การใช้แอคติวิตีของคะตะเลสในการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในเนื้อไก่

นางสาวทิพา สายดาราสมุทร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-332-394-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CATALASE ACTIVITY FOR THE ESTIMATION OF TOTAL BACTERIA IN CHICKEN MEAT

Miss Tipa Saidarasamoot

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Food Technology
Department of Food Technology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1998

ISBN 974-332-394-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้แอคติวิตีของคะตะเลสในการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในเนื้อไก่
โดย	นางสาวทิพา สายดาราสมุทร
ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประเวทย์ ตุ้ยเต็มวงศ์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชัยยุทธ ธัญพิทยากุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. ประเวทย์ ตุ้ยเต็มวงศ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุวิมล กีรติพิบูล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์)

ทิพา สายดาราสมุทร : การใช้แอคติวิตีของคะตะเลสในการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในเนื้อไก่ (CATALASE ACTIVITY FOR THE ESTIMATION OF TOTAL BACTERIA IN CHICKEN MEAT) อ. ที่ปรึกษา: อาจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ผศ. ดร. ประเวทย์ ตุ้ยเต็มวงศ์, 97 หน้า, ISBN 974-332-394-5.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการที่รวดเร็วในการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในเนื้อไก่ โดยการตรวจสอบแอคติวิตีของคะตะเลสที่มีในแบคทีเรีย โดยใช้เครื่องมือที่ประดิษฐ์ขึ้นเรียกว่า Catalasemeter ซึ่งสามารถวัดแอคติวิตีของคะตะเลสได้ในรูป Flotation Time (FT) ในหน่วยวินาที เมื่อตรวจสอบ sensitivity ของเครื่องมือที่มีต่อคะตะเลสจากเชื้อบริสุทธิ์*Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่าง Logarithm ของ FT กับ Logarithm ของโคโลนีต่อมิลลิลิตรเป็นแบบเส้นตรง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากัน คือ - 0.99 ($p \leq 0.05$) และสามารถตรวจสอบแอคติวิตีของคะตะเลสได้ที่จำนวนเซลล์ในช่วง 10^4 ถึง 10^8 และ 10^5 ถึง 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาชนิดและปริมาณของpredominant bacteria ในเนื้อไก่ พบว่าเป็น *Pseudomonas* sp., *Micrococcus* sp., *Acinetobacter* sp. และ Enterobacteriaceae ร้อยละ 87, 5, 3 และ 3 ตามลำดับ โดยแบคทีเรียทุกกลุ่มให้ผลการทดสอบการสร้างคะตะเลสเป็นบวก การเลือกภาวะที่เหมาะสมในการยับยั้งคะตะเลสรบกวนจากเนื้อเยื่อไก่และเลือดไก่ โดยไม่ทำให้แอคติวิตีของคะตะเลสจาก predominant bacteria สูญเสียไป คือการให้ความร้อนอุณหภูมิ 65°C นาน 5 นาที เมื่อศึกษาการใช้ Catalasemeter ในการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียpsychrotroph ในเนื้ออกไก่ และ เนื้อน่องไก่แช่เย็น พบว่าความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์ต่อกรัมกับแอคติวิตีของคะตะเลสมีค่า r อยู่ในช่วง – 0.98 ถึง – 0.96 ($p \leq 0.05$) สามารถประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในช่วง 10^4 ถึง 10^9 โคโลนีต่อกรัม และสามารถประมาณจำนวนแบคทีเรีย psychrotroph ทั้งหมดในช่วง 10^3 ถึง 10^8 โคโลนีต่อกรัม เมื่อศึกษาชนิดและปริมาณของ predominant bacteria ในเนื้อไก่แปรรูปชนิดน่องไก่หมักซอสกระเทียมแช่เย็น พบว่าเป็นกลุ่ม Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* sp., *Lactobacillus* sp. และกลุ่ม Micrococcaceae ร้อยละ 50, 18, 16 และ 4 ตามลำดับ โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่สร้างคะตะเลสในระดับต่ำหรือไม่สร้างคะตะเลส ทำให้ไม่เหมาะสมที่จะใช้วิธีการตรวจสอบคะตะเลสในการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดสำหรับตัวอย่างชนิดนี้

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อนิสิต ทิพา สายดาราสมุทร

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C827557 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY
KEY WORD: CATALASE / TOTAL BACTERIA / CHICKEN MEAT
TIPA SAIDARASAMOOT : CATALASE ACTIVITY FOR THE ESTIMATION OF TOTAL BACTERIA IN CHICKEN MEAT, THESIS ADVISOR : ROMANEE SANGUANDEEKUL, Ph. D. , THESIS CO-ADVISOR : ASSIST. PROF. PRAVATE TUITEMWONG, Ph. D., 97 pp. ISBN 974-332-394-5.

The objective of this research was to develop the rapid method for estimation of total number of bacteria in chicken meat by detecting catalase activity which they produced. The devised apparatus, Catalasemeter, can be used to assess catalase activity by measuring Flotation Time (FT) in second. Catalasemeter was able to detect activity of catalase in *Micrococcus luteus* ATCC 9341 and *Pseudomonas aerugionsa* ATCC 27853 between 10^4 to 10^8 and 10^5 to 10^8 CFU.ml^{-1}., respectively, and the relationships between Logarithm FT and Logarithm CFU.ml^{-1}., in both cases were linear with $r = -0.99$ ($p \leq 0.05$). Identification of predominant bacteria was found to be *Pseudomonas* sp. 87%, *Micrococcus* sp. 5%, *Acinetobacter* sp. 3% and Enterobacteriaceae 3% and all of them were catalase positive. In order to eliminate the interference of tissue and blood catalase from bacterial catalase measurement, it was found that heating the sample at 65°C for 5 minutes could suppress the interference catalase and yet had the least effect on bacterial catalase activity. A study of total viable cell count and total psychrotroph count for both boneless breast meat and drumstick were performed against catalase activities. All correlation coefficients relating logarithm of FT to logarithm of CFU.g^{-1} ranged from $r = -0.98$ to $r = -0.96$ ($p \leq 0.05$). Catalasemeter was able to detect total viable cell number between 10^4 to 10^9 CFU.g^{-1} and total psychrotroph cell number between 10^3 to 10^8 CFU.g^{-1}. Identification of predominant bacteria in chicken's drumstick in garlic sauce was found to be Enterobacteriaceae 50%, *Pseudomonas* sp. 18%, *Lactobacillus* sp. 16% and Micrococcaceae 4%. Most of the bacteria were either low in catalase activity or catalase negative. Therefore, the measurement of catalase activity to estimate the number of bacteria in this product was not recommended.

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อนิสิต Tipa Saidarasamoot

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Romanee Sanguandeekul

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม Pravate Tuitemwong

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์ในด้านต่าง ๆ จากหลายฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และ แก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ผศ. ดร. ประเวทย์ ตุ้ยเต็มวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ และสนับสนุนในด้านอุปกรณ์ สารเคมี และเอกสาร รวมทั้งคำแนะนำต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. ชัยยุทธ ธัญพิทยากุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. สุวิมล กีรติพิบูล และ ผศ. สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์ ที่ได้กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และเสนอแนวทางแก้ไขปรับปรุง ให้วิทยานิพนธ์นี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ Prof. Dr. Daniel Y. C. Fung ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และเอกสารต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณจักรกฤษณ์ จิตติมงคล สำนักวิจัยและบริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่ประดิษฐ์เครื่องมือสำหรับใช้ทำวิจัย และ เนื่องจากทุนการวิจัยบางส่วนได้รับมาจากทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย จึงขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยมา ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยขอบคุณเป็นพิเศษสำหรับคุณอภิสิทธิ์ ศรีอรุณเรืองชัย ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ เป็นอย่างดี นอกจากนี้ขอขอบคุณเพื่อน ๆ จากภาควิชาจุลชีววิทยา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่เป็นกำลังใจให้เสมอมา

ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และบุคคลในครอบครัวที่ส่งเสริมให้โอกาสที่ดี ให้การสนับสนุนด้านการเงิน ตลอดจนให้กำลังใจ และ ความช่วยเหลือด้วยดีในทุก ๆ ด้านจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญรูป.....ญ
บทที่
1. บทนำ.....1
2. วารสารปริทัศน์.....2
3. การทดลอง.....21
4. ผลการทดลอง.....26
5. วิจารณ์ผลการทดลอง.....58
6. สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ.....73
รายการอ้างอิง.....76
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก.....82
ภาคผนวก ข.....89
ภาคผนวก ค.....91
ภาคผนวก ง.....92
ภาคผนวก จ.....94
ภาคผนวก ฉ.....96
ประวัติผู้เขียน.....97

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 Rate Constants ของคะตะเลสใน Enzymatic Cycle.....8

2 แอคติวิตีของ Superoxide dismutase (SOD) และคะตะเลสในจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ.....14

3 ชนิด และ ปริมาณของ predominant bacteria ที่พบในเนื้อไก่.....32

4 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ FT ในการวัดแอคติวิตีของคะตะเลสจากเนื้อเยื่อไก่ ที่ระดับ pH ต่าง ๆ.....34

5 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ FT ในการวัดแอคติวิตีของคะตะเลสจากเลือดไก่ ที่ระดับ pH ต่าง ๆ.....35

6 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ FT ในการวัดแอคติวิตีของคะตะเลสจาก *P. aeruginosa* ATCC 27853 ที่ระดับ pH ต่าง ๆ.....36

7 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ FT ในการวัดแอคติวิตีของคะตะเลสจาก *M. luteus* ATCC 9341 ที่ระดับ pH ต่าง ๆ.....37

8 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ FT ในการวัดแอคติวิตีของคะตะเลสจากเนื้อเยื่อไก่ ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ.....40

9 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ FT ในการวัดแอคติวิตีของคะตะเลสจากเลือดไก่ ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ.....41

10 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ FT ในการวัดแอคติวิตีของคะตะเลสจาก *P. aeruginosa* ATCC 27853 ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ.....42

11 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ FT ในการวัดแอคติวิตีของคะตะเลสจาก *M. luteus* ATCC 9341 ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ.....43

12 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ FT ในการวัดแอคติวิตีของคะตะเลสจากเนื้อเยื่อไก่ โดยแปรอุณหภูมิร่วมกับ pH.....47

13 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ FT ในการวัดแอคติวิตีของคะตะเลสจากเลือดไก่ โดยแปรอุณหภูมิร่วมกับ pH.....48

14 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ FT ในการวัดแอคติวิตีของคะตะเลสจาก *P. aeruginosa* ATCC 27853 โดยแปรอุณหภูมิร่วมกับ pH.....49

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

15 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ FT ในการวัดแอคติวิตีของคะตะเลสจาก *M. luteus* ATCC 9341 โดยแปรอุณหภูมิร่วมกับ pH.....50

16 ชนิดและปริมาณของ predominant bacteria ที่พบในเนื้อไก่แปรรูป.....56

ข 1 การเตรียมสารละลายบอริก – ซิตริก ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH ต่าง ๆ จากสารละลายที่เตรียมไว้สองชนิด.....89

ข 2 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่pH ต่าง ๆ จากสารละลายที่เตรียมไว้สองชนิด.....90

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ตัวที่หนึ่ง ทำปฏิกิริยากับคะตะเลส เกิดcompound I.....7

2 Compound I ทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ตัวที่สอง และสลายกลายเป็น ผลิตภัณฑ์.....7

3 ปฏิกิริยาalcohol oxidation ซึ่ง alcohol เข้าทำปฏิกิริยากับคะตะเลสแทนcompound I....9

4 Block diagram ของ Catalasemeter ที่ประดิษฐ์ขึ้น.....26

5 รูปแบบของ Catalasemeter ที่ประดิษฐ์ขึ้น.....27

6 Catalasemeter ที่ประดิษฐ์ขึ้น.....28

7 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรีย *M. luteus* ATCC 9341ทั้งหมด (Log cfu / ml) กับแอคติวิตีของคะตะเลสที่วัดได้โดยใช้Catalasemeter (Log FT).....30

8 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ATCC 27853 ทั้งหมด (Log cfu / ml) กับแอคติวิตีของคะตะเลสที่วัดได้โดยใช้Catalasemeter (Log FT).....31

9 แอคติวิตีของคะตะเลสจากเนื้อเยื่อไก่ เลือดไก่ แบคทีเรีย *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *M. luteus* ATCC 9341 ที่ระดับ pH ต่าง ๆ.....38

10 แอคติวิตีของคะตะเลสจากเนื้อเยื่อไก่ เลือดไก่ แบคทีเรีย *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *M. luteus* ATCC 9341 ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลานาน 5 นาที.....44

11 แอคติวิตีของคะตะเลสจากเนื้อเยื่อไก่ เลือดไก่ แบคทีเรีย *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *M. luteus* ATCC 9341 ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลานาน 10 นาที.....45

12 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total viable count) (Log cfu / ml) ในเนื้ออกไก่แช่เย็นกับแอคติวิตีของคะตะเลสเมื่อวัดด้วยCatalasemeter (Log FT).....52

13 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด(total viable count) (Log cfu / ml) ในเนื้อน่องไก่แช่เย็นกับแอคติวิตีของคะตะเลสเมื่อวัดด้วยCatalasemeter (Log FT).....53

14 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรียpsychrotroph ทั้งหมด (total psychrotroph count) (Log cfu / ml) ในเนื้ออกไก่แช่เย็นกับแอคติวิตีของคะตะเลสเมื่อวัดด้วยCatalasemeter (Log FT).....54

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

15 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรีย psychrotroph ทั้งหมด (total psychrotroph count) (Log cfu / ml) ในเนื้อน่องไก่แช่เย็นกับแอคติวิตีของคะตะเลสเมื่อวัดด้วย Catalasemeter (Log FT)..... 55
16 ชุด Sensor และ วงจร Control ของ Catalasemeter..... 82
17 ชุด Regulator ของ Catalasemeter..... 84
18 วงจรนับ และ แสดงผล (Counter and Display)..... 85
19 วงจรกำเนิดความถี่สัญญาณนาฬิกา (Clock generator) ของ Catalasemeter..... 86