บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสที่ pH ต่าง ๆ

ในงานวิจัยนี้ต้องการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์จากแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำสด แล้วแปลค่าแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสที่วัดได้เป็นค่าประมาณของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด โดยคำนวณจากสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสกับจำนวนแบคทีเรีย โดยอาศัยสมมุติฐานของ Fung (1986) ซึ่งกล่าวว่าแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (Fung, 1986) แต่เนื่องจากเอนไซม์คะตะเลสเป็นเอนไซม์ที่มีในเนื้อเยื่อสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ดังนั้นในการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสที่สร้างจากแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำสดจึงพบว่ามีการรบกวนของเอนไซม์คะตะเลสจากเนื้อเยื่อกุ้งในระบบอยู่เสมอ จึงจำเป็นที่จะต้องหาวิธีการลดการรบกวนของเอนไซม์คะตะเลสที่ไม่ต้องการนั้นโดยอาศัยหลักความแตกต่างของสมบัติของเอนไซม์ที่สร้างจากแหล่งต่างกัน เนื่องจากเอนไซม์คะตะเลสในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ มีองค์ประกอบของโปรตีนแตกต่างกัน ซึ่งมีผลทำให้สมบัติของเอนไซม์แตกต่างกัน (Sumne et al, 1940) เช่น Willits (1965) ศึกษาคุณภาพของน้ำนมที่ได้จากแม่วัวที่เป็นโรคเต้านมอักเสบโดยการประเมินจากการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสที่สร้างจากเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งสามารถแยกแอคติวิตีของคะตะเลจากแหล่งอื่นออกไปโดยปรับ pH ในระบบให้เป็น 7.2 ซึ่งเป็น pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์คะตะเลสจากเม็ดเลือดขาว Fung(1986) ศึกษาการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ปนเปื้อนบนผิวเนื้อไก่โดยการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรียที่ปนเปื้อนและยับยั้ง

แอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสจากแหล่งอื่นคือเอนไซม์คะตะเลสจากเลือดไก่โดยใช้ pH 3.3 Doi (1992) แยกแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสที่มีในน้ำนมวัวออกจากแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำนมด้วย pH 11 เพื่อศึกษาการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำนมดิบโดยการตรวจสอบเอนไซม์คะตะเลส ในงานวิจัยนี้จึงได้ทดลองหาวิธีการลดการรบกวนของเอนไซม์คะตะเลสจากเนื้อเยื่อกุ้ง จากการทดลองเบื้องต้นพบว่าในเนื้อเยื่อกุ้งมีเอนไซม์คะตะเลสปริมาณมาก จึงได้พยายามศึกษาสมบัติของเอนไซม์คะตะเลสจากทั้งสองแหล่งเพื่อใช้ในการแยกศึกษาเฉพาะเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรีย โดยการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรียและเนื้อเยื่อกุ้งที่ pH ต่างๆ โดยใช้ Catalasemeter ที่สร้างขึ้นแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสจะแสดงในรูปของ Floatation time (FT) มีหน่วยเป็นวินาที ซึ่งปริมาณเอนไซม์คะตะเลสจะแปรผกผันกับ FT ในการเตรียมเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรียจำเป็นต้องแยกแบคทีเรียออกจากตัวกุ้งแล้วนำมาทำ Total plate count ผสมทุกโคโลนีเข้าด้วยกัน นำไปทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลส ทั้งนี้เพื่อป้องกันการรบกวนของเอนไซม์คะตะเลสจากเนื้อเยื่อกุ้งที่อาจติดมาได้ อันจะทำให้ค่า FT ต่ำกว่าความเป็นจริง ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 5 พบว่าเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรียมีแอคติวิตีสูงที่สุด (optimum pH activity) ที่ pH 7.5 และยังพบว่าที่ทุกช่วง pH มีแอคติวิตีที่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ดังแสดงในตารางที่ 3) ส่วนเอนไซม์คะตะเลสจากเนื้อเยื่อกุ้งมีแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 8.0 โดยที่แอคติวิตีของเอนไซม์ในช่วง pH 7.0,7.5 และ 8.0 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ดังแสดงในตารางที่ 4)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรีย

จากผลการทดลองในเบื้องต้นสรุปได้ว่าไม่สามารถใช้ช่วง pH ในการยับยั้งหรือลดการรบกวนของเอนไซม์คะตะเลสจากเนื้อเยื่อกุ้งในการตรวจสอบเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรีย จึงทดลองหาวิธีการอื่น ๆ เพื่อลดการรบกวนของเอนไซม์คะตะเลสจากเนื้อเยื่อกุ้งโดยเลือกใช้ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส โดยศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสจากทั้งสองแหล่งที่อุณหภูมิต่างๆ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5 พบว่าอุณหภูมิที่สามารถใช้ในการยับยั้งคะตะเลสจากแบคทีเรียได้โดยสมบูรณ์ คือ 72 °C ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Ang (1994) ที่กล่าวว่าอุณหภูมิที่สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรียโดยสมบูรณ์คืออุณหภูมิที่สูงกว่า 71 °C และจากผลการทดลองวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสในเนื้อเยื่อกุ้ง พบว่าอุณหภูมิที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้โดยสมบูรณ์คือ 68 °C ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้ช่วงอุณหภูมิในการยับยั้งเอนไซม์คะตะเลสจากเนื้อเยื่อกุ้งเพื่อแยกแอคติวิตีออกจากระบบได้เนื่องจากที่ 68 °C นอกจากจะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรียต่ำลงแล้วยังมีผลในการทำลายแบคทีเรียบางส่วนซึ่งจะทำให้การประมาณจำนวนแบคทีเรียผิดพลาดได้ ดังนั้นเมื่อไม่สามารถใช้ช่วง pH และอุณหภูมิในการยับยั้งการรบกวนของเอนไซม์คะตะเลสจากเนื้อเยื่อกุ้งได้ จึงแก้ปัญหาการรบกวนของเอนไซม์จากเนื้อเยื่อกุ้งโดยการแยกแบคทีเรียออกจากตัวกุ้งก่อนการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสโดยวิธีการสุ่มตัวอย่างจากพื้นผิว (Sampling surface) แบบ Rinse method ซึ่ง Jennifer (1978) กล่าวว่า Rinse method เป็นวิธีการสุ่มตัวอย่างจากพื้นผิวที่มีความคลาดเคลื่อนน้อยกว่าวิธีอื่นๆ และเหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนแบบไม่สม่ำเสมอ (non-uniform contamination) จึงทดลองหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำสดโดยวิธี Rinse method เปรียบเทียบกับวิธี Blend method และตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในส่วนต่าง ๆ ของตัวกุ้ง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 7 พบว่ากุ้งกุลาดำที่ยังสดและเนื้อเยื่อไม่ฉีกขาดแบคทีเรีย

ปนเปื้อนอยู่ที่เปลือกกุ้งเป็นส่วนใหญ่ ถึงแม้ว่าพบแบคทีเรียบางส่วนอยู่ในเนื้อเยื่อกุ้งในช่วง 10^3 โคโลนีต่อกรัม ซึ่งตรวจสอบได้โดยการแกะเปลือกและดึงไส้กุ้งออกนำมาปั่นละเอียด (Blend method) แล้วตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด แต่แบคทีเรียที่พบนี้น่าจะเกิดจากการปนเปื้อนในระหว่างการปอกเปลือกกุ้งมากกว่าการปนเปื้อนในเนื้อเยื่อกุ้งก่อนการปอกเปลือก นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบประสิทธิภาพของ Rinse method โดยการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียที่เหลือหลังจากการ rinse โดยการนำกุ้งที่ผ่านการ rinse แล้วมาดึงไส้ออกนำเนื้อกุ้งมาปั่นละเอียดตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด แสดงผลในตารางที่ 8 พบว่าทุกตัวอย่างมีแบคทีเรียที่เหลืออยู่ในช่วง 10^3 โคโลนีต่อกรัม และไม่ขึ้นกับจำนวนแบคทีเรียที่ปนเปื้อนเริ่มต้น เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่าง Rinse method กับ Blend method แสดงผลในตารางที่ 6 พบว่าจำนวนแบคทีเรียที่ตรวจพบในทั้งสองวิธีมีค่าใกล้เคียงกันเสมอแสดงให้เห็นว่าการแยกแบคทีเรียออกจากตัวกุ้งโดยวิธี Rinse method มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับ Blend method และการสุ่มตัวอย่างจากพื้นผิวโดย Rinse method พบว่ามีการรบกวนของเอนไซม์คะตะเลสจากเนื้อเยื่อกุ้งน้อยมากและถือว่าเป็นค่าที่เท่ากันของกุ้งทุกตัว สังเกตได้จากผลการทดลองในตารางที่ 6 พบว่าการแยกแบคทีเรียออกจากตัวอย่างกุ้งโดยวิธี Blend method และ Rinse method ที่มีจำนวนแบคทีเรียใกล้เคียงกันแต่เมื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสโดย Catalasemeter ตัวอย่างที่ใช้วิธี Blend method กลับให้ค่า FT ที่ต่ำกว่ามาก ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการมีปริมาณเอนไซม์มากกว่าปรกติ และเมื่อแบคทีเรียเพิ่มจำนวนมากขึ้นแต่ค่า FT ยังคงเดิมแสดงให้เห็นว่าในระบบนี้มีปริมาณของเอนไซม์คะตะเลสจากเนื้อเยื่อกุ้งมากเกินไปจึงไม่เห็นผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรีย ในขณะที่ Rinse method แสดงผลของ FT ที่เพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนแบคทีเรียลดลง และยังพบอีกว่าเมื่อจำนวนแบคทีเรียใกล้เคียงกันค่า FT อยู่ในระดับเดียวกันแสดงว่ามีปริมาณเอนไซม์คะตะเลสใกล้เคียงกันด้วยแสดงว่าไม่มีการรบกวนของเอนไซม์คะตะเลสจากเนื้อเยื่อหรือมีอยู่ในระดับที่เท่ากันของกุ้งทุกตัว

นอกจากนี้ภาวะการตรวจสอบเอนไซม์คะตะเลสที่จะต้องควบคุมได้แก่ ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เหมาะสมที่จะใช้วัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลส คือ ความเข้มข้นร้อยละ 3 (Gagnon, 1956) การเติม EDTA เข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ ในปริมาณร้อยละ 1 ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ใช้เป็นตัวจับกับโลหะที่รบกวนการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส (Dodds, Helley and Kemoton, 1983) ดังนั้นการเตรียมสับเสตรทที่เหมาะสมสำหรับการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำสดสำหรับใช้ในการทดลองนี้ คือ สารละลายไฮโดรเจน-เปอร์ออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 3 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 และเติมสารละลาย EDTA 10^{-6} โมลาร์ ปริมาณร้อยละ 1 ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งสารละลายนี้จะใช้เป็นสับเสตรทในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสในการทดลองขั้นต่อไป สารละลายนี้ควรเก็บที่อุณหภูมิต่ำเพื่อป้องกันการสลายตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

3. การศึกษาความไวของเครื่องมือต่อเอนไซม์คะตะเลส

ในการทดลองนี้ใช้วิธีในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลส 2 วิธี คือ Gas column method และการวัดด้วย Catalasemeter ได้ทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพ ของทั้งสองวิธีนี้ เพื่อเลือกวิธีที่เหมาะสมโดยการศึกษาความไวของทั้ง 2 วิธีต่อเอนไซม์คะตะเลส และเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรีย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 การทดสอบความไวของเครื่องมือต่อเอนไซม์คะตะเลส

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนที่มีชื่อทางการค้าว่า Microcatalase ® ด้วย Catalasemeter ระบบ Paper disk แสดงผลการทดลองในรูปที่ 6 พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่า Logarithm ของ FT กับค่า Logarithm ของความเข้มข้นของเอมไซม์คะตะเล... เป็นแบบเส้นตรง มีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ -0.95 ($p \leq 0.05$) และการวัดด้วย Catalasemeter ระบบ Filter membrane แสดงผลการทดลองในรูปที่ 7 ให้ความสัมพันธ์เป็นแบบเส้นตรงเช่นเดียวกัน มีค่า r เท่ากับ -0.97 ($p \leq 0.05$) ซึ่งการวัดด้วย Catalasemeter ทั้งสองระบบ ต่างให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Gagnon, Hunting และ Essenlen (1959) ซึ่งพบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง FT กับ ความเข้มข้นของเอนไซม์คะตะเลส เมื่อวัดด้วย Catalasemeter ระบบ Paper disk เป็นแบบเส้นตรง เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Fung (1986) พบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง Logarithm ของ FT และ Logarithm ของความเข้มข้นของเอนไซม์คะตะเลส เมื่อวัดด้วย Catalasemeter ระบบ Paper disk เป็นแบบเส้นตรงมีค่า r เท่ากับ -0.99 ($p \leq 0.01$) ซึ่งเป็นค่า r ที่สูงกว่าผลที่ได้จากการทดลองในงานวิจัยนี้ทั้ง 2 ระบบ สาเหตุอาจเกิดจากชนิดของกระดาษที่ใช้ โดยที่ Fung (1986) ใช้กระดาษชนิดพิเศษที่เตรียมขึ้นพร้อมกับ Catalasemeter ที่ผลิตโดยบริษัท Bio-Engineering Group (New Haven CT) และไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับรายละเอียดและสมบัติของกระดาษชนิดนี้ แต่สำหรับงานวิจัยนี้ในการทดลองระบบ Paper disk ได้ดัดแปลงใช้กระดาษกรอง Whatman No 2 ซึ่งอาจมีคุณสมบัติในการดูดซับเอนไซม์ได้น้อยกว่าและมีน้ำหนักมากกว่าทำให้มีความไวต่อเอนไซม์คะตะเลสด้อยกว่ากระดาษชนิดพิเศษนั้น แต่อย่างไรก็ตามก็ยังให้ค่า r สูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนด คือมากกว่า 0.8 จึงถือได้ว่า Paper disk ที่ใช้ในการทดลองนี้สามารถใช้ในการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสได้ จากการทดลองยังพบอีกว่า Catalasemeter ทั้งสองระบบสามารถใช้

ตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ในช่วงความเข้มข้นของเอนไซม์ 10^{-1} ถึง 10^{2} ยูนิต ต่อ มิลลิลิตร สาเหตุที่ Catalasemeter ไม่สามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 10^{-1} ยูนิตต่อมิลลิลิตร ได้เนื่องจากเมื่อมีปริมาณเอนไซม์คะตะเลสน้อยจะทำให้ก๊าซออกซิเจนที่เกิดขึ้นมีปริมาณไม่มากพอที่จะยกแผ่น disk ให้ลอยขึ้นสู่ด้านบนได้ ในขณะที่ปริมาณมากกว่า 10^{2} ยูนิต ต่อมิลลิลิตร จะทำให้เกิดก๊าซออกซิเจนปริมาณมากในเวลาอันสั้นทำให้แผ่น disk ไม่จมลงในสารละลายกล่าวคือ FT สั้นเกินกว่าที่จะบันทึกเวลาด้วย Catalasemeter ได้เป็นข้อจำกัดของเครื่องมือชนิดนี้ การที่ Catalasemeter ระบบ Filter membrane ให้ค่า r สูงกว่าระบบ Paper disk เนื่องจาก Filter membrane มีน้ำหนักเบากว่าจึงต้องการก๊าซออกซิเจนในการยกแผ่น disk ในปริมาณที่น้อยกว่า อาจกล่าวได้ว่าการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสในระบบ Filter membrane มีความไวต่อการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลส ดีกว่าระบบ Paper disk

ในงานวิจัยนี้ได้ทดลองวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลส โดย Gas column method อีกด้วย ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 8 ซึ่งพบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง Logarithm ของ % Gas column กับ Logarithm ของความเข้มข้นของเอนไซม์คะตะเลส เป็นแบบเส้นตรงมีค่า r เท่ากับ 0.90 และสามารถตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลส ได้ในช่วงความเข้มข้น 10^{-2} ถึง 10^{0} ยูนิต ต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ในกรณีที่มีปริมาณเอนไซม์คะตะเลส เข้มข้นมากกว่า 1 ยูนิต ต่อมิลลิลิตร จะทำให้เกิดก๊าซออกซิเจนขึ้นปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็วและดันของเหลวในปลาย capillary tube ให้แยกออกจากกันเป็นชั้น จึงไม่สามารถวัด Gas column และ total column ได้

เมื่อเปรียบเทียบความไวของ Gas column method กับ Catalasemeter ที่มีต่อเอนไซม์คะตะเลส พบว่า Gas column method สามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่าจึงมีความไวต่อเอนไซม์คะตะเลสมากกว่า Catalasemeter ทั้ง 2 ระบบ แต่ Catalasemeter ทั้ง 2 ระบบสามารถใช้วัด

แอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลส ได้ที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่าและในช่วงที่กว้างกว่า

3.2 การทดสอบความไวของเครื่องมือต่อเอนไซม์คะตะเลสจากเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์

เนื่องจาก Pseudomonas fluorescens เป็นแบคทีเรียชนิด strong Catalase positive (Fung, 1986) จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวแทนของแบคทีเรียในการทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสที่สร้างจากแบคทีเรีย เมื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสบริสุทธิ์ ด้วย Catalasemeter ระบบ Paper disk แสดงผลการทดลองในรูปที่ 9 พบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง Logarithm ของ FT กับ Logarithm ของจำนวน โคโลนี ต่อ มิลลิลิตร เป็นแบบเส้นตรงให้ค่า r เท่ากับ -0.91 ($P \leq 0.05$) และสามารถใช้ตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสของแบคทีเรียที่มีเซลล์ในช่วง 10^4 ถึง 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร หากมีจำนวนเซลล์ต่ำกว่า 10^4 จะไม่สามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสได้เนื่องจากมีปริมาณเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรียไม่มากพอที่จะทำให้เกิดก๊าซออกซิเจนในระดับที่จะยกแผ่น disk ให้ลอยได้ซึ่งเป็นเหตุผลเดียวกับที่อธิบายในหัวข้อ 2.1 แต่เมื่อตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรียบริสุทธิ์ในระบบ Filter membrane กลับไม่พบความสัมพันธ์ใดๆโดยสามารถตรวจสอบแอคติวิตีได้เฉพาะที่จำนวนแบคทีเรียมากกว่าหรือเท่ากับ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และค่า FT สูงกว่าระบบ Paper disk ที่จำนวนเซลเท่ากัน ทั้งนี้เนื่องจากแผ่น Filter membrane มีลักษณะผิวเป็นมันลื่นน่าจะทำให้การเกาะติดของเซลล์แบคทีเรียไม่ดีนัก จึงได้ทำการทดลองเปรียบเทียบการเกาะติดของแบคทีเรียบนแผ่น disk ทั้งสองชนิด โดยนำแผ่น disk ทั้งสองชนิดจุ่มลงใน suspension ของแบคทีเรียที่มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วินาที แล้วนำมาหย่อนลงในหลอดทดลองที่บรรจุน้ำปลอดเชื้อทิ้งไว้ 10 วินาที แล้วคีบแผ่น disk ออกมานำน้ำในหลอดทดลองไปตรวจสอบจำนวนเชื้อทั้งหมด พบว่าน้ำที่จุ่มด้วย Filter membrane มีจำนวนแบคทีเรียหลุดออกมาในช่วง 10^5 ถึง 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

ในขณะที่น้ำที่ได้จากการจุ่ม Paper disk มีแบคทีเรียหลุดออกมาน้อยมากคือน้อยกว่า 10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Filter membrane ไม่เหมาะที่จะใช้ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรียเนื่องจากเมื่อหย่อนแผ่น Filter membrane ลงในสับเสตรทซึ่งเป็นสารละลาย เซลล์ของแบคทีเรียจะหลุดออกเป็นจำนวนมากทำให้การประมาณจำนวนแบคทีเรียคลาดเคลื่อนได้ ส่วนระบบ Paper disk นั้นถึงแม้ว่าจะมีแบคทีเรียบางส่วนหลุดออกมาแต่ก็มีจำนวนไม่มากนักและภาวะการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสนั้นเมื่อหย่อนแผ่น disk ลงในสารละลายไฮโดรเจน-เปอร์ออกไซด์จะมีฟองก๊าซออกซิเจนเกิดขึ้นซึ่งจะช่วยกันเซลล์แบคทีเรียไม่ให้หลุดลอยไปในสารละลายได้อีกทางหนึ่ง และเมื่อเปรียบเทียบค่า r กับการวัดแอคติวิตีของ Microcatalase* พบว่าการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในเชื้อบริสุทธิ์มีค่า r ต่ำกว่ามาก ทั้งนี้เนื่องจากในการทดลองจำเป็นที่จะต้องเจือจาง Suspension ของเชื้อด้วย Nutrient broth เนื่องจากใช้ Nutrient broth ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ เมื่อต้องการศึกษาการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรียที่จำนวนเซลล์ระดับต่างๆ จึงต้องเจือจาง culture ของแบคทีเรีย เมื่อเจือจางด้วยน้ำพบว่าค่า r ระหว่างจำนวนเซลล์กับ FT ต่ำกว่า 0.7 ทั้งนี้การเจือจางด้วยน้ำทำให้สภาวะในการทดลองไม่คงที่นั่นคือระดับความเข้มข้นของ Nutrient broth ในแต่ละ suspension ของเซลล์ลดลงตามระดับการเจือจาง Nutrient broth ที่ติดอยู่บนแผ่น disk อาจมีผลทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้าไปสัมผัสกับเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรียได้น้อยลง ซึ่ง George (1948) กล่าวว่า ความเข้มข้นของไฮโดรเจน-เปอร์ออกไซด์ที่จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์คะตะเลสมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลส ดังนั้นการมี Nutrient broth ไม่เท่ากันในแต่ละตัวอย่างทำให้อัตราการจับกันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับเอนไซม์คะตะเลสไม่สม่ำเสมอทำให้ผลการทดลองที่ได้มีความคลาดเคลื่อนค่า r ที่ได้จึงต่ำ ดังนั้นในการทดลองต้องควบคุมสิ่งแวดล้อมให้คงที่เสมอ

เมื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสจากเชื้อบริสุทธิ์ ด้วย Gas column method (รูปที่ 10) พบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง Logarithm ของ % Gas column

กับ Logarithm ของจำนวนโคโลนีต่อกรัม มีค่า r เท่ากับ 0.97 ($P \leq 0.05$) และสามารถตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสได้ที่จำนวนเซลล์ในช่วงแคบกว่า Catalasemeter คือ 10^{5} ถึง 10^{7} โคโลนี ต่อ มิลลิลิตร จากผลการทดลองการวัดด้วย Gas column method พบว่าให้ค่า r สูงถึง 0.97 ซึ่งสูงกว่าการทดลองของ Fung (1985)ซึ่งตรวจสอบแบคทีเรียบนผิวปีกไก่แช่เย็นด้วยวิธี Gas Column method และพบความสัมพันธ์ระหว่าง Logarithm ของ %Gas column กับ Logarithm ของจำนวนโคโลนีต่อตารางเซนติเมตร เป็นเส้นตรงแต่ให้ค่า rเพียง 0.89 ทั้งนี้สาเหตุหนึ่งอาจเกิดจากในการทดลอง Fung ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาเพียง 5 นาที แต่จากการทดลองในงานวิจัยนี้พบว่าที่ 5 นาที ยังคงมีอัตราการเกิดก๊าซออกซิเจนมากพอสมควร ซึ่ง Chance (1950) ได้กล่าวว่ากลไกที่ทำให้เกิดก๊าซออกซิเจน ในปฏิกิริยาคือการที่เอนไซม์คะตะเลสเปลี่ยนรูปไปเป็น Compound I เมื่อรวมกับไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์และเมื่อเกิด compound I ถึงระดับหนึ่งจะเริ่มเกิด compound II อย่างช้าๆ ซึ่ง compound II เป็นโครงร่างที่ไม่ active ของเอนไซม์คะตะเลส โดยการเกิดโครงร่างทั้งสองแบบจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาพอสมควร ดังนั้นเวลาเพียง 5 นาที อาจไม่พอเพียงสำหรับตัวอย่างที่มีปริมาณเอนไซม์คะตะเลสมากระดับหนึ่งโดยอัตราการเปลี่ยนโครงร่างจาก compoud Iไปเป็น compound II ยังไม่ถึงจุดสมดุล ซึ่งทำให้อัตราการเกิดก๊าซออกซิเจนไม่คงที่ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เวลา 15 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์และเกิดก๊าซออกซิเจนอย่างคงที่

จากผลการทดลองในข้อ 3.1 และ 3.2 จึงเลือกเครื่องมือ Catalasemeter ระบบ Paper disk สำหรับใช้ในการประมาณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำสดในการทดลองขั้นต่อไปด้วยเหตุผลคือให้ค่า r ที่ดี ให้ผลเชื่อถือได้ สามารถตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสได้ที่จำนวนแบคทีเรียในช่วงกว้างกว่าวิธีอื่น ๆ และมีราคาถูกเนื่องจาก Paper disk ที่ใช้ดัดแปลงโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No 2 เมื่อรวมราคากับสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง พบว่าราคาต่อ 1 ตัวอย่างเพียง 25 สตางค์

4. การศึกษาการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบ

ในสภาพความเป็นจริงโรงงานที่ผลิตกุ้งกุลาดำแช่เยือกแข็ง จำเป็นที่จะต้องซื้อกุ้งกุลาดำวัตถุดิบจากหลายแหล่ง ดังนั้นในการศึกษาการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบ จึงต้องทำการทดลองโดยศึกษาในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบจากแหล่งเลี้ยงที่แตกต่างกันเพื่อทดสอบว่าระบบและวิธีการที่เลือกใช้ในการประมาณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในกุ้งกุลาดำสามารถใช้กับวัตถุดิบที่มาจากแหล่งต่างกันได้ ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียที่เป็น Predominant bacteria ในกุ้งสดมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์ของกุ้ง ฤดูกาล และสิ่งแวดล้อมในการเลี้ยง (Cobb et al, 1976) และแบคทีเรียต่างชนิดกันมีสมบัติในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสแตกต่างกัน (Charboneau, 1975) ซึ่งจะมีผลต่อการประมาณจำนวนแบคทีเรียโดยการตรวจสอบเอนไซม์คะตะเลส การทดลองนี้จึงศึกษาในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบจากแหล่งเลี้ยงต่างกัน 3 แหล่ง ซึ่งมีความแตกต่างกันของแหล่งน้ำและสภาพภูมิอากาศ โดยกุ้งกุลาดำจากภาคตะวันออกคือ จังหวัดระยอง กุ้งกุลาดำจากภาคใต้ คือ จังหวัดนครศรีธรรมราช และจังหวัดสุราษฎร์ธานี

เมื่อทำการทดลองประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบจากทั้ง 3 แหล่ง ด้วย Catalasemeter ระบบ Paper disk พบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง Logarithm ของโคโลนี ต่อ กรัม กับ Logarithm ของ FT ทั้ง 3 แหล่ง เป็นเส้นตรง โดยทั้ง 3 เส้นมีค่าความชันเท่ากัน คือ -0.34 แต่ละแหล่งมีค่า r ดังนี้ คือ จังหวัดระยอง มีค่า r เท่ากับ -0.98 ($P \leq 0.05$) แสดงในรูปที่ 11 จังหวัดนครศรีธรรมราช มีค่า r เท่ากับ -0.97 ($P \leq 0.05$) แสดงในรูปที่ 12 และจังหวัดสุราษฎร์ธานี ค่า r เท่ากับ -0.97 ($P \leq 0.05$) แสดงในรูปที่ 13 และทั้ง 3 แหล่งสามารถใช้ Catalasemeter ระบบ Paper disk ตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ที่จำนวนเซลล์อยู่ในช่วง 10^4 ถึง 10^7 โคโลนี ต่อ กรัม และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการประมาณจำนวนแบคทีเรียในทั้ง 3 แหล่ง โดยการ

วิเคราะห์ความแปรปรวนร่วม (Analysis of Covariance) ในแผนการทดลองแบบ CRD โดยให้แหล่งของกุ้งวัตถุดิบเป็น Treatment ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติแสดงในภาคผนวก ช

จากการวิเคราะห์ทางสถิติสรุปได้ว่าผลการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบจากทั้ง 3 แหล่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 แต่เนื่องจากกุ้งกุลาดำวัตถุดิบจากทั้งสามจังหวัดมีสภาวะแวดล้อมในการเลี้ยงแตกต่างกันน่าจะมีชนิดและปริมาณของ predominant bacteria แตกต่างกัน (Cobb et.al, 1976) และแบคทีเรียแต่ละชนิดมีระดับการสร้างเอนไซม์คะตะเลสแตกต่างกัน (Fung, 1986) จึงจำเป็นที่จะต้องหาเหตุผลเพื่ออธิบายถึงสาเหตุที่การประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสด้วย Catalasemeter ในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบทั้งสามแหล่งโดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ การทดลองในขั้นต่อไปจึงศึกษาชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกุ้งทั้ง 3 แหล่ง ตลอดจนศึกษาถึงความไวของแบคทีเรียเหล่านั้นต่อ Catalasemeter ในการทดลองข้อ 5 และ 6 ตามลำดับ

5. การศึกษาชนิดและปริมาณของ predominant bacteria ที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบ

ในการศึกษาชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบนั้นในขั้นแรกได้จัดกลุ่มของเชื้อโดยการย้อมแกรมพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบจากจังหวัดระยอง คือ cocci แกรมบวกจำนวนถึงร้อยละ 48 แสดงผลในรูปที่ 14 จึงนำแบคทีเรียกลุ่มนี้มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีต่อไป พบว่า cocci แกรมบวกที่พบนั้นจัดอยู่ใน Family Micrococcaceae ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 Genus คือ Planococcus, Staphylococcus และ Micrococcus ความแตกต่างของ Genus Planococcus จาก 2 Genus ที่เหลือ คือไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส

และความแตกต่างของ Staphylococcus กับ Micrococcus คือ คุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดสและการทนต่อ Bacitracin (Sydney, Allen and Scott,1986) จึงนำแบคทีเรีย กลุ่ม cocci แกรมบวก มาทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส แล้วนำแบคทีเรียที่ให้ผลบวกมาทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดสและการทนต่อ Bacitracin พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ให้ผล Oxidase test เป็นบวกและทนต่อ Bacitracin เป็นลบ ซึ่งเป็นคุณสมบัติของแบคทีเรียในกลุ่ม Micrococcus จึงสรุปได้ว่า predominant bacteria ของกุ้งกุลาดำวัตถุดิบ จากจังหวัดระยอง คือ Micrococcus (ตารางที่ 9) ผลการย้อมแกรมของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบจากจังหวัดนครศรีธรรมราช กับสุราษฎร์ธานี มีความคล้ายคลึงกันคือเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะการติดสีแกรมคล้ายกับ cocci แกรมลบ ถึงร้อยละ 41 และ 56 ตามลำดับ (รูปที่ 14) ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปทดสอบสมบัติทางชีวเคมีต่อไป ซึ่งแบคทีเรียจำพวก cocci แกรมลบจัดอยู่ใน family Neisseriaceae ประกอบด้วย 2 genus คือ Branhamella และ Neisseria นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียอีกหลาย Genus ที่ติดสีแกรมลักษณะใกล้เคียงกับแบคทีเรียใน family Neisseriaceae มาก ทำให้เกิดการเข้าใจผิดได้เสมอ ได้แก่ แบคทีเรียใน Genus Morexella, Aceinetobacter และ Halobacterium ดังนั้นต้องคำนึงถึงแบคทีเรียในกลุ่มนี้ด้วยเสมอ (Bunchanan and Gibbon, 1974) จึงนำแบคทีเรียกลุ่มนี้ทั้งหมดมาทดสอบสมบัติอื่นๆ อีก โดยในขั้นแรกทดสอบแบคทีเรีย Genus Halobacterium ซึ่งมีสมบัติต่างจาก Genus อื่นๆ คือ สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือเข้มข้นร้อยละ 12 ถึง 15 และผลการทดสอบพบว่า แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ให้ผลบวกเพียงร้อยละ 1 ของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบทั้งหมด ส่วนในจังหวัดนครศรีธรรมราชเป็นผลลบทั้งหมด จึงทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียใน Genus Branhanella, Neisseria, Moraxella และ Acinetobacter ซึ่ง Bunchanan และ Gibbons (1974) ได้กล่าวถึงความแตกต่างทางชีวเคมีของแบคทีเรียใน Genus เหล่านี้ว่า แบคทีเรียใน Genus Acinetobacter จะให้ผล Oxidase test เป็นลบ

ในขณะที่แบคทีเรียใน Genus Branhanella Neisseria และ Moraxella ให้ผล Oxidase test เป็นบวกจากความแตกต่างดังกล่าว จึงนำแบคทีเรียที่เหลือทั้งหมดมาตรวจสอบ Oxidase test จากผลการตรวจสอบพบว่าแบคทีเรียเกือบทั้งหมดให้ผล Oxidase test เป็นลบ จึงสรุปได้ว่า predominant bacteria ในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบจากจังหวัดนครศรีธรรมราชและจังหวัดสุราษฎร์ธานี คือ แบคทีเรีย Genus Acinetobacter แสดงผลการทดลองในตารางที่ 9 ผลการทดสอบ predominant bacteria ที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบนี้สอดคล้องกับรายงานของ นภา โล่ห์ทอง (2535)

6. การศึกษาผลของชนิดและปริมาณแบคทีเรียต่อความสามารถในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสโดยเครื่องมือ

6.1 ศึกษาระดับการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของแบคทีเรีย

จากผลการทดลองการวัดระดับการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบจากทั้ง 3 แหล่ง โดยวิธี Capillary tube catalase test (Fung and Petrishko, 1973) แสดงผลการทดลองในตารางที่ 10 ซึ่งพบว่าแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบส่วนใหญ่เป็นพวกที่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ในระดับ +++ หรือเป็น strong catalase positive ซึ่งสอดคล้องกับ Fung (1986) ที่กล่าวว่าแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารสดที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำได้แก่พวกที่มีสมบัติในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้เป็นส่วนใหญ่ และแบคทีเรียต่างชนิดกัน มีระดับการสร้างเอนไซม์คะตะเลสแตกต่างกัน จากการทดลองโดยวิธี Capillary tube catalase test พบว่า predominant bacteria ที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบ คือ Micrococcus และ Aceinetobacter ต่างก็เป็น strong catalase positive เช่นเดียวกัน

6.2 ศึกษาผลของสัดส่วนของแบคทีเรียที่มีระดับการสร้างเอนไซม์คะตะเลสแตกต่างกันต่อการวัดแอคติวิตีของเครื่องมือ

เนื่องจากกุ้งกกุลาดำวัตถุดิบจากแหล่งต่างๆ มีแบคทีเรียปนเปื้อนอยู่หลายชนิด แต่ละชนิดมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสระดับต่างกัน และแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสแตกต่างกันจะมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นที่วัดด้วย Catalasemeter (Apparent Limits Sensitivity) ได้แตกต่างกัน โดยพบว่าแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสมากจะสามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสได้ที่จำนวนเซลล์น้อยกว่าแบคทีเรียทีสร้างเอนไซม์คะตะเลสน้อย (Fung, 1986) ดังนั้นจึงศึกษาผลของแบคทีเรียที่มีระดับการสร้างเอนไซม์คะตะเลสต่างกันและในสัดส่วนต่าง ๆ ต่อความไวของ Catalasemeter เพื่อยืนยันผลการทดลองการประมาณแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำในข้อ 4 จากการทดลองโดยผสมแบคทีเรียชนิดที่มีการสร้างเอนไซม์คะตะเลสในระดับแตกต่างกันและควบคุมจำนวนแบคทีเรียต่อปริมาตรให้เท่ากัน ในอัตราส่วนที่ 2 ต่อ 1 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากผลการทดลองตรวจสอบชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่มีระดับการสร้างเอนไซม์คะตะเลสต่างกัน (ตารางที่ 10) พบว่าแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสระดับ +++, ++ และ + มีสัดส่วนต่างกันน้อยที่สุดโดยประมาณ คือ 2 ต่อ 1 จากการทดลองผสมแบคทีเรียชนิดที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสแตกต่างกัน 2 ระดับมีผลการทดลองดังนี้

การผสมแบคทีเรียที่มีระดับการสร้างเอนไซม์ +++ และ + ที่อัตราส่วนต่างๆ คือ +++ : + ได้แก่ 0 : 1, 1 : 2, 1 : 1, 2 : 1 และ 1 : 0 พบว่าที่ 1: 0 และ 2 : 1 มีความไวต่อ Catalasemeter ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงผลการทดลองในตารางที่ 11 จึงกล่าวได้ว่าถ้ามีจำนวนแบคทีเรียที่สร้างคะตะเลสในระดับ +++ มากกว่า ระดับ + อยู่ 1 เท่าจะแสดงแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสเท่ากับการมี +++ อยู่เพียงชนิดเดียว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การผสมแบคทีเรียระดับการสร้างเอนไซม์ +++ และ ++ คือ +++ : ++ ได้แก่ 0 : 1,1 : 2, 1 : 1, 2 : 1 และ 1 : 0 พบว่าที่ 1 : 0 และ 2 : 1 มีความไวต่อ Catalasemeter ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงผลการทดลองในตารางที่ 12 ซึ่งสรุปผลได้เช่นเดียวกับผลการทดลองของ +++ : +

การผสมที่แบคทีเรียที่มีระดับการสร้างเอนไซม์ ++ และ + คือ ++ : + ได้แก่ 0 : 1,1 : 2, 1 : 1, 2 : 1 และ 1 : 0 พบว่าที่ 1 : 0 และ 2 : 1 มีความไวต่อ Catalasemeter แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงผลการทดลองในตารางที่ 13 ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ระดับ ++ เมื่อผสมกับ + จะมีปริมาณเอนไซม์ไม่มากพอที่จะแสดงแอคติวิตีได้เท่ากับการมี ++ เพียงชนิดเดียว

เมื่อผสมแบคทีเรียที่มีระดับการสร้างเอนไซม์ทั้ง 3 ระดับเข้าด้วยกัน พบว่า +++ : ++ : + คือ 0 : 0 : 1, 0 : 1 : 0, 1 : 1 : 2, 1 : 2 : 2, 2 : 1 : 2, 1 : 1 : 1, 1 : 2 : 1, 2 : 2 : 1, 2 : 1 : 1 และ 1 : 0 : 0 พบว่าที่ 1 : 0 : 0 , 2: 1 : 1 และ 2 : 2 : 1 มีความไวต่อ Catalasemeter ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงผลการทดลองในตารางที่ 14 จึงกล่าวได้ว่าการมีแบคทีเรียชนิด +++ มากกว่าระดับอื่น ๆอยู่ 1เท่าหรือการมีแบคทีเรีย ++ ในปริมาณเท่ากันในระบบจะยังคงมีปริมาณเอนไซม์มากพอที่จะแสดงแอคติวิตีได้เท่ากับการมี +++ เพียงชนิดเดียว เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาระดับการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำจากจังหวัดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่าแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในจังหวัดนครศรีธรรมราช จังหวัดระยอง และจังหวัดสุราษฎร์ธานี นั้นมีสัดส่วนของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสระดับ +++ : ++ : + เท่ากับ 3.5 : 1.75 : 1 , 40 : 7 : 1 และ 7.25 : 3.5 : 1 ตามลำดับซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำจากทุกจังหวัดต่างก็มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสระดับ +++ มากกว่า 2 เท่าเสมอเมื่อเทียบกับชนิดอื่น ๆ จึงทำให้ความไวของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำจากทุกจังหวัดต่อ Catalasemeter ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ดังนั้นจึงสามารถใช้ Catalasemeter ในการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบจากทุกแหล่งได้ดี และคาดว่าจะสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบในระหว่างการผลิตและในผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกุ้งกุลาดำสดแช่เยือกแข็งได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย