1096.

Tiecco, G., Tantillo, G., Francioso, E., Paparella, A. and De Natale, G., 1986, "Ricerca quali-quantitativa di alcune amine biogenic in insaccati nel torso delli stagionatura", **Ind. Aliment**, Vol. 5, pp. 209-213.

Vanpee, K.H. and Lingen, F., 1985, "Purification and molecular and catalytic properties of bromoperoxidase from Streptomyces phaeochromogenes", **Journal of General Microbiology**, Vol. 131, pp. 1911-1916.

Vanpee, K.H. and Lingen, F., 1987, "Purification of bromoperoxidase from *Pseudomonas aureofaciens*", **Journal of Bacteriology**, Vol. 161, pp. 1171-1175.

Vianello, F., Malek-Mirzayans, A., Di Paolo, M.L., Stevanato, R. and Rigo, A., 1999, "Purification and Characterization of AmineOxidase from Pea Seedlings", **Protein Expression and Purification**, Vol. 15, pp. 196–201.

Visessanguan, W., Benjakul, S., Riebroy, S. and Thepkasikul, P., 2004, "Changes in composition and functional properties of proteins and their contributions to Nham characteristics." **Meat Science**, Vol. 66, pp. 579–588.

Yeh, C.Y., Lin, S.J. and Hwang, D.F., 2006, "Biogenic amines, histamine and label of dressed fried fish meat products in Taiwan", **Food Control**, Vol. 17, pp. 423-428.

Yongmei, L., Xin, L., Xiaohong, C., Mei, J., Chao, L. And Mingsheng, D., 2007, "A survey of biogenic amines in Chinese rice wines", **Food Chemistry**, Vol. 100, pp. 1424-1428.

ภาคผนวก ก

ตารางผลการทดลอง

1. การสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดส

1.1 ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์

ตารางที่ ก.1 ผลของการตรวจวัดปริมาณโปรตีนของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

เอนไซม์	OD 660 (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล (crude enzyme)	0.424 ± 0.009	$n = 2$	0.212

1.2 กิจกรรมของเอนไซม์

ตารางที่ ก.2 ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

เอนไซม์	OD 590 (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ	กิจกรรม (มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิลิตร)
โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล (crude enzyme)	0.270 ± 0.013	$n = 2$	45.9 ± 2.164	0.22 ± 0.01

หมายเหตุ 1 ยูนิต (U) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผลิตโบรโมฟีนอลบลู 1 ไมโครโมลต่อนาที (ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ)

2. การศึกษาความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

2.1 การศึกษาความเข้มข้นของฟีนอลเรดที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา

ตารางที่ ก.3 ผลของความเข้มข้นของฟีนอลเรดต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิ-เดสจากสาหร่ายทะเล โดยใช้ฟีนอลเรดความเข้มข้น 0 – 16.67 ไมโครโมลาร์ โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

ฟีนอลเรด (μM)	ค่า OD 590 (mean ± SD)	โบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้น (μM)	จำนวนซ้ำ
0.00	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	*n=2*
1.11	0.049 ± 0.001	0.918 ± 0.013	*n=2*
2.22	0.087 ± 0.004	1.636 ± 0.067	*n=2*
3.33	0.125 ± 0.000	2.365 ± 0.000	*n=2*
4.44	0.173 ± 0.002	3.263 ± 0.040	*n=2*
5.56	0.212 ± 0.001	4.001 ± 0.013	*n=2*
7.78	0.231 ± 0.002	4.361 ± 0.040	*n=2*
10.00	0.234 ± 0.002	4.417 ± 0.040	*n=2*
12.22	0.238 ± 0.001	4.502 ± 0.027	*n=2*
14.44	0.239 ± 0.004	4.512 ± 0.067	*n=2*
16.67	0.235 ± 0.004	4.446 ± 0.080	*n=2*
30.00	0.247 ± 0.004	4.663 ± 0.067	*n=2*

2.2 การศึกษาความเข้มข้นของโปตัสเซียมโบร์ไมด์ที่เหมาะสม

ตารางที่ ก.4 ผลของความเข้มข้นของโปตัสเซียมโบร์ไมด์ต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยใช้โปตัสเซียมโบร์ไมด์ ความเข้มข้น 0 – 2.22 มิลลิโมลาร์ โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

KBr (mM)	ค่า OD 590 (mean ± SD)	โบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้น (μM)	จำนวนซ้ำ
0.00	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	*n=2*
0.22	0.023 ± 0.005	0.426 ± 0.094	*n=2*
0.44	0.055 ± 0.005	1.031 ± 0.094	*n=2*
0.67	0.074 ± 0.005	1.390 ± 0.094	*n=2*
0.89	0.098 ± 0.008	1.854 ± 0.161	*n=2*
1.11	0.117 ± 0.002	2.204 ± 0.040	*n=2*
1.56	0.123 ± 0.001	2.327 ± 0.027	*n=2*
2.00	0.125 ± 0.001	2.355 ± 0.013	*n=2*
2.44	0.124 ± 0.004	2.346 ± 0.080	*n=2*
2.89	0.124 ± 0.004	2.346 ± 0.080	*n=2*
3.33	0.127 ± 0.004	2.393 ± 0.067	*n=2*
6.00	0.131 ± 0.003	2.478 ± 0.054	*n=2*

2.3 การศึกษาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เหมาะสม

ตารางที่ ก.5 ผลของความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 0–0.49 มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิลิตร โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (mM)	ค่า OD 590 (mean ± SD)	โบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้น (μM)	จำนวนซ้ำ
0.00	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	*n=2*
0.01	0.042 ± 0.001	0.795 ± 0.027	*n=2*
0.02	0.149 ± 0.006	2.809 ± 0.120	*n=2*
0.02	0.220 ± 0.001	4.152 ± 0.013	*n=2*
0.05	0.332 ± 0.007	6.281 ± 0.134	*n=2*
0.10	0.441 ± 0.001	8.343 ± 0.027	*n=2*
0.16	0.470 ± 0.008	8.891 ± 0.161	*n=2*
0.25	0.482 ± 0.006	9.109 ± 0.120	*n=2*
0.33	0.493 ± 0.008	9.327 ± 0.161	*n=2*
0.39	0.498 ± 0.007	9.421 ± 0.134	*n=2*
0.49	0.511 ± 0.008	9.667 ± 0.161	*n=2*

3. การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ตารางที่ ก.6 ผลของความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 0 – 0.490 มิลลิโมลาร์ และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (mM)	ค่า OD 590 (mean ± SD)	อัตราเร็วในการผลิตโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้น ($\mu M.min^{-1}$)	จำนวนซ้ำ
0.00	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	*n=2*
0.01	0.040 ± 0.001	0.040 ± 0.001	*n=2*
0.02	0.138 ± 0.003	0.140 ± 0.006	*n=2*
0.02	0.207 ± 0.000	0.208 ± 0.001	*n=2*
0.05	0.312 ± 0.003	0.314 ± 0.007	*n=2*
0.10	0.417 ± 0.001	0.417 ± 0.001	*n=2*
0.16	0.442 ± 0.004	0.445 ± 0.008	*n=2*
0.25	0.453 ± 0.003	0.455 ± 0.006	*n=2*
0.33	0.463 ± 0.004	0.466 ± 0.008	*n=2*
0.39	0.469 ± 0.003	0.471 ± 0.007	*n=2*
0.49	0.481 ± 0.004	0.483 ± 0.008	*n=2*

4. การศึกษาปริมาณของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

4.1 การศึกษาปริมาณของเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay

ตารางที่ ก.7 ผลของปริมาณไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล ต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา ในช่วงความเข้มข้น 0 – 0.41 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ไดเอมีนออกซิเดส (U/ml)	ค่า OD 590 (mean ± SD)	โบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้น (μM)	จำนวนซ้ำ
0.00	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	*n=2*
0.01	0.061 ± 0.009	1.145 ± 0.174	*n=2*
0.02	0.133 ± 0.008	2.507 ± 0.147	*n=2*
0.04	0.255 ± 0.012	4.815 ± 0.227	*n=2*
0.08	0.376 ± 0.008	7.104 ± 0.147	*n=2*
0.12	0.496 ± 0.005	9.374 ± 0.094	*n=2*
0.16	0.529 ± 0.047	9.998 ± 0.896	*n=2*
0.20	0.548 ± 0.024	10.367 ± 0.455	*n=2*
0.31	0.589 ± 0.008	11.133 ± 0.147	*n=2*
0.41	0.604 ± 0.004	11.426 ± 0.080	*n=2*

4.2 การศึกษาปริมาณของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay

ตารางที่ ก.8 ผลของปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา ในช่วงความเข้มข้น 0 – 9.18 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร

โบรโมเปอร์ออกซิเดส (mU/ml)	ค่า OD 590 (mean ± SD)	โบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้น (μM)	จำนวนซ้ำ
0.00	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	*n=2*
0.92	0.059 ± 0.011	1.107 ± 0.201	*n=2*
1.84	0.084 ± 0.003	1.589 ± 0.054	*n=2*
3.67	0.162 ± 0.007	3.065 ± 0.134	*n=2*
5.51	0.273 ± 0.003	5.165 ± 0.054	*n=2*
7.34	0.348 ± 0.016	6.574 ± 0.308	*n=2*
9.18	0.450 ± 0.013	8.513 ± 0.241	*n=2*
11.02	0.517 ± 0.008	9.781 ± 0.161	*n=2*
14.69	0.561 ± 0.012	10.604 ± 0.227	*n=2*
18.36	0.576 ± 0.029	10.887 ± 0.548	*n=2*
27.54	0.610 ± 0.004	11.540 ± 0.080	*n=2*

5. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ตารางที่ ก.9 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล ในช่วงระยะเวลา 0 – 10 ชั่วโมง

เวลาในการตรวจวัด (ชั่วโมง)	ค่า OD 590 (mean ± SD)	โบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้น (μM)	จำนวนซ้ำ
0	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	*n=2*
1	0.148 ± 0.003	2.800 ± 0.054	*n=2*
2	0.326 ± 0.003	6.167 ± 0.054	*n=2*
3	0.450 ± 0.011	8.513 ± 0.214	*n=2*
4	0.497 ± 0.000	9.402 ± 0.000	*n=2*
5	0.550 ± 0.039	10.395 ± 0.736	*n=2*
6	0.574 ± 0.039	10.849 ± 0.736	*n=2*
7	0.587 ± 0.019	11.095 ± 0.361	*n=2*
8	0.581 ± 0.007	10.991 ± 0.134	*n=2*
9	0.575 ± 0.017	10.878 ± 0.321	*n=2*
10	0.583 ± 0.008	11.020 ± 0.147	*n=2*

6. การสร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบเอมีนชนิดต่าง ๆ สำหรับการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมักดอง ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ตารางที่ ก.10 ผลของการตรวจวัดสารประกอบเอมีนมาตรฐาน putrescine ในช่วงความเข้มข้น 0–8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ความเข้มข้นของ putrescine (mg/ml)	OD 590 nm (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ
0	0.000 ± 0.000	$n = 2$
1	0.119 ± 0.017	$n = 2$
2	0.192 ± 0.008	$n = 2$
3	0.302 ± 0.005	$n = 2$
4	0.406 ± 0.001	$n = 2$
5	0.512 ± 0.004	$n = 2$
8	0.831 ± 0.002	$n = 2$

ตารางที่ ก.11 ผลของการตรวจวัดสารประกอบเอมีนมาตรฐาน cadaverine ในช่วงความเข้มข้น 0–8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ความเข้มข้นของ cadaverine (mg/ml)	OD 590 nm (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ
0	0.000 ± 0.000	$n = 2$
1	0.124 ± 0.004	$n = 2$
2	0.206 ± 0.004	$n = 2$
3	0.298 ± 0.016	$n = 2$
4	0.413 ± 0.009	$n = 2$
5	0.465 ± 0.025	$n = 2$
8	0.718 ± 0.008	$n = 2$

ตารางที่ ก.12 ผลของการตรวจวัดสารประกอบเอมีนมาตรฐาน histamine ในช่วงความเข้มข้น 0–8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ความเข้มข้นของ histamine (mg/ml)	OD 590 nm (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ
0	0.000 ± 0.000	$n = 2$
1	0.093 ± 0.003	$n = 2$
2	0.241 ± 0.003	$n = 2$
3	0.306 ± 0.012	$n = 2$
4	0.340 ± 0.016	$n = 2$
5	0.426 ± 0.035	$n = 2$
8	0.707 ± 0.020	$n = 2$

ตารางที่ ก.13 ผลของการตรวจวัดสารประกอบเอมีนมาตรฐาน tryptamine ในช่วงความเข้มข้น 0–14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยาenzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ความเข้มข้นของ tryptamine (mg/ml)	OD 590 nm (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ
0	0.000 ± 0.000	$n = 2$
2	0.100 ± 0.011	$n = 2$
4	0.257 ± 0.001	$n = 2$
6	0.335 ± 0.042	$n = 2$
8	0.485 ± 0.004	$n = 2$
10	0.578 ± 0.025	$n = 2$
12	0.632 ± 0.005	$n = 2$
14	0.763 ± 0.002	$n = 2$

ตารางที่ ก.14 ผลของการตรวจวัดสารประกอบเอมีนมาตรฐาน tyramine ในช่วงความเข้มข้น 0–14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ความเข้มข้นของ tyramine (mg/ml)	OD 590 nm (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ
0	0.000 ± 0.000	$n = 2$
1	0.015 ± 0.004	$n = 2$
5	0.134 ± 0.003	$n = 2$
10	0.297 ± 0.016	$n = 2$
15	0.392 ± 0.007	$n = 2$
20	0.482 ± 0.020	$n = 2$
25	0.554 ± 0.027	$n = 2$
30	0.666 ± 0.003	$n = 2$

ตารางที่ ก.15 ผลของการตรวจวัดสารประกอบเอมีนมาตรฐาน ß - phenylethylamine ในช่วงความเข้มข้น 0–2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ความเข้มข้นของ ß - phenylethylamine (mg/ml)	OD 590 nm (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ
0.0	0.000 ± 0.000	*n* = 2
0.1	0.049 ± 0.021	*n* = 2
0.2	0.105 ± 0.001	*n* = 2
0.4	0.165 ± 0.001	*n* = 2
0.8	0.326 ± 0.001	*n* = 2
1.2	0.473 ± 0.004	*n* = 2
1.6	0.673 ± 0.003	*n* = 2
2.0	0.819 ± 0.007	*n* = 2

7. การพัฒนาการสกัดสารประกอบเอมีนจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง

7.1 การศึกษาชนิดของกรดที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดอง

ตารางที่ ก.16 ผลของชนิดของกรดที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่สกัดได้จากตัวอย่างแหนมหมู

ชนิดของกรดที่ใช้สกัด	OD 590 nm (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ
4 M HCl	0.159 ± 0.007	*n=2*
0.6 M PCA	0.124 ± 0.006	*n=2*
1.5 M PCA	0.162 ± 0.011	*n=2*
3 M PCA	0.262 ± 0.004	*n=2*

ตารางที่ ก.17 ผลของชนิดของกรดที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่สกัดได้จากตัวอย่างไส้กรอกเปรี้ยว

ชนิดของกรดที่ใช้สกัด	OD 590 nm (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ
4 M HCl	0.086 ± 0.003	*n=2*
0.6 M PCA	0.071 ± 0.001	*n=2*
1.5 M PCA	0.156 ± 0.003	*n=2*
3 M PCA	0.247 ± 0.009	*n=2*

ตารางที่ ก.18 ผลของชนิดของกรดที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่สกัดได้จากตัวอย่างข้าวหมาก

ชนิดของกรดที่ใช้สกัด	OD 590 nm (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ
4 M HCl	0.069 ± 0.005	*n=2*
0.6 M PCA	0.030 ± 0.003	*n=2*
1.5 M PCA	0.115 ± 0.001	*n=2*
3 M PCA	0.064 ± 0.006	*n=2*

ตารางที่ ก.19 ผลของชนิดของกรดที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่สกัดได้จากตัวอย่างปลาร้า

ชนิดของกรดที่ใช้สกัด	OD 590 nm (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ
4 M HCl	0.209 ± 0.008	*n=2*
0.6 M PCA	0.118 ± 0.001	*n=2*
1.5 M PCA	0.115 ± 0.008	*n=2*
3 M PCA	0.088 ± 0.004	*n=2*

ตารางที่ ก.20 ผลของชนิดของกรดที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่สกัดได้จากตัวอย่างหอยดอง

ชนิดของกรดที่ใช้สกัด	OD 590 nm (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ
4 M HCl	0.133 ± 0.011	*n=2*
0.6 M PCA	0.102 ± 0.008	*n=2*
1.5 M PCA	0.105 ± 0.005	*n=2*
3 M PCA	0.054 ± 0.006	*n=2*

7.2 การศึกษาอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างและกรดที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดอง

ตารางที่ ก.21 ผลของอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างและกรดที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่สกัดได้จากตัวอย่างแหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว

อัตราส่วน (ตัวอย่าง : กรด)	OD 590 nm (mean ± SD)		Biogenic amines (mg/kg)		จำนวนซ้ำ
	แหนมหมู	ไส้กรอกเปรี้ยว	แหนมหมู	ไส้กรอกเปรี้ยว	
1 : 0.75	0.209 ± 0.018	0.162 ± 0.006	203.31 ± 17.88^{b}	104.73 ± 4.13^{c}	*n=2*
1 : 1.0	0.180 ± 0.007	0.141 ± 0.011	210.12 ± 8.25^{b}	121.92 ± 9.78^{c}	*n=2*
1 : 1.5	0.121 ± 0.009	0.112 ± 0.004	210.99 ± 16.10^{b}	180.77 ± 5.73^{b}	*n=2*
1 : 2.0	0.121 ± 0.006	0.103 ± 0.005	270.90 ± 14.31^{a}	239.30 ± 11.56^{a}	*n=2*
1 : 2.5	0.096 ± 0.003	0.088 ± 0.004	280.16 ± 8.25^{a}	256.81 ± 12.38^{a}	*n=2*

<u>หมายเหตุ</u> : abc หมายถึง ค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล โดยใช้ ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในตัวอย่างแต่ละชนิด โดยใช้การทดสอบแบบ Duncan Test

7.3 การศึกษาจำนวนครั้งในการสกัดที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสกัดสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดอง

ตารางที่ ก.22 ผลของจำนวนครั้งที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่สกัดได้จากตัวอย่างแหนมหมู และไส้กรอกเปรี้ยว

จำนวนครั้งที่ใช้ในการสกัด	OD 590 nm (mean ± SD)		Biogenic amines (mg/kg)		จำนวนซ้ำ
	แหนมหมู	ไส้กรอกเปรี้ยว	แหนมหมู	ไส้กรอกเปรี้ยว	
1	0.265 ± 0.002	0.124 ± 0.006	128.65 ± 1.03^{c}	60.31± 2.75^{c}	*n=2*
2	0.171 ± 0.012	0.162 ± 0.006	149.27 ± 10.52^{b}	104.73 ± 4.13^{b}	*n=2*
3	0.104 ± 0.004	0.160 ± 0.013	168.61 ± 6.88^{a}	258.59 ± 21.78^{a}	*n=2*
4	0.086 ± 0.001	0.129 ± 0.000	166.34 ± 1.38^{ab}	250.97 ± 0.00^{a}	*n=2*

หมายเหตุ : abc หมายถึง ค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล โดยใช้ ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในตัวอย่างแต่ละชนิด โดยใช้การทดสอบแบบ Duncan Test

7.4 การสกัดและการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดอง ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ตารางที่ ก.23 ปริมาณสารประกอบเอมีนที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารหมักดองชนิดต่าง ๆ ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ตัวอย่าง	OD 590 (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ
แหนมหมู	0.055 ± 0.002	*n=2*
ไส้กรอกเปรี้ยว	0.045 ± 0.001	*n=2*
ข้าวหมาก	0.033 ± 0.003	*n=2*
ปลาร้า	0.089 ± 0.001	*n=2*
หอยดอง	0.073 ± 0.006	*n=2*

7.5 การหาค่าเปอร์เซ็นต์การสกัดสารประกอบเอมีน (% recovery)

ตารางที่ ก.24 ค่าเปอร์เซ็นต์การสกัดสารประกอบเอมีนชนิดต่าง ๆ (% recovery)

ตัวอย่าง	OD 590 (mean ± SD)			จำนวนซ้ำ
	Putrescine	Cadaverine	Histamine	
แหนมหมู	0.215 ± 0.001	0.192 ± 0.008	0.141 ± 0.002	*n=2*
ไส้กรอกเปรี้ยว	0.214 ± 0.002	0.196 ± 0.001	0.152 ± 0.008	*n=2*
ข้าวหมาก	0.213 ±0.003	0.157 ± 0.001	0.151 ± 0.004	*n=2*
ปลาร้า	0.296 ± 0.018	0.231 ± 0.004	0.225 ± 0.011	*n=2*
หอยดอง	0.265 ± 0.008	0.228 ± 0.008	0.158 ± 0.014	*n=2*

8. การศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในอาหารหมักดอง

ตารางที่ ก. 25 ผลของระยะเวลาในการหมักต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในแหนม และไส้กรอกเปรี้ยว

เวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)	OD 590 nm (mean ± SD)		จำนวนซ้ำ
	แหนมหมู	ไส้กรอกเปรี้ยว	
1	0.055 ± 0.016	0.060 ± 0.011	*n=2*
3	0.164 ± 0.007	0.084 ± 0.003	*n=2*
5	0.179 ± 0.012	0.094 ± 0.004	*n=2*
7	0.196 ± 0.018	0.157 ± 0.006	*n=2*

9. การศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในอาหารหมักดอง

ตารางที่ ก.26 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาต่อปริมาณสารประกอบเอมีนที่เกิดขึ้นในแหนมและไส้กรอกเปรี้ยว

อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บ (องศาเซลเซียส)	OD 590 nm (mean ± SD)		จำนวนซ้ำ
	แหนมหมู	ไส้กรอกเปรี้ยว	
ก่อนเก็บรักษา	0.085 ± 0.004	0.054 ± 0.003	*n=2*
-4	0.092 ± 0.004	0.052 ± 0.005	*n=2*
4	0.089 ± 0.009	0.053 ± 0.002	*n=2*
25	0.218 ± 0.001	0.127 ± 0.004	*n=2*
37	0.305 ± 0.001	0.173 ± 0.006	*n=2*

10. การศึกษาการทำปฏิกิริยา โดยการใช้สารยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

10.1 การศึกษาการทำปฏิกิริยาโบรมิเนชัน โดยการใช้สารยับยั้งปฏิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ตารางที่ ก.27 การทำปฏิกิริยาโบรมิเนชันของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่าย โดยการใช้โพแทสเซียมไซยาไนด์ และโซเดียมเอไซด์ เข้มข้น 0.2 - 2.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลายปฏิกิริยา เป็นสารยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส

ความเข้มข้นของสารยับยั้ง (mg/ml)	OD 590 (mean ± SD)		จำนวนซ้ำ
	KCN	NaN_3	
0.0	0.446 ± 0.000	0.446 ± 0.000	*n=2*
0.2	0.509 ± 0.020	0.482 ± 0.008	*n=2*
0.4	0.470 ± 0.001	0.446 ± 0.001	*n=2*
0.8	0.438 ± 0.001	0.447 ± 0.002	*n=2*
1.2	0.346 ± 0.002	0.453 ± 0.003	*n=2*
1.6	0.327 ± 0.001	0.432 ± 0.002	*n=2*
2.0	0.317 ± 0.009	0.431 ± 0.004	*n=2*
2.4	0.253 ± 0.002	0.411 ± 0.006	*n=2*

10.2 การศึกษาการทำปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยการใช้สารยับยั้งปฏิริยาของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ตารางที่ ก.28 การทำปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยการเติมสารยับยั้งของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เวลาในการบ่มปฏิกิริยา (ชั่วโมง)	OD 590 (mean ± SD)			จำนวนซ้ำ
	No inhibitor	KCN	NaN_3	
0	0.253 ± 0.001	0.253 ± 0.001	0.253 ± 0.001	*n=2*
1	0.237 ± 0.001	0.174 ± 0.002	0.247 ± 0.003	*n=2*
2	0.242 ± 0.001	0.168 ± 0.003	0.245 ± 0.001	*n=2*
3	0.243 ± 0.004	0.165 ± 0.004	0.249 ± 0.003	*n=2*

ตารางที่ ก.29 การทำปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล โดยการเติมสารยับยั้งของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

เวลาในการบ่มปฏิกิริยา (ชั่วโมง)	OD 590 (mean ± SD)			จำนวนซ้ำ
	No inhibitor	KCN	NaN_3	
0	0.245 ± 0.001	0.245 ± 0.001	0.245 ± 0.001	*n=2*
1	0.267 ± 0.001	0.204 ± 0.003	0.249 ± 0.000	*n=2*
2	0.304 ± 0.004	0.196 ± 0.000	0.243 ± 0.001	*n=2*
3	0.303 ± 0.003	0.183 ± 0.007	0.230 ± 0.001	*n=2*

11. การตรวจสอบคุณภาพของการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay

ตารางที่ ก.30 การตรวจสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ครั้งที่วิเคราะห์	OD 590 nm (mean ± SD)	ครั้งที่วิเคราะห์	OD 590 nm (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ
1	0.568 ± 0.004	31	0.585 ± 0.025	*n=2*
2	0.416 ± 0.003	32	0.564 ± 0.045	*n=2*
3	0.582 ± 0.011	33	0.449 ± 0.015	*n=2*
4	0.461 ± 0.004	34	0.557 ± 0.001	*n=2*
5	0.462 ± 0.036	35	0.474 ± 0.040	*n=2*
6	0.567 ± 0.030	36	0.456 ± 0.001	*n=2*
7	0.479 ± 0.000	37	0.598 ± 0.016	*n=2*
8	0.473 ± 0.021	38	0.519 ± 0.009	*n=2*
9	0.538 ± 0.019	39	0.500 ± 0.005	*n=2*

ครั้งที่วิเคราะห์	OD 590 nm (mean ± SD)	ครั้งที่วิเคราะห์	OD 590 nm (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ
10	0.498 ± 0.012	40	0.493 ± 0.008	*n=2*
11	0.456 ± 0.008	41	0.542 ± 0.008	*n=2*
12	0.519 ± 0.060	42	0.469 ± 0.033	*n=2*
13	0.488 ± 0.047	43	0.475 ± 0.001	*n=2*
14	0.492 ± 0.003	44	0.456 ± 0.056	*n=2*
15	0.487 ± 0.042	45	0.484 ± 0.002	*n=2*
16	0.590 ± 0.007	46	0.552 ± 0.007	*n=2*
17	0.457 ± 0.013	47	0.521 ± 0.001	*n=2*
18	0.504 ± 0.016	48	0.526 ± 0.004	*n=2*
19	0.424 ± 0.014	49	0.521 ± 0.009	*n=2*
20	0.442 ± 0.037	50	0.426 ± 0.025	*n=2*
21	0.494 ± 0.027	51	0.507 ± 0.007	*n=2*
22	0.485 ± 0.020	52	0.479 ± 0.014	*n=2*
23	0.425 ± 0.003	53	0.426 ± 0.005	*n=2*
24	0.443 ± 0.010	54	0.424 ± 0.010	*n=2*
25	0.477 ± 0.014	55	0.425 ± 0.043	*n=2*
26	0.487 ± 0.013	56	0.539 ± 0.024	*n=2*
27	0.438 ± 0.008	57	0.504 ± 0.023	*n=2*
28	0.456 ± 0.005	58	0.469 ± 0.027	*n=2*
29	0.469 ± 0.004	59	0.398 ± 0.002	*n=2*
30	0.418 ± 0.008	60	0.450 ± 0.009	*n=2*

12. การสกัดเอนไซม์เอมีนออกซิเดส

12.1 ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์

ตารางที่ ก.31 ผลของการตรวจวัดปริมาณโปรตีนของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากส่วนต่างๆของต้นอ่อนของเมล็ดถั่วเหลืองงอก

แหล่งของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากต้นอ่อนของเมล็ดถั่วเหลืองงอก	OD 660 (mean ± SD)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	จำนวนซ้ำ
ส่วนราก (ก่อนทำ dialysis)	0.791 ± 0.004	7.905 ± 0.078	*n=2*
ส่วนลำต้น(ก่อนทำ dialysis)	0.747 ± 0.002	7.470 ± 0.042	*n=2*
ส่วนราก (หลังทำ dialysis)	0.580 ± 0.001	2.900 ± 0.014	*n=2*
ส่วนลำต้น(หลังทำ dialysis)	0.538 ± 0.004	2.690 ± 0.042	*n=2*

12.2 กิจกรรมของเอนไซม์

ตารางที่ ก.32 ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากส่วนต่างๆของต้นอ่อนของเมล็ดถั่วเหลืองงอก

แหล่งของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากต้นอ่อนของเมล็ดถั่วเหลืองงอก	OD 590 (mean ± SD)	กิจกรรม (ยูนิต/มิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัม)	จำนวนซ้ำ
ส่วนราก (ก่อนทำ dialysis)	0.234 ± 0.007	0.111 ± 0.003	0.014 ± 0.000	*n=2*
ส่วนลำต้น(ก่อนทำ dialysis)	0.246 ± 0.017	0.116 ± 0.008	0.016 ± 0.001	*n=2*
ส่วนราก (หลังทำ dialysis)	0.392 ± 0.011	0.185 ± 0.005	0.064 ± 0.002	*n=2*
ส่วนลำต้น(หลังทำ dialysis)	0.345 ± 0.008	0.163 ± 0.004	0.061 ± 0.001	*n=2*

13. การศึกษาปริมาณของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

13.1 การศึกษาปริมาณของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay

ตารางที่ ก.33 ผลของปริมาณเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล ต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา ในช่วงความเข้มข้น 0 – 18.50 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร

เอมีนออกซิเดส (mU/ml)	ค่า OD 590 (mean ± SD)	โบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้น (μM)	จำนวนซ้ำ
0.00	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	*n=2*
0.37	0.081 ± 0.003	1.532 ± 0.054	*n=2*
1.48	0.149 ± 0.007	2.819 ± 0.134	*n=2*
3.70	0.291 ± 0.010	5.505 ± 0.187	*n=2*
5.55	0.384 ± 0.001	7.264 ± 0.027	*n=2*
7.40	0.476 ± 0.003	9.005 ± 0.054	*n=2*
11.10	0.508 ± 0.009	9.601 ± 0.174	*n=2*
14.80	0.537 ± 0.002	10.149 ± 0.040	*n=2*
18.50	0.533 ± 0.003	10.083 ± 0.054	*n=2*

13.2 การศึกษาปริมาณของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay

ตารางที่ ก.34 ผลของปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ร่วมกับเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา ในช่วงความเข้มข้น 0 – 18.36 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร

โบรโมเปอร์ออกซิเดส (mU/ml)	ค่า OD 590 (mean ± SD)	โบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้น (μM)	จำนวนซ้ำ
0.00	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	*n=2*
0.92	0.124 ± 0.001	2.346 ± 0.027	*n=2*
1.84	0.209 ± 0.001	3.944 ± 0.013	*n=2*
3.67	0.359 ± 0.021	6.782 ± 0.388	*n=2*
5.51	0.447 ± 0.007	8.456 ± 0.134	*n=2*
7.34	0.466 ± 0.013	8.816 ± 0.241	*n=2*
9.18	0.480 ± 0.010	9.081 ± 0.187	*n=2*
11.02	0.480 ± 0.013	9.081 ± 0.241	*n=2*
14.69	0.489 ± 0.003	9.251 ± 0.054	*n=2*
18.36	0.493 ± 0.008	9.327 ± 0.161	*n=2*

14. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ตารางที่ ก.35 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล ในช่วงระยะเวลา 0 – 10 ชั่วโมง

เวลาในการตรวจวัด (ชั่วโมง)	ค่า OD 590 (mean ± SD)	โบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้น (μM)	จำนวนซ้ำ
0	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	*n=2*
1	0.307 ± 0.004	5.798 ± 0.067	*n=2*
2	0.430 ± 0.004	8.135 ± 0.080	*n=2*
3	0.487 ± 0.002	9.204 ± 0.040	*n=2*
4	0.479 ± 0.004	9.052 ± 0.067	*n=2*
5	0.478 ± 0.006	9.033 ± 0.120	*n=2*
6	0.473 ± 0.001	8.948 ± 0.027	*n=2*
7	0.476 ± 0.014	9.005 ± 0.268	*n=2*
8	0.481 ± 0.006	9.090 ± 0.120	*n=2*
9	0.481 ± 0.008	9.090 ± 0.147	*n=2*
10	0.479 ± 0.010	9.062 ± 0.187	*n=2*

15. การสร้างกราฟมาตรฐานของสารประกอบเอมีนชนิดต่าง ๆ สำหรับการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนในอาหารหมักดอง ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ตารางที่ ก.36 กราฟมาตรฐาน putrescine ในช่วงความเข้มข้น 0–5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดส จากสาหร่ายทะเล

ความเข้มข้นของ putrescine (mg/ml)	OD 590 nm (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ
0	0.000 ± 0.000	$n = 2$
0.5	0.083 ± 0.013	$n = 2$
1	0.152 ± 0.035	$n = 2$
2	0.332 ± 0.006	$n = 2$
3	0.462 ± 0.066	$n = 2$
4	0.577 ± 0.009	$n = 2$
5	0.714 ± 0.042	$n = 2$

ตารางที่ ก.37 กราฟมาตรฐาน cadaverine ในช่วงความเข้มข้น 0–5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ความเข้มข้นของ cadaverine (mg/ml)	OD 590 nm (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ
0	0.000 ± 0.000	$n = 2$
0.5	0.089 ± 0.015	$n = 2$
1	0.149 ± 0.004	$n = 2$
2	0.311 ± 0.004	$n = 2$
3	0.413 ± 0.015	$n = 2$
4	0.540 ± 0.014	$n = 2$
5	0.648 ± 0.009	$n = 2$

ตารางที่ ก.38 กราฟมาตรฐาน histamine ในช่วงความเข้มข้น 0–5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ความเข้มข้นของ histamine (mg/ml)	OD 590 nm (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ
0	0.000 ± 0.000	$n = 2$
0.5	0.084 ± 0.011	$n = 2$
1	0.154 ± 0.006	$n = 2$
2	0.243 ± 0.037	$n = 2$
3	0.343 ± 0.006	$n = 2$
4	0.517 ± 0.038	$n = 2$
5	0.642 ± 0.001	$n = 2$

ตารางที่ ก.39 กราฟมาตรฐาน tryptamine ในช่วงความเข้มข้น 0–14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ความเข้มข้นของ tryptamine (mg/ml)	OD 590 nm (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ
0	0.000 ± 0.000	$n = 2$
2	0.121 ± 0.036	$n = 2$
4	0.274 ± 0.016	$n = 2$
6	0.379 ± 0.001	$n = 2$
8	0.466 ± 0.008	$n = 2$
10	0.608 ± 0.038	$n = 2$
12	0.785 ± 0.001	$n = 2$
14	0.883 ± 0.019	$n = 2$

ตารางที่ ก.40 กราฟมาตรฐาน tyramine ในช่วงความเข้มข้น 0–2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ความเข้มข้นของ tyramine (mg/ml)	OD 590 nm (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ
0.0	0.000 ± 0.000	$n = 2$
0.1	0.081 ± 0.004	$n = 2$
0.5	0.322 ± 0.022	$n = 2$
1.0	0.557 ± 0.006	$n = 2$
1.5	0.853 ± 0.016	$n = 2$
2.0	1.025 ± 0.042	$n = 2$

ตารางที่ ก.41 กราฟมาตรฐาน ß-phenylethylamine ในช่วงความเข้มข้น 0–2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ความเข้มข้นของ ß-phenylethylamine (mg/ml)	OD 590 nm (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ
0	0.000 ± 0.000	$n = 2$
0.2	0.060 ± 0.004	$n = 2$
0.5	0.283 ± 0.037	$n = 2$
1.0	0.457 ± 0.012	$n = 2$
1.5	0.642 ± 0.021	$n = 2$
2.0	0.871 ± 0.008	$n = 2$

16. การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง

ตารางที่ ก.42 การหาค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ที่มีสารประกอบเอมีนมาตรฐานชนิด putrescine เป็นซับสเตรต โดยคำนวณจาก Lineweaver-Burk plot

ความเข้มข้นของ putrescine (M)	ปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้น (µM)	อัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยา ($\mu M.min^{-1}$)	จำนวนซ้ำ
0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	$n = 2$
0.011	1.570 ± 0.241	0.009 ± 0.001	$n = 2$
0.023	2.876 ± 0.669	0.016 ± 0.004	$n = 2$
0.045	6.271 ± 0.120	0.035 ± 0.001	$n = 2$
0.068	8.731 ± 1.244	0.049 ± 0.007	$n = 2$
0.091	10.906 ± 0.174	0.061 ± 0.001	$n = 2$
0.113	13.498 ± 0.789	0.075 ± 0.004	$n = 2$

ตารางที่ ก.43 การหาค่า K_m และ V_{max}ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ที่มีสารประกอบเอมีนมาตรฐานชนิด cadaverine เป็นซับสเตรต โดยคำนวณจาก Lineweaver-Burk plot

ความเข้มข้นของ cadaverine (M)	ปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้น (μM)	อัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยา ($\mu M.min^{-1}$)	จำนวนซ้ำ
0.00	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	$n = 2$
0.03	1.674 ± 0.281	0.009 ± 0.002	$n = 2$
0.05	2.809 ± 0.067	0.016 ± 0.000	$n = 2$
0.11	5.874 ± 0.067	0.033 ± 0.000	$n = 2$
0.15	7.804 ± 0.281	0.043 ± 0.002	$n = 2$
0.20	10.216 ± 0.268	0.057 ± 0.001	$n = 2$
0.24	12.249 ± 0.174	0.068 ± 0.001	$n = 2$

ตารางที่ ก.44 การหาค่า K_m และ V_{max}ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ที่มีสารประกอบเอมีนมาตรฐานชนิด histamine เป็นซับสเตรต โดยคำนวณจาก Lineweaver-Burk plot

ความเข้มข้นของ histamine (M)	ปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้น (μM)	อัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยา ($\mu M.min^{-1}$)	จำนวนซ้ำ
0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	$n = 2$
0.009	1.580 ± 0.201	0.009 ± 0.001	$n = 2$
0.018	2.904 ± 0.120	0.016 ± 0.001	$n = 2$
0.036	4.588 ± 0.709	0.025 ± 0.004	$n = 2$
0.054	6.489 ± 0.107	0.036 ± 0.001	$n = 2$
0.072	9.781 ± 0.722	0.054 ± 0.004	$n = 2$
0.090	12.145 ± 0.027	0.067 ± 0.000	$n = 2$

ตารางที่ ก.45 การหาค่า K_m และ V_{max}ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ที่มีสารประกอบเอมีนมาตรฐานชนิด tryptamine เป็นซับสเตรต โดยคำนวณจาก Lineweaver-Burk plot

ความเข้มข้นของ tryptamine (M)	ปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้น (μM)	อัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยา ($\mu M.min^{-1}$)	จำนวนซ้ำ
0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	$n = 2$
0.025	2.280 ± 0.682	0.013 ± 0.004	$n = 2$
0.050	5.184 ± 0.294	0.029 ± 0.002	$n = 2$
0.075	7.170 ± 0.027	0.040 ± 0.000	$n = 2$
0.100	8.806 ± 0.147	0.049 ± 0.001	$n = 2$
0.125	11.502 ± 0.722	0.064 ± 0.004	$n = 2$
0.150	14.841 ± 0.013	0.082 ± 0.000	$n = 2$
0.175	16.695 ± 0.361	0.093 ± 0.002	$n = 2$

ตารางที่ ก.46 การหาค่า K_m และ V_{max}ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ที่มีสารประกอบเอมีนมาตรฐานชนิด tyramine เป็นซับสเตรต โดยคำนวณจาก Lineweaver-Burk plot

ความเข้มข้นของ tyramine (M)	ปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้น (μM)	อัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยา ($\mu M.min^{-1}$)	จำนวนซ้ำ
0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	$n = 2$
0.001	1.523 ± 0.067	0.008 ± 0.000	$n = 2$
0.007	6.082 ± 0.415	0.034 ± 0.002	$n = 2$
0.015	10.537 ± 0.107	0.059 ± 0.001	$n = 2$
0.022	16.137 ± 0.294	0.090 ± 0.002	$n = 2$
0.029	19.391 ± 0.803	0.108 ± 0.004	$n = 2$

ตารางที่ ก.47 การหาค่า K_m และ V_{max}ของเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ที่มีสารประกอบเอมีนมาตรฐานชนิด ß-phenylethylamine เป็นซับสเตรต โดยคำนวณจาก Lineweaver-Burk plot

ความเข้มข้นของ ß-phenylethylamine (M)	ปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้น (µM)	อัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยา ($\mu M.min^{-1}$)	จำนวนซ้ำ
0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	$n = 2$
0.003	1.135 ± 0.080	0.006 ± 0.000	$n = 2$
0.008	5.344 ± 0.709	0.030 ± 0.004	$n = 2$
0.017	8.636 ± 0.227	0.048 ± 0.001	$n = 2$
0.025	12.136 ± 0.388	0.067 ± 0.002	$n = 2$
0.033	16.468 ± 0.147	0.091 ± 0.001	$n = 2$

17. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดอง ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ตารางที่ ก.48 ปริมาณสารประกอบเอมีนที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารหมักดองชนิดต่างๆ ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ตัวอย่าง	OD 590 nm (mean ± SD)	จำนวนซ้ำ
แหนมหมู	0.366 ± 0.00	*n=2*
ไส้กรอกเปรี้ยว	0.299 ± 0.01	*n=2*
ข้าวหมาก	0.103 ± 0.01	*n=2*
ปลาร้า	0.316 ± 0.00	*n=2*
หอยดอง	0.228 ± 0.00	*n=2*

18. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเอมีนจากอาหารหมักดองประเภทต่างๆ

ตารางที่ ก.49 ปริมาณสารประกอบเอมีนที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารหมักดองประเภทต่างๆ ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้าและเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

ตัวอย่าง	OD 590 nm (mean ±SD)		จำนวนซ้ำ
	commercial DAO[a]	crude AO[b]	
ไส้กรอกซาลามิ	0.067 ± 0.002	0.075 ± 0.005	*n = 2*
ไส้กรอกเบคอนยัดไส้	0.128 ± 0.001	0.130 ± 0.001	*n = 2*
น้ำบูดู	0.227 ± 0.006	0.247 ± 0.004	*n = 2*
ไตปลาดอง	0.244 ± 0.002	0.277 ± 0.003	*n = 2*
แหนมปลา	0.258 ± 0.009	0.281 ± 0.007	*n = 2*
บลูชีส	0.034 ± 0.001	0.041 ± 0.006	*n = 2*
มอร์ทาเดลลาชีส	0.063 ± 0.001	0.059 ± 0.003	*n = 2*
โยเกิร์ต ยี่ห้อดัชชี่	-0.120 ± 0.000	-0.054 ± 0.001	*n = 2*
โยเกิร์ต ยี่ห้อเดลี่โฮม	-0.099 ± 0.000	-0.081 ± 0.002	*n = 2*
นมเปรี้ยว ยี่ห้อโฟร์โมสต์	-0.047 ± 0.001	0.020 ± 0.003	*n = 2*
นมเปรี้ยว ยี่ห้อเมจิ	-0.025 ± 0.000	-0.014 ± 0.001	*n = 2*
ผักเสี้ยนดอง	0.067 ± 0.004	0.055 ± 0.001	*n = 2*
หล่อเหลียงดอง	0.085 ± 0.001	0.066 ± 0.005	*n = 2*
สะตอดอง	0.088 ± 0.001	0.067 ± 0.002	*n = 2*
น้ำกระชาย	0.070 ± 0.008	0.044 ± 0.001	*n = 2*
น้ำหมักชีวภาพ ยี่ห้อจตุผล	0.162 ± 0.003	0.124 ± 0.015	*n = 2*
น้ำมะรุม	0.095 ± 0.004	0.036 ± 0.005	*n = 2*
ไวน์แอปเปิ้ล	-0.017 ± 0.001	-0.013 ± 0.001	*n = 2*
ไวน์กระชายดำ	0.084 ± 0.004	0.056 ± 0.001	*n = 2*

หมายเหตุ : [a] หมายถึง การตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล และ [b] หมายถึง การตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีน ด้วยวิธี enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองและโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

19. การศึกษาเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป

19.1 การศึกษาความเข้มข้นของ stabilizer ที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการรักษาเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป

ตารางที่ ก.50 ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา enzyme coupling assay ของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป ชนิดที่ใช้ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และชนิดที่ใช้เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง ร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล เมื่อใช้ putrescine เป็นสารตั้งต้น

กลีเซอรอล (% v/v)	OD 590 nm (mean ±SD)		จำนวนซ้ำ
	commerical DAO	crude AO	
0	0.519 ± 0.028	0.288 ± 0.008	*n = 2*
2	0.512 ± 0.016	0.288 ± 0.008	*n = 2*
4	0.494 ± 0.044	0.295 ± 0.011	*n = 2*
6	0.433 ± 0.007	0.276 ± 0.018	*n = 2*
8	0.419 ± 0.010	0.217 ± 0.004	*n = 2*
10	0.406 ± 0.004	0.214 ± 0.001	*n = 2*
12	0.333 ± 0.005	0.203 ± 0.001	*n = 2*
14	0.309 ± 0.013	0.194 ± 0.004	*n = 2*
16	0.282 ± 0.008	0.175 ± 0.003	*n = 2*
18	0.254 ± 0.002	0.152 ± 0.005	*n = 2*
20	0.208 ± 0.005	0.136 ± 0.001	*n = 2*

ตารางที่ ก.51 ผลของความเข้มข้นของโพลีเอทีลีนไกลคอลต่อปริมาณโบรโมฟีนอลบลูที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา enzyme coupling assay ของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปชนิดที่ใช้ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และชนิดที่ใช้เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลืองร่วมกับโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล เมื่อใช้ putrescine เป็นสารตั้งต้น

โพลีเอทีลีนไกลคอล (% w/v)	OD 590 nm (mean ±SD)		จำนวนซ้ำ
	commerical DAO	crude AO	
0	0.519 ± 0.028	0.288 ± 0.008	*n = 2*
1	0.535 ± 0.005	0.314 ± 0.003	*n = 2*
2	0.502 ± 0.016	0.311 ± 0.004	*n = 2*
3	0.751 ± 0.012	0.309 ± 0.004	*n = 2*
4	0.748 ± 0.012	0.416 ± 0.050	*n = 2*
5	0.732 ± 0.006	0.394 ± 0.045	*n = 2*
6	0.741 ± 0.016	0.415 ± 0.008	*n = 2*

19.2 การศึกษาผลของการใช้ stabilizer ต่อเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป

ตารางที่ ก.52 ผลของการใช้ stabilizer ต่อเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป ชนิดที่ประกอบด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล เมื่อใช้ putrescine เป็นสารตั้งต้น

อายุการเก็บรักษา (สัปดาห์)	OD 590 nm (mean ±SD)			จำนวนซ้ำ
	no stabilizer	add glycerol 2 % (v/v)	add PEG 2% (w/v)	
0	0.378 ± 0.011	0.344 ± 0.037	0.482 ± 0.001	*n = 2*
1	0.389 ± 0.005	0.344 ± 0.003	0.509 ± 0.001	*n = 2*
2	0.490 ± 0.006	0.358 ± 0.004	0.515 ± 0.019	*n = 2*
4	0.348 ± 0.007	0.531 ± 0.060	0.508 ± 0.064	*n = 2*
6	0.308 ± 0.006	0.354 ± 0.032	0.430 ± 0.003	*n = 2*
8	0.282 ± 0.007	0.338 ± 0.023	0.392 ± 0.010	*n = 2*
10	0.209 ± 0.004	0.353 ± 0.006	0.311 ± 0.012	*n = 2*
12	0.177 ± 0.001	0.351 ± 0.001	0.281 ± 0.025	*n = 2*
14	0.150 ± 0.006	0.348 ± 0.001	0.267 ± 0.018	*n = 2*
16	0.147 ± 0.004	0.382 ± 0.004	0.259 ± 0.018	*n = 2*
18	-0.022 ± 0.000	0.328 ± 0.029	0.214 ± 0.006	*n = 2*
20	-0.045 ± 0.013	0.322 ± 0.014	0.195 ± 0.017	*n = 2*
22	-0.048 ± 0.007	0.344 ± 0.059	0.157 ± 0.007	*n = 2*
24	-0.111 ± 0.000	0.354 ± 0.038	0.171 ± 0.036	*n = 2*
26	-0.206 ± 0.000	0.244 ± 0.006	0.178 ± 0.047	*n = 2*
28	-0.120 ± 0.000	0.208 ± 0.008	0.167 ± 0.012	*n = 2*
30	-0.166 ± 0.003	0.182 ± 0.004	0.155 ± 0.036	*n = 2*

ตารางที่ ก.53 ผลของการใช้ stabilizer ต่อเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป ชนิดที่ประกอบด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล เมื่อใช้ putrescine เป็นสารตั้งต้น

อายุการเก็บรักษา (สัปดาห์)	OD 590 nm (mean ±SD)			จำนวนซ้ำ
	no stabilizer	add glycerol 2 % (v/v)	add PEG 2% (w/v)	
0	0.470 ± 0.035	0.475 ± 0.021	0.499 ± 0.010	*n = 2*
1	0.461 ± 0.051	0.445 ± 0.023	0.500 ± 0.001	*n = 2*
2	0.474 ± 0.025	0.486 ± 0.013	0.502 ± 0.027	*n = 2*
3	0.503 ± 0.001	0.469 ± 0.012	0.498 ± 0.028	*n = 2*
4	0.487 ± 0.022	0.464 ± 0.014	0.507 ± 0.065	*n = 2*
5	0.493 ± 0.013	0.477 ± 0.021	0.513 ± 0.050	*n = 2*
6	0.468 ± 0.018	0.463 ± 0.014	0.505 ± 0.024	*n = 2*
7	0.457 ± 0.039	0.474 ± 0.035	0.487 ± 0.034	*n = 2*
8	0.423 ± 0.039	0.450 ± 0.021	0.504 ± 0.035	*n = 2*
9	0.394 ± 0.007	0.449 ± 0.011	0.475 ± 0.040	*n = 2*
10	0.382 ± 0.040	0.460 ± 0.024	0.511 ± 0.035	*n = 2*
11	0.326 ± 0.004	0.485 ± 0.011	0.479 ± 0.009	*n = 2*
12	0.315 ± 0.019	0.465 ± 0.031	0.498 ± 0.011	*n = 2*

19.3 การศึกษาผลของการทำแห้ง ต่อเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป

ตารางที่ ก.54 ผลของการทำแห้งต่อเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปชนิดที่ประกอบด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล เมื่อใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐาน putrescine เป็นสารตั้งต้น

อายุการเก็บรักษา (สัปดาห์)	OD 590 nm (mean ±SD)	จำนวนซ้ำ
0	0.300 ± 0.052	*n = 2*
2	0.292 ± 0.015	*n = 2*
4	0.292 ± 0.034	*n = 2*
6	0.290 ± 0.032	*n = 2*
8	0.285 ± 0.001	*n = 2*
10	0.287 ± 0.002	*n = 2*
12	0.317 ± 0.006	*n = 2*
14	0.304 ± 0.129	*n = 2*
16	0.299 ± 0.021	*n = 2*
18	0.294 ± 0.035	*n = 2*
20	0.286 ± 0.057	*n = 2*

ตารางที่ ก.55 ผลของการทำแห้งต่อเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปชนิดที่ประกอบด้วยปฏิกิริยา enzyme coupling assay ระหว่างเอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล เมื่อใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐาน putrescine เป็นสารตั้งต้น

อายุการเก็บรักษา (สัปดาห์)	OD 590 nm (mean ±SD)	จำนวนซ้ำ
0	0.490 ± 0.033	*n = 2*
2	0.520 ± 0.038	*n = 2*
4	0.493 ± 0.036	*n = 2*
6	0.466 ± 0.032	*n = 2*
8	0.485 ± 0.025	*n = 2*
10	0.489 ± 0.042	*n = 2*
12	0.481 ± 0.003	*n = 2*

19.4 การศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษา ต่อเสถียรภาพของน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูป

ตารางที่ ก.56 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปที่ใช้เอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล ชนิดสารละลายที่ไม่มีการเติม stabilizer เมื่อใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐาน putrescine เป็นสารตั้งต้น

อายุการเก็บรักษา (สัปดาห์)	OD 590 nm (mean ±SD)			จำนวนซ้ำ
	4 °C	10 °C	25 °C	
0	0.378 ± 0.011	0.519 ± 0.028	0.519 ± 0.028	*n = 2*
2	0.490 ± 0.006	0.384 ± 0.003	0.362 ± 0.013	*n = 2*
4	0.348 ± 0.007	0.350 ± 0.012	0.310 ± 0.012	*n = 2*
6	0.308 ± 0.006	0.309 ± 0.011	0.242 ± 0.013	*n = 2*
8	0.282 ± 0.007	0.237 ± 0.005	0.207 ± 0.004	*n = 2*

ตารางที่ ก.57 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปที่ใช้เอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล ชนิดสารละลายที่ไม่มีการเติม stabilizer เมื่อใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐาน putrescine เป็นสารตั้งต้น

อายุการเก็บรักษา (สัปดาห์)	OD 590 nm (mean ±SD)			จำนวนซ้ำ
	4 °C	10 °C	25 °C	
0	0.470 ± 0.035	0.427 ± 0.023	0.427 ± 0.023	*n = 2*
2	0.474 ± 0.025	0.437 ± 0.023	0.323 ± 0.003	*n = 2*
4	0.487 ± 0.022	0.340 ± 0.013	0.211 ± 0.000	*n = 2*
6	0.468 ± 0.018	0.266 ± 0.017	0.141 ± 0.007	*n = 2*
8	0.423 ± 0.039	0.238 ± 0.001	0.100 ± 0.001	*n = 2*

ตารางที่ ก.58 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปที่ใช้เอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล ชนิดสารละลายที่มีการเติมกลีเซอรอล เมื่อใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐาน putrescine เป็นสารตั้งต้น

อายุการเก็บรักษา (สัปดาห์)	OD 590 nm (mean ±SD)			จำนวนซ้ำ
	4 °C	10 °C	25 °C	
0	0.344 ± 0.037	0.507 ± 0.008	0.507 ± 0.008	*n = 2*
2	0.358 ± 0.004	0.434 ± 0.013	0.359 ± 0.006	*n = 2*
4	0.531 ± 0.060	0.434 ± 0.013	0.322 ± 0.002	*n = 2*
6	0.354 ± 0.032	0.413 ± 0.019	0.300 ± 0.032	*n = 2*
8	0.338 ± 0.023	0.315 ± 0.009	0.243 ± 0.031	*n = 2*

ตารางที่ ก.59 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปที่ใช้เอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล ชนิดสารละลายที่มีการเติมกลีเซอรอล เมื่อใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐาน putrescine เป็นสารตั้งต้น

อายุการเก็บรักษา (สัปดาห์)	OD 590 nm (mean ±SD)			จำนวนซ้ำ
	4 °C	10 °C	25 °C	
0	0.475 ± 0.021	0.396 ± 0.023	0.396 ± 0.023	*n = 2*
2	0.486 ± 0.013	0.385 ± 0.052	0.311 ± 0.007	*n = 2*
4	0.464 ± 0.014	0.342 ± 0.027	0.206 ± 0.013	*n = 2*
6	0.463 ± 0.014	0.338 ± 0.020	0.162 ± 0.021	*n = 2*
8	0.450 ± 0.021	0.322 ± 0.001	0.144 ± 0.016	*n = 2*

ตารางที่ ก.60 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปที่ใช้เอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล ชนิดสารละลายที่มีการเติมโพลีเอทีลีนไกลคอล เมื่อใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐาน putrescine เป็นสารตั้งต้น

อายุการเก็บรักษา (สัปดาห์)	OD 590 nm (mean ±SD)			จำนวนซ้ำ
	4 °C	10 °C	25 °C	
0	0.482 ± 0.001	0.630 ± 0.085	0.630 ± 0.085	*n = 2*
2	0.515 ± 0.019	0.620 ± 0.036	0.478 ± 0.033	*n = 2*
4	0.508 ± 0.064	0.539 ± 0.015	0.329 ± 0.012	*n = 2*
6	0.430 ± 0.003	0.434 ± 0.017	0.253 ± 0.004	*n = 2*
8	0.392 ± 0.010	0.317 ± 0.010	0.160 ± 0.005	*n = 2*

ตารางที่ ก.61 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปที่ใช้เอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล ชนิดสารละลายที่มีการเติมโพลีเอทีลีนไกลคอล เมื่อใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐาน putrescine เป็นสารตั้งต้น

อายุการเก็บรักษา (สัปดาห์)	OD 590 nm (mean ±SD)			จำนวนซ้ำ
	4 °C	10 °C	25 °C	
0	0.499 ± 0.010	0.475 ± 0.023	0.475 ± 0.023	*n = 2*
2	0.502 ± 0.027	0.465 ± 0.049	0.393 ± 0.004	*n = 2*
4	0.507 ± 0.065	0.451 ± 0.051	0.359 ± 0.018	*n = 2*
6	0.505 ± 0.024	0.422 ± 0.001	0.213 ± 0.012	*n = 2*
8	0.504 ± 0.035	0.407 ± 0.008	0.181 ± 0.008	*n = 2*

ตารางที่ ก.62 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปที่ใช้เอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสทางการค้า และเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล ชนิดผงแห้ง เมื่อใช้สารประกอบเอมีนมาตรฐาน putrescine เป็นสารตั้งต้น

อายุการเก็บรักษา (สัปดาห์)	OD 590 nm (mean ±SD)			จำนวนซ้ำ
	4 °C	10 °C	25 °C	
0	0.300 ± 0.052	0.511 ± 0.008	0.511 ± 0.008	*n = 2*
2	0.292 ± 0.015	0.484 ± 0.006	0.375 ± 0.014	*n = 2*
4	0.292 ± 0.034	0.409 ± 0.006	0.292 ± 0.006	*n = 2*
6	0.290 ± 0.032	0.379 ± 0.011	0.259 ± 0.004	*n = 2*
8	0.285 ± 0.001	0.320 ± 0.011	0.230 ± 0.004	*n = 2*

ตารางที่ ก.63 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำยาตรวจวิเคราะห์สารประกอบเอมีนสำเร็จรูปที่ใช้เอนไซม์เอมีนออกซิเดสจากถั่วเหลือง และเอนไซม์

โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล ชนิดผงแห้ง เมื่อใช้สารประกอบเอมีน มาตรฐาน putrescine เป็นสารตั้งต้น

อายุการเก็บรักษา (สัปดาห์)	OD 590 nm (mean ±SD)			จำนวนซ้ำ
	4 °C	10 °C	25 °C	
0	0.490 ± 0.033	0.310 ± 0.005	0.310 ± 0.005	*n = 2*
2	0.520 ± 0.038	0.281 ± 0.007	0.224 ± 0.003	*n = 2*
4	0.493 ± 0.036	0.227 ± 0.006	0.163 ± 0.021	*n = 2*
6	0.466 ± 0.032	0.160 ± 0.008	0.119 ± 0.004	*n = 2*
8	0.485 ± 0.025	0.146 ± 0.003	0.108 ± 0.006	*n = 2*

ภาคผนวก ข
วิธีการทดลองและสูตรในการคำนวณ

1. การหาปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ ตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

หลักการ วัดสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของโปรตีนกับคอปเปอร์อิออนในสารละลายที่เป็นด่างและปฏิกิริยารีดักชันของ Phosphomolypdate-Phosphotungstic acid ใน Folin Reagent โดย Aromatic Amino acid

อุปกรณ์ สเปคโตรโฟโตมิเตอร์

สารเคมี

1. Reagent

Reagent A โซเดียมคาร์บอนเนต 10 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

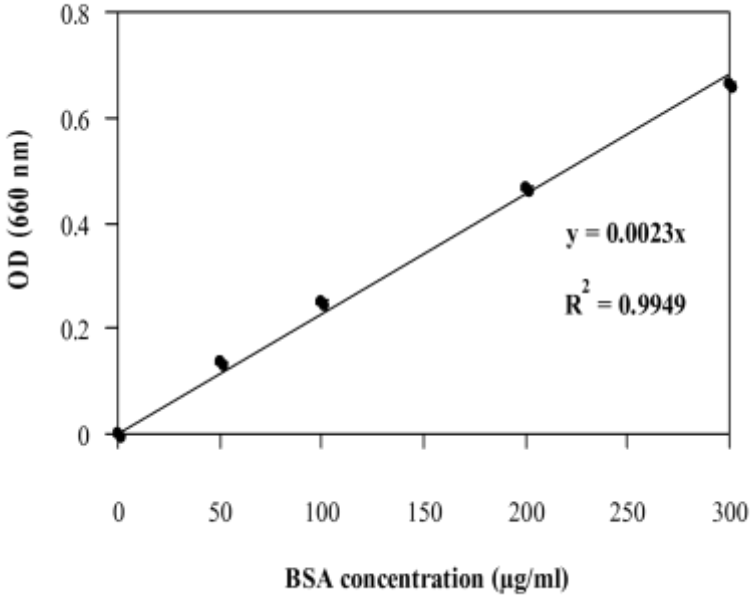
Reagent B คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม ในสารละลายโพแทสเซียมตราเตรท (1 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Reagent C ผสม Reagent A กับ Reagent B ในอัตราส่วน 50: 1 (เมื่อต้องการใช้ภายใน 1 วัน)

2. Folin reagent นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1
3. Bovine serum albumin (BSA)

วิธีการทดลอง

1. นำสารตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร
2. เติม Reagent C ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
3. เติม Folin reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยวัดเปรียบเทียบกับ blank ที่ใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่าง อ่านค่าความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน
5. สร้างกราฟมาตรฐาน โดยทำการทดลองเช่นเดียวกัน โดยใช้สารละลาย BSA ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 300 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของโปรตีนโดยใช้สารละลายซีรัมอัลบูมินความเข้มข้น 0 – 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจวัดโดยวิธี Lowery (1951)

2. สูตรการคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์

สูตรที่ใช้ในการคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (Activity) มีดังต่อไปนี้

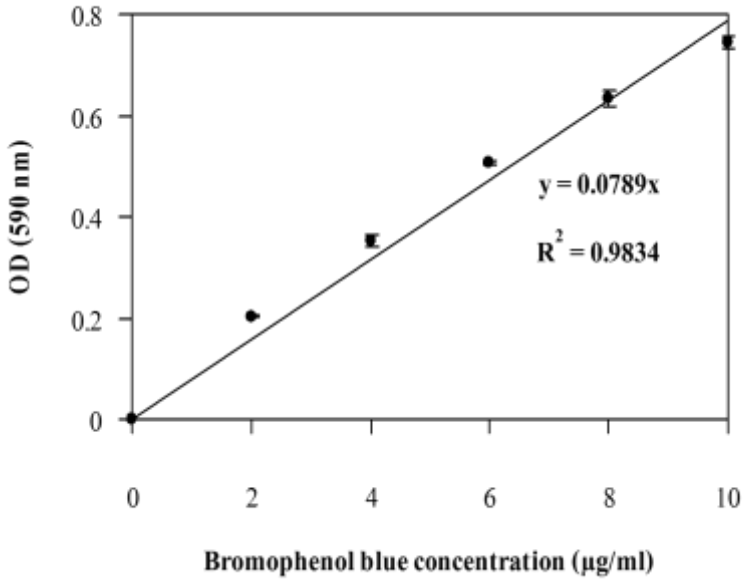
$$U/ml = \frac{(\Delta A_{test} - \Delta A_{blank}) \times \text{Total reaction} \times \text{Dilution factor}}{\text{Slope} \times \text{Enzyme volume} \times \text{time} \times \text{M.W.}}$$

$$U/ml = \frac{(\Delta A_{test} - \Delta A_{blank}) \times \text{Total reaction} \times \text{Dilution factor}}{\text{Molar extinction coefficient} \times \text{Enzyme volume} \times \text{time} \times d}$$

โดยที่ ΔA = change of absorbance

M.W. = molecular weight

d = light path



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของโบรโมฟีนอลบลู โดยใช้สารละลายโบรโมฟีนอลบลูความเข้มข้น 0–10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร