บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

การตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาทางอาหาร เป็นการปฏิบัติเพื่อให้มั่นใจว่า สามารถควบคุมอันตรายจากจุลินทรีย์ได้ โดยปกติแล้วจะอาศัยวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ด้วยอุปกรณ์ เช่น จานอาหารเลี้ยงเชื้อ และหลอดแก้ว ซึ่งมีข้อด้อยหลายประการ เนื่องจากมีขนาดใหญ่ทำให้สิ้นเปลือง นอกจากนี้ ผลการวิเคราะห์ยังใช้เวลานาน การแก้ไขปัญหาอาจทำได้เพียงชี้จุดบกพร่องที่เกิดขึ้น ซึ่งอาหารนั้น ๆ อาจจำหน่ายไปแล้ว การใช้วิธีที่รวดเร็วในการวิเคราะห์ผลจึงทำให้ประหยัดเวลา สะดวก และ การควบคุมคุณภาพทำได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (ประเวทย์ ตุ้ยเต็มวงศ์ และมรณี ตุ้ยเต็มวงศ์, 2537)

การตรวจสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี เช่น แอคติวิตีของคะตะเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ในแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญส่วนใหญ่ โดยอาศัยหลักการที่ว่าแอคติวิตีของคะตะเลสจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อจำนวนแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น ก็เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ประมาณความหนาแน่นของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ได้ (Fung, 1993)

จุลินทรีย์ในอาหาร

จุลินทรีย์สามารถปนเปื้อนและเพิ่มจำนวนได้ในอาหาร จากทั้งวัตถุดิบ กระบวนการผลิต หรือระหว่างการรอบริโภค การปนเปื้อนนี้จะมีผลต่อคุณภาพอาหาร คือ อายุการเก็บสั้นลง ลักษณะอาหารและคุณค่าทางโภชนาการเปลี่ยนแปลงไป ที่สำคัญคือ จุลินทรีย์บางชนิดทำให้เกิดโรคหรือสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายเมื่อบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนนั้นเข้าไป

<u>การเจริญของแบคทีเรียบนเนื้อสัตว์</u>

เนื้อสัตว์รวมทั้งสัตว์ปีกเป็นอาหารที่เหมาะแก่การเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากมีสารอาหารต่าง ๆ อุดมสมบูรณ์ แม้ว่าเนื้อเยื่อภายในของเนื้อสัตว์ที่ได้จากสัตว์ที่มีสุขภาพดีจะถือว่าปลอดเชื้อ แต่ก็มีแบคทีเรียที่ทำให้เนื้อสัตว์เสื่อมเสียเจริญอยู่บริเวณผิวภายนอก โดยปนเปื้อนมาจากกระบวนการฆ่าสัตว์ และกระบวนการแปรรูป แบคทีเรียที่บริเวณผิวนอกนี้จะไม่แพร่กระจายเข้าไปสู่เนื้อเยื่อภายใน จนกระทั่งเจริญเพิ่มจำนวนสูงพอและแสดงการเสื่อมเสียอย่างชัดเจน (Brown, 1982)

Gill (1986) ให้นิยามของคำว่า การเสื่อมเสีย (spoilage) ของเนื้อสัตว์ ว่า " ลักษณะอาการ หรือกลุ่มของลักษณะจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ ซึ่งทำให้เนื้อสัตว์แสดงการเปลี่ยนแปลงในด้านกลิ่น กลิ่นรส หรือลักษณะปรากฏอย่างชัดเจน"

โดยทั่วไปเนื้อสัตว์จะถูกเก็บรักษาในที่เย็น ดังนั้นจุลินทรีย์ที่เจริญเป็นสาเหตุให้เนื้อสัตว์เสื่อมเสียส่วนมากก็คือ จุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ หรือ psychrotroph ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นพวกแบคทีเรียรูปแท่ง แกรมลบ โดยพบ *Pseudomonas* species มากที่สุด ที่พบรองลงมาได้แก่ *Achromobacter, Acinetobacter, Flavobacterium* และ *Alcaligenes* (Ayres และคณะ, 1950; Walker และ Ayres, 1956; Nagel และคณะ, 1960; Patterson, 1972; Gill และ Newton, 1977; Thomas และ McMeekin,1980) ส่วนพวกแบคทีเรียก่อโรค (pathogens) ส่วนใหญ่จะไม่เจริญหรือสร้างสารพิษในอาหารที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำ (Kraft , 1986)

การตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดต่อกรัมของอาหาร สามารถใช้เป็นดัชนีบอกถึงความสะอาด ความสด รวมถึงความปลอดภัยของอาหารนั้นได้ ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว มีหลักการสำคัญที่ใช้ในการนับหรือประมาณจำนวนจุลินทรีย์ ได้ 4 วิธี ดังนี้ (สุวณี สุภเวชย์ และ มาลัย วรจิตร, 2536)

1. <u>การนับจำนวนโดยตรง</u> (Direct Count Methods)

เป็นการนับจำนวนเซลล์ที่มีในตัวอย่างโดยตรง ซึ่งทำได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ และ สไลด์พิเศษ คือ counting chamber slide (Petroff – Hauser counting chamber) หรือสไลด์ธรรมดา (The Breed count slide) วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และใช้อุปกรณ์น้อย แต่มีข้อเสียคือ ต้องมีแบคทีเรียอย่างน้อย 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ถ้ามากหรือน้อยเกินไป การนับอาจไม่ถูกต้อง และที่สำคัญวิธีนี้ไม่สามารถแยกเซลล์เป็นออกจากเซลล์ตายได้ และใช้ได้กับตัวอย่างบางลักษณะเท่านั้น

2. <u>การนับเซลล์ที่มีชีวิต</u> (Viable Cell Count)

วิธีการนี้จะตรวจนับได้เฉพาะจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตเท่านั้น วิธีการที่ใช้ทั่วไปคือนำตัวอย่างมาทำให้เจือจางเป็นลำดับก่อน แล้วจึงนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสม นับจำนวน

โคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหาร โดยถือว่าหนึ่งโคโลนี มาจากแบคทีเรีย 1 เซลล์ มีหลายวิธีด้วยกันคือ วิธี Plate Count ได้แก่ pour plate , spread plate หรือ surface count , spiral plate วิธี Roll tube count วิธี Drop count method วิธี Membrane filter count

จุลินทรีย์จำนวนมากมีความคุ้นเคยหรืออาศัยในสภาพแวดล้อมที่เป็นน้ำ ดังนั้นมักจะไม่สร้างโคโลนีบนอาหารแข็ง หรือเมื่อจุลินทรีย์บาดเจ็บ แม้ว่าจะยังคงมีmetabolically active อยู่ แต่ก็อาจไม่สร้างโคโลนีได้ นอกจากนี้บางกรณีเมื่อจุลินทรีย์รวมกลุ่มกันมาก ๆ และไม่แยกออกจากกันก็จะไม่สร้างโคโลนีเดี่ยวขึ้นเช่นกัน ทำให้เกิดการผิดพลาดในการตรวจนับจำนวน สามารถลดปัญหาเหล่านี้ได้โดยเพาะเชื้อลงในอาหารเหลวแทนอาหารแข็ง เช่น เทคนิค Most Probable Numbers (MPN) ซึ่งเป็นค่าประมาณของจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทางสถิติในตัวอย่าง วิธีนี้นิยมใช้หา coliform หรือ fecal *E. coli* จากน้ำหรือสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปหาจุลินทรีย์อื่น ๆ ในตัวอย่างที่เป็นของเหลวโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์นั้น ๆ

3. <u>การวัดกิจกรรมของเซลล์</u> (Measuring Cell Activity)

วิธีนี้จะเป็นการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงด้านต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นเนื่องจากกิจกรรมระหว่างที่จุลินทรีย์เจริญ ตัวอย่างเช่น การวัดการเปลี่ยนแปลงพลังงานความร้อนที่เกิดจากการหายใจของจุลินทรีย์ (Microcalorimetry) การวัดการเปลี่ยนแปลงสภาพความต้านทานกระแสไฟฟ้าของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเกิดจากการที่จุลินทรีย์เจริญและใช้สารอาหารนั้น(Impedance measurement)

4. <u>การวัดองค์ประกอบของเซลล์</u> (Measuring Cell Constituent)

วิธีที่ใช้กันมาก ได้แก่ การวัดปริมาณATP (Adenosine Triphosphate) ที่สร้างขึ้นในกระบวนการ energy metabolism ของจุลินทรีย์ วิธีอื่นๆ เช่น การวัดปริมาณendotoxin ซึ่งพบใน cell walls ของแบคทีเรียแกรมลบ (Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) test)

นอกจากนี้ การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น เช่น คะตะ เลส (Catalase) ก็เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียในตัวอย่างได้ โดยอาศัยหลักการที่ว่าเมื่อแบคทีเรียเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้น ปริมาณคะตะเลสที่สร้างก็จะเพิ่มขึ้นด้วย

วิธีการต่าง ๆ ที่กล่าวมาเหล่านี้มีข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกันไป วิธีการนับเซลล์ที่มีชีวิตเป็นวิธีการแบบดั้งเดิม (Conventional methods) และเป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้กันทั่วไป ซึ่งมีข้อด้อย คือใช้เวลานาน ประมาณ 1 ถึง 2 วัน ขึ้นไป ในการรอให้เชื้อเจริญเป็นโคโลนีที่มองเห็นได้ ส่วนวิธีการวัดกิจกรรมของเซลล์และวิธีการวัดองค์ประกอบของเซลล์ ถือเป็นวิธีการที่สามารถประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดได้รวดเร็ว แต่ส่วนใหญ่ต้องใช้สารเคมีและอุปกรณ์พิเศษที่มีราคาแพง แต่มีวิธีการหนึ่งที่สะดวก รวดเร็ว และใช้สารเคมีและอุปกรณ์ที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน นั่นคือ การวัดแอคติวิตีของคะตะเลสที่แบคทีเรียสร้างขึ้น

เอนไซม์คะตะเลส

Catalase (hydrogen peroxide : hydrogen peroxide oxidoreductase ; EC 1.11.1.6) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตที่ต้องการอากาศในการเจริญ หน้าที่ของคะตะเลสคือ ป้องกันเซลล์จากความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยกระตุ้นปฏิกิริยาการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังสมการ

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

โครงสร้างของคะตะเลสมีลักษณะเป็น tetramer คือประกอบด้วย 4 subunits แต่ละ subunit ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวเชื่อมต่อกับ prosthetic group ที่เป็น high-spin ferric protoporphyrin IX ปกติแล้วคะตะเลสจะเสถียรที่ pH ระหว่าง 3 ถึง 10 การทำให้โปรตีนเสียสภาพโดยการแตกตัว จะเกิดที่ pH รุนแรง โดยมีพวก detergents อยู่ด้วย (Wong, 1995)

คะตะเลส สามารถทำปฏิกิริยาได้ 2 แบบ คือ

1. Catalatic reaction

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

เป็นปฏิกิริยา oxidation ที่มีการถ่ายทอดอิเล็กตรอน 2 ตัว

2. Peroxidatic reaction

$$H_2O_2 + RCH_2OH \rightarrow RCHO + 2\ H_2O$$

เป็นปฏิกิริยา oxidation ที่มีการถ่ายทอดอิเล็กตรอน 1 ตัว

ในสภาวะปกติจะอยู่ในลักษณะ catalatic reaction แต่ในกรณีที่มีปริมาณเปอร์ออกไซด์ต่ำมาก จึงจะแสดงปฏิกิริยาแบบ peroxidatic reaction โดยมี hydrogen donor เป็น methanol, ethanol และ phenol

<u>กลไกการเกิดปฏิกิริยาของคะตะเลส แบบCatalatic reaction</u> (Wong, 1995)

ในปัจจุบัน การศึกษามักมุ่งความสนใจไปที่ bovine liver catalase อย่างกว้างขวาง ปฏิกิริยาโดยรวมของคะตะเลสจะประกอบด้วยคะตะเลส 1 โมล ทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 2 โมล ได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นน้ำ และออกซิเจน กลไกของปฏิกิริยาอธิบายได้ว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ประกอบด้วยกิจกรรมทั้งแบบ oxidizing และ reducing โดยมีการถ่ายทอดอิเล็กตรอน 2 ตัว ในแต่ละกระบวนการ แสดงได้ดังสมการ

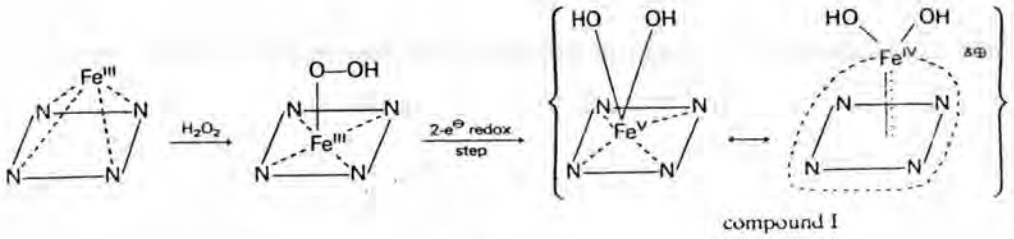
1) Oxidation ของ native ferric enzyme เป็น catalase compound I โดยสับสเตรทไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ถูก reduced เป็นน้ำ

$$En - Fe(III) + H_2O_2 \rightarrow En - Fe(IV) = O^{+} + H_2O$$

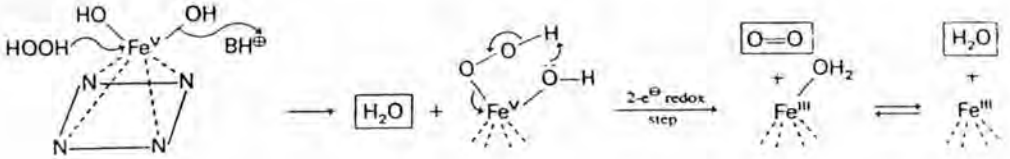
2) Reduction ของ compound I กลับไปเป็น native ferric enzyme โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ถูก oxidized เป็นออกซิเจน

$$En - Fe(IV) = O^{+} + H_2O_2 \rightarrow En - Fe(III) + O_2$$

ปฏิกิริยาของคะตะเลสเป็นแบบ first-order ปริมาณของสับสเตรทเปอร์ออกไซด์ที่สลายตัวจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของทั้งสับสเตรทเอง และของเอนไซม์ กลไกการเกิดปฏิกิริยาของคะตะเลสสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 1 และ รูปที่ 2



รูปที่ 1 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ตัวที่หนึ่งทำปฏิกิริยากับคะตะเลส เกิดcompound I



รูปที่ 2 compound I ทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ตัวที่สอง และ สลายกลายเป็นผลิตภัณฑ์ (จาก Walsh , 1979)

<u>การสร้าง Compound I และ ปฏิกิริยา Reduction ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์</u>

ปฏิกิริยาแรก คือ ปฏิกิริยาoxidation ผ่าน electron 2 ตัว ของ ferric enzyme เป็น compound I ซึ่งมีโครงสร้างเป็น π-cation radical ของ [O = Fe (IV) – porphyrin]$^{+}$ อัตราเร็วปฏิกิริยาในการเกิด compound I เมื่อมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสับสเตรท เท่ากับ 6×10^{6} $M^{-1}s^{-1}$ เปอร์ออกไซด์อื่น ๆ เช่น alkyl หรือ acyl peroxides สามารถเป็นสับสเตรทได้เช่นกัน แม้ว่าจะมีอัตราเร็วปฏิกิริยาที่ต่ำกว่ามาก (ตารางที่ 1) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้ในกรณีนี้ คือ แอลกอฮอล์ [En – Fe (III) + R – OOH $\rightarrow$ En – Fe (IV) = O^{+} + ROH] อัตราการเกิดปฏิกิริยา

ที่ต่ำของสับสเตรทกลุ่มนี้อธิบายได้โดยหลักความจริงที่ว่า โมเลกุลของสารเหล่านี้ มีความจำกัดต่อการเข้าทำปฏิกิริยากับ heme

ตารางที่ 1 Rate Constants ของคะตะเลสใน Enzymatic Cycle

Substrate	Rate Constants ($M^{-1}s^{-1}$)	
	k_1 Formation of compound I	k_4^I Reduction of compound I
H_2O_2 / H_2O_2	6×10^6	3.5×10^7
CH_3OOH / CH_3OH	8.5×10^6	830
CH_3CH_2OOH / CH_3CH_2OH	2×10^4	1020
$CH_3(CH_2)_2OOH$ / $CH_3(CH_2)_2OH$	5.5×10^3	6.5
$HOCH_2OOH$ / $HOCH_2OH$	3×10^4	1200

(จาก Schonbaum และ Chance (1976) อ้างถึงใน Wong (1995))

ปฏิกิริยา Reduction ของ Catalase Compound I

Catalase Compound I ทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 2 โมเลกุล เพื่อให้ catalatic cycle สมบูรณ์ ทำให้กลับเป็น native enzyme และ เกิดออกซิเจนและน้ำขึ้น

Catalase Compound II

Catalase Compound I สามารถถูกเปลี่ยนไปเป็น compound II ได้ ผ่านปฏิกิริยา reduction ของ electron 1 ตัว โดยสับสเตรทที่เฉพาะ เช่น ferrocyanide, ascorbic acid และ phenols Catalase compound II เป็น oxidant ที่เสว และอยู่ใน inactive form

<u>กลไกการเกิดปฏิกิริยาของคะตะเลสแบบPeroxidatic reaction</u>

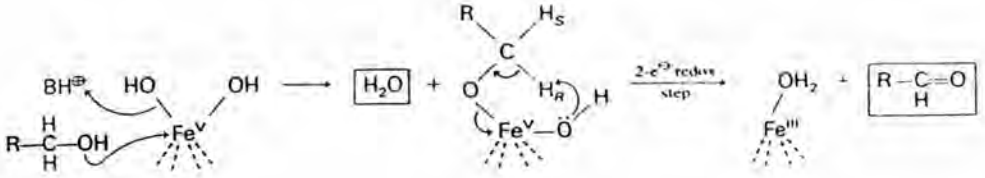
Catalase Compound I สามารถทำปฏิกิริยากับ electron donor substrate อื่น ๆ ด้วย เช่น alkyl หรือ acyl alcohols แต่มีอัตราค่าคงที่ต่ำกว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1) ในปฏิกิริยาเหล่านี้ แทนที่ H_2O จะเป็น hydrogen donor กลับเป็นแอลกอฮอล์ที่จะถูก oxidized เป็น aldehydes ดังสมการ

$$En - Fe(III) + H_2O_2 \rightarrow En - Fe(IV) = O^+ + H_2O$$

$$En - Fe(IV) = O^+ + RCH_2OH \rightarrow En - Fe(III) + RCHO + H_2O$$

ปฏิกิริยารวม $H_2O_2 + RCH_2OH \rightarrow RCHO + 2H_2O$

ปฏิกิริยารวมแสดงให้เห็นกระบวนการ peroxidase – catalyzed โดยอิเล็กตรอนสำหรับปฏิกิริยา reduction ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้มาจากสับสเตรทตัวที่สอง ซึ่งในกรณีนี้คือแอลกอฮอล์ (แม้ว่า 2 - electron step reduction ของ compound I จะรวมอยู่ด้วย) ดังนั้นขั้นแรกจะรวมการสร้าง compound I กับปฏิกิริยา reduction ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำ ดังที่กล่าวมาแล้วในกลไกการเกิดปฏิกิริยาแบบ catalatic แต่ความแตกต่างจะเห็นได้ในขั้นที่สอง



รูปที่ 3 ปฏิกิริยาalcohol oxidation ซึ่ง alcohol เข้าทำปฏิกิริยากับคะตะเลสแทนcompound I (จาก Walsh, 1979)

ในกรณีที่แอลกอฮอล์เป็น hydrogen donor อัตราคงที่ k_4' สำหรับปฏิกิริยา reduction ของ compound I มีค่าประมาณ 1×10^3 $M^{-1}s^{-1}$ สำหรับ methanol และ ethanol ซึ่งต่ำกว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1) สำหรับปฏิกิริยา oxidation ของไฮโดรเจน

เปอร์ออกไซด์ใน catalatic cycle ไฮโดรเจน 2 อะตอม และ ออกซิเจน 2 อะตอม สมมูลย์กัน (H:O:O:H) ในปฏิกิริยา oxidation ของ alkyl หรือ acyl alcohols ตำแหน่งของโมเลกุลสับสเตรทจะจำกัดมากขึ้น และผลที่สุดก็คือปฏิกิริยาเป็น Stereospecific กับ pro-R hydrogen selectively abstracted เหมือนกับที่เกิดใน alcohol dehydrogenase

มีข้อสังเกตว่า เมื่อไม่มี hydrogen donors Compound I จะทำปฏิกิริยากับ organic hydroperoxides ด้วย ได้ผลผลิตเป็น compound II และ radical ซึ่งเร่งการทำลายเอนไซม์

$$E - Fe(III) + ROOH \rightarrow E - Fe(IV) = O^{+} + ROH$$

$$E - Fe(IV) = O^{+} + ROOH \rightarrow Fe(IV) = O + ROO + H^{+}$$

<u>ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาของคะตะเลส</u>

ผลของ pH

Bonnichsen (1947) ศึกษาอัตราการเกิดปฏิกิริยาของคะตะเลสในเลือดม้าที่ pH ต่าง ๆ พบว่า การสร้าง และ การสลายตัวของ compound I จะคงที่ในช่วง pH 3 ถึง 9 เหตุที่ไม่พบการยับยั้งปฏิกิริยาของคะตะเลสทันทีอย่างเด่นชัดในสภาวะกรดอาจเนื่องจากเกิด catalase-hydrogen compound II ขึ้น นอกจากนี้พบว่า แอคติวิตีจะสูญเสียมากขึ้นเมื่อมีสับสเตรทอยู่ด้วย ซึ่งสาเหตุยังไม่ทราบชัดเจน ต่อมา Chance (1952) แสดงผลของปฏิกิริยา catalatic โดยรวมที่ลดลงเมื่อ pH มากกว่า 9 โดยเสนอว่า pH มีผลต่อโครงสร้างและการแตกตัวของออกซิเจนจาก compound I ถ้ากลไกการยับยั้งโปรตีนของคะตะเลสเนื่องจากการแตกตัวที่ผันกลับได้บางส่วนไปเป็น subfragments สามารถตรวจนับได้ อัตราเร็วปฏิกิริยาของcompound I ที่คำนวณได้จะคงที่ไปจนถึง pH 12

ผลของอุณหภูมิ

ผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาแบบ catalatic อาจเกิดเนื่องจากการสร้าง และการสลายตัวของ compound I ตามที่ Bonnichsen , Chance และ Theorell (1947) รายงานว่าคะตะเลสมี

ค่า Q_{10} เท่ากับ 1.1 และ พลังงานกระตุ้นมีค่าเท่ากับ 1700 $\pm$ 100 แคลอรี ซึ่งเท่ากับเอนไซม์มีประสิทธิภาพจับกับสับสเตรทร้อยละ 6 แต่ Strother และ Ackerman (1961) พิจารณาผลการทดลองดังกล่าวว่ามีความผิดพลาดเพราะ ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำมาก โดยใช้กลีเซอรอลเป็นสารป้องกันการแข็งตัว ทำให้อัตราเร็วทั้งหมดในการสร้าง compound I ไม่ได้อยู่ในรูปความสัมพันธ์แบบ Q_{10} สภาวะคงที่ของ compound I จะสูงสุดและคงที่ที่ประมาณ - 4 ถึง 26 องศาเซลเซียส แต่จะลดลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิอื่นนอกจากขอบเขตนี้

ผลของความเข้มข้นของสับสเตรท

อัตราการสลายตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยคะตะเลส จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอนไซม์โดยตรง แต่ความสัมพันธ์จะซับซ้อนกว่านั้น George (1948) รายงานว่าปฏิกิริยาของคะตะเลสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.06 โมล อัตราการสลายตัวจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้น ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.06 ถึง 0.08 โมล อัตราการสลายตัวจะเกิดสูงสุด และเมื่อความเข้มข้นสูงกว่า 0.08 โมล อัตราการสลายตัวจะลดลง Ogura (1955) ใช้คะตะเลสบริสุทธิ์จากตับม้าทำปฏิกิริยาโดยแปรความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปในช่วงต่าง ๆ พบว่าอัตราของปฏิกิริยาเป็นไปตาม first order reaction และสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสับสเตรท

<u>วิธีตรวจสอบแอคติวิตีของคะตะเลส</u>

แอคติวิตีของคะตะเลสสามารถตรวจสอบได้หลายวิธี ซึ่งทุกวิธีเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการวัดแอคติวิตีของคะตะเลสในค่าของ Katalase – fahigkeit (Kat.F)

Titrimetric Method (Voneuler และ Josephson, 1926)

เป็นวิธีที่ถือว่าดีที่สุดในการตรวจสอบคะตะเลสบริสุทธิ์ และ คะตะเลสที่บริสุทธิ์บางส่วน (partially purified catalase) มีขั้นตอนคือ ผสมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กับ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แล้วทำให้เย็นถึง 0 องศาเซลเซียส เติมสารละลายคะตะเลสลงทำปฏิกิริยาในหลอดทดสอบแล้วคนอย่างแรง เก็บตัวอย่างสารละลายที่เกิดปฏิกิริยาแล้ว 5 มิลลิลิตร ที่เวลา 3, 6, 9 และ

12 นาที โดยหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างมาไตเตรตด้วยสารละลายเปอร์แมงกาเนต เข้มข้น 0.005 นอร์มอล จนถึงจุดยุติจะเกิดสีชมพู คำนวณแอคติวิตีได้ตามสมการ

$$K = (2.303 / t) \text{ Log } (X_o / X_t) \text{ min}^{-1} \text{ at } 0^\circ \text{ c}$$

t : time

X_o : titration value in o time

X_t : titration value in t time

$$\text{Kat . F} = K / W$$

W : จำนวนกรัมน้ำหนักแห้งของคะตะเลส

Spectrophotometric Method (Chance และ Herbert, 1950)

เป็นวิธีตรวจสอบแอคติวิตีของคะตะเลสโดยการวัดการลดลงของการดูดกลืนแสงในช่วง 230 ถึง 250 นาโนเมตร เนื่องจากการสลายตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยคะตะเลส วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ ใช้ได้กับสารละลายคะตะเลสที่มีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะไม่รบกวนการดูดกลืนแสงในช่วงดังกล่าว วิธีการคือ ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 1 ต่อ 500 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และสารละลายคะตะเลส 1 ไมโครลิตร โดยปรับความเข้มข้นของคะตะเลสให้ได้ประมาณ 1 ต่อ 2 ของเปอร์ออกไซด์ที่ถูกสลายใน 30 วินาที วัดการดูดกลืนแสงที่เวลา 0, 10, 20, 30, 50 และ 70 วินาที คำนวณแอคติวิตีได้ตามสมการ

$$K = (2.3 / t_2 - t_1) \text{ Log } (X_1 / X_2)$$

t_1 และ t_2 คือ เวลาที่ใช้ในการวัดการดูดกลืนแสงที่อ่านค่า X_1 และ X_2 ตามลำดับ

$$Kat . F = 60 K / 2.3 W$$

W : จำนวนกรัมของคะตะเลสในปฏิกิริยาสุดท้ายของสารละลายของผสม 50 มิลลิลิตร

Manometric Methods (George, 1948)

เป็นวิธีการที่อาศัยการวัดปริมาณออกซิเจนที่เกิดจากปฏิกิริยาของคะตะเลสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยบันทึกเป็นไมโครลิตรของออกซิเจนต่อนาที เทคนิคนี้มักใช้ในการหาค่าคงที่ของความเร็วปฏิกิริยา George (1948) ใช้วิธีที่เรียกว่า " Boat Technique " โดยใช้ Barcroft manometer และ pressure– gauge ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ ผลของ pH ที่มีต่อการสลายตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยคะตะเลส

Colorimetric Method (Asru , 1972)

หลักการของวิธีนี้ คือ การวัดอัตราการสลายตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยคะตะเลสที่เวลาต่าง ๆ โดยหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายไดโครเมตในกรดอะซิติก (dichromate / acetic acid mixture) เมื่อถูกต้มให้ร้อนในปฏิกิริยาที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารละลายนี้จะสลายตัวเป็น chromic acetate และ เปลี่ยนรูปเป็น perchromic acid ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่ไม่เสถียร สามารถวัดสีได้ที่ความยาวคลื่น 570 ถึง 610 นาโนเมตร คำนวณแอคติวิตีได้ตามสมการ

$$K = 1 / t \ (\text{Log} \ S_o / S)$$

S_o : ความเข้มข้นของเปอร์ออกไซด์เริ่มต้น

S : ความเข้มข้นของเปอร์ออกไซด์ที่เวลา t

$$Kat . F = K (0) / (\text{gm protein / ml})$$

บทบาทของคะตะเลสในการต้านความเป็นพิษของออกซิเจนต่อเซลล์

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ถูกสร้างโดยเซลล์ด้วยปฏิกิริยา reduction ของ electron 2 ตัว โดยมี flavoproteins เป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยา ออกซิเจนส่วนใหญ่ซึ่งอยู่ในสภาวะ ground state ที่มีในระบบชีววิทยา จะถูก reduced ไปเป็นน้ำ ดังสมการ

$$O_2 + 4\,H^+ \rightarrow 2\,H_2O$$

ออกซิเจนที่เหลือบางส่วนจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ ซูเปอร์ออกไซด์ ได้โดยกลไกต่าง ๆ ดังสมการ

$$O_2 + 2\,e^- \rightarrow H_2O_2$$
$$O_2 + 1\,e^- \rightarrow O_2^-$$

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็น oxidant ที่ดี แต่ตัวมันเพียงอย่างเดียวจะไม่เป็นอันตราย ส่วน ซูเปอร์ออกไซด์ แม้จะเป็น oxidant ที่ไม่ค่อยดี และเป็นอนุมูลอิสระที่อ่อน แต่ซูเปอร์ออกไซด์ที่มีอยู่ในเซลล์นั้นสามารถสร้างเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ $OH^\bullet$ ได้ โดยการทำงานของ Liganded divalent Transitional Metal (L- d TM) เช่น Ferric ion ดังสมการ

$$O_2^- + H_2O_2 + L-d\,TM \rightarrow 2\,OH^\bullet$$

$OH^\bullet$ เป็นอนุมูลอิสระที่แรง ซึ่งเป็นพิษต่อแบคทีเรีย และสามารถเป็นตัวเริ่มต้นในปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ กับองค์ประกอบเซลล์

$$OH^\bullet + X_{\text{cell component}} \rightarrow X^\bullet$$

กลไกต่อต้านการเกิด $OH^\bullet$ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเซลล์โดยทั่วไป คือ การสร้าง superoxide dismutase (SOD) และคะตะเลส (ตารางที่ 2) ซึ่งจะพบแอคติวิตีของคะตะเลสมากที่สุดในอวัยวะ ตับ และ ไต ของสัตว์ ส่วนในแบคทีเรียพบว่า aerobic bacteria ส่วนใหญ่ และ

facultative anaerobic bacteria บางชนิด สามารถสร้างคะตะเลสได้ และพวก obligate anaerobes ทุกชนิดไม่สร้างคะตะเลส แต่พบว่าแบคทีเรียบางชนิดที่ไม่สร้างคะตะเลสในสภาวะปกติ สามารถทำให้สร้างคะตะเลสได้โดยการเลี้ยงในอาหารที่เติม hematin (Whittenbury ,1964)

ตารางที่ 2 แอคติวิตีของSuperoxide dismutase (SOD) และคะตะเลส ในจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

Organism	Specific activity (U / mg)	
	SOD	catalase
Aerobes :		
Escherichia coli	1.8	6.1
Salmonella typhimurium	1.4	2.4
Rhizobium japonicum	2.6	0.7
Micrococcus radiodurans	7.0	289
Pseudomonas species	2.0	22.5
Aerotolerant anaerobes :		
Eubacterium limosum	1.6	0
Streptococcus faecalis	0.8	0
Streptococcus lactis	1.4	0
Clostridium oroticum	0.6	0
Lactobacillus plantarum	0	0
Strict anaerobes :		
Veillonella alcalescens	0	0
Clostridium pasteurianum	0	0
Clostridium butyricum	0	0
Clostridium sticklandii	0	0
Butyrivibrio fibrisolvens	0	0.1

(จาก Gottschalk, 1986)

การสังเคราะห์คะตะเลสในเซลล์แบคทีเรีย

งานวิจัยหลายชิ้นได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อแอคติวิตีของคะตะเลสในเซลล์จุลินทรีย์ Finn และ Condon (1975) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมการสังเคราะห์คะตะเลสในแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter aerogenes* และ *Escherichia coli* พบว่า specific activity ของคะตะเลสจะลดลงระหว่างช่วง logarithmic phase ของการเจริญ และเพิ่มขึ้นเมื่อเข้าสู่ช่วง stationary phase การสังเคราะห์คะตะเลสในเซลล์ *S. typhimurium* ที่เพิ่มขึ้นในช่วงท้ายของ exponential phase จะเกิดขึ้นพร้อมกับการที่ pH ของระบบลดลง แต่ทั้งนี้หากควบคุม pH ให้คงที่อยู่ในช่วงเป็นกลาง คือ pH 7.0 ก็จะทำให้การสังเคราะห์คะตะเลสไม่แปรผันไป นอกจากนี้ยังรายงานว่า การเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในช่วง 1 ไมโครโมล ถึง 2 มิลลิโมล ระหว่างการเจริญช่วง exponential phase ของ *S. typhimurium* culture จะเป็นการกระตุ้นการสังเคราะห์คะตะเลสโดยพบสร้างสูงสุดถึง 80 ไมโครโมล ทั้งนี้ได้เสนอสมมติฐานเพื่ออธิบายผลของการกระตุ้นเมื่อเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นี้ว่าเป็นผลเนื่องจากสารอื่นที่เกิดขึ้นหลังการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในระบบ โดยพิจารณาจากเวลาที่ข้าลงก่อนที่จะตรวจสอบการสังเคราะห์คะตะเลสได้ เป็นเวลา 10 ถึง 15 นาที หลังจากเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงใน *S. typhimurium* เวลาที่ข้าลงไปนี้ยาวนานกว่าที่จะพบโดยทั่วไปในพวก enteric bacteria อื่น ๆ เช่น ในกรณีการเหนี่ยวนำของ β - galactosidase ใน *E. coli* ใช้เวลาเพียง 80 ถึง 90 วินาที แม้ว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ส่วนใหญ่จะถูกสลายโดยคะตะเลส และเปอร์ออกซิเดสที่มีอยู่บ้างใน 2 นาทีแรกหลังจากการเติมลงไป แต่ในกรณีนี้ messenger ribonucleic acid สำหรับคะตะเลสมักจะไม่เสถียร และคาดว่าสารประกอบบางอย่างที่สังเคราะห์ขึ้นหลังจากเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงใน exponential growing cell น่าจะเป็นตัวเหนี่ยวนำที่แท้จริงของการสังเคราะห์คะตะเลสในเซลล์แบคทีเรีย Marie และ Parak (1980) รายงานว่าการเติม heme precusors จะเพิ่มแอคติวิตีของคะตะเลส แต่การเติมกลูโคสจะให้ผลตรงกันข้าม ซึ่งผลในลักษณะเดียวกันนี้รายงานโดย Hassan และ Fridovich (1978) เช่นกัน และรายงานด้วยว่าการเจริญของ *E. coli* เมื่อมี adenosine 3', 5' – cyclic monophosphoric acid (cAMP) 8 มิลลิโมล อยู่ด้วย จะช่วยลดผลกระทบของกลูโคสได้ และกล่าวว่าการควบคุมกลไกของ catalase biosynthesis ในเซลล์ *E. coli* นี้เป็นตัวอย่างหนึ่งของ catabolite repression

Jones และ Suggett (1968) ตรวจสอบการสร้างคะตะเลสของแบคทีเรีย *Serratia sp.* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว พบว่าในช่วงที่แบคทีเรียยังอายุน้อย จะพบคะตะเลสเฉพาะในเซลล์ โดยไม่พบ

คะตะเลสในส่วนที่กรองได้จาก culture เลย แต่เมื่อแบคทีเรียอายุมากขึ้น จะพบคะตะเลสในส่วนที่กรองได้จาก culture มากขึ้นด้วย แต่ก็น้อยกว่าคะตะเลสภายในเซลล์เสมอ

ปริมาณของคะตะเลสที่แบคทีเรียสังเคราะห์ได้จะขึ้นกับสายพันธุ์ด้วย Charbonneau, Therrien และ Gagnon (1975) ศึกษาการสร้างคะตะเลสในแบคทีเรีย 13 สปีชีส์ ทั้งด้านคุณภาพและปริมาณ พบว่าภายใต้ภาวะที่ทำการทดลอง *Bacillus megaterium* จะผลิตคะตะเลสสูงสุด *Bacillus cereus*, *Sarcina lutea* และ *Micrococcus luteus* ผลิตได้ปริมาณใกล้เคียงกัน แต่น้อยกว่า *B. megaterium* มาก ส่วน *Salmonella*, *Shigella* และ *Escherichia* เป็นกลุ่มที่ผลิตได้ปริมาณน้อยที่สุดในจำนวนทั้งหมดที่ศึกษา ส่วนงานวิจัยของ Wang และ Fung (1986) พบว่า *M. luteus* สร้างคะตะเลสได้มากที่สุด รองมาคือ *Pseudomonas fluorescens* และ *Staphylococcus aureus* ส่วน *E. coli* และ *B. cereus* สร้างได้น้อยเป็นอันดับสาม และ *Salmonella typhimurium* จะสร้างได้ในปริมาณน้อยที่สุดของแบคทีเรียที่ศึกษา

Catalase Test

มีการศึกษาการตรวจสอบแอคติวิตีของคะตะเลสเพื่อวัตถุประสงค์ต่างๆ กัน โดยใช้อุปกรณ์และวิธีการที่หลากหลายออกไป เช่น

- ตรวจสอบเพื่อเป็น screening test ในผู้ป่วยที่ปัสสาวะติดเชื้อ (bacteriuria) หรือภาวะนิ่วในไต (pyelonephritis) (Lie, 1967)
- ตรวจสอบเต้านมอักเสบในน้ำนมวัวได้เนื่องจากมี bacteria และ neutrophil granulocytes อยู่ในตัวอย่าง (Willitts, 1965)
- ตรวจสอบ end-point temperature ของเนื้อสัตว์ที่ผ่านการให้ความร้อน (Ang และคณะ, 1994)

การทดสอบคะตะเลสได้ถูกนำมาใช้เพื่อเป็นวิธีที่รวดเร็วสำหรับประมาณจำนวนจุลินทรีย์ในอาหารเฉพาะหลายชนิด แม้ว่าสามารถแบ่งจุลินทรีย์ออกได้เป็นพวก catalase positive และ catalase negative และทั้ง 2 กลุ่มต่างก็มีความสำคัญในทางจุลชีววิทยาอาหาร แต่ภายใต้ภาวะการเก็บอาหารที่แน่นอนภาวะหนึ่ง ๆ จะมีจุลินทรีย์เฉพาะกลุ่มเท่านั้นที่เจริญเป็นpredominants อยู่ ซึ่งอาหารที่เน่าเสียได้ง่าย เช่น เนื้อสัตว์ต่าง ๆ ส่วนใหญ่มีการเก็บรักษาอยู่ในภาวะแช่เย็นและ

มีอากาศ ซึ่งจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหารเหล่านี้คือพวก psychrotrophs ต่าง ๆ ก็จะให้ผลการทดสอบคะตะเลสเป็นบวก (Fung , 1994)

วิธีการและอุปกรณ์ที่ใช้ตรวจสอบแอคติวิตีของคะตะเลสจากจุลินทรีย์

Capillary tube catalase test (Fung และ Petrishko , 1973)

เป็นวิธีง่าย ๆ ให้ผลเป็นระดับกึ่งปริมาณ (semiquantitative) เท่านั้น วิธีการคือ ใช้หลอด capillary ที่บรรจุไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 % แตะที่ผิวของโคโลนีเดี่ยวที่ต้องการทดสอบ ปริมาณของออกซิเจนที่เกิดขึ้นในหลอด capillary จะเป็นสิ่งแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่ทดสอบนั้นสามารถสร้างคะตะเลสได้ในระดับใด

Catalase detection tube method (Fung , 1985)

วิธีการคือ ใช้ pasteur pipette ซึ่ง sealed ปิดปลายทางด้านแคบแล้ว ดูดสารละลายตัวอย่าง 0.05 มิลลิลิตร เข้าทางด้านกว้างของปิเปต เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3% ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน แล้วสะบัดให้สารละลายทั้งหมดเข้าไปสู่ส่วนแคบของปิเปตทิ้งไว้ 5 นาที แล้วกลับปิเปตให้ตั้งขึ้น แรงตึงผิวจะทำให้สารละลายยังคงอยู่ในส่วนบนที่แคบของปิเปตได้ จากนั้นวัดปริมาตรของออกซิเจนที่เกิดสะสมอยู่บริเวณปลายปิเปต โดยใช้ micrometer รายงานผลในรูปเปอร์เซ็นต์ของ total column เพื่อลดความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากปิเปตที่ใช้มีเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เท่ากัน ดังนี้

$$\% \text{ gas column} = \frac{\text{gas column}}{\text{total column}} \times 100$$

ค่า % gas column สามารถนำมาแปรผันเป็นจำนวนแบคทีเรียได้โดยนำตัวอย่างชุดเดียวกันไปหา total plate count แล้วนำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง % gas column กับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/ml)

Catalasemeter (Gagnon และคณะ, 1977)

เป็นเครื่องมือสำหรับวัดปริมาณของคะตะเลสในตัวอย่างในรูปของเวลาที่เกิดปฏิกิริยา โดยการทำงานของ Catalasemeter จะเริ่มขึ้นเมื่อใส่แผ่น paper disc ที่ดูดซับสารละลายตัวอย่างไว้ลงในหลอดทดสอบของเครื่องมือซึ่งบรรจุสับสเตรทของคะตะเลสคือโฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไว้แล้วจมตัวลงสู่ก้นหลอด ถ้าในตัวอย่างมีคะตะเลสจะทำให้เกิดออกซิเจนขึ้น ฟองก๊าซจะจับอยู่กับแผ่น paper disc และทำให้แผ่น paper disc ลอยขึ้นสู่ผิวหน้าของสารละลาย เครื่องมือจะจับเวลาเป็นวินาที ตั้งแต่แผ่น paper disc เริ่มจมตัวลงสู่ก้นหลอด แล้วลอยกลับขึ้นมาสู่ผิวหน้าของสารละลายอีกครั้ง เรียกเวลานี้ว่า Flotation Time (FT) มีหน่วยเป็นวินาที สามารถนำค่า FT มาแปรผันกลับเป็นความเข้มข้นของคะตะเลสในตัวอย่าง หรือเป็นจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างได้โดยการเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) สำหรับกรณีที่ใช้ประมาณจำนวนจุลินทรีย์การที่มีจำนวนจุลินทรีย์อยู่ในระดับสูง ค่าFT จะสั้น และในทางกลับกันค่า FT จะยาวนานถ้ามีจำนวนจุลินทรีย์อยู่ในระดับต่ำ และถ้าต่ำมากถึงระดับหนึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะไม่สามารถทำให้แผ่น paper disc ลอยกลับขึ้นมาจากก้นหลอดได้

Gagnon และ คณะ (1959) พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคะตะเลสบริสุทธิ์กับFT เป็นแบบเส้นตรงและมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ $\pm$ 0.076 การเติม EDTA เข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ลงในสารละลายโฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะช่วยกำจัดไอออนของโลหะหนักที่รบกวนปฏิกิริยาของคะตะเลส (Dodds และ คณะ , 1983) ทำให้ Catalasemeter มี Sensitivity ต่อคะตะเลสดีขึ้น โดยพบว่ามีค่า correlation coefficient (r) สูงถึง – 0.99 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.99 เปอร์เซ็นต์ (Wang และ Fung, 1986) นอกจากนี้พบว่าความแตกต่างของสายพันธุ์แบคทีเรียจะทำให้มีความสามารถในการสร้างคะตะเลสได้แตกต่างกันด้วย โดยแบคทีเรียที่สร้างคะตะเลสได้ปริมาณมากจะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ทั้งหมดกับ FT ได้ดีกว่า และสามารถใช้ Catalasemeter เริ่มตรวจสอบได้ที่จำนวนเซลล์น้อยกว่าด้วย (Charbonneau และคณะ, 1975; Wang และ Fung ,1986) เมื่อใช้ Catalasemeter ในการตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมดิบ พบว่าจะตรวจสอบได้เมื่อมีจำนวนแบคทีเรียมากกว่า 1×10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (Lonne, 1969) แต่ถ้าน้ำนมดิบนั้นมีแบคทีเรียชนิดที่ไม่สร้างคะตะเลสเป็นส่วนใหญ่จะทำให้การตรวจสอบผิดพลาดไป จึงเป็นข้อจำกัดอย่างหนึ่งในการใช้ Catalasemeter ในการตรวจสอบคุณภาพน้ำนมดิบ ส่วนในอาหารชนิดอื่น พบว่า Catalasemeter ให้ค่า correlation coefficient (r) ที่ดีของ FT กับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และกับแบคทีเรีย psychrotrophs จากตัวอย่างผิวเนื้อไก่แช่เย็น คือ

r = - 0.93 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.99% โดยกำจัดคะตะเลสรบกวนจากเลือดที่ติดมาบนผิวเนื้อไก่ด้วยการปรับสภาวะให้เป็นกรดที่ pH 3.30 (Wang และ Fung , 1986) Boismenu และคณะ (1991) ตรวจสอบแอคติวิตีของคะตะเลสจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ที่แยกได้จากเนื้อปลา cod โดยใช้ Catalasemeter พบว่าการเพิ่มขึ้นของแอคติวิตีของคะตะเลสสัมพันธ์กับการเพิ่มของจำนวนแบคทีเรีย โดยมีค่า r = 0.958 และปรับปรุงเทคนิคการวิเคราะห์โดยการเติม Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 0.05% ลง ใน buffer solution ที่ใช้แยกจุลินทรีย์จากตัวอย่าง ซึ่ง SDS จะช่วยลดอุณหภูมิที่ใช้ยับยั้งคะตะเลสรบกวนจากเนื้อปลา cod ลงจาก 41 องศาเซลเซียส (Boismenu และคณะ , 1990) เหลือเพียง 37 องศาเซลเซียส แต่ทั้งนี้ไม่ได้อธิบายเหตุผลไว้