วิธีรวดเร็วในการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ในกุ้งกุลาดำ Penaeus monodon Fabricius สด

นางสาว ชื่นจิต จันทน์วัฒนวงษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2538

ISBN 974-632-586-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

T 152 0192 1

RAPID METHOD FOR ESTIMATION OF TOTAL NUMBER OF CATALASE PRODUCING BACTERIA IN FRESH BLACK TIGER PRAWN *Penaeus monodon* Fabricius

MISS CHEUNJIT JUNWATTANAWONG

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science

Department of Food Technology
Graduate school
Chulalongkorn University

1995

ISBN 974-632-586-8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ วิธีรวดเร็วในการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสในกุ้งกุลาดำ Penaeus monodon Frabicius สด

โดย นางสาว ชื่นจิต จันทน์วัฒนวงษ์

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ ดร. สุวิมล กีรติพิบูล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. วรรณา ดุลยชัญ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร. สุวิมล กีรติพิบูล)

.....กรรมการ

(ดร. รุจ วัลยะเสวี)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	วิธีรวดเร็วในการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสในกุ้งกุลาดำ Penaeus monodon Frabicius สด
โดย	นางสาว ชื่นจิต จันทน์วัฒนวงษ์
ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. สุวิมล กีรติพิบูล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรรณา ตุลยธัญ)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. สุวิมล กีรติพิบูล)

.....กรรมการ
(ดร. รุจ วัลยะเสวี)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ชื่นจิต จันทน์วัฒนวงษ์ : วิธีรวดเร็วในการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสในกุ้งกุลาดำ Penaeus monodon Fabricius สด (RAPID METHOD FOR ESTIMATION OF TOTAL NUMBER OF CATALASE PRODUCING BACTERIA IN FRESH BLACK TIGER PRAWN Penaeus monodon Fabricius) อ.ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์ ดร.สุวิมล กีรติพิบูล, 114 หน้า. ISBN 974-632-586-8

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในกุ้งกุลาดำสดด้วยวิธีที่รวดเร็ว โดยการตรวจสอบเอนไซม์คะตะเลสที่สร้างจากแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำวัดถุดิบ โดยใช้เครื่องมือที่สร้างขึ้น คือ Catalasemeter ซึ่งมี 2 ระบบคือ ระบบ Filter membrane และระบบ Paper disk ส่วนอีกวิธีหนึ่งคือ Gas column method ในขั้นตอนแรกศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมที่จะใช้ในการทดลอง พบว่าสับสเตรทที่เหมาะสมคือ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 3 ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 และในการวัดแอคติวิตีของคะตะเลสต้องแยกแบคทีเรียออกจากตัวกุ้งโดย Rinse method เพื่อป้องกันการรบกวนของคะตะเลสจากเนื้อเยื่อกุ้ง ในขั้นตอนที่สอง ศึกษาความไวของเครื่องมือ พบว่า Catalasemeter ทั้ง 2 ระบบ มีความไวต่อเอนไซม์คะตะเลสที่มีชื่อทางการค้าว่า Microcatalase® ในช่วง 10^{-1} ถึง 10^{2} ยูนิตต่อมิลลิลิตร และไวต่อคะตะเลสจาก Pseudomonas fluorescens ในระบบ Paper disk ในช่วง 10^{4} ถึง 10^{8} โคโลนีต่อมิลลิลิตร แต่ระบบ Filter membrane วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ถ้ามากกว่า 10^{8} โคโลนีต่อมิลลิลิตร Gas column method มีความไวต่อคะตะเลสบริสุทธิ์ในช่วง 10^{-2} ถึง 10^{0} ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีความไวต่อคะตะเลสจาก Pseudomonas fluorescens อยู่ในช่วง 10^{5} ถึง 10^{7} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในขั้นตอนที่สามเลือก Catalasemeter ระบบ Paper disk มาใช้ในการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำวัดถุดิบจาก 3 แหล่ง คือ จังหวัดนครศรีธรรมราช ระยอง และสุราษฎร์ธานี พบว่าสามารถตรวจสอบแบคทีเรียได้ในช่วงจำนวนเซลล์เท่ากับ 10^{4} ถึง 10^{5} โคโลนีต่อกรัม และผลการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยการทดสอบคะตะเลสจากกุ้งทั้ง 3 แหล่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ในขั้นตอนที่สี่ ศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำวัดถุดิบจากทั้ง 3 แหล่ง พบว่าส่วนใหญ่เป็นชนิดที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสในระดับสูง (+++) ในส่วนผสมของแบคทีเรียที่มีแบคทีเรียชนิดที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสระดับสูง (+++) มากกว่าแบคทีเรียที่สร้างคะตะเลสในระดับต่ำกว่า (++, +) อยู่เพียง 1 เท่า จะแสดงแอคติวิตีของคะตะเลสเท่ากับการมีแบคทีเรียระดับสูง (+++) อยู่เพียงชนิดเดียว predominant bacteria ที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำจากจังหวัดระยองคือแบคทีเรียใน Genus Micrococcus จังหวัดนครศรีธรรมราช และสุราษฎร์ธานีคือ Genus Acinetobacter ซึ่งแบคทีเรียในทั้งสอง Genus ต่างก็สร้างคะตะเลสระดับสูง (+++)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อนิสิต ชื่นจิต จันทน์วัฒนวงษ์

สาขาวิชา เทคโนโลยีการอาหาร ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รมณี สงวนดีกุล

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม สุวิมล กีรติพิบูล

##C526778 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY
KEY WORD: CATALASE/BLACK TIGER PRAWN/Penaeus monodon
CHEUNJIT JUNWATTANAWONG : RAPID METHOD FOR ESTIMATION OF TOTAL NUMBER OF CATALASE PRODUCING BACTERIA IN FRESH BLACK TIGER PRAWN Penaeus monodon Fabricius. THESIS ADVISOR : ROMANEE SANGUANDEEKUL, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : SUWIMON KEERATIPIBUL, Ph.D. 144 pp.
ISBN 974-632-586-8

The rapid methods for estimation of the total number of bacteria in fresh black tiger prawn were devloped by detecting activity of enzyme catalase. The method were assessed in 2 ways by using Catalasemeter constructed in this project and Gas column method. Two detecting systems were tested in Catalasemeter using filter membrane system and paper disk system. The bacterial catalase was separated from the prawn's tissue by rinse method. Catalasemeter method was able to detect commercial catalase (Microcatalase®) at the level between 10^{-1} to 10^{2} International Units.ml^{-1}. Paper disk Catalasemeter was able to detect activity of catalase in Pseudomonas fluorescens between 10^{4} to 10^{8} CFU.ml^{-1}, while Filter membrane Catalasemeter method could detect activity of catalase only at 10^{8} CFU.ml^{-1}. For Gas column method, detection level of pure catalase and catalase from Pseudomonas fluorescens were 10^{-2} to 10 International Units.ml^{-1} and 10^{5} to 10^{7} CFU.ml^{-1} respectively. Using paper disk Catalasemeter, the total number of bacteria of fresh black tiger prawns from Nakon Si Thammarat, Rayong and Surat Thani were estimated to be in between 10^{4} to 10^{9} CFU.g^{-1}. Which is not significantly different at $P \leq 0.05$. Identification of predominant bacteria was found to be those which give strong catalase activity (+++). Mixtures of strong (+++) and weak catalase (++ or +) producing bacteria at ratio of 2:1 gave the same catalase activity as the strong catalase positive bacteria (+++). Predominant bacteria of black tiger prawn from Rayong was the genus Micrococcus, whereas predominant bacteria from Nakon Si Thammarat and Surat Thani was the genus Acinetobacter. Both genera are strong catalase positive.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อนิสิต ชื่นจิต จันทน์วัฒนาวงศ์

สาขาวิชา เทคโนโลยีการอาหาร ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา สุวิมล กีรติพิบูล

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงด้วยความอนุเคราะห์จากหลายฝ่ายขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงต่อ อาจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือสนับสนุนให้คำแนะนำ และแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆในการทำวิทยานิพนธ์ตั้งแต่เริ่มงานจนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ อาจารย์ ดร. สุวิมล กิรติพิบูล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. วรรณา ตุลยธัญ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร. รุจ วัลยเสวี ที่ได้กรุณาสละเวลาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และได้เสนอแนวทางแก้ไขและปรับปรุงให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ Prof.Dr. Daniel Y.C. Fung ที่กรุณาให้คำแนะนำและเอกสารที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัย อาจารย์ พงษ์เทพ วิไลพันธ์ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้กรุณาให้คำแนะนำเรื่องกุ้งกุลาดำ

ขอขอบพระคุณทบวงมหาวิทยาลัยที่มอบทุน UDC สำหรับการศึกษา และบัณฑิตวิทยาลัยที่มอบทุนสนับสนุนการวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คุณรังสิโรจน์ ฝูงประเสริฐ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าประดิษฐ์เครื่องมือสำหรับใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ บริษัทแกลงจำกัด บริษัทเอเชี่ยนซีฟูดส์(มหาชน)จำกัด สมาคมส่งออกอาหารแช่เยือกแข็งแห่งประเทศไทย และสถานีประมงชายฝั่งตะวันออก จังหวัดระยอง ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างกุ้งกุลาดำ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ และพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารที่ให้ความช่วยเหลือตลอดงานวิจัย ขอขอบคุณเป็นพิเศษสำหรับพี่ชายและหลาน ที่ได้ร่วมเดินทางในการทำวิจัย ณ จังหวัดต่างๆ และคุณธีระพล ประกิตชัยวัฒนา ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยด้วยดีเสมอมา

ท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และบุคคลในครอบครัวที่ส่งเสริม ให้โอกาสที่ดี ตลอดจนให้กำลังใจ และความช่วยเหลือในทุกๆ ด้านด้วยดีเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญรูปภาพ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. วารสารปริทัศน์ 3

3. การทดลอง..... 25

4. ผลการทดลอง..... 38

5. วิจารณ์ผลการทดลอง..... 66

6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 83

รายการอ้างอิง..... 86

ภาคผนวก ก..... 94

ภาคผนวก ข..... 98

ภาคผนวก ค..... 101

ภาคผนวก ง..... 102

ภาคผนวก จ..... 106

ภาคผนวก ฉ..... 107

ภาคผนวก ช..... 109

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ช..... 112

ประวัติผู้เขียน..... 114

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 จุลินทรีย์ที่ตรวจพบเป็นส่วนใหญ่ในอาหารทะเลซึ่งจับใหม่ ๆ..... 7

2 การผสม culture ของแบคทีเรียที่มีระดับการสร้างเอนไซม์คะตะเลสต่างกัน ในอัตราส่วนต่าง ๆ..... 37

3 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ FT ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสที่สร้างจากแบคทีเรียที่ระดับ pH ต่าง ๆ..... 40

4 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ FT ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสที่สร้างจากเนื้อเยื่อกุ้งที่ระดับ pH ต่างๆ..... 41

5 ผลการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียและการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสจากแบคทีเรีย และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ปนเปื้อนในเนื้อเยื่อกุ้งและการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสจากเนื้อเยื่อกุ้งที่อุณหภูมิต่างๆ..... 43

6 การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำสดเมื่อแยกแบคทีเรียโดย Rinse และ Blend method และวัดแอคติวิตีของเอนไซมคะตะเลส Catalasemeter..... 44

7 การตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ปนเปื้อนบนเปลือกกุ้งและเนื้อเยื่อกุ้งหลังปอกเปลือกโดย Rinse method..... 45

8 จำนวนแบคทีเรียที่เหลือทั้งหมดในตัวกุ้งหลังจากการแยกแบคทีเรียออกจากตัวกุ้งโดยวิธี Rinse method..... 46

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

9 ชนิดและปริมาณของ predominant bacteria ที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบจากจังหวัดต่างๆ..... 60
10 ปริมาณของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบที่มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสระดับต่าง ๆ 61
11 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ FT จากการผสมแบคทีเรียที่มีระดับการสร้างเอนไซม์คะตะเลส +++ กับ + ในอัตราส่วนต่าง ๆ..... 62
12 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ FT จากการผสมแบคทีเรียที่มีระดับการสร้างเอนไซม์คะตะเลส +++ กับ ++ ในอัตราส่วนต่าง ๆ..... 63
13 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ FT จากการผสมแบคทีเรียที่มีระดับการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ++ กับ + ในอัตราส่วนต่าง ๆ..... 64
14 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ FT จากการผสมแบคทีเรียที่มีระดับการสร้างเอนไซม์คะตะเลส +++ กับ ++ และ + ในอัตราส่วนต่าง ๆ 65

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ หน้า

1 โครงสร้างของ Ferriprotoporphyrin III (protohemin)..... 10

2 รูปแบบของ Catalasemeter..... 28

3 ชุดเครื่องมือ Catalasemeter..... 30

4 อุปกรณ์และการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสด้วย Gas column method..... 31

5 แอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสที่สร้างจากเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำและแบคทีเรียที่ระดับ pH ต่าง ๆ..... 39

6 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Microcatalase ® กับแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสเมื่อวัดด้วยเครื่อง Catalasemeter ระบบ Paper disk..... 48

7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Microcatalase ® กับแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสเมื่อวัดด้วยเครื่อง Catalasemeter ระบบ Filter membrane..... 49

8 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Microcatalase ® กับแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสเมื่อวัดด้วย Gas column method..... 50

9 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดกับแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสจากเชื้อ Pseudomonas fluorescens เมื่อวัดด้วย Catalasemeter ระบบ Paper disk..... 52

10 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดกับแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลสจากเชื้อ Pseudomonas fluorescens เมื่อวัดด้วย Gas column method 53

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ หน้า

11 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำ วัตถุดิบจากจังหวัดนครศรีธรรมราชกับแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลส เมื่อวัดด้วย Catalasemeter ระบบ Paper disk..... 55

12 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบจากจังหวัดระยอง กับแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลส เมื่อวัดด้วย Catalasemeter ระบบ Paper disk..... 56

13 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำ วัตถุดิบจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี กับแอคติวิตีของเอนไซม์คะตะเลส เมื่อวัดด้วย Catalasemeter ระบบ Paper disk..... 57

14 แสดงผลของชนิดของรูปร่าง, สมบัติการติดสีและปริมาณของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำวัตถุดิบจากจังหวัดนครศรีธรรมราช, ระยอง และสุราษฎร์ธานี..... 59

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย