บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

กุ้งสดแช่เยือกแข็งเป็นผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเกษตรที่สามารถส่งออก และนำเงินตราเข้าประเทศปีละนับหมื่นล้านบาท อัตราการขยายตัวของสินค้าประเภทนี้อยู่ในเกณฑ์สูง (ฝ่ายวิชาการธนาคารกสิกรไทย, 2532) ตลาดส่งออกกุ้งแช่เยือกแข็งที่สำคัญได้แก่ ญี่ปุ่น และสหรัฐอเมริกา ซึ่งนำเข้ากุ้งสดแช่แข็งจากประเทศไทยเป็นปริมาณมากกว่าครึ่งหนึ่งของปริมาณส่งออกรวม ส่วนตลาดอื่นๆ ได้แก่ ประเทศกลุ่มตลาดร่วมยุโรป เช่น อิตาลี สหราชอาณาจักร เยอรมันตะวันตก ฝรั่งเศส เบลเยี่ยม เป็นต้น ประเทศเหล่านี้เป็นผู้นำเข้าสำคัญในกลุ่มตลาดร่วมยุโรปที่มีการนำเข้ากุ้งสดแช่เยือกแข็งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วทั้งในด้านปริมาณและมูลค่า นอกจากนี้ยังมีการส่งออกไปยังประเทศอื่นๆในเอเชียและออสเตรเลียอีกเล็กน้อย (เรืองไร โตกฤษณะ, 2532) แม้ว่าปริมาณการส่งออกของอุตสาหกรรมกุ้งกุลาดำยังคงเพิ่มขึ้นแต่เป็นที่น่าสังเกตว่าส่วนแบ่งตลาดกุ้งแช่แข็งจากประเทศไทยในตลาดหลัก คือ ญี่ปุ่น และสหรัฐอเมริกาไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก เพื่อเข้าใจถึงวิกฤตการณ์ของอุตสาหกรรมกุ้งกุลาดำ จึงควรพิจารณาสภาวะทางการตลาดของประเทศคู่ค้าที่สำคัญคือประเทศญี่ปุ่น เนื่องจากสภาวะเศรษฐกิจที่ดีขึ้นผู้บริโภคมีอำนาจซื้อมากขึ้น ความต้องการนำเข้ากุ้งในตลาดญี่ปุ่นจึงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แต่เนื่องจากญี่ปุ่นสามารถติดต่อเลือกนำเข้าได้จากหลายแห่ง โอกาสขยายตลาดของกุ้งไทยจึงไม่แน่ใจว่าจะแจ่มใสนัก การขยายตัวจึงขึ้นอยู่กับราคา รูปแบบของสินค้า และคุณภาพ (เกียรติชัย เจษฎาพันธ์ และคณะ, 2532 ; ธงชัย ลือไทยสงค์, 2531)

เรืองไร โตกฤษณะ (2532) ยังได้กล่าวถึงตลาดสหรัฐอเมริกาว่าตลาดกุ้งสดแช่แข็งในสหรัฐอเมริกา ค่อนข้างคงตัวถึงแม้จะมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยแต่ก็ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก และมีแนวโน้มการนำเข้าจากจากประเทศในกลุ่มละตินอเมริกาโดยเฉพาะจากเอควาดอร์มากกว่าจะนำเข้ากุ้งสดแช่แข็งจากไทย ในปี พ.ศ 2529 —

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2530 ประเทศสหรัฐอเมริกาเคยส่งกลับกุ้งสดแช่เยือกแข็งจากประเทศไทยเนื่องจากสาเหตุการเน่าเสีย จึงอาจเป็นสาเหตุให้ประเทศสหรัฐอเมริกาใช้เป็นข้ออ้างในการกีดกันสินค้านี้จากประเทศไทย ในปี พ.ศ 2537 อิตาลีได้ระงับการนำเข้าอาหารทะเลแช่เยือกแข็งจากประเทศไทยชั่วคราว ทั้งนี้เพราะกลุ่มประเทศอิตาลี ฝรั่งเศส กรีซ เป็นประเทศที่มีความเข้มงวดในการตรวจสอบคุณภาพอาหารทะเลก่อนอนุญาตให้นำเข้า ซึ่งเป็นเรื่องที่ผู้ผลิตหรือผู้ส่งออกของไทยต้องให้ความระมัดระวัง เนื่องจากแต่ละครั้งที่ประสบปัญหาผู้ส่งออกจะได้รับความเสียหายอย่างมหาศาล เพื่อไม่ให้เกิดผลกระทบต่อการส่งออกของสินค้าชนิดนี้จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีมาตรการการควบคุมคุณภาพอย่างมีประสิทธิภาพซึ่งจะสร้างความไว้วางใจให้กับประเทศผู้นำเข้า อันจะเป็นหนทางหนึ่งที่จะช่วยให้ประเทศไทยสามารถส่งออกกุ้งแช่เยือกแข็งได้มากกว่าที่เป็นอยู่ (สมาคม-ส่งออกอาหารแช่เยือกแข็ง, 2537)

ดังนั้นการควบคุมคุณภาพของกุ้งแช่เยือกแข็งจะต้องเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะหน่วยงานด้านการตรวจสอบคุณภาพ ต้องมีความแม่นยำ รวดเร็ว และถูกต้อง ซึ่งในปัจจุบันนี้ได้มีการพัฒนาวิธีการใหม่ๆ ที่ได้รับการปรับปรุงให้ดีว่าวิธีเดิม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กระบวนการผลิตและการควบคุมคุณภาพกุ้งกุลาดำสดแช่เยือกแข็ง

กระบวนการผลิตและควบคุมคุณภาพของกุ้งสดแช่เยือกแข็งในระดับอุตสาหกรรมมีขั้นตอนดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเปลี่ยนแปลงสมบัติด้านจุลินทรีย์และด้านชีวเคมีของกุ้งสด

สมบัติด้านเคมีและชีวเคมีในกุ้งสดที่อุณหภูมิ 0 ถึง 15 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 3 วันนั้น มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากและคุณภาพของกุ้งสดในสภาวะนี้มีคุณสมบัติด้านเคมีและชีวเคมีอยู่ในขั้นที่ยอมรับได้ (Shamshad et.al, 1990) ได้มีการศึกษาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดของกุ้งเพาะเลี้ยงและกุ้งทะเลแช่เยือกแข็งในช่วง 1 ปี เพื่อประเมินเปรียบเทียบคุณภาพ และความเกี่ยวพันระหว่างฤดูกาลกับจำนวนแบคทีเรียที่ตรวจพบ ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณแบคทีเรียในกุ้งทั้ง 2 ชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่า อิทธิพลของฤดูกาลมีผลต่อคุณภาพของกุ้งทั้ง 2 ชนิด โดยฤดูร้อนปริมาณแบคทีเรียจะสูงขึ้น (เพ็ญศรี,อุรารัตน์ และ อัชฌา, 2534) จุลินทรีย์ที่เป็น predominant bacteria ในกุ้งสด มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์ของกุ้ง ฤดูกาล สิ่งแวดล้อมในการเลี้ยง การขนส่ง การเก็บรักษา เวลา อุณหภูมิในระหว่างการเก็บในน้ำแข็ง (Cobb et.al, 1976) ในอาหารทะเลซึ่งจับใหม่ๆ จุลินทรีย์ที่เป็น predominant bacteria ที่ตรวจพบในแต่ละเขต เช่น เขตหนาวแบคทีเรียส่วนใหญ่คือ Pseudomonas และ Alteromonas ส่วนในเขตร้อนคือ Micrococcus แสดงในตารางที่ 1

ระดับชั้นคุณภาพของกุ้งกุลาดำสดแช่เยือกแข็ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กุ้งกุลาดำส่วนใหญ่จะเพาะเลี้ยงเพื่อการส่งออก บังอร สายสิทธิ์ (2534) รายงานว่า คุณภาพของกุ้งกุลาดำที่ต่างประเทศต้องการ มีลักษณะ 3 ประการ คือ

1. คุณภาพทั่วไป ได้แก่ ความสด และความสะอาด ซึ่งทั้งญี่ปุ่นและสหรัฐอเมริกาจะเข้มงวดมาก มีการตรวจสอบสิ่งปลอมปนต่างๆ

2. คุณภาพด้านสารตกค้าง เป็นปัญหาที่ทั้งญี่ปุ่นและสหรัฐอเมริกา ให้ความสนใจอย่างมาก ได้แก่ สารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ และวัตถุเจือปนในอาหาร

3. คุณภาพในด้านแบคทีเรีย มีการตรวจสอบเชื้อต่างๆเช่น จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดต่อกรัม โคลิฟอร์มแบคทีเรีย และจุลินทรีย์ก่อโรคต่างๆ โดยสหรัฐอเมริกาจะเข้มงวดต่อเชื้อซัลโมเนลลา(Salmonella sp.) ส่วนญี่ปุ่นจะเน้นที่เชื้อวิบริโอ (Vibrio sp.)

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ตรวจพบเป็นส่วนใหญ่ในอาหารทะเลซึ่งจับใหม่ ๆ

แหล่งที่จับ	Genus	ร้อยละที่พบ
เขตหนาว (ทะเลเหนือ)	Pseudomonas และ Alteromonas	30-60
	Moraxella และ Acinetobacter	18-16
	Flavobacterium และ Cytophaga	3-17
	Vibrio	2-12
	Coryneform	0.9-10
	Micrococcus	0.9-35
แถบร้อน	Micrococcus	49
	Pseudomonas	18
	Coreneform	12
	Acinetobacter	9

ที่มา : นภา โล่ห์ทอง (2535)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุลินทรีย์กับคุณภาพของอาหาร

จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารมีผลต่อผู้บริโภค และคุณภาพของอาหาร โดยจุลินทรีย์สามารถปนเปื้อนและเพิ่มจำนวนในอาหารได้ในวัตถุดิบ กระบวนการผลิต ผลิตภัณฑ์สำเร็จ หรือระหว่างการรอบริโภค ซึ่งจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนบางชนิดมีผลต่อคุณภาพอาหารคือ ทำให้ความสดลดลง อายุการเก็บสั้นลง คุณภาพด้านโภชนาการเปลี่ยนไปและเน่าเสีย จุลินทรีย์บางชนิดมีผลทำให้เกิดโรคหรือสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค และจุลินทรีย์บางประเภทเป็นดรรชนีบ่งบอกการปนเปื้อนของเชื้อโรคในอาหารในระหว่างกระบวนการผลิตได้ (นภา โล่ห์ทอง, 2535)

จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดต่อกรัมในผลิตภัณฑ์อาหารก็เป็นมาตรฐานอีกข้อหนึ่งที่แต่ละประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น สหราชอาณาจักร ได้กำหนดเอาไว้ในอาหารทะเลแช่เยือกแข็งโดยมีได้ไม่เกิน10^5 ถึง 10^6 โคโลนีต่อกรัม ในขณะที่บางประเทศ เช่น ประเทศไทย อินเดีย กำหนดให้ไม่เกิน 10^7 โคโลนีต่อกรัม ซึ่งจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในกุ้งสดแช่เยือกแข็งจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นในวัตถุดิบเป็นสำคัญ ดังนั้นการควบคุมคุณภาพของกุ้งวัตถุดิบจึงเป็นขั้นตอนที่จำเป็น โดยจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเป็นดรรชนีในการบ่งบอกถึงความสะอาด ความสด และสามารถใช้ในการแบ่งชั้นคุณภาพของวัตถุดิบ จากความสำคัญดังกล่าวจึงจำเป็นที่จะต้องทราบผลการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในเวลาอันรวดเร็วซึ่งจะทำให้การควบคุมคุณภาพในขั้นตอนนี้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการที่รวดเร็วที่ใช้ในการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

วิธีการที่รวดเร็วที่เป็นการประยุกต์ด้านจุลชีววิทยา โดยพัฒนาในงานด้านจุลชีววิทยาทางอาหารมี 4 ประเภท ได้แก่

1. การตรวจสอบเอนไซม์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น เช่น รีดักเตส (Reductase) คะตะเลส (Catalase) โคอะกูเลส (Coagulase) เทอร์โมเอ็นโดนิวคลีเอส (Thermoendonuclease) เป็นต้น

2. การวัดองค์ประกอบและกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียในอาหาร เช่น การวัดปริมาณ ATP ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (ATP estimation) การวัดองค์ประกอบของผนังเซลของแบคทีเรียแกรมลบ (Limulus ameabosyte lysate test) เป็นต้น

3. การวัดแอคติวิตีของแบคทีเรียในอาหาร เช่น การวัดการเปลี่ยนแปลงพลังงานความร้อนที่เกิดจากกระบวนการหายใจของแบคทีเรีย (Microcalorymetry) การวัดการเปลี่ยนแปลงสภาพการนำไฟฟ้าที่เกิดจากการสลายสารอาหารของแบคทีเรีย (Electrical impedance) เป็นต้น

4. การนับจำนวนประชากรของแบคทีเรียที่มีชีวิตโดยตรง เช่น การใช้เครื่องมือที่สร้างขึ้นสำหรับนับจำนวนเซลโดยเฉพาะ (Image analyzer)

วิธีการเหล่านี้มีทั้งข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป (Goldchmidt and Fung, 1978) วิธีการดั้งเดิมและเป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดคือ การนับจำนวนแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือที่เรียกว่า Total viable cell count ซึ่งวิธีนี้ใช้เวลาประมาณ 2 วัน ในการบ่มเชื้อให้เจริญเป็นโคโลนีที่สามารถมองเห็นได้ ในจำนวนวิธีการที่รวดเร็วที่กล่าวมาแล้วมีวิธีการหนึ่งที่เป็นวิธีการที่สามารถประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดได้สะดวก รวดเร็วและที่สำคัญคือสารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้หาได้โดยง่าย วิธีนี้ก็คือ การวัดปริมาณเอนไซม์คะตะเลสที่แบคทีเรียสร้างขึ้น

เอนไซม์คะตะเลสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญที่ใช้ในการประมาณจำนวนแบคทีเรียในอาหารเพราะเอนไซม์คะตะเลสนั้นมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่มีแอคติวิสูง (highly reactive enzyme) และอาหารที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำมีแบคทีเรียชนิดที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสปนเปื้อนอยู่เป็นส่วนใหญ่ (Fung, 1986)

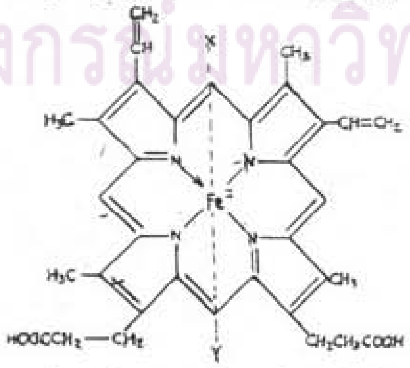
เอนไซม์คะตะเลส

เอนไซม์คะตะเลส (H_2O_2 : H_2O_2 Oxidoreductase ; E.C 1. 11. 1.6) เป็นเอนไซม์ที่ถูกพบและสกัดได้มานานกว่าศตวรรษและเป็นเอนไซม์ที่ได้รับความสนใจตลอดจนถึงปัจจุบัน ความสำคัญเบื้องต้นของเอนไซม์คะตะเลสคือสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ดังสมการ

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2 \text{ (gas)}$$

เอนไซม์คะตะเลสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ มวลโมเลกุลประมาณ 240,000 โดยที่เอนไซม์คะตะเลสแต่ละโมเลกุลประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย (subunits) และแต่ละหน่วยย่อยมี protohemin 1 หมู่ นอกจากนี้ยังมี prosthetic group เป็น Ferriprotoporphyrin III ดังรูปที่ 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 โครงสร้างของ Ferriprotoporphyrin III (protohemin)

เอนไซม์คะตะเลสจะเร่งปฏิกิริยา 2 แบบ คือ

1. Catalatic reaction

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

2. Peroxidatic reaction

$$H_2O_2 + 2AH_2 \longrightarrow 2H_2O + \text{polymerized products}$$

ถ้าเป็นสภาวะปกติจะอยู่ในลักษณะ catalatic reaction ในกรณีที่มีปริมาณเปอร์ออกไซด์ต่ำมากจะแสดงปฏิกิริยาแบบ peroxidatic reaction และมี H_2 donor (AH_2) เป็น เมธานอล เอธานอล และฟีนอล (Robinson, 1991)

การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์คะตะเลสต่อการจับกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เมื่อเติมเอนไซม์คะตะเลสลงในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะมีฟองก๊าซออกซิเจนเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในเวลา 2 นาที หลังจากนั้นอัตราเร็วในการเกิดก๊าซออกซิเจนจะเป็นไปอย่างช้าๆเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จึงคาดว่าเอนไซม์คะตะเลสอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงร่าง (conformation) (George, 1947) ต่อมา Chance (1950) เสนอว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์คะตะเลสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีกลไกดังสมการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$$Cat(OH)_4 + H_2O_2 \rightleftharpoons Cat(OH)_3OOH \text{ (Compound I)} + H_2O$$

$$Cat(OH)_3OOH + H_2O_2 \longrightarrow Cat(OH)_4 + H_2O + O_2$$

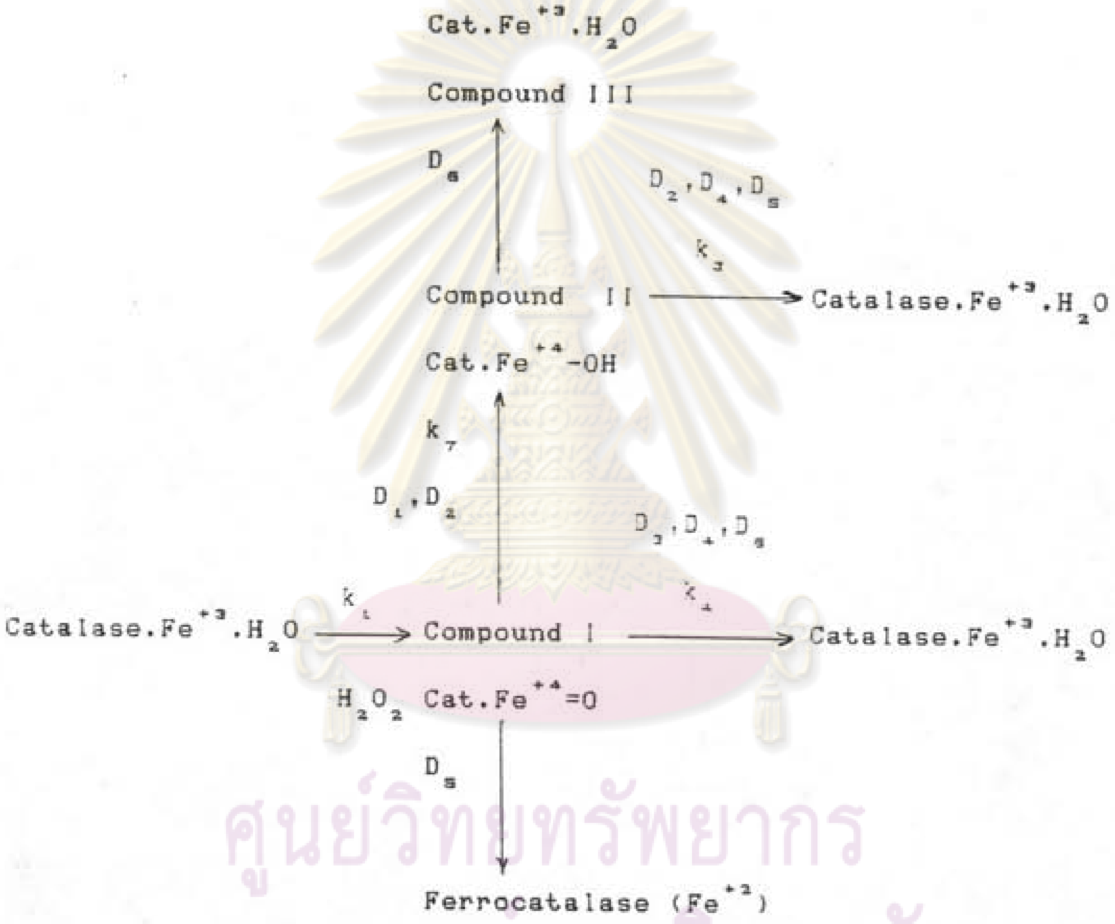
โดย $Cat(OH)_4$ คือ เอนไซม์คะตะเลส

$Cat(OH)_3OOH$ คือ Catalase-hydrogenperoxide Compound I

Chance (1950) ยังกล่าวอีกว่า Catalase-hydrogenperoxide Compound I เป็นรูปแบบที่สำคัญและเป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดก๊าซออกซิเจน แล้วกลับเป็นเอนไซม์คะตะเลสอิสระเพื่อจับกับสับเสตรทและดำเนินปฏิกิริยาต่อไป แต่เมื่อเกิด Compound I ในระดับหนึ่ง Compound I บางส่วนจะเริ่มเปลี่ยนโครงร่างไปเป็น Compound II (Catalase-hydrogenperoxide Compound II) อย่างช้าๆ ซึ่งลำดับในการเกิดCompound II นั้นจะต้องใช้เวลาระยะหนึ่งหลังเกิด Compound I เสมอ ในขณะที่ hematin-peroxide bond เปลี่ยนรูปจาก Compound I ไปเป็น Compound II จะต้องมีเอนไซม์คะตะเลสอิสระในกระบวนการไว้รวมกับไฮโดรเจน-เปอร์ออกไซด์เพื่อให้เกิด Compound I จนกระทั่งถึงจุดสมดุล Compound IIเป็นรูปแบบที่ไม่แอคทีฟ การเปลี่ยนโครงร่างจาก Compound I เป็น Compound II จะทำให้ค่าคงที่ของความเร็วของปฏิกิริยาลดลง นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์คะตะเลสอีกรูปแบบหนึ่งที่อาจเกิดขึ้นได้ในปฏิกิริยา คือ Tertiary compound (Catalase-hydrogen-peroxide Compound III) ซึ่งเสนอโดย Keilin และ Hartree (1951) Compound III จะถูกสร้างขึ้นในสภาวะที่มีการออกซิเดชั่นของแอสคอร์เบท (ascor-bate) อย่างรวดเร็ว Compound III เป็นรูปแบบที่ไม่แอคทีฟมากกว่า Compound II และมีโครงร่างที่ไม่เหมาะต่อการจับกับสับเสตรท (inhibited form) ของเอนไซม์คะตะเลส

Hydrogen donor ของเอนไซม์คะตะเลส

เนื่องจาก H_2O_2 ทำหน้าที่เป็นสับเสตรท (Hydrogen donor) แล้วยังมี CH_3OH, CH_3CH_2OH และสารอื่นๆอีกด้วยโดยมีกลไกดังนี้ (Robinson, 1991)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย D_1 คือ ascorbate, ferrocyanide

D_2 คือ phenols

D_3 คือ alcohol, formic acid

D_4 คือ nitrate

D_5 คือ azide, hydroxylamine

D_6 คือ hydrogenperoxide

เมื่อสับเสตรทเป็น HOOH, $k_1 = 6 \times 10^6$ $M^{-1}sec^{-1}$

CH_3OH, $k_1 = 8.5 \times 10^5$ $M^{-1}sec^{-1}$

CH_3CH_2OH, $k_1 = 2 \times 10^4$ $M^{-1}sec^{-1}$

สำหรับการเกิด Compound I จากเอนไซม์คะตะเลส ที่ pH 7, 25 °C

ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์คะตะเลส

ผลของ pH Bonnichsen และคณะ (1947) ศึกษาปฏิกิริยาของคะตะเลสที่สกัดจากเลือดของม้า ที่ pH ต่างๆ พบว่าโครงสร้างและอัตราการสลายตัวของ compound I คงที่ในช่วง pH 3 ถึง 9 ถึงแม้ว่าผลของกรดไม่ยับยั้งเอนไซม์คะตะเลสทันทีแต่สามารถลดแอคติวิตีลงได้อย่างมากในระหว่างปฏิกิริยาเพราะมี catalase-hydrogenperoxide compound II เกิดขึ้น และยังคงมีแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสต่อไปเมื่อมีสับเสตรท แต่เหตุผลที่จะใช้ในการอธิบายยังไม่ชัดเจน Chance (1952a) แสดงให้เห็นว่า catalactic reaction ลดลงเมื่อ pH มากกว่า 9 เพราะ pH มีผลต่อโครงสร้างและการแตกตัวของออกซิเจนใน compound I

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของอุณหภูมิ ผลของอุณหภูมิอาจเกิดจากโครงสร้างและการสลายตัวของ compoundI Bonnichsen, Chance และ Theorell (1947) พบว่าเอนไซม์คะตะเลสมี ค่า Q_{10} เท่ากับ 1.1 และพลังงานกระตุ้นของเอนไซม์คะตะเลสคือ 1700±100 แคลอรี่ โดย ร้อยละ 6 ของเอนไซม์จับกับสับเสตรท Strother และ Ackerman (1961) ทดสอบผลของอุณหภูมิต่ำต่อแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลส โดยใช้กลีเซอรอลเป็นสารป้องกันการแข็งตัว (antifreezing agent) พบว่า ความเร็วในการเกิด compound I นั้นสัมพันธ์กับค่า Q_{10} และที่สภาวะสมดุลของการเกิด compound I

Q_{10} มีค่าสูงสุดและมีค่าคงที่ที่ -4 ถึง 26 °C แต่จะลดลงอย่างรวดเร็วถ้านอกเหนือไปจากช่วงอุณหภูมินี้

ผลของความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ George (1948) รายงานว่าอัตราการสลายตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ขึ้นอยู่กับปริมาณของเอนไซม์คะตะเลสโดยตรง เมื่อศึกษาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ในช่วง 0.06 ถึง 0.08 โมล พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.06 โมล อัตราการสลายตัวจะขึ้นอยู่กับสัดส่วนของของเอนไซม์โดยตรง เมื่อความเข้มข้นสูงกว่า 0.08 โมล อัตราการสลายตัวจะลดลง Ogura (1955) ทำการทดลองโดยใช้เอนไซม์คะตะเลสบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากตับม้าโดยแปรความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในช่วงต่างๆ พบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาของเอนไซม์คะตะเลสเป็น first order reaction และเกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของสับเสตรท

สมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมีของเอนไซม์คะตะเลส

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ถูกสร้างโดยเซลด้วยปฏิกิริยารีดักชัน(reduction) ของออกซิเจนที่มีอิเลกตรอน 2 ตัว ถ้าไม่มีเอนไซม์คะตะเลสการมีเปอร์ออกไซด์นั้นจะเป็นพิษต่อเซล จำนวนออกซิเจนทั้งหมดในสภาวะเบื้องต้น (ground state) ที่มีในระบบชีววิทยาจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นน้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$$O_2 + 4H^+ \longrightarrow 2H_2O$$

แต่ออกซิเจนบางส่วนนั้นสามารถเปลี่ยนไปเป็น ซุปเปอร์ออกไซด์ (superoxide) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยกลไกต่างๆ

$$O_2 + 1\bar{e} \longrightarrow O_2^{\bar{\cdot}}$$

$$O_2 + 2\bar{e} \longrightarrow H_2O_2$$

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวเติมออกซิเจน (oxidant) ที่ดี แต่ตัวมันเพียงอย่างเดียวไม่เป็นอันตราย ส่วน superoxide ถึงแม้จะเป็นตัวเติมออกซิเจนที่ไม่ดี แต่ superoxide ที่มีอยู่ในเซลล์นั้นสามารถสร้างเป็น H_2O_2 และ OH° ได้โดยการทำงานของ liganded divalent transitional metal (L-dTM) เช่น Ferric ion

$$O_2^{\bar{\cdot}} + H_2O_2 + L\text{-}dTM \longrightarrow 2OH\cdot$$

OH• เป็นอนุภาคอิสระ (Free radical) ที่รุนแรงและเป็นพิษต่อแบคทีเรีย และเป็นอนุภาคอิสระเริ่มต้นในปฏิกิริยาลูกโซ่ซึ่งจะทำลายองค์ประกอบของเซลล์

$$OH\cdot + X_{cell} \longrightarrow X\cdot$$

ดังนั้นเซลล์จึงมีกลไกที่จะต่อต้านการเกิด OH• และ H_2O_2 ได้โดยการสร้าง superoxide dismutase (SOD) และเอนไซม์คะตะเลส (Frederick and Fridovich, 1981)

เอนไซม์คะตะเลสที่อยู่ในส่วนต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตนั้นเกิดจาก cytochrome ในระบบการหายใจซึ่งระบบนี้ได้พลังงานจากการ interaction ของออกซิเจนกับผลผลิตใน Kreb's cycle ทำให้ออกซิเจนลดลงจากเดิมและกลายเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออก-ไซด์ซึ่งจำเป็นต้องกำจัดออกไปเนื่องจากมีความเป็นพิษ ซึ่งในพืชและสัตว์ต่างก็มีแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลส โดยในอวัยวะของสัตว์ในตับและไตจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์

คะตะเลสมากที่สุด ส่วนในแบคทีเรียนั้นพบว่า aerobic bacteria ทั้งหมด และ facultative anaerobic bacteria บางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ ส่วนพวก obligate anerobes ทุกชนิดไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เซลล์แบคทีเรียเหล่านี้มีขนาดเล็กและมีเอนไซม์คะตะเลสอยู่น้อยหรือส่วนสำคัญของเอนไซม์ขาดหายไป สามารถตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียได้โดยการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออก-ไซด์เข้มข้นร้อยละ 3 ลงบนโคโลนีของเชื้อนั้นถ้าเป็นพวกที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสจะมีฟองก๊าซเกิดขึ้น (Agner, 1942; Mollard, 1947) แบคทีเรียที่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสในสภาวะปกติบางชนิดสามารถทำให้สร้างเอนไซม์คะตะเลสได้โดยการเลี้ยงแบคทีเรียนั้นในอาหารที่เติมสารอาหารที่มี heme-iron (Whittebury, 1964)

จุลินทรีย์กับการสร้างเอนไซม์คะตะเลส

เมื่อทดสอบ anticatalase antibodies ในกระต่ายหลังจากฉีดเอนไซม์คะตะเลสที่แยกได้จากแหล่งอื่น สรุปได้ว่าเอนไซม์คะตะเลสจากแหล่งต่างกันจะมีองค์-ประกอบของโปรตีนต่างกันจึงทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์แตกต่างกันเอนไซม์คะตะเลสที่สร้างจากจุลินทรีย์ชนิด Micrococcus lysodeikicus มีแอคติวิตีสูงกว่าเอนไซม์คะตะเลสจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Tria, 1939 ; Sumner et.al, 1940)

Jones และ Suggett (1968) ศึกษา endocatalase และ exocatalase โดยการตรวจสอบแอคติวิตีของเซลล์แบคทีเรียชนิด Serratia sp. ที่เลี้ยงในอาหารเหลวและจากส่วนที่กรองได้จาก culture พบว่าในช่วงที่เชื้ออายุน้อย เอนไซม์คะตะเลสจะอยู่ในเซลและไม่พบในส่วนที่กรองจาก culture แต่เมื่อปล่อยให้ culture มีอายุมากขึ้น พบว่าในส่วนที่กรองได้มีปริมาณเอนไซม์คะตะเลสมากขึ้นแต่น้อยกว่าในเซลล์เสมอ George และ Fung (1986) กล่าวถึงการเปรียบเทียบผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อ Escherichia coli สายพันธุ์ต่างๆ พบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เมื่อทดสอบใน

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

aerobic strains มีความแตกต่างกันแต่เมื่อทดสอบใน anaerobic strains ไม่มีปฏิกิริยาเกิดขึ้น และกล่าวถึงความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสของ <u>Staphylococcus</u> <u>aureus</u>, <u>Pseudomonas</u> <u>aeruginosa</u> และ <u>E.</u> <u>coli</u> ที่เลี้ยงในอาหารที่แตกต่างกัน สรุปได้ว่าปริมาณของเอนไซม์คะตะเลสที่สร้างจากเชื้อแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณไฮโดรเจนไอออนแตกต่างกันเป็นสำคัญ และยังพบว่าการมีน้ำตาลเดกโตรสในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้การสร้างเอนไซม์คะตะเลสของเชื้อลดลงซึ่งไม่ได้เกิดจากการลดจำนวนเซลของจุลินทรีย์ (George and Fung, 1986b) Molland (1947) ศึกษาความสามารถในการทนต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเชื้อ 37 ชนิด โดยวิธี Polarographic Method พบว่าจุลินทรีย์ชนิดที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสในปริมาณมากมักจะทนต่อไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ได้ดี โดยเฉพาะ <u>Streptococcus</u> <u>salivarius</u> สามารถทนต่อไฮโดร-เจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้นถึงร้อยละ 4 เมื่อทดลองเติม โซเดียมซัลไฟด์ (sodium sul-fide) พบว่าสามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสในเซลได้แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ จึงกล่าวได้ว่าเอนไซม์คะตะเลสไม่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ Clayton (1960) พบว่าการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากขึ้นจะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสเพิ่มขึ้น Fin และ Condon (1975) รายงานผลของการสร้างเอนไซม์คะตะเลสในแต่ละช่วงการเจริญของ <u>Salmonella</u> <u>typhimurium</u> พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสในแบคทีเรียลดลงในช่วงต้น log phase แต่จะเพิ่มขึ้นในช่วงปลายของ log phase และในระหว่าง stationary phase การสังเคราะห์เอนไซม์คะตะเลสจะเพิ่มขึ้นอีกในช่วงปลายของ exponential phase ในการทดลองต้องควบคุม pH ให้อยู่ในสภาวะที่เป็นกลาง คือ pH 7.0 จึงจะทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์คะตะเลสไม่แปรผัน และยังพบว่าการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออก-ไซด์ช่วง 1ไมโครโมล ถึง 2 ไมโครโมล ในช่วง exponential growth phase ใน culture ของ <u>S.</u> <u>typhimurium</u> จะกระตุ้นให้สังเคราะห์เอนไซม์คะตะเลสในระดับสูงสุดถึง 80 ไมโครโมล ทั้งนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่ได้เป็นตัวกระตุ้นการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สังเคราะห์เอนไซม์คะตะเลสโดยตรงแต่เป็นสารอื่นที่เกิดขึ้นหลังจากการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไปในระบบ โดยทดลองใน S. typhimurium และเชื้ออื่นๆ ที่เป็น enteric bacteria และอยู่ในช่วง lag phase ซึ่งเป็นช่วงก่อนที่เชื้อจะสังเคราะห์เอนไซม์คะตะเลส หลังจากเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 10 ถึง 15 นาที พบว่ามี β-galactosidase เฉพาะในช่วงเวลา 80 ถึง 90 วินาทีแรก ใน E. coli ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกสลายโดยเอนไซม์คะตะเลสและเปอร์ออกซิเดสที่มีอยู่ภายใน 2 นาที ในกรณีนี้ messenger ribonucleic acid ของเอนไซม์คะตะเลสมักจะไม่เสถียร และคาดว่าสารบางอย่างที่สังเคราะห์ขึ้นหลังเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ใน exponential growing cell นั้นจะเป็นตัวกระตุ้นที่แท้จริงที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์คะตะเลส Marie และ Parex (1980) ตรวจสอบการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสในเชื้อ Micrococcus luteus พบว่าการเติม heme precursorsจะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสเพิ่มขึ้น แต่การเติมกลูโคสจะทำให้แอคติวิติลดลง

วิธีตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลส

แอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสมีการตรวจสอบได้ด้วยวิธีต่างๆ คือ Titrimetric, Spectrophotometric และ Manometric method ซึ่งทุกวิธีเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสในค่าของ Katalase-fahigkeit(Kat.F) (Voneuler and Josephson, 1926)

Titrimetric Method โดย Voneuler and Josephson (1926) ซึ่งเป็นวิธีที่ถือว่าดีที่สุดในการตรวจสอบเอนไซม์คะตะเลสบริสุทธิ์ และ partially purified catalase มีขั้นตอนคือ ผสมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในฟอสเฟสบัฟเฟอร์ ทำให้เย็นถึง 0 °C แล้วเติมสารละลายของเอนไซม์คะตะเลสลงในจานสำหรับปฏิกริยาและเขย่า เก็บตัวอย่างที่เกิดปฏิกิริยาแล้วในช่วงเวลา 3, 6, 9 และ

12 นาที โดยหยุดปฏิกิริยาด้วย กรดซัลฟูริก เข้มข้น 2 นอร์มอล แล้วนำตัวอย่างมาไตเตรทด้วย สารละลายเปอร์มังกาเนต เข้มข้น 0.005 นอร์มอล จุดยุติ คือสีชมพู คำนวณหาแอคติวิตีตามสมการ

$$Kat.F = k/w$$

w = gram dry weight of catalase

$k = (2.303/t) \mathrm{Log}(x_o/x_t)\ \mathrm{min}^{-1}$ at 0 °C

t = time

x_o = titration value in 0 time

x_t = titration value in t time

Spectrophotometric Method โดย Chance และ Fergusson (1954) เป็นวิธีที่ตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสโดยการวัดการลดลงของการดูดกลืนแสงในช่วง 230 ถึง 250 นาโนเมตร เนื่องจากการสลายตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยเอนไซม์คะตะเลส โดยวัดการดูดกลืนแสงในช่วงเวลา 0,10, 20,30,50 และ 70 วินาที ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 1 ต่อ 500 จำนวน 3 มิลลิลิตร และสารละลายของเอนไซม์คะตะเลสจำนวน 1 ไมโครลิตร โดยปรับความเข้มข้นของเอนไซม์คะตะเลสให้ได้ประมาณ 1 ต่อ 2 ของเปอร์ออกไซด์ที่สลายตัวภายใน 30 วินาที คำนวณหาแอคติวิตีตามสมการ

$$k = (2.3/t_2 - t_1)(x_1/x_2)$$

t_1 และ t_2 คือ เวลาใช้ในการวัดการดูดกลืนแสงที่อ่านค่า x_1 และ x_2 ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$$Kat.F = 60k/2.3w$$

w = จำนวนกรัมของคะตะเลสในปฏิกิริยาสุดท้ายที่ผสมในสารละลาย 50 มิลลิลิตร

Manometric Methods เป็นวิธีที่ใช้ในการวัดปริมาณก๊าซออกซิเจนที่เกิดจากเอนไซม์คะตะเลสทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ บันทึกจำนวนไมโครลิตรของก๊าซออกซิเจนต่อนาที ซึ่งเทคนิคนี้ใช้ในการวัดความเร็วของปฏิกิริยา George (1948) วัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสด้วยวิธีที่เรียกว่า Boat Technique ซึ่งประกอบด้วยอุปกรณ์คือ Barcroft manometer และ pressure gauge เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และผลของ pH ที่มีต่อการสลายตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเอนไซม์คะตะเลส

Nicholls (1959) กล่าวว่า Manometric method นั้นให้ค่าอัตราเร็ว (absolute rate) ของแอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำ และแต่ละวิธีให้ผลที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยถ้าใช้เอนไซม์ชนิดเดียวกันและเตรียมจากสภาวะเดียวกัน

อีกวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสได้อย่างรวดเร็วได้แก่ วิธี Colorimetric Method (Asru, 1972)

Colorimetric Method หลักการของวิธีนี้ คือ การวัดอัตราการสลายตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยเอนไซม์คะตะเลสที่เวลาต่างๆ แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายไดโครเมตในกรดอะซิติก (dichromate/acetic acid mixture) เมื่อถูกต้มให้ร้อนในปฏิกิริยาที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารละลายนี้จะสลายตัวเป็น โครมิกอะซิเตต (chromic acetate) และเปลี่ยนรูปเป็น เปอร์โครมิกแอซิด (perchromic acid) ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่ไม่เสถียร สามารถวัดสีได้ที่ความยาวคลื่น 570 ถึง 610 นาโนเมตร คำนวณแอคติวิตีได้จากสมการ

$$K = 1/t\ (\log S_o/S)$$

S_o = Initial concentration

S = Concentration of peroxide at t time

$$Kat.f = K(0)/(gm\ protein\ /ml)$$

วิธีการและอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลส

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียโดยการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสที่แบคทีเรียสร้างขึ้นโดยวิธีการและเครื่องมือต่างๆ มีดังนี้

Catalasemeter

เป็นชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดปริมาณออกซิเจนที่เกิดจากการเร่งสลายตัวของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเอนไซม์คะตะเลสโดยวัดในรูปของ Floatation Time(FT) มี 2 ระบบคือ ระบบ paper disk และระบบ membrane filter โดย Catalasemeter มีความไวที่ดีต่อเอนไซม์คะตะเลส โดยพบว่าความสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณเอนไซม์คะตะเลสบริสุทธิ์กับ FT นั้นเป็นแบบเส้นตรงและมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ $\pm$ 0.076 (Gagnon,Hunting and Esselen, 1959) และเมื่อเติมละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสารละลาย EDTA ที่เข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ พบว่าเนื่องจากสารละลาย EDTA สามารถกำจัดไอออนของโลหะหนักที่รบกวนการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส (Dodds, Holley and Kemoton, 1983) ทำให้ Catalasemeter มีความไวต่อเอนไซม์คะตะเลสดีขึ้น โดยพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient ,r) สูงถึง -0.99 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99.99 (Fung, 1986) นอกจากนี้ Catalasemeter ยังมีความไวต่อแบคทีเรียแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยพบว่าแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสในปริมาณ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มากจะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดกับ FTได้ดีกว่าและสามารถเริ่มตรวจสอบเมื่อมีจำนวนแบคทีเรียน้อยๆ ได้ ในขณะเดียวกันแบคทีเรียที่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสไม่มีผลตอบสนองต่อ Catalasemeter (Charboneau,Therrien and Gagnon,1974 ; Fung, 1986) และเมื่อใช้ Catalasemeter ในการตรวจสอบคุณภาพของน้ำนมดิบโดยตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่าง FT กับจำนวนเซลเม็ดเลือดขาวในน้ำนมจากวัวที่เป็นโรคเต้านมอักเสบพบว่ามีค่า r เท่ากับ -0.75 (Willitts, 1965) ส่วนการตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำนมดิบนั้น ใช้ catalasemeter ในการตรวจสอบได้ก็ต่อเมื่อมีแบคทีเรียในน้ำนมมากกว่า $1x10^5$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร (Lonne, 1969) แต่ถ้าน้ำนมดิบนั้นมีแบคทีเรียชนิดที่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสเป็นส่วนใหญ่จะทำให้การตรวจสอบผิดพลาดไปจึงเป็นข้อจำกัดอย่างหนึ่งของการใช้ Catalasemeter ในการตรวจสอบคุณภาพของน้ำนมดิบ แต่สามารถนำมาใช้ในการประเมินคุณภาพของน้ำนมหลังการพาสเจอร์ไรซ์ได้ดี และพบว่า r เท่ากับ -0.75 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99.99 (Phillip and Griffiths, 1986) ส่วนการตรวจสอบในอาหารชนิดอื่นๆเช่น เนื้อไก่งวงสุกที่บรรจุในถุงสุญญากาศพบว่าให้ค่า r ที่ดี แต่ถ้าเนื้อไก่งวงนั้น มีจำนวนแบคทีเรียน้อยกว่า 10^4 เซล/กรัม ไม่สามารถใช้ catalasemeter ในการตรวจสอบได้ (Dodds, Holley and Kemoton, 1983) เมื่อนำมาตรวจสอบแบคทีเรียบนผิวเนื้อไก่แช่เย็น พบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง FT กับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและ FT กับประชากรของแบคทีเรียเฉพาะชนิดที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ พบว่าต่างมีค่า rเท่ากับ -0.93 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99.99 และไก่แช่เย็นที่มีคุณภาพดี(มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดน้อยกว่า 10^3 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร) มี FT มากกว่า 4,200 วินาที และไก่แช่เย็นคุณภาพต่ำ (มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมากกว่า 10^5 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร) มี FT น้อยกว่า 580 วินาที ทั้งนี้ได้กำจัดเอนไซม์คะตะเลสในเลือดไก่ที่ติดบนผิวเนื้อไก่ โดยการทำ acidification (Fung, 1986)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Gas column method

เป็นการวัดปริมาณออกซิเจนที่เกิดขึ้นในรูปของ % Gas Column เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียโดยตรงพบว่ากราฟระหว่าง % Gas Column กับ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด มีลักษณะเป็นแบบ Sigmoidal และความสัมพันธ์ระหว่าง FT กับ % Gas Column เป็นสัดส่วนผกผันกัน เมื่อใช้วิธีนี้ตรวจสอบแบคทีเรียทั้งหมดในปีกไก่แช่เย็น พบว่าให้ค่า r เท่ากับ 0.57 ในขณะที่ Catalasemeter ให้ค่า r เท่ากับ -0.64 (Fung, 1986)

นอกจากนี้ยังมีอุปกรณ์และวิธีการอื่นๆ ที่สามารถใช้ในการวัดปริมาณออกซิเจนที่เกิดขึ้นได้ เช่น Warburg respirometer สามารถใช้ตรวจสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลของเม็ดเลือดขาวกับปริมาณออกซิเจน ในตัวอย่างน้ำนมจากวัวที่เป็นโรคเต้านมอักเสบให้ค่า r เท่ากับ 0.90 และอีกวิธีหนึ่งคือการใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า Smith fermentation tube ในการวัดปริมาณก๊าซออกซิเจนที่เกิดจากปฏิกิริยาแต่ไม่พบความสัมพันธ์ใดๆกับจำนวนเซลเม็ดเลือดขาว (Willitts and Babel, 1965) ส่วนการใช้หลอด capillary ในการวัดปริมาณออกซิเจนนั้นเป็นการทดสอบในเชิงกึ่งปริมาณเท่านั้น (Fung and Petrishko, 1973)

จากแนวคิดและทฤษฎีต่างๆ ที่กล่าวมาทั้งหมดนั้นจึงได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำสดโดยการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรียเหล่านั้นด้วยชุดเครื่องมือ Catalasemeter และ Gas column method นอกจากนี้ยังตรวจสอบชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบที่มีแหล่งเลี้ยงต่างกัน เพื่อศึกษาผลของการมีสัดส่วนของแบคทีเรียที่มีระดับการสร้างเอนไซม์คะตะเลสแตกต่างกันต่อความสัมพันธ์ระหว่างการวัดแอคติวิตีด้วยเครื่องมือเหล่านั้นกับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด