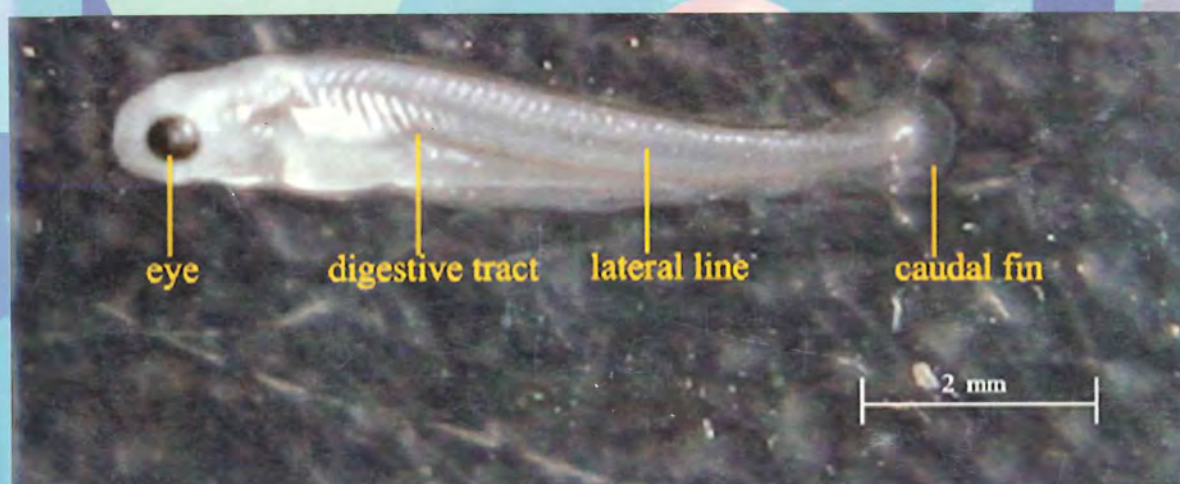
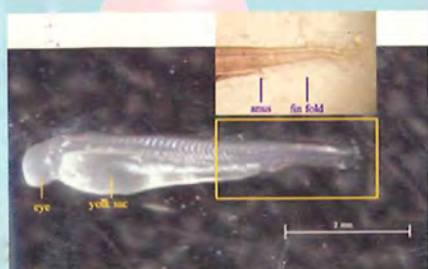






วารสาร
วิทยาศาสตร์ปูช
KKU SCIENCE JOURNAL

ISSN 0125 - 2344

เจ้าของ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สำนักงาน

คณะวิทยาศาสตร์ ตึก 6 มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อ.เมือง จ.ขอนแก่น 400002

โทรศัพท์ 0-4320-2372 โทรสาร 0-4320-2371

วัตถุประสงค์

1. เพื่อส่งเสริมและเผยแพร่วิทยาการในสาขาวิชาต่าง ๆ ทางด้านวิทยาศาสตร์
2. เพื่อเผยแพร่ผลงานทางด้านการวิจัย และการศึกษา ค้นคว้าของอาจารย์และนักศึกษา
3. เพื่อเป็นสื่อกลางการแลกเปลี่ยนความรู้ และแนวความคิดทางวิชาการระหว่างอาจารย์ นักศึกษา และผู้สนใจ ทั้งภายในและภายนอกสถาบัน

กำหนดออก ปีละ 4 ฉบับ

- ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม
ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน
ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน
ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม

ที่ปรึกษา

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ละออศรี เสนาะเมือง)
รองคณบดีฝ่ายวิชาการ
(เอกพรณ สวัสดิ์จิตต์)

บรรณาธิการ

นฤมล แสงประดับ

กองบรรณาธิการ

กิตติกร นาคประสิทธิ์
งามนิจ อาจอินทร์
ชุติมา หาญจวนิช
ประเสริฐ แข่งขัน
สมปอง ธรรมศิริรักษ์
สมเดช กนกเมธากุล
สุพรรณี อึ้งปัญสัตวงศ์
เสาวนิต ทองพิมพ์
อัจฉราภรณ์ ภักดี
ธรรมพิเชษฐ แผงโยธา
สุภาพร พิมพ์วาปี

ฝ่ายศิลป์และภาพ

กิเลน ติณนเรศมธุ
สุชาติ เทพภูเขียว

ฝ่ายเศรษฐกิจ

บุญคุ้ม เหลือล้ำ

ฝ่ายจัดการและ เลขานุการ

ศุภลักษณ์ ทองปัน
สมศักดิ์ อุ่นจันทิ

**บทความและงานวิจัย
ได้รับการกลั่นกรอง
จากผู้ทรงคุณวุฒิ**

บทความหรือข้อคิดเห็นใด ๆ ในวารสารนี้เป็นของผู้เขียน ไม่จำเป็นต้องสอดคล้องกับทัศนะของกองบรรณาธิการ

วิทยาศาสตร์ชุมชน

K K U S C I E N C E J O U R N A L

ปีที่ 36 ฉบับที่ 2

Volume 36 Number 2

บรรณาธิการแถลง

บทความ

- ☐ การประยุกต์ใช้แสงซินโครตรอนในวิทยาศาสตร์การแพทย์
Application of synchrotron radiation in medical sciences
จรรวณ ศิริเทพทวี..... 81
- ☐ บทบาทของคาเทชินในชาเขียวต่อการลดปริมาณโคเลสเตอรอลในเลือด
Role of Green tea Catechins on Lower Plasma Cholesterol
จันทร์พร ทองเอกแก้ว..... 91
- ☐ พอลิฟีนอลออกซิเดส และการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลในผักผลไม้
เกียรติศักดิ์ ดวงมัลย์..... 97
- ☐ Review of Design and Analysis of Computer Simulated Experiments
Anamai Na-udom..... 106

งานวิจัย

- ❑ การจำแนกสปีชีส์ของสัตว์ในส่วนผสมเนื้อสัตว์
ด้วยเทคนิคพีซีอาร์เชิงซ้อน
Identification of Animal Species in
Meat Mixtures by Multiplex PCR Technique
กัญญา จิระเจริญรัตน์
ฐาปนา เขมณีพิรุณธ์
จุฑารัตน์ เศรษฐกุล.....

121
- ❑ การผลิตลิปิดจากจุลินทรีย์โดยยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูง
Microbial lipid production by locally
isolated oleaginous yeast
รัตนภรณ์ ลีสิงห์.....

129
- ❑ พัฒนาการของลูกปลานวลจันทร์
(*Cirrhinus microlepis*) วัยอ่อน
Development of *Cirrhinus microlepis* larvae
ชุดิมา หาญจวนิช ปรัชญา สนิท.....

139
- ❑ ประสิทธิภาพของวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบทั่วไป
ของการเลือกลำดับที่ของชุดตัวอย่างเมื่อจัดลำดับ
แบบสมบูรณ์
Efficiency of General Ranked Set Sampling
with Perfect Ranking
นวกา ปลูกปลื้ม
ชัชวาลย์ เรืองประพันธ์
อนันท์ ทวีวานิช.....

151



ISSN 0125-2364
วิทยาศาสตร์
KKU SCIENCE JOURNAL

Advisory Committee Dean, Faculty of Science
(La-Orsri Sanoamuang)
Associate Dean for Academic Affairs
(Ekaphan Swatsitang)

Publisher

Faculty of Science, Khon Kaen University,
Thailand.

Office

Faculty of Science, Building 6, Khon Kaen
University, Khonkaen Thailand, 40002
Tel. 0-4320-2372 Fax 0-4320-2371

Objectives

1. To promote dissemination of knowledge in all fields of science.
2. To publish research results of faculty, researchers and students.
3. To be a medium for the exchange of knowledge and ideas among faculty, researchers and students of Khon Kaen University and other institutions.

Publishing frequency

KKU Science Journal is a quarterly journal. Each volume consists of 4 numbers.

Number 1 January - March

Number 2 April - June

Number 3 July - September

Number 4 October - December

Editor

Narumon Sangpradub

Editorial Board

Kittikorn Nakpasit
Ngamnij Arch-int
Chutima Hanjavanit
Prasert Kaengkan
Sompong Thammasirirak
Somdej Kanokmedhakul
Supunnee Ungpansattawong
Soawanit Tongpim
Adcharaporn Pagdee
Thampichet Pangyotha
Suphaporn Phimwapi

Artists

Kilen Tinnoraset
Suchart Thepphukhieo

Treasurer

Boonkoom Lualon

Managing Staff

Suphaluk Tongpun

and Secretary

Somsak Unjantee

**All articles published in
KKU Science Journal have been
peer reviewed.**

บรรณารักษาร **แกลบ**

สวัสดีค่ะ ท่านผู้อ่านที่รักและเคารพทุกท่าน

ขอต้อนรับเปิดเทอมใหม่ ปีการศึกษา 2551 และขอแสดงความยินดีกับนักศึกษาชั้นใหม่ทุกท่านค่ะ วารสารฉบับนี้มีเรื่องน่าสนใจคับคั่งเช่นเดิม สำหรับเล่มหน้าก็สนุกไม่แพ้กัน ขอเชิญชวนทุกท่านส่งบทความมานะคะ นอกจากเป็นการแลกเปลี่ยนความรู้ และประสบการณ์วิทยาศาสตร์ร่วมกันแล้ว ยังเป็นแนวทางหนึ่งในการช่วยกระตุ้นให้เยาวชนสนใจวิทยาศาสตร์มากขึ้น พบกันใหม่ เดือนกันยายนค่ะ

บรรณารักษารวารสารวิทยาศาสตร์ มข.



การประยุกต์ใช้แสงซินโครตรอนในวิทยาศาสตร์การแพทย์

(Application of synchrotron radiation in medical sciences)

จารุวรรณ ศิริเทพทวี¹

บทนำ

แสงไม่เพียงแต่จะมีความสำคัญต่อการดำรงชีพของมนุษย์เท่านั้น แสงยังมีประโยชน์ต่อการค้นคว้า วิจัยทางวิทยาศาสตร์เป็นอย่างมาก เนื่องจากแสงทำให้เราเห็นภาพของสิ่งต่างๆ ตั้งแต่สิ่งที่มีขนาดเล็กระดับอะตอม ไปจนถึงสิ่งที่มีขนาดใหญ่ อย่างเช่น จักรวาล การเลือกชนิดของแสงในการศึกษานั้นต้องสัมพันธ์กับขนาดของวัตถุที่ต้องการศึกษาด้วย แสงมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันไปขึ้นกับช่วงความยาวคลื่นของแสง ได้แก่ คลื่นวิทยุ คลื่นไมโครเวฟ รังสีใต้แดง (Infrared) แสงในช่วงที่ตามองเห็นตั้งแต่แสงสีแดงจนถึงแสงสีม่วง (สีของรุ้งกินน้ำ) รังสีเหนือม่วง รังสีเอกซ์ (X-ray) และรังสีแกมมา

การพัฒนาเทคโนโลยีสมัยใหม่ การสร้างวัสดุใหม่ๆ การรักษาสสิ่งแวดล้อม การพัฒนาการรักษาโรคนั้น ล้วนแล้วแต่ขึ้นอยู่กับความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับโครงสร้างในระดับอะตอมและโมเลกุล ในการศึกษาวัตถุที่มีขนาดเล็กระดับอะตอมนั้นต้องใช้แสงที่มีความยาวคลื่นที่มีขนาดเดียวกัน ได้แก่ รังสีเอกซ์ เครื่องกำเนิดแสงซินโครตรอน เช่น เครื่องกำเนิดแสงสยามเป็นแหล่งกำเนิดรังสีเอกซ์ที่มีความเข้มสูงมาก ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์ธาตุต่างๆ ได้ แม้ว่าจะมีปริมาณเพียงเล็กน้อย แสงซินโครตรอนมีประโยชน์อย่างมากทั้งในแง่การนำไปใช้งาน และเทคโนโลยีต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง อีกทั้งทำให้เกิดการพัฒนาในลักษณะ

สหวิทยาการของวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในหลายสาขา อาทิเช่น ฟิสิกส์ เคมี ชีววิทยา ชีวเคมี เทคโนโลยีชีวภาพ โลหะวิทยา วัสดุศาสตร์ วิศวกรรมไฟฟ้า อิเล็กทรอนิกส์ คอมพิวเตอร์ วิศวกรรมเคมี และทางการแพทย์ เป็นต้น

“แสงซินโครตรอน” เป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่อนุภาคอิเล็กตรอนปลดปล่อยออกมาขณะที่เคลื่อนที่ด้วยความเร็วเข้าใกล้ความเร็วของแสงและมีการเลี้ยวโค้งโดยสนามแม่เหล็กไฟฟ้า เป็นแสงที่มีคุณลักษณะพิเศษที่โดดเด่นหลายประการ (ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยเครื่องกำเนิดแสงซินโครตรอนแห่งชาติ, 2549) คือ

1. มีสเปกตรัมที่ต่อเนื่อง (continuous spectrum) แสงซินโครตรอนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะมีสเปกตรัมต่อเนื่อง ตั้งแต่ย่าน อินฟราเรด จนถึงรังสีเอกซ์ (ภาพที่ 1)
2. มีความเข้มสูง (high intensity)
3. มีความคมสูงมาก (highly collimated) แสงซินโครตรอนถูกปล่อยออกมาเป็นลำเล็ก ๆ ในแนวสัมผัสกับทิศทางการเคลื่อนที่ของอนุภาค โดยการมีขนาดลำแสงที่เล็ก ร่วมกับการมีความเข้มสูง ทำให้แสงซินโครตรอนมีความสว่างจ้า (brilliance) สูงมาก
4. มีลักษณะเป็น pulse แสงซินโครตรอนเมื่อถูกปล่อยออกมาในลักษณะเป็น pulse สั้น ๆ ทำให้สามารถใช้แสงในการทดลองที่ระบบการตรวจวัดต้องการความละเอียด หรือสามารถแยกแยะในการวัดช่วงแคบๆ

ได้ (low time resolution หรือ time-resolved measurement)

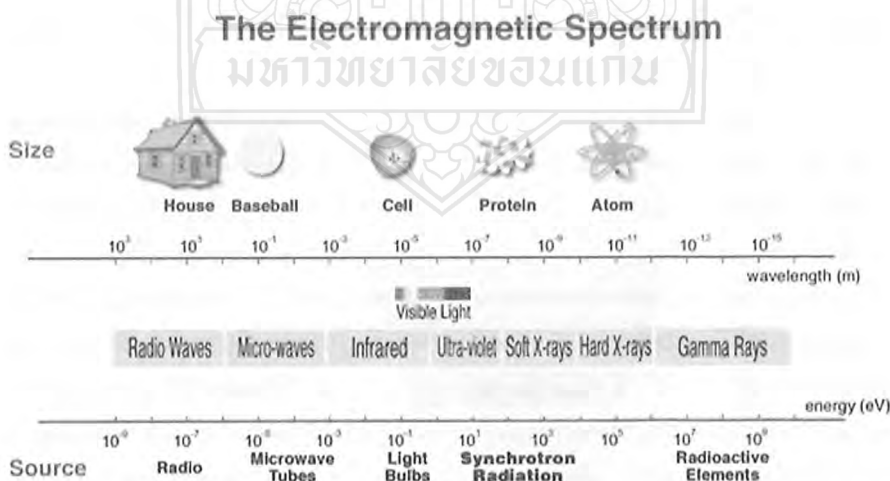
5. เป็นแสงที่รู้คุณสมบัติเชิงปริมาณ (brilliance) สเปกตรัมของแสงซินโครตรอนนั้นสามารถรู้ค่าได้แน่นอนโดยการคำนวณทางทฤษฎี จึงสามารถนำแสงซินโครตรอนมาใช้ในการทดลองโดยมีความเข้มข้นที่มาตรฐานตลอดย่านพลังงานที่ได้

6. เป็นแสงโพลาไรซ์ (polarized light) แสงซินโครตรอนจาก bending magnet เป็นแสงโพลาไรซ์แบบระนาบที่มีทิศทางการสั่นไฟฟ้าขนานกับระนาบของแนวการเคลื่อนที่ของอนุภาค และโดยการใช้อุปกรณ์ เช่น helical undulator ทำให้สามารถผลิตแสงซินโครตรอนที่มีคุณสมบัติ circular polarization ได้

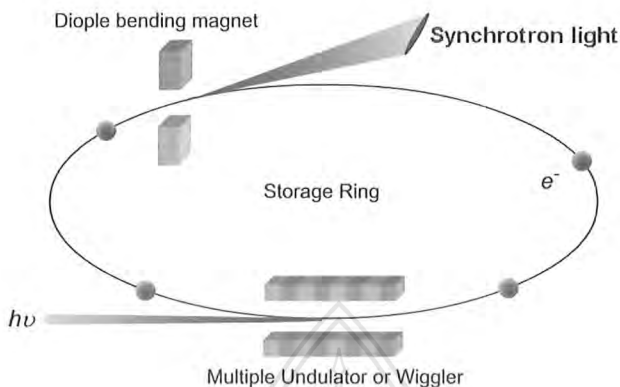
7. เป็นแหล่งกำเนิดแสงที่มีการปนเปื้อนต่ำ (clean environment) เนื่องจากแสงซินโครตรอนทำงานในระบบเกือบเป็นสุญญากาศ (ความดันประมาณ 10^{-10} Torr) ทำให้แสงที่ได้มีการปนเปื้อนจากรังสีอื่นๆ ที่ไม่ต้องการน้อยมาก

ด้วยลักษณะพิเศษที่โดดเด่นของแสงซินโครตรอน และการพัฒนาในเทคนิคการตรวจวิเคราะห์เมื่อแสงซินโครตรอนกระทบวัตถุตัวอย่าง

ทำให้สามารถศึกษาลักษณะทางโครงสร้าง และสมบัติต่างๆ ของวัตถุนั้นๆ ได้จากการวัดผลที่เกิดขึ้นระหว่างแสงกับวัตถุตัวอย่าง เช่น การวัดพลังงานอิเล็กตรอนหรือพลังงานโฟตอนที่เกิดขึ้น เช่น การวัดค่าการกระเจิงของแสง (scattering) การวัดค่าการดูดกลืน (absorption) ของแสงโดยวัตถุตัวอย่าง เป็นต้น ทำให้ถูกนำไปใช้ในการศึกษาวิจัย และพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์ได้หลากหลายสาขา เช่น การศึกษาหรือวิเคราะห์สมบัติของวัสดุ โครงสร้างทางอะตอม โมเลกุล หรือพันธะเคมีภายในสสาร รวมทั้งสามารถใช้ในการศึกษาเซลล์หรือโครงสร้างที่มีความซับซ้อนของสารชีวโมเลกุลจากสิ่งมีชีวิต ตลอดจนการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม การผลิตชิ้นส่วนอิเล็กทรอนิกส์ และชิ้นส่วนขนาดเล็ก เป็นต้น ทำให้แสงซินโครตรอนเป็นแหล่งกำเนิดแสงที่มีลักษณะพิเศษเหนือกว่าแหล่งกำเนิดแสงที่ใช้ในห้องทดลองทั่วไป เช่น halogen lamps, plasma sources และ lasers นอกจากนี้การเร่งอนุภาคแบบ periodic โดยใช้สนามแม่เหล็กแบบ periodic magnets ของ undulator และ wiggler ช่วยทำให้แสงซินโครตรอนที่ผลิตได้มีความเข้มสูงขึ้น (ภาพที่ 2) และมีคุณสมบัติตามที่ต้องการ



ภาพที่ 1 Electromagnetic spectrum ของแสงซินโครตรอนที่ต่อเนื่องตั้งแต่ย่านอินฟราเรด จนถึงรังสีเอกซ์ (จาก <http://all-physics.net/images/spectrum.gif>)



ภาพที่ 2 โครงสร้างการเร่งอนุภาคเพื่อผลิตแสงซินโครตรอน ($h\nu$: photon source, e^- : electrons)
(จาก http://spie.org/Images/Graphics/Newsroom/Imported/0812/0812_fig1.jpg).

สำหรับประเทศไทย เครื่องกำเนิดแสงซินโครตรอนเครื่องแรก (เครื่องกำเนิดแสงสยาม) และเป็นเครื่องเดียวในประเทศไทย ตั้งอยู่ที่ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยเครื่องกำเนิดแสงซินโครตรอนแห่งชาติ จังหวัดนครราชสีมา ปัจจุบันสามารถผลิตแสงซินโครตรอนจากอิเล็กตรอนในวงแหวนกักเก็บอิเล็กตรอน (storage ring) ที่มีพลังงาน 1.20 GeV ซึ่งทำให้ศูนย์ฯ สามารถใช้งานจากรังสีเอกซ์ ได้สูงถึง 9 keV (ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยเครื่องกำเนิดแสงซินโครตรอนแห่งชาติ, 2549)

ปัจจุบันได้มีการนำแสงซินโครตรอนมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาและวิจัยในทุกแขนงวิชาของวิทยาศาสตร์พื้นฐาน รวมทั้งด้านวัสดุศาสตร์ สิ่งแวดล้อม ธรณีวิทยา และทางการแพทย์

ประโยชน์ของแสงซินโครตรอนทางวิทยาศาสตร์การแพทย์

การนำแสงซินโครตรอนมาใช้ประโยชน์ทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ สามารถแบ่งออกได้ตามเทคนิคของการประยุกต์ใช้แสงซินโครตรอนดังนี้

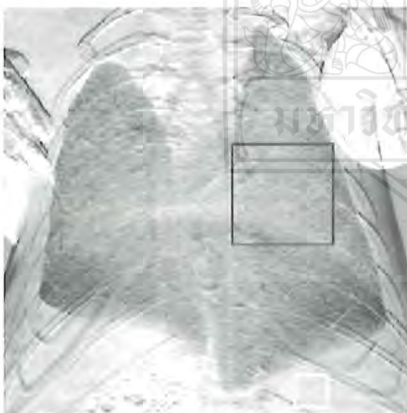
1. **Synchrotron infrared spectroscopy (และ microscopy)** แสงซินโครตรอนสามารถนำมาศึกษาเพื่อคัดเลือกลักษณะที่เป็นตัวช่วยพยากรณ์ขั้นผิวหนังไปยังบริเวณเป้าหมายที่ต้องการได้ เช่น เทคนิค synchrotron Fourier-transform infrared (synchrotron

FT-IR) ถูกนำมาใช้ศึกษาความสามารถในการแทรกซึม (penetration) ของกรดไขมันที่มักใช้เพื่อเป็น chemical enhancers เช่น palmitic acid (C_{16}) และ myristic acid (C_{14}) ในชั้นผิวหนังของหนูที่ทาด้วยไขมันทั้งสอง (Cotte et al., 2004) การค้นพบระดับของสารครีเอทีน (creatinine) เพิ่มขึ้นเป็นครั้งแรกในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) ซึ่งการค้นพบนี้สามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้เทคนิค synchrotron infrared spectroscopy จำแนกสารครีเอทีนที่อยู่ภายใน plaques ที่พบได้บนเนื้อเยื่อสมอง (Dumas et al., 2006) นอกจากนี้ synchrotron FTIR spectroscopy ได้ถูกนำมาใช้เพื่อช่วยในการศึกษาผลของ chemotherapy drugs ที่ใช้รักษาโรคมะเร็งกับเซลล์ชนิดต่าง ๆ (Cotte et al., 2004) โรค Alzheimer's disease ที่ถูกชักนำให้เกิดขึ้นได้จากสัตว์เลี้ยงที่ได้รับอาหารที่มีปริมาณสูงของโลหะทรานซิชัน (transition metals) เช่น เหล็ก (Fe) สังกะสี (Zn) และ ทองแดง (Cu) โดยศึกษาจากความสูงของกราฟของ IR ที่แสดงโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) แอลฟาฮีลิกซ์ (α -helix) และ เบต้าชีต (β -sheet) ของโปรตีนในเนื้อเยื่อของสมอง (Marinkovic et al., 2005) เนื้อเยื่อกระดูกสามารถนำมาวินิจฉัยโรคกระดูกพรุน (osteoporosis) ในสัตว์ทดลองโดยใช้อัตราส่วนระหว่าง carbonate/phosphate band ratio (Huang et al., 2002)

2. X-ray imaging

2.1 Phase contrast X-ray imaging

เป็นการประยุกต์ใช้แสงซินโครตรอน เพื่อดูอวัยวะของสิ่งมีชีวิตได้ทั้งร่างแบบ 3 มิติ รวมทั้งเหมาะกับการวิเคราะห์อวัยวะที่ประกอบด้วย soft tissue ตัวอย่างของการใช้ phase contrast X-ray imaging ในการศึกษาทางการแพทย์ เช่น การศึกษาทรวงอกของหนูอายุ 1 เดือน (แสดงในรูปภาพที่ 3) (Kitchen et al., 2005) หรือ การดูพัฒนาการของปอดของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังที่คล้ายกับจิงโจ้นิดหนึ่ง (tamar wallaby) ซึ่งคลอดหลังจากที่แม่ตั้งท้องได้เพียง 4 สัปดาห์ ในเริ่มแรกจากการศึกษาด้วย phase contrast X-ray imaging พบว่า ลูกของตัว tamar wallaby มีพัฒนาการค่อนข้างต่ำ และค่อย ๆ มีการปรับตัวเองเพื่อที่จะมีชีวิตรอดได้ในสิ่งแวดล้อมภายนอกท้องแม่ โดยการพัฒนาอวัยวะต่าง ๆ ขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ปอด เพื่อให้สัมพันธ์กับการผ่านเข้าออกของอากาศได้ ซึ่งการศึกษารุ่นนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อทางการแพทย์ของมนุษย์ โดยใช้เป็นแนวทางเพื่อแก้ปัญหาการหายใจที่ลำบากของทารกที่คลอดก่อนกำหนดและปอดยังเจริญไม่เต็มที่ (Lewis, 2005)



ภาพที่ 3 Phase contrast image ของทรวงอกของหนูอายุ 1 เดือน ทำการทดลองที่ Spring-8 ใช้ระดับพลังงานของรังสี X-ray ที่ 33 keV และใช้ผลึกซิลิกา (silica) ระนาบ 3,3,3 เป็นตัว reflection (Kitchen et al., 2005)

2.2 X-ray dark-field imaging เพื่อให้

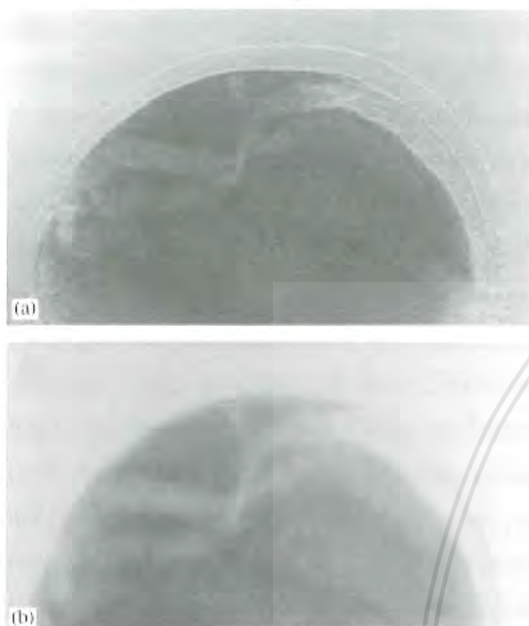
สามารถนำแสงซินโครตรอนมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อย่างแท้จริง กลุ่มนักวิจัยจากสถาบันทดลองของ Photon Factory (Tsukuba, Japan) ได้พัฒนาเทคนิคที่เรียกว่า X-ray dark-field imaging (X-ray DFI) เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรคในมนุษย์ ข้อดีของเทคนิคนี้ที่เหนือกว่าการศึกษาชิ้นเนื้อด้วยเทคนิค absorption imaging ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้กันโดยทั่วไป คือ จะให้ภาพที่คมชัด และเห็นความแตกต่างของแต่ละส่วนของอวัยวะได้อย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 4 (Ando et al., 2005) ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดเจนขึ้นถึงประโยชน์ของการใช้ X-ray DFI แสดงในภาพที่ 5 โดยเปรียบเทียบการวินิจฉัยเนื้อเยื่อของมะเร็งเต้านมในระยะเริ่มแรกด้วย X-ray DFI ที่ให้ผลชัดเจนกว่าการวิเคราะห์ด้วย X-ray imaging (contrast imaging จากการตรวจวิเคราะห์ของโรงพยาบาล โดยสามารถตรวจพบบริเวณที่เกิด calcification ของเนื้อเยื่อที่ชักนำไปเกิดมะเร็งเต้านมได้ชัดเจน (Ando et al., 2005)

3. X-ray fluorescence เนื่องจากแร่ธาตุ

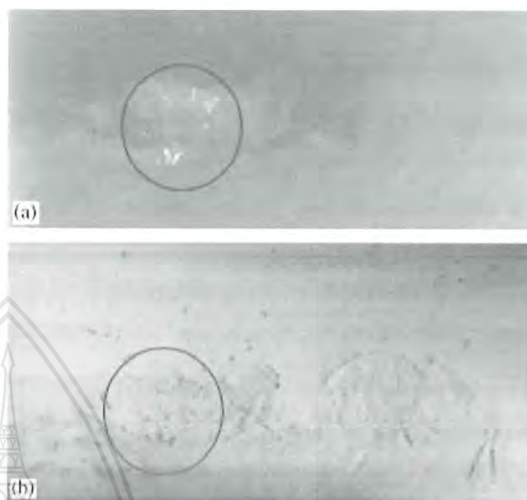
(trace elements) มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิต เช่น กระบวนการกระตุ้น หรือยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ของเซลล์โดยที่แร่ธาตุเหล่านี้ อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดความผิดปกติของเซลล์ จนกระทั่งเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็ง ดังนั้น จึงได้มีการพัฒนานำเทคโนโลยีของแสงซินโครตรอน คือ เทคนิค X-ray fluorescence มาใช้วิเคราะห์หาชนิดของธาตุต่าง ๆ ในตัวอย่างชิ้นเนื้อของผู้ป่วยโรคมะเร็ง และเปรียบเทียบกับคนปกติ เพื่อหาสาเหตุของธาตุที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งเทคนิคของการประยุกต์ใช้แสงซินโครตรอนที่ใช้หลักการ X-ray fluorescence มีดังนี้

3.1 Synchrotron radiation induced

X-ray emission (SRIXE) เป็นเทคนิคที่เคยถูกนำมาใช้ศึกษาระดับปริมาณของธาตุ โพแทสเซียม (K) เหล็ก (Fe) ทองแดง (Cu) และ สังกะสี (Zn) ในตัวอย่าง



ภาพที่ 4 แสดงภาพที่ได้จากการวิเคราะห์ articular cartilage ของชิ้นส่วนที่ตัดจาก femour joint ของมนุษย์ ด้วย (a) X-ray DFI ทำการทดลองที่สถานีทดลอง BL20B2 ณ Spring-8 ประเทศญี่ปุ่น เปรียบเทียบกับที่วิเคราะห์ด้วย (b) X-ray absorption image ในตัวอย่างเดียวกัน (Ando *et al.*, 2005)



ภาพที่ 5 ภาพจากชิ้นเนื้อที่ตัดจากตัวอย่างมะเร็งเต้านมวิเคราะห์ด้วย (a) X-ray DFI และ (b) ordinary X-ray machine (Ando *et al.*, 2005)

ชิ้นเนื้อของมะเร็งเต้านมเทียบกับระดับของคนปกติ โดยพบว่า ชิ้นเนื้อของผู้ป่วยโรคมะเร็งจะมีระดับของโปแตสเซียมสูงกว่าชิ้นเนื้อคนปกติ และมีระดับของเหล็กต่ำกว่าปกติ (Sky-Peck, 1986) SRIXE สามารถนำมาตรวจหาระดับของ เหล็ก ทองแดง และสังกะสีที่เพิ่มขึ้นในชิ้นเนื้อ เพื่อศึกษาความเกี่ยวข้องระหว่างแร่ธาตุและการพัฒนาของมะเร็งต่อมลูกหมากได้ (Kwiatk *et al.*, 2005)

3.2 Total reflection X-ray fluorescence (TXRF) สามารถนำมาใช้ประยุกต์หาความเข้มข้นของแร่ธาตุในเนื้อเยื่อมะเร็งเทียบกับชิ้นเนื้อปกติเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเทคนิคในวินิจฉัยคัดกรองโรค (screening) รวมทั้งการติดตามการรักษา ซึ่งการทดลอง

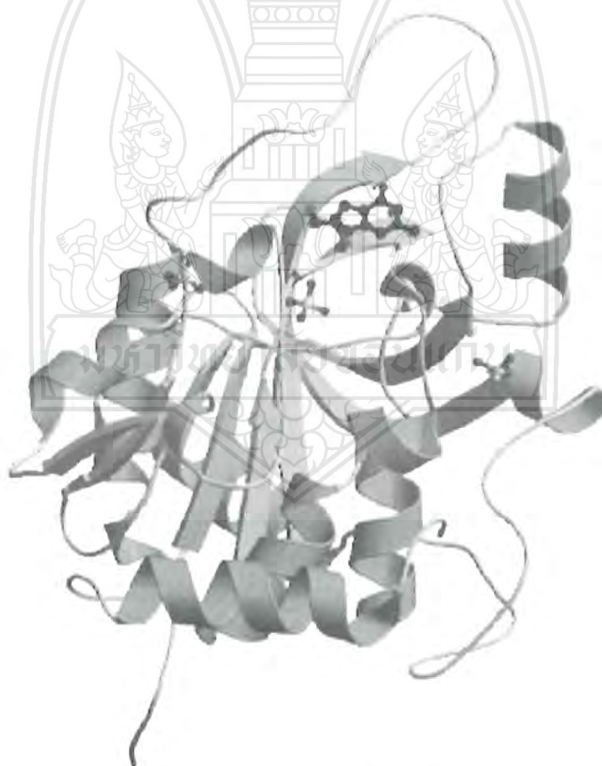
ได้ทำในชิ้นเนื้อของทางเดินอาหารส่วนกระเพาะ ลำไส้ใหญ่ และไส้ตรง (Benninghoff *et al.*, 1997; Benninghoff and Denkhau, 1998) นอกจากนี้ TXRF ยังได้นำมาใช้หาปริมาณของธาตุ เหล็ก ทองแดง สังกะสี และ เซเลเนียม (Se) ในตัวอย่างซี่มของผู้ป่วยโรคมะเร็งเทียบกับคนปกติ (Marco *et al.*, 2001)

3.3 Proton-induced X-ray emission (PIXE) ได้ถูกนำมาใช้ศึกษาความเข้มข้นของธาตุหลายชนิดในเนื้อเยื่อของมะเร็งปอดระหว่างเพศชายและเพศหญิง โดยพบว่า ระดับของธาตุ สตรอนเชียม (Sr) และ ตะกั่ว (Pb) มีระดับลดลงในเพศหญิง (Kubala-Kukus *et al.*, 1999)

3.4 Energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF) ได้นำมาใช้ศึกษาความเข้มข้นของธาตุหลายชนิดในเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ ของมนุษย์ เช่น ลำไส้ใหญ่ เต้านม และมดลูก พบว่า ทุกเนื้อเยื่อของอวัยวะเหล่านี้เมื่อเกิดเป็นมะเร็งจะมีการสะสมของธาตุ ฟอสฟอรัส (P) กำมะถัน (S) โปแตสเซียม แคลเซียม (Ca) เหล็ก และ ทองแดง แต่จะมีการลดลงของระดับของ สังกะสี และ โบรมีน (Br) (Magalhães *et al.*, 2006)

4. X-ray diffraction เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาโครงสร้างของสารทั้งสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ที่อยู่ในรูปผลึก รวมทั้งโครงสร้างของสารชีวโมเลกุลจำพวกโปรตีนและกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ปัจจุบันเทคนิคของ synchrotron X-ray diffraction ที่นิยมใช้กันมาก คือ X-ray crystallography เพื่อศึกษาโครงสร้างของโปรตีนที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์และการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนนั้น ๆ เมื่อได้รับยาปฏิชีวนะหรือยารักษาโรค ซึ่งเทคนิคนี้มีประโยชน์อย่างมากต่อวงการแพทย์ในปัจจุบันและอนาคต โดยสามารถใช้เป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาการผลิตยาเพื่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ นอกจากนี้ เทคนิคนี้ยังสามารถใช้ศึกษาหาความผิดปกติของสารชีวโมเลกุลในร่างกายที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการหาสาเหตุ รักษา และป้องกันการเกิดโรคได้ ตัวอย่าง

ของงานวิจัยที่ใช้เทคนิค X-ray crystallography เช่น การศึกษาโครงสร้างของโปรตีนผิวนอก (surface protein) ของเชื้อที่ก่อโรคมาลาเรีย (*Plasmodium*) ในหลาย ๆ สายพันธุ์เพื่อที่จะใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบผลิตภัณฑ์ยาสำหรับด้านการบุกรุกของเชื้อเข้าสู่เซลล์ และผลิตวัคซีน (Bentley, 2006) การศึกษาโครงสร้างของ SARS-coronavirus spike protein เพื่อให้เข้าใจถึง fusion mechanism ของไวรัสต่อเซลล์เป้าหมายได้ และใช้เป็นแนวทางป้องกันต่อไป (Hsu *et al.*, 2004) โครงสร้างของผลึกของสารเชิงซ้อน (complex) ระหว่างเอนไซม์ purine nucleoside phosphorylase จากมนุษย์และตัวยา acyclovir (ภาพที่ 6) ได้เคยมีการทำการศึกษาด้วยเทคนิคนี้เช่นกัน เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับพัฒนายาตัวใหม่ขึ้น โดยลดผลข้างเคียงของยาต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายของมนุษย์ (dos Santos *et al.*, 2003)



ภาพที่ 6 แสดง ribbon diagrams ของสารเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์ purine nucleoside phosphorylase จากมนุษย์และตัวยา acyclovir (dos Santos *et al.*, 2003)

5. X-ray absorption spectroscopy (XAS)

เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาการดูดกลืนรังสีเอกซ์ของอะตอมของธาตุในสารตัวอย่างที่อยู่ในรูปผลึก amorphous ของเหลว และก๊าซ ภายหลังจากการดูดกลืนรังสีอะตอมที่ถูกกระตุ้นจะกลับคืนสู่สถานะพื้นฐานของอะตอม ซึ่งจะทำให้เกิดการเรืองแสง และการปล่อยอิเล็กตรอนตัวอื่น ๆ ออกมา ดังนั้น การวัดสเปกตรัมการดูดกลืนรังสีเอกซ์ของสารตัวอย่างในทางปฏิบัติสามารถทำได้ 3 วิธี (วันทนา คล้ายสุบรรณ, 2549) คือ

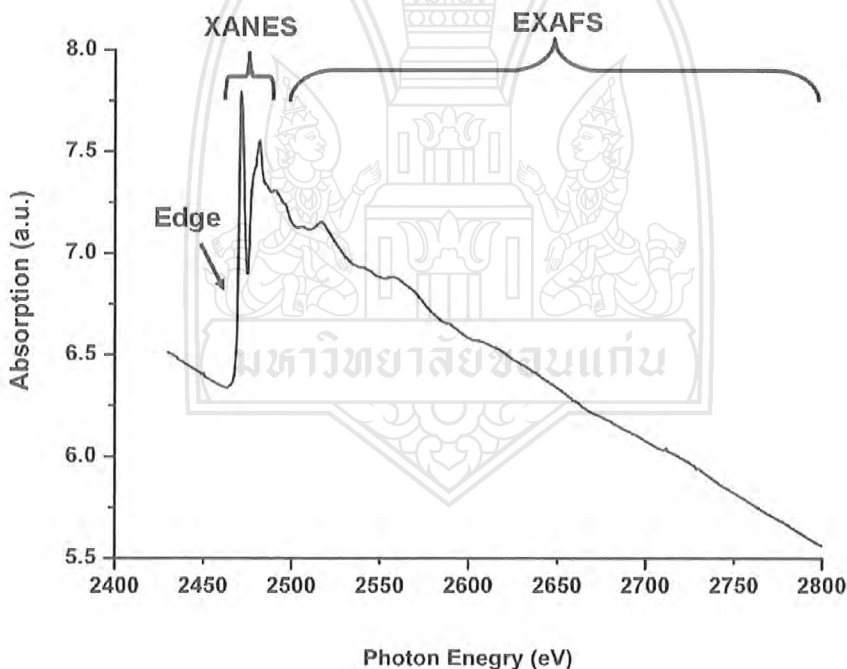
ก) การวัด XAS แบบทะลุผ่าน (transmission-mode XAS)

ข) การวัด XAS แบบเรืองแสง (fluorescent-mode XAS)

ค) การวัด XAS แบบกระแสนิอิเล็กตรอน

(Electron-yield XAS)

สเปกตรัมของ XAS ประกอบด้วยโครงสร้างหลักสองชนิด คือ X-ray absorption near edge structure (XANES) และ extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) (ภาพที่ 7) ซึ่งโครงสร้าง XANES สามารถใช้วิเคราะห์ชนิดของอะตอมได้แบบ fingerprinting รวมทั้งใช้บ่งชี้องค์ประกอบเคมีในสารตัวอย่างได้ โครงสร้างของ EXAFS เป็นบริเวณที่ถัดจาก XANES โดยจะสามารถใช้วิเคราะห์ โครงสร้างของสารได้โดยวิเคราะห์หาความยาวพันธะระหว่างอะตอมที่ดูดกลืนรังสีถึงอะตอมข้างเคียง ซึ่งการวิเคราะห์ โครงสร้าง EXAFS จำเป็นต้องใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่จำเพาะ (dos Santos *et al.*, 2003)



ภาพที่ 7 กราฟตัวอย่างสเปกตรัมของ XAS ของสารประกอบเฟอร์ริกไดซัลไฟด์ (FeS_2) วัดโดยใช้ transmission mode ณ สถานีทดลอง Beamline 8 ของศูนย์ปฏิบัติการวิจัยเครื่องกำเนิดแสงซินโครตรอนแห่งชาติ ประเทศไทย

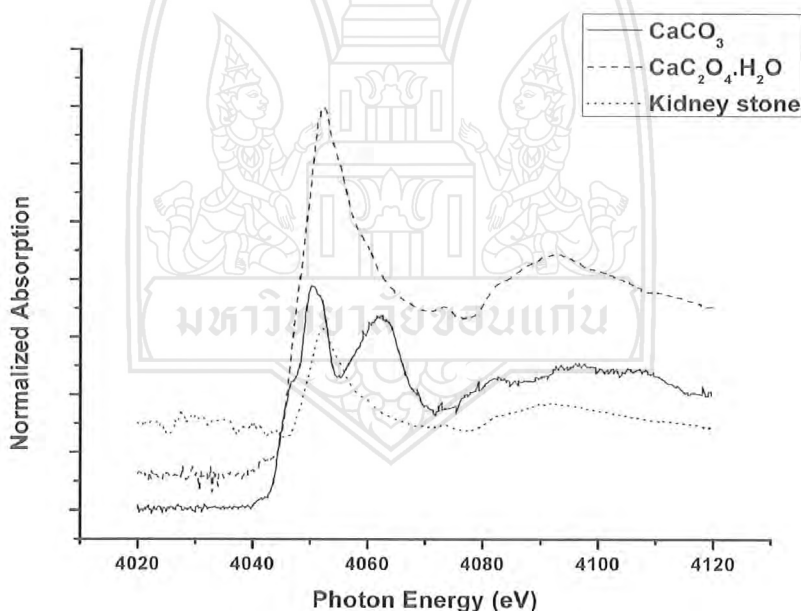
(ดัดแปลงจาก Pattanasiriwisawa *et al.*, 2007)

ตัวอย่างของการใช้ XAS ในทางการแพทย์ เช่น การศึกษาอันตรกิริยา (interaction) ระหว่าง กรดอะมิโนและธาตุทองแดง เพื่อพัฒนาที่ใช้รับประทานสำหรับป้องกันภาวะขาดธาตุทองแดงในผู้ป่วยโรค Menkes disease โดยใช้เทคนิค EXAFS (Nicolis *et al.*, 2001) นอกจากนี้ EXAFS และ XANES ยังช่วยให้พบโครงสร้างใหม่ของสารหนู (As) ที่เป็นองค์ประกอบในตัวยาคีที่เป็นของเหลวสำหรับใช้รักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) (Nicolis *et al.*, 2001)

XANESยังเป็นเทคนิคที่สามารถช่วยพิสูจน์ว่า ระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) มักเป็นบริเวณที่จะได้รับสิ่งแปลกปลอมจำพวกฝุ่นผงละเอียดจากการหายใจเข้าไป (inhaled fine particles) ซึ่งทำการทดลองโดยให้หนูได้รับอากาศที่มีการปนเปื้อนของผงละเอียดของเฟอร์ริกออกไซด์ ($\text{fine Fe}_2\text{O}_3$) เป็นเวลา

14 วัน แล้วจึงทำการผ่าสมองของหนู นำชิ้นเนื้อมาทดสอบหาการปนเปื้อนของธาตุเหล็กด้วย XANES โดยผลการทดลองสามารถชี้ชัดได้ว่า เหล็กสามารถปนเปื้อนเข้าไปในระบบประสาทของหนูได้ในส่วนของเส้นประสาทออลแฟกทอรี (olfactory nerve) และเส้นประสาทไตรเจมินัล (trigeminal nerve) (Wang *et al.*, 2007)

ปัจจุบันสถานี่ทดลอง XAS ของศูนย์ปฏิบัติการวิจัยเครื่องกำเนิดแสงซินโครตรอนแห่งชาติ ได้ให้บริการตรวจวิเคราะห์ และสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับทางการแพทย์ได้ เช่น การวิเคราะห์องค์ประกอบของก้อนนิ่วชนิดแคลเซียมออกซาลเลต ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) จากไตของมนุษย์ด้วยเทคนิค XANES ดังแสดงในภาพที่ 8 (Siritapetawee *et al.*, 2008)



ภาพที่ 8 แสดงการวัดการดูดกลืนรังสี X-ray ของธาตุแคลเซียม (Ca) ที่ K-edge spectra ของก้อนนิ่วจากไตของมนุษย์ด้วยเทคนิค XANES (Siritapetawee *et al.*, 2008)

สรุป

แสงซินโครตรอนเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีสเปกตรัมต่อเนื่องตั้งแต่ย่าน อินฟราเรด จนถึงรังสีเอกซ์ และเนื่องจากเป็นแสงที่มีความเข้มสูง มีความคมชัดมาก สามารถทราบระดับพลังงานและเลือกใช้ได้อย่างเหมาะสม ทำให้แสงซินโครตรอนถูกนำมาใช้ในงานวิจัยและพัฒนาในทุกแขนงวิชา รวมทั้งอุตสาหกรรม และสิ่งแวดล้อม ในทางการแพทย์สามารถประยุกต์ใช้แสงซินโครตรอนช่วยในการวินิจฉัยและรักษาโรคได้ รวมทั้งใช้ในการออกแบบผลิตภัณฑ์ยา โดยใช้หลักการของ IR spectroscopy, IR microscopy, X-ray imaging, X-ray diffraction และ X-ray absorption spectroscopy เป็นต้น ปัจจุบันประเทศไทยได้มีแหล่งกำเนิดแสงซินโครตรอนที่สามารถเปิดให้ใช้บริการวิเคราะห์ได้ ณ ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยเครื่องกำเนิดแสงซินโครตรอนแห่งชาติ จังหวัดนครราชสีมา

เอกสารอ้างอิง

- วันทนา คล้ายสุบรรณ. 2549. เทคนิคการทดลอง X-ray absorption spectroscopy ณ ห้องปฏิบัติการแสงสยาม. นครราชสีมา : สมบูรณ์การพิมพ์.
- ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยเครื่องกำเนิดแสงซินโครตรอนแห่งชาติ. 2549. การใช้ประโยชน์แสงซินโครตรอน. นครราชสีมา : สมบูรณ์การพิมพ์.
- Ando, M., Hashimoto, E., Hashizume, H., Hyodo, K., Inoue, H., Kunisada, T.M., Maksimenko, A., Mori, K., Rubenstein, E., Roberson, J., Shimao, D., Sugiyama, H., Takeda, K., Toyofuku, F., Ueno, E., Umetani, K., Wada, H., Pattanasiriwisawa, W. (2005). Clinical step onward with X- ray dark-field imaging and perspective view of medical applications of synchrotron radiation in Japan. Nucl Instrum Methods Phys Res Sect A. 548: 1-16.
- Ando, M., Yamasaki, K., Toyofuku, F., Sugiyama, H., Obayashi, C., Li, G., Pan, L., Jiang, X., Pattanasiriwisawa, W., Shimao, D., Hashimoto, E., Kimura, T., Tsuneyoshi, M., Ueno, E., Tokumori, K., Maksimenko, A., Higashida, Y., Hirano, M. (2005). Attempt at Visualizing Breast Cancer with X-ray Dark Field Imaging. Jpn J Appl Phys. 44: L528.
- Benninghoff, L., Denkhaus, E. (1998). Trace element distribution in human tissues of the digestive tract for malignant-normal and tissue type classification. Metal Ions Biol Med. 5: 572-577.
- Benninghoff, L., von Czarnowski, D., Denkhaus, E., Lemke, K. (1997). Analysis of human tissues by total reflection X-ray fluorescence. Application of chemometrics for diagnostic cancer recognition. Spectrochim Acta Part B. 52:1039-1046.
- Bentley, G.A. (2006). Functional and immunological insights from the three-dimensional structures of Plasmodium surface proteins. Curr Opin Microbiol. 9: 395-400.
- Cotte, M., Dumas, P., Besnard, M., Tchoreloff, P., Walter, P. (2004). Synchrotron FT-IR microscopic study of chemical enhancers in transdermal drug deliver: example of fatty acids. J Control Release. 97: 269-281.
- Dumas, P., Sockalingum, G.D., Sulé-Suso, J. (2006). Adding synchrotron radiation to infrared microspectroscopy: what's new in biomedical applications ? Trends Biotechnol. 25: 40-44.
- Hsu, C.H., Ko, T.P., Yu, H.M., Tang, T.K., Chen, S.T., Wang, A.H.J. (2004). Immunological, structural, and preliminary X-ray diffraction

- characterizations of the fusion core of the SARS-coronavirus spike protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 324: 761-767.
- Huang, R.Y., Miller, L.M., Carlson, C.S., Chance, M.R. (2002). Characterization of bone mineral composition in the proximal tibia of cynomolgus monkeys: effect of ovariectomy and nandrolone decanoate treatment. *Bone.* 30: 492-497.
- Kitchen, M.J., Lewis, R.A., Yagi, N., Uesugi, K., Paganin, D., Hooper, S.B., Adams, G., Jureczek, S., Singh, J., Christensen, C.R., Hufton, A.P., Hall, C.J., Cheung, K.C., Pavlov, K.M. (2005). Phase contrast X-ray imaging of mice and rabbit lungs: a comparative study. *Br J Radiol.* 78:1018-1027.
- Kubala-Kukus, A., Braziewicz, J., Banas, D., Majewska, U., Gózd, S., Urbaniak, A. (1999). Trace element load in cancer and normal lung tissue, *Nucl Instrum Methods Phys Res Sect B Beam Interact Mater Atoms.* 150: 193-199.
- Kwiatk, W.M., Banas, A., Gajda, M., Galka, M., Pawlicki, B., Falkenberg, G., Cichocki, T. (2005). Cancerous tissues analyzed by SRIXE. *J Alloys Compd.* 401:173-177.
- Lewis, R.A. (2005). Medical applications of synchrotron radiation in Australia. *Nucl Instrum Methods Phys Res Sect A.* 548: 23-29.
- Magalhães, T., von Bohlen, A., Carvalho, M.L., Becker, M. (2006). Trace elements in human cancerous and healthy tissues from the same individual: a comparative study by TXRF and EDXRF. *Spectrochim Acta Part B.* 61:1185-1193.
- Marco, P.L.M., Jiménez, E., Hernández, E.A., Rojas, C.A., Greaves, E.D. (2001). Determination of Zn/Cu ratio and oligoelements in serum samples by total reflection X-ray fluorescence spectrometry for cancer diagnosis. *Spectrochim Acta Part B.* 56:2195-2201.
- Marinkovic, N.S., Dokken, K.M., Davis, L.C. Linkous, D. Flinn, J.M., Chance, M.R. (2005). Synchrotron Infrared Spectroscopy at NSLS Beamline U2B. *Am Biotech Lab.* 23: 12-13.
- Nicolis, I., Deschamps, P., Curis, E., Corriol, O., Acar, V., Zerrouk, N., Chaumeil, J. C., Guyon F., B_nazeth S. (2001). XAS applied to pharmaceuticals: drug administration and bioavailability. *J Synchrotron Radiat.* 8: 984-986.
- Pattanasiriwisawa, W., Siritapetawee, J., Patarapaibbchi, O. (2007). Structural and Oxidation state Characterization of Sulfur Vulcanized in Natural and Synthesis Rubber using X-ray Absorption Spectroscopy (XAS). *International Conference on Materials for Advanced Technologies 2007 (ICMAT 2007)*, Singapore, Abstract p. 32.
- dos Santos, D.M., Canduri, F., Pereira, J.H., Dias, M.V.B., Silva, R.G., Mendes, M.A., Palma, M.S., Basso, L.A., de Azevedo, W.F., Santos, D.S. (2003). Crystal structure of human purine nucleoside phosphorylase complexed with acyclovir. *Biochem Biophys Res Commun.* 308: 553-559.
- Siritapetawee, J., Pattanasiriwisawa, W. (2008). An attempt of kidney stone analysis with the application of synchrotron radiation. *J Synchrotron Radiat.* 15: 158-161.
- Sky-Peck, H.H. (1986). Trace metals and neoplasia. *Clin Physiol Biochem.* 4: 99-111.
- Wang, B., Feng, W.Y., Wang, M., Shi, J.W., Zhang, F., Ouyang, H., Zhao, Y.L., Chai, Z.F., Huang, Y.Y., Xie, Y.N., Wang, H.F., Wang, J. (2007). Transport of intranasally instilled fine Fe₂O₃ particles into the brain: micro-distribution, chemical states, and histopathological observation. *Biol Trace Elem Res.* 118: 233-43.
- <http://all-physics.net/images/spectrum.gif>.
- http://spie.org/Images/Graphics/Newsroom/Imported/0812/0812_fig1.jpg.

บทบาทของคาเทชินในชาเขียวต่อการลดปริมาณ โคเลสเตอรอลในเลือด

Role of Green tea Catechins on Lower Plasma Cholesterol

จันทร์พร ทองเอกแก้ว¹

บทคัดย่อ

ภาวะโคเลสเตอรอลในเลือดสูง (hypercholesterolemia) สามารถนำไปสู่การเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและอุดตัน (Atherosclerosis) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคหัวใจขาดเลือด (ischemic heart disease) และทำให้เกิดหัวใจวายได้ ต่อมาได้มีรายงานวิจัยว่า การดื่มชาเขียวสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดได้ สาเหตุเนื่องมาจากในชาเขียวมีสารประกอบสำคัญเรียกว่า โพลีฟีนอล (polyphenols) หรือเรียกกันทั่วไปว่า คาเทชิน (catechins) สารประกอบคาเทชินที่อยู่ในชาเขียว ประกอบด้วย Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), Epicatechin-3-gallate, Epicatechin และ Epigallocatechin โดยสารประกอบที่มีปริมาณมากที่สุดคือ Epigallocatechin-3-gallate หรือ อี จี ซี จี (EGCG) ซึ่งมีมากถึง 58% ของคาเทชินทั้งหมด อี จี ซี จี นี้สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของโคเลสเตอรอล และเพิ่มจำนวนตัวรับแอลดีแอลของเซลล์เนื้อเยื่อ ทำให้ลดการสร้างและสะสมแผ่นคราบ (plaque) ในเส้นเลือดจากโคเลสเตอรอลและช่วยลดการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งตัวตีบตัน ซึ่งเป็นผลดีต่อสุขภาพของหลอดเลือดหัวใจจึงเป็นการช่วยในการลดอุบัติการณ์ของโรคเส้นเลือดหัวใจตีบ (coronary atherosclerosis) นั้นเอง

Abstract

Hypercholesterolemia is one of the major risk factors for the development of atherosclerosis. Epidemiological studies have identified that drinking green tea is associated with lower plasma cholesterol concentrations. Green tea contains an abundance of polyphenolic compounds called catechins, with the four main types being Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), Epicatechin-3-gallate, Epicatechin and Epigallocatechin. EGCG is the most abundant; accounting for 58% of the total catechins and was the only catechin which can increase LDL receptor binding activity resulting in low plasma cholesterol and reduce atherosclerosis.

คำสำคัญ : โคเลสเตอรอล, คาเทชิน, อี จี ซี จี, ตัวรับแอลดีแอล

Keywords: Cholesterol, Catechins, epigallocatechin gallate (EGCG), LDL-receptor

¹ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ. วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190

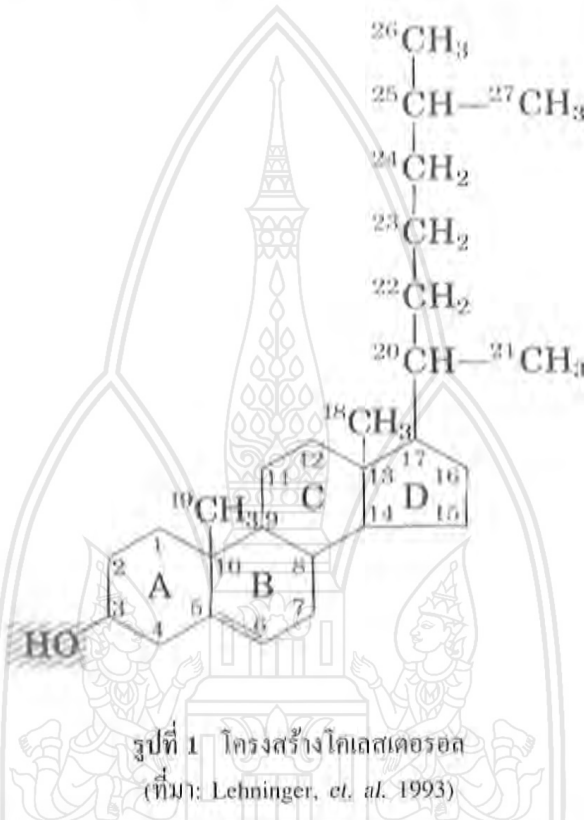
Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Rajathanee University, Ubon Ratchathani 34190

โคเลสเตอรอล

โคเลสเตอรอล (Cholesterol) เป็นไขมันชนิดหนึ่ง มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 1 ที่ร่างกายใช้สร้างเป็นเยื่อเซลล์ สร้างเป็นจนวนหุ้มเส้นประสาท สร้างฮอร์โมนต่างๆ ที่สำคัญคือ สเตอรอยด์ นอกจากนั้นยังใช้สร้างเกลือน้ำดีซึ่งช่วยในการย่อยและดูดซึมไขมัน

จากอาหาร ร่างกายได้รับโคเลสเตอรอลจาก 2 ทาง คือ

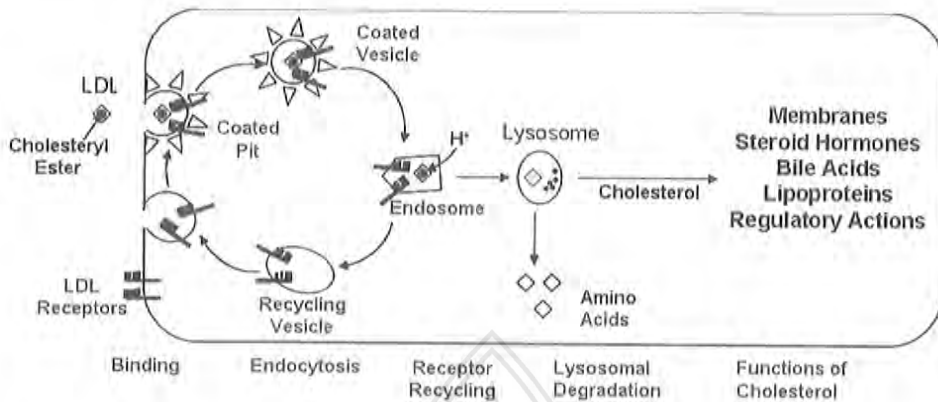
1. จากอาหารที่มาจากสัตว์ อาหารที่มีโคเลสเตอรอลมาก ได้แก่ เครื่องในสัตว์ ไข่แดง หอยนางรม และสัตว์ที่มีกระดูกงู เป็นต้น
2. ร่างกายสร้างขึ้นเองที่ตับ



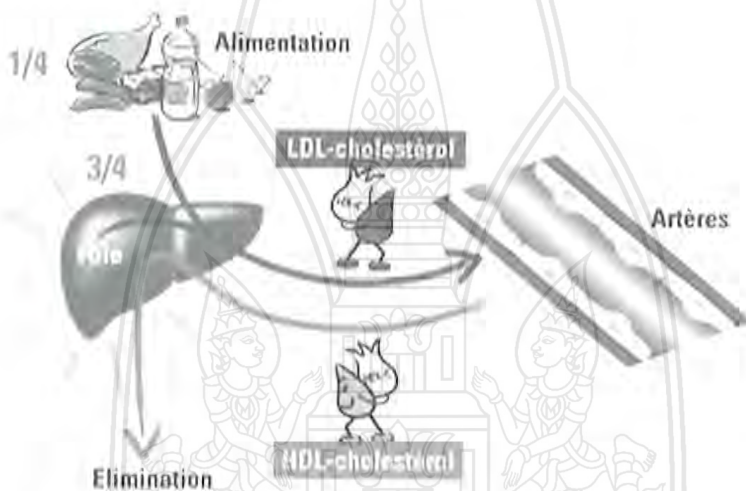
การขนส่งและการใช้โคเลสเตอรอล

โคเลสเตอรอลที่ตับสร้างขึ้นเองหรือได้จากอาหาร จะถูกส่งไปสู่เนื้อเยื่ออื่นๆ ของร่างกาย โดยส่งร่วมกับไขมันอื่นไปในรูปไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำมาก เรียกว่า วีแอลดีแอล (VLDL: very low density lipoprotein) ซึ่งสร้างจากตับ เมื่อวีแอลดีแอลส่งไขมันไปให้เนื้อเยื่อที่ต้องการไขมันแล้วจะมีความหนาแน่นมากขึ้น กลายเป็นไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำ เรียกว่า แอลดีแอล (LDL: low density lipoprotein) ซึ่งยังมีโคเลสเตอรอลเป็นองค์ประกอบอยู่

สำหรับเนื้อเยื่ออื่นๆ ของร่างกายจะสามารถรับโคเลสเตอรอลได้ ต้องมีตัวรับแอลดีแอล (LDL receptor) จากนั้นแอลดีแอล จะถูกพาเข้าเซลล์ ดังรูปที่ 2 และแอลดีแอล จะถูกย่อยสลายไป เซลล์จะนำโคเลสเตอรอลไปใช้สร้างหรือซ่อมแซมเยื่อเซลล์ของเนื้อเยื่อนั้น นอกจากนี้ยังมีไลโปโปรตีนอีกชนิดหนึ่ง คือ เอชดีแอล (HDL: high density lipoprotein) ซึ่งจะทำหน้าที่ตรงกันข้ามกับแอลดีแอล คือ ขนส่งโคเลสเตอรอลที่มากเกินไปในเซลล์กลับไปยังตับ ดังรูปที่ 3 (Lehninger et al., 1993)



รูปที่ 2 การนำเอเลดีแอลเข้าสู่เซลล์โดยตัวรับเอเลดีแอล (LDL receptor) ด้วยวิธี receptor-mediated endocytosis (ที่มา: www4.utsouthwestern.edu/~brown/past2.html)



รูปที่ 3 การขนส่งโคเลสเตอรอลไปยังเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ โดยอาศัยเอเลดีแอลและการขนส่งโคเลสเตอรอลที่มากเกินพอในเซลล์กลับไปยังตับโดยเอชดีแอล (ที่มา: www.prevention-cardio.com/images/alimentation_et_chlesterol_medium.jpg)

โคเลสเตอรอลกับการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งตัว (Atherosclerosis)

เซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ จะนำเอาเอเลดีแอลเข้าสู่เซลล์ในปริมาณจำกัดเท่าที่เซลล์ต้องการ ดังนั้นถ้าในร่างกายมีเอเลดีแอลสูงในกระแสเลือด ซึ่งอาจเกิดจากการบริโภคอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูง หรือเกิดจาก

การที่มีความผิดปกติในการนำเอเลดีแอลเข้าสู่เซลล์ของเนื้อเยื่อต่างๆ จะทำให้มีเอเลดีแอลส่วนเกินอยู่ในกระแสเลือดมาก จึงมีโอกาสเกิดออกซิเดชันของกรดอะมิโนใน Apoprotein ที่เป็นองค์ประกอบของเอเลดีแอล ทำให้เอเลดีแอลอยู่ในรูปที่ถูกออกซิไดส์ (Oxidized LDL) ในผนังชั้นในของเส้นเลือดมากขึ้นด้วย ซึ่งเอเลดีแอล

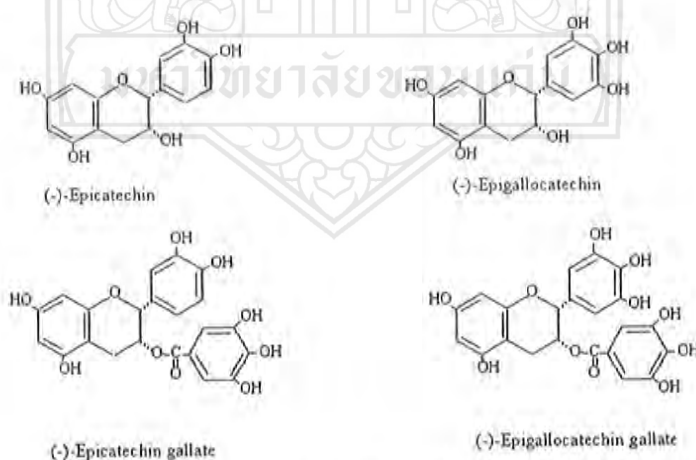
ที่อยู่ในรูปที่ถูกออกซิไดส์นั้นจะถูกจับกินโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวขนาดใหญ่ (macrophage) โดยอาศัยตัวรับที่เรียกว่า Scavenger receptor ซึ่งจะสามารถรับเอาแอลดีแอลที่อยู่ในรูปที่ถูกออกซิไดส์เข้าสู่เซลล์ได้โดยไม่จำกัดปริมาณ ส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดขาวที่กินแอลดีแอลที่อยู่ในรูปที่ถูกออกซิไดส์เข้าไปมากๆ ก็จะมีโคเลสเตอรอลในเซลล์มากตามไปด้วย ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะมีลักษณะเหมือนฟองเต็มเซลล์ เรียกว่า foam cell ซึ่งมักจะไปเกาะที่ผนังของเส้นเลือดและสะสมเป็นแผ่นคราบ (plaque) ถ้ามีการสะสมมากจะทำให้หลอดเลือดแดงตีบแคบลง เกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) เมื่อเป็นมากขึ้น เลือดจะไหลผ่านไม่ดี เกิดเป็นก้อนอุดตันได้ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคหัวใจขาดเลือด (ischemic heart disease) และทำให้เกิดหัวใจวายได้ (Mathew et al., 2000)

จากการศึกษาในประชากรทั่วโลก พบว่า ผู้ใหญ่ที่มีระดับโคเลสเตอรอลในเลือดสูงเกินกว่า 260 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร จะมีความเสี่ยงของโรคหัวใจขาดเลือดสูงกว่าคนที่ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดน้อยกว่า 220 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ประมาณ 3-5 เท่า การที่มีระดับโคเลสเตอรอลรวม (total cholesterol) ในเลือดสูง ส่วนใหญ่เกิดจากการมีระดับแอลดีแอลโคเลสเตอรอลสูง (LDL-C) การมีระดับแอลดีแอลโคเลสเตอรอล มากกว่า 130 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร จัด

เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง และคนที่มีความเสี่ยงต่อโรคหัวใจขาดเลือด มากกว่า 35 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร จะมีโอกาสเป็นโรคหัวใจขาดเลือด มากกว่าคนที่มีความเสี่ยงโคเลสเตอรอลปริมาณมาก (สรวิวัฒนา ทรงจิตสมบูรณ์, 2549)

กลไกในการลดโคเลสเตอรอลโดยสารคาเทชินในชาเขียว

ชาเขียวมีสารประกอบสำคัญที่ทำให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกาย (Active health component) ที่เรียกว่า โพลีฟีนอล (polyphenols) หรือเรียกกันทั่วไปว่า คาเทชิน (catechins) ซึ่งคาเทชินนี้จะมีปริมาณ 30-40% ของส่วนที่เป็นของแข็งที่สามารถสกัดได้จากใบชาเขียวแห้ง (1) คาเทชินที่อยู่ในชาเขียว ประกอบไปด้วย Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), Epicatechin-3-gallate, Epicatechin และ Epigallocatechin มีโครงสร้างดังรูปที่ 4 โดยสารประกอบที่มีปริมาณมากที่สุดและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในชาเขียว คือ Epigallocatechin-3-gallate หรือ อี จี จี จี (EGCG) โดยพบว่า ใบชาเขียวแห้ง 1 ช่อ (1.5 กรัม ต่อช่อ) จะมี อี จี จี จี ประมาณ 35 - 110 มิลลิกรัม และมีความแรงของการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าวิตามินซี และวิตามินอี 25-100 เท่า (Graham, 1992)



รูปที่ 4 โครงสร้างของสารประกอบคาเทชินในชาเขียว (ที่มา: www.catechin.co.uk/catechins.jpg)

บทบาทของสารประกอบคาเทชินต่อการลดระดับโคเลสเตอรอลได้รับความสนใจจากนักวิจัยและได้ทำการศึกษาเป็นจำนวนมาก เนื่องจากภาวะโคเลสเตอรอลในเลือดสูงจะนำไปสู่การเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและอุดตัน ตลอดจนพยาธิสภาพของหลอดเลือดหัวใจ ซึ่งนับเป็นหนึ่งในสาเหตุการตายที่พบบ่อยที่สุด โดยมีการทดลองให้หนูบริโภคน้ำที่มีโคเลสเตอรอลสูงเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้อาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูงพร้อมกับได้รับคาเทชิน พบว่า คาเทชินสามารถลดปริมาณการเพิ่มขึ้นของระดับโคเลสเตอรอลในเลือดได้ (Muramatsu *et al.*, 1986) Erba *et al.*, (2005) ได้รายงานไว้ว่า ผู้ที่ดื่มชาประมาณสองถ้วยต่อวัน สามารถลดไขมันในเลือดชนิดโคเลสเตอรอลลงได้เล็กน้อย (จาก 119 เหลือ 106 มิลลิกรัม/เดซิลิตร) ต่อมาได้มีการศึกษาผลของ (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) ซึ่งเป็นสารประกอบตัวหนึ่งในกลุ่มของคาเทชินต่อการลดระดับโคเลสเตอรอลในพลาสมาของหนู พบว่า อี จี ซี จี สามารถเพิ่มอัตราการดูดซึมโคเลสเตอรอลจากกระแสเลือดได้โดยไปเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของตัวรับแอลดีแอล (Fukuyo *et al.*, 1986, Chisaka *et al.*, 1988, Chyu *et al.*, 2004 และ Bursill *et al.*, 2006) นอกจากนี้ Osada *et al.*, (2001) ได้รายงานไว้ว่า อี จี ซี จี ยังเป็นตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ของโคเลสเตอรอล ทำให้ลดการเกิดและการสะสมของโคเลสเตอรอลในเส้นเลือด ทำให้ลดการเกิดเส้นเลือดแข็งตัวตีตัน และลดอุบัติการณ์ของโรคเส้นเลือดหัวใจตีบ (coronary atherosclerosis) จากรายงานการศึกษาข้างต้นจะเห็นได้ว่า อี จี ซี จี ในชาเขียวมีบทบาทสำคัญในการลดช่วยระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือด จึงนับว่าเป็นสารประกอบอีกชนิดหนึ่งที่มีคุณประโยชน์อย่างยิ่ง

เอกสารอ้างอิง

ศรีวัฒนา ทรงจิตสมบูรณ์. 2549. โคเลสเตอรอล. สำนักงานวิจัยคณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี. กรุงเทพฯ.

Bursill, C.A. and Roach, P.D. (2006). Modulation of cholesterol metabolism by the green tea polyphenol (-)- Epigallocatechin gallate in cultured human liver (HepG2) cells. *J. Agri. Food chem.* 54: 1621-1626.

Chisaka, T., Matsuda, H., Kubomura, Y., Mochizuki, M., Yamahara, J. and Fujimura, H. (1988). The effect of crude drugs on experimental hypercholesterolaemia: mode of action of (-)-epigallocatechin gallate in tea leaves. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 227-233.

Chyu, K. Y., Babbidge, S. M., Zhao, X., Dandillaya, R., Rierveld, A. G., Yano, J., Dimayuga, P., Cercek, B. and Shah, P. K. (2004). Differential effects of green tea-derived catechin on developing versus established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 109: 2448-2453.

Erba, D., Riso, P., Bordonni, A., Foti, P., Biagi, P.L. and Testolin, G. (2005). Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidative status and plasma lipid profile in humans. *J. Nutr. Biochem.* 16:144-149.

Fukuyo, M., Hara, Y. and Muramatsu, K. (1986). Effect of tea leaf catechin, (-)-epigallocatechin gallate, on plasma cholesterol level in rats. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* 39: 495-500.

Graham, H. N. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *PreV. Med.* 21: 334-350.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L. and Cox, M.M. (1993). *Principles of Biochemistry*. 2nd edition. Irving Place, New York: Worth publishers.

Mathews, C.K., Van Holde, K.E. and Ahern, K.G. (2000). *Biochemistry*. 3rd edition. Sanfran-

- cisco, California: Benjamin/Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman.
- Muramatsu, K., Fukuyo, M. and Hara, Y. (1986). Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 32: 613-622.
- Osada, K., Takahashi, M., Hoshina, S., Nakamura, M., Nakamura, S. and Sugano, M. (2001). Tea catechins inhibit cholesterol oxidation accompanying oxidation of low density lipoprotein in vitro. *Comp. Biochem. Pysiol. C Toxicol. Pharmacol.* 128: 153-164.
- <http://www4.utsouthwestern.edu/.../brown/past2.html>
- http://www.prevention-cardio.com/images/alimentation_et_chlesterol_medium.jpg
- <http://www.catechin.co.uk/catechins.jpg>



พอลิฟีนอลออกซิเดส และการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล ในผักผลไม้

เกียรติศักดิ์ ดวงมัลย์¹

1. บทนำ

การเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลในผักผลไม้ อาจเกิดขึ้นได้เมื่อผักผลไม้ชำหรือเมื่อหั่นผักผลไม้บางชนิดเช่น แอปเปิ้ล มะเขือ หัวปลี โดยจะเกิดสีน้ำตาลขึ้นที่บริเวณรอยหั่น หรือเกิดขึ้นระหว่างการแปรรูปผักผลไม้ ปฏิกิริยาชนิดนี้เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในผักผลไม้ เอนไซม์ที่เป็นสาเหตุหลักของการเกิดปฏิกิริยาประเภทนี้คือ พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มของออกซิโดรีดักเทส (oxidoreductases)

พอลิฟีนอลออกซิเดส จัดเป็นเอนไซม์ประเภท group specificity ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกซึ่งมีโครงสร้างจำเพาะ ซึ่งอาจเป็น monophenol หรือ diphenol ขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ ปฏิกิริยาเกิดในภาวะที่มีออกซิเจน โดยการเกิดออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกก่อให้เกิดสารมัธยันต์ (intermediate) ที่เรียกว่า o-quinones ซึ่งไม่เสถียรและมีความไวต่อปฏิกิริยาสูงและสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยาต่อบัสนาร์ในกลุ่มฟีนอลิก หรือสาร o-quinone หรือกรดอะมิโนหรือโปรตีน หรือสารแอนโทไซยานิน ในผักผลไม้ เกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องและได้สารสีน้ำตาลที่เรียกว่า เมลานิน (melanins) เอนไซม์ชนิดนี้นอกจากพบในผักผลไม้แล้ว สามารถพบได้ในแมลง เชื้อรา บางชนิด เห็ด รวมทั้งในมนุษย์ ซึ่งกลไกการเกิดปฏิกิริยาและสารตั้งต้นในแต่ละแหล่งจะแตกต่างกันออกไป

(Mayer and Harel, 1991; Zawistowski *et al.*, 1991; Amiot *et al.*, 1997; Yoruk and Marshall, 2003)

ผลคืออันเนื่องมาจากปฏิกิริยาของเอนไซม์นี้ได้แก่ การเกิดสีและกลิ่นเฉพาะตัวในผลิตภัณฑ์ประเภทชา กาแฟ ผลไม้แห้ง รวมทั้งการเกิดสีในไวน์แดง อย่างไรก็ตาม ปฏิกิริยานี้ส่งผลเสียในผลิตภัณฑ์บางประเภท เช่น การเกิดสีน้ำตาลที่ไม่เป็นที่ต้องการ (brown discoloration) ในผักผลไม้พร้อมบริโภค (fresh-cut produce) และการสูญเสียคุณค่าทางอาหารเนื่องจากการสูญเสียกรดอะมิโนในการเกิดปฏิกิริยา

2. ความสำคัญของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส ในผักผลไม้

ในภาวะปกติเอนไซม์จะอยู่แยกจากสารประกอบฟีนอลิก เมื่อผักผลไม้เกิดการชำหรือเซลล์แตก จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้น โดยเอนไซม์ที่อยู่ในพลาสติด (plastid) จะเร่งการเกิดปฏิกิริยาของสารตั้งต้นในกลุ่มฟีนอลิก (ในภาวะปกติจะอยู่ใน cell sap) ทำให้เกิดสารมัธยันต์ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาต่อทำให้ได้สารประกอบสีน้ำตาลที่เรียกว่า เมลานิน บทบาทของเอนไซม์ในผักผลไม้ อาจพิจารณาได้ในสองลักษณะ (Vaughn *et al.*, 1988; Mayer and Harel, 1991) คือ

2.1 บทบาทของเอนไซม์เมื่ออยู่ในธรรมชาติ
(Physiological function)

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10400, E-mail: Kiattisak.D@Chula.ac.th

ยังไม่ปรากฏหลักฐานยืนยันที่แน่ชัดเกี่ยวกับบทบาทของเอนไซม์ชนิดนี้เมื่อเอนไซม์อยู่ในเซลล์ แต่เชื่อว่ามีบทบาทต่อการทนหนาวของพืชบางชนิด รวมทั้งมีหลักฐานสนับสนุนว่า เอนไซม์มีส่วนในการสร้างสารที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด และไวรัสที่เข้าทำลายพืชผลไม้หลังจากเกิดการฉีกขาดของเซลล์ (Osuga *et al.*, 1994; Whitaker, 1995a; Yoruk and Marshall, 2003)

2.2 บทบาทของเอนไซม์ที่มีต่ออุตสาหกรรมอาหารและกระบวนการผลิตอาหาร

บทบาทของเอนไซม์ต่อกระบวนการผลิตอาหารจะเด่นชัดและต้องคำนึงถึง เนื่องจากเอนไซม์

จะก่อให้เกิดสารสีน้ำตาลซึ่งเป็นที่ต้องการในผลิตภัณฑ์บางชนิด หรือไม่เป็นที่ต้องการในผลิตภัณฑ์บางชนิดดังที่กล่าวแล้วในบทนำ

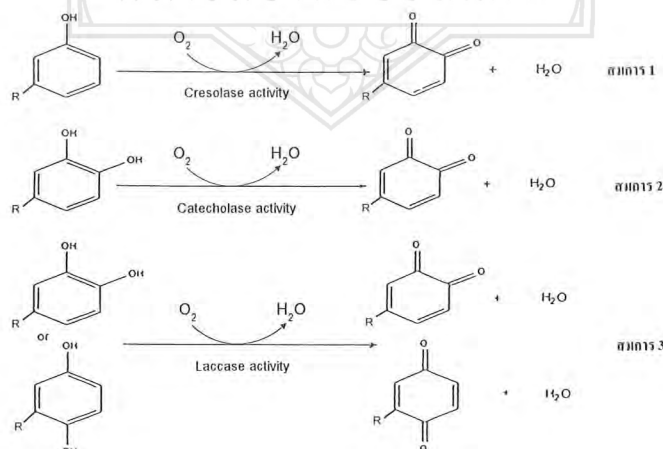
3. ชีวิตเคมีของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส

3.1 กลไกการเกิดปฏิกิริยา

เนื่องจากพอลิฟีนอลออกซิเดสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ซึ่งใช้สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาเอนไซม์แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ขึ้นกับกลไกการเร่งปฏิกิริยาและสารตั้งต้นของปฏิกิริยา เอนไซม์ทั้งสามกลุ่มแสดงในตารางที่ 1 (Mayer and Harel, 1991; Whitaker, 1995b; Yoruk and Marshall, 2003)

ตารางที่ 1 การแบ่งกลุ่มเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส

EC number	ชื่อสามัญ	หน้าที่ของเอนไซม์
EC 1.14.18.1	monophenol monooxygenase, tyrosinase, cresolase	เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิลให้กับ monophenol ทำให้ได้สาร o-dihydroxyphenol และเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ o-dihydroxyphenol ที่เกิดขึ้นให้ได้สาร o-quinone (รูปที่ 1 สมการ 1)
EC 1.10.3.2	o-diphenol oxidase, catecholase, catechol oxidase, phenolase	เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ o-dihydroxyphenol ให้ได้สาร o-quinone (รูปที่ 1 สมการ 2)
EC 1.10.3.1	p-diphenol oxidase, laccase	เร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชันของ o-และ p-diphenol (รูปที่ 1 สมการ 3)

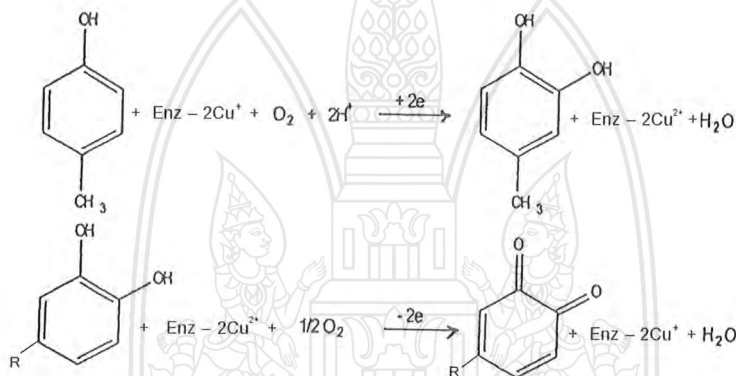


รูปที่ 1 กลไกการเร่งปฏิกิริยาโดยพอลิฟีนอลออกซิเดส

การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ อาจแตกต่างกัน ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับกลไกการเกิดปฏิกิริยาเคมี (Whitaker, 1995b)

1. Cresolase activity เอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ให้กับ monophenol หรือที่เรียกว่า hydroxylation of monophenol ทำให้ได้สาร *o*-dihydroxyphenol จากนั้นเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ *o*-dihydroxyphenol เกิดเป็นสาร *o*-quinone และเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องจนได้เมลานิน

2. Diphenolase activity หรือ catecholase activity เอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ *o*-dihydroxyphenol เกิดเป็นสาร *o*-quinone และเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องจนได้เมลานิน



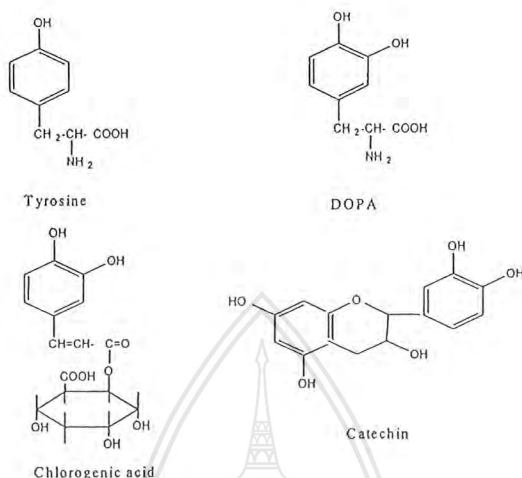
รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงเลขออกซิเดชันของทองแดงในโครงสร้างของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส

3.2 ความจำเพาะต่อสารตั้งต้น (substrate specificity)

เอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสจากแหล่งต่างๆ จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นต่างกัน ดังนั้น เอนไซม์ชนิดนี้จึงจัดเป็น group specificity พอลิฟีนอลออกซิเดสจากสัตว์มักจะมีจำเพาะต่อ tyrosine และ 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) ในขณะที่

ในผักผลไม้แต่ละชนิดอาจมีเพียง cresolase activity หรือ diphenolase activity หรืออาจมีเอนไซม์ซึ่งมีกิจกรรมทั้งสองประเภทก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของผักผลไม้ (Mayer and Harel, 1991) พอลิฟีนอลออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีทองแดงเป็นส่วนประกอบในโครงสร้าง โดยมีทองแดงสองอะตอมอยู่บริเวณ active site ของเอนไซม์และส่งผลต่อ activity ของเอนไซม์ (Yoruk and Marshall, 2003) ในการเกิดปฏิกิริยาจะมีการเปลี่ยนแปลงเลขออกซิเดชันของทองแดง (รูปที่ 2) ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงค่า pH จะส่งผลต่อ activity ของเอนไซม์ เนื่องจาก pH มีผลต่อการจัดเรียงตัวของสายพอลิเพปไทด์ในโครงสร้างของเอนไซม์และมีผลต่อการยึดจับทองแดงที่บริเวณ active site

พอลิฟีนอลออกซิเดสจากพืชและเชื้อรามีความจำเพาะต่อ monophenols และ diphenols หลายชนิด นอกจากนี้ มีรายงานว่า ชนิดของสารตั้งต้นจะมีผลต่ออัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาคู่ (Lee, 1992; Yoruk and Marshall, 2003) ตัวอย่างสูตรโครงสร้างของสารตั้งต้นของพอลิฟีนอลออกซิเดส แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 ตัวอย่างสารประกอบฟีนอลิกที่เป็นสารตั้งต้นของพอลิฟีนอลออกซิเดส

3.3 ค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน

ค่า pH ของพอลิฟีนอลออกซิเดสขึ้นกับแหล่งของเอนไซม์และสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยา Vamos-Vigyazo (1981) ได้รายงานค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นี้ในผักผลไม้หลายชนิด ได้แก่ แอปเปิ้ล กลัวยว อาโวคาโด องุ่น เห็ด มันฝรั่ง ลูกท้อ โดยมีค่าอยู่ในช่วง 5.0-7.0 Zawistowski *et al.* (1991) ได้รายงานค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในอินทผลัม มะเขือยาว ผลกีว ฝรั่ง มีค่าอยู่ระหว่าง 6.0-7.8

ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของพอลิฟีนอลออกซิเดสอยู่ที่ 25-30 องศาเซลเซียส อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น เอนไซม์ประเภทนี้ไม่ทนต่อความร้อน (low heat stability) โดยอุณหภูมิในช่วง 70-90 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ (Zawistowski *et al.*, 1991; Duangmal and Owusu-Apenten, 1999)

3.4 มวลโมเลกุล ค่า pI และ Multiple forms

ตัวอย่างค่ามวลโมเลกุลและค่า pI ของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสจากแหล่งต่าง ๆ แสดงดังตาราง

ที่ 2 จากการศึกษาการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ พบว่าพอลิฟีนอลออกซิเดสในผักผลไม้จะอยู่ในรูปของ multiple forms (Vamos-Vigyazo, 1981 ; Zawistowski *et al.*, 1991; Yoruk and Marshall, 2003) โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะเร่งปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลเช่นเดียวกัน มีค่ามวลโมเลกุลเท่ากัน แต่มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น ค่าอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ค่า pI และ electrophoretic mobility ที่ต่างกัน

4. การยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล

อันเนื่องจากเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส

สามารถยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลประเภทนี้ได้โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ การกำจัดหรือเปลี่ยนรูปของสารตั้งต้นปฏิกิริยา หรืออาจใช้วิธีการซึ่งส่งผลต่อทั้งสารตั้งต้นของปฏิกิริยาและกิจกรรมของเอนไซม์ นอกจากนี้ อาจทำได้โดยการกำจัดออกซิเจนซึ่งเป็นสารตั้งต้นตัวหนึ่งในปฏิกิริยา หรือการคัดเลือกสายพันธุ์ผักผลไม้ที่มียีนที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลต่ำเมื่อมีการฉีดพ่นของเซลล์ (Iyengar and McEvily, 1992; Martinez and Whitaker, 1995)

ตารางที่ 2 มวลโมเลกุลและค่า pI ของพอลิฟีนอลออกซิเดสจากพืช

แหล่งของ พอลิฟีนอลออกซิเดส	มวลโมเลกุล (kDa)		pI	เอกสารอ้างอิง
	ด้วยวิธี Gel filtration	ด้วยวิธี SDS-PAGE		
แอปเปิ้ล (apple)	46	-	4.5-5.0	Janovitz-Klapp <i>et al.</i> (1989)
อาร์ทิโชค (artichoke)	116	-	4.5	Leoni <i>et al.</i> (1990)
มะเขือ (eggplant)	79	-	-	Roudsari <i>et al.</i> (1981)
พลัม (stanley plum)	-	45-66	-	Siddiq <i>et al.</i> (1996)
สตรอเบอร์รี่ (strawberry)	111 และ 34.5	-	- 34.5	Wesche-Ebeling and Montgomery (1990)
กล้วย (banana)	-	31	5.2	Galeazzi <i>et al.</i> (1981)
กล้วย (plantain)	30 และ 70	-	-	Ngalani <i>et al.</i> (1993)
เห็ดพอร์ตาเบลล่า	41	48	5.1, 5.2, 5.3	Zhang and Flurkey (1999)
มันเทศ (sweet potato)	96	25	-	Lourenco <i>et al.</i> (1992)
มันฝรั่ง	-	60	-	Pathak and Ghole (1994)
มันฝรั่ง (var. Cara)	-	60 และ 69	-	Partington and Bolwell (1996)

การใช้สารเคมีในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลก่อนข้างจะมีประสิทธิภาพสูง และเป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย การเลือกใช้ชนิดสารเคมีควรคำนึงถึงธรรมชาติและความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ กลไกการยับยั้ง ความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิของอาหารที่ใช้ รวมทั้งกฎข้อบังคับ กลิ่นรส ความเป็นพิษ และราคาต่อหน่วย มีบทความทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งปฏิกิริยาสีน้ำตาลในผักผลไม้ที่สำคัญ เช่น

บทความของ Vamos-Vigyazo (1981) Macheix *et al.* (1991) Zawistowski *et al.* (1991) Iyengar and McEvily (1992) Martinez and Whitaker (1995) Vamos-Vigyazo (1995) Walker (1995) Amiot *et al.* (1997) Artes *et al.* (1998) and Yoruk and Marshall (2003) เมื่อแบ่งตามกลไกการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลสารยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาจะแยกเป็น 6 กลุ่ม ดังตารางที่ 3 (Iyengar and McEvily, 1992)

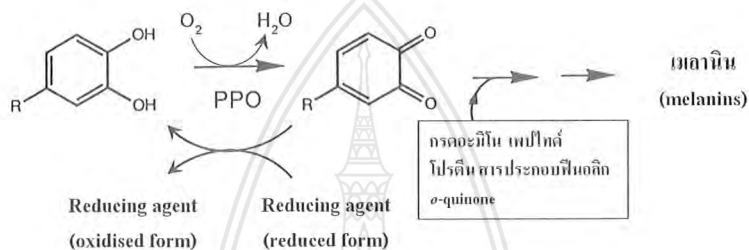
ตารางที่ 3 การจำแนกสารยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลเนื่องจากพอลิฟีนอลออกซิเดส

กลุ่ม	ตัวอย่างสาร
1. Reducing agents	sulphiting agents, ascorbic acid and its derivatives, glutathione, and cysteine
2. Chelating agents	phosphates, EDTA, and organic acids
3. Acidulants	citric acid and phosphoric acid
4. PPO inhibitors	aromatic carboxylic acids, aliphatic alcohols, substituted resorcinols, anions, and peptides
5. Complexing agent	cyclodextrins and chitosans
6. Enzyme treatments	ring-cleaving oxygenases and proteases

4.1 การใช้ reducing agents

Reducing agent จะช่วยชะลอการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลโดยการรีดิวซ์สาร o-quinone ที่เกิดขึ้นให้กลับ ไปเป็นสารประกอบฟีนอลิกดั้งเดิม ดังนั้น การยับยั้งปฏิกิริยาโดยใช้สารในกลุ่มนี้จะยับยั้งได้เพียง

ชั่วคราว เมื่อ reducing agent ถูกใช้หมดไป ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลจะดำเนินต่อไป (รูปที่ 4) ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ สารประกอบซัลไฟต์ กรดแอสคอร์บิกและอนุพันธ์ (Iyengar and McEvily, 1991; Vamos-Vigyazo, 1995)



รูปที่ 4 การทำงานของ reducing agents

เมื่อมีการใช้ reducing agent มักมีช่วงการชะลอการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลหรือที่เรียกว่า lag phase เกิดขึ้น ช่วงระยะเวลาการชะลอขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารที่ใช้ หลังจาก reducing agent หมดไป ปฏิกิริยาสามารถดำเนินต่อไปได้ แต่โดยทั่วไปอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะลดลง (Duangmal and Owusu-Apenten, 1999)

4.1.1 สารประกอบซัลไฟต์ (Sulphiting agents)

โดยปกตินิยมใช้สารประกอบซัลไฟต์ในอาหารหลายชนิด เนื่องจากสามารถช่วยยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลทั้งชนิดที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์และไม่เกี่ยวข้อง สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิด และทำหน้าที่เป็น antioxidant หรือเป็น reducing agent จากการศึกษพบว่า สารประกอบเมตาไบซัลไฟต์นอกจากจะส่งผลต่อสาร o-quinone ที่เกิดขึ้นแล้ว ยังมีผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์อีกด้วย (Sayavedra-Soto and Montgomery, 1986)

เมื่อบริโภคสารประกอบซัลไฟต์ รวมทั้งไธโอซัลเฟอร์ไดออกไซด์เข้าไป ร่างกายจะเปลี่ยนให้เป็นสารประกอบซัลเฟตและขับออกจากร่างกาย แต่ใน

ผู้บริโภครายละเอียดเฉพาะกลุ่มคนผิวขาวมักจะมีอาการแพ้สารในกลุ่มนี้ ทำให้เกิดอาการในกลุ่มผู้ที่มีการหอบหืด (asthmatics) องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (US-FDA) อนุญาตให้มีซัลเฟอร์ไดออกไซด์ตกค้าง (residual sulphur dioxide) ในน้ำผลไม้ผลิตภัณฑ์ มันฝรั่งแปรรูป และในผลไม้แห้งได้ไม่เกิน 300,500 และ 2000 ppm ตามลำดับ ในปัจจุบันมีการห้ามการใช้สารประกอบซัลไฟต์ในผลิตภัณฑ์หลายประเภท ทำให้ต้องหาสาร reducing agent ตัวอื่นมาใช้ทดแทน (Sapers, 1993; Osuga et al., 1994)

4.1.2 กรดแอสคอร์บิกและอนุพันธ์ของกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid and its derivatives)

กรดแอสคอร์บิกไม่เสถียร และถูกออกซิไดซ์ง่าย จึงนิยมใช้อนุพันธ์ของกรดแอสคอร์บิกแทน (Zawistowski et al., 1991) การใช้กรดแอสคอร์บิกและอนุพันธ์ เช่น โซเดียมแอสคอร์บิก erythorbate จะช่วย ยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลในอาหารได้ โดยจะใช้ในรูปของสารละลาย การเพิ่มระยะเวลาการแช่ และเพิ่มความเข้มข้น จะช่วยให้ประสิทธิภาพการยับยั้งสูงขึ้น (Iyengar and McEvily, 1992; Duangmal and Owusu-Apenten, 1999)

4.2 Chelating agents

เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้มีทองแดงที่บริเวณเร่ง ดังนั้น การใช้ chelator จึงช่วยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้ เพราะ chelator จะกำจัดทองแดงออกจากโครงสร้างของเอนไซม์ ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้ ได้แก่ กรดอินทรีย์ และ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งของ EDTA ก่อนข้างต้นเมื่อเทียบกับสารยับยั้งในกลุ่มอื่น (Duangmal and Owusu-Apenten, 1999)

4.3 Acidulants

สารในกลุ่มนี้จะช่วยควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหาร เมื่อค่า pH ของระบบต่ำกว่า 4.0 เอนไซม์จะทำงานได้ช้ามากหรือไม่ทำงาน ทั้งนี้ เนื่องจากค่า optimum pH ของเอนไซม์อยู่ในช่วง 5.0-7.0 นอกจากนี้ pH ของระบบยังมีผลต่อการจับตัว (binding) ของทองแดงที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ ซึ่งจะง่ายต่อการที่ chelator ที่ใช้จะกำจัดทองแดงออกจากโครงสร้างบริเวณ active site ของเอนไซม์ (Iyengar and McEvily, 1992; Yoruk and Marshall, 2003)

ตัวอย่างของ acidulant ที่ใช้ได้แก่ สารในกลุ่มกรดอินทรีย์ เช่น กรดซิตริก กรดมาลิก กรดคาร์บอริก สารในกลุ่มกรดอนินทรีย์ ได้แก่ กรดฟอสฟอริก ในอุตสาหกรรมอาหารนิยมใช้กรดซิตริกในการยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากเอนไซม์ โดยนิยมใช้ในผักผลไม้พร้อมบริโภค ทั้งนี้ เนื่องจากกรดซิตริกมีประสิทธิภาพทั้งด้านการลด pH ให้ต่ำกว่า 4.0 และการเป็น chelator ในการจับทองแดงที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ การเลือกใช้ acidulant ตัวอื่นๆ ควรคำนึงถึงข้อจำกัดในเรื่องราคา และรสชาติของอาหารที่เปลี่ยนไป (Vamos-Vigyazo, 1981; Iyengar and McEvily, 1992) ในปัจจุบันนิยมใช้กรดซิตริกร่วมกับกรดแอสคอร์บิกและอนุพันธ์ของกรดแอสคอร์บิกเพื่อช่วยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลในผักผลไม้พร้อมบริโภค และมีการผลิตสารผสมชนิดนี้จำหน่ายในเชิงการค้า (Artes *et al.*, 1998)

4.4 PPO inhibitors

ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ substituted resorcinols (ได้แก่ 4-hexylresorcinol), aromatic carboxylic acids (เช่น cinnamic acid, *p*-coumaric acid และ ferulic acid), aliphatic alcohols, amino acids, peptides, anions และ kojic acid นอกจากนี้ยังพบว่า aromatic carboxylic acids มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับสารประกอบฟีนอลิกจึงช่วยยับยั้งปฏิกิริยาได้ แต่อย่างไรก็ตาม ในทางการค้ามีใช้เฉพาะ 4-hexylresorcinol เช่น ใช้ในผักผลไม้พร้อมบริโภค และกึ่งแปรรูป (Iyengar and McEvily, 1992)

4.5 Complexing agents

ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไซโคล-เดกซ์ทริน (cyclodextrin) ซึ่งมีกลไกการยับยั้งโดยการสร้างสารประกอบเชิงซ้อน (inclusion complex) กับสารประกอบฟีนอลิก จึงช่วยยับยั้งปฏิกิริยา Lopes-Nicolas *et al.* (2007) ศึกษาผลของการใช้ cyclodextrin (ชนิด α และ β) ต่อการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลในน้ำลูกท้อ พบว่า เฉพาะ α -cyclodextrin เท่านั้นที่ยับยั้งปฏิกิริยาได้

4.6 Enzyme treatments

มีงานวิจัยศึกษาเกี่ยวกับการใช้สาร ring-cleaving oxygenases, proteases และ catechol transferases ในการยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการประยุกต์ใช้ในทางการค้า (Iyengar and McEvily, 1992)

5. บทสรุป

การทำงานของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลในผักผลไม้ การป้องกัน/ยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลทำได้หลายวิธี เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์พืช การกำจัดสารตั้งต้นของปฏิกิริยา การใช้สารเคมี ทั้งนี้การเลือกใช้สารเคมีควรคำนึงถึงประสิทธิภาพ ราคา วิธีการใช้ รวมทั้งผลกระทบต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์ทั้งด้าน สี กลิ่น รส และรสชาติ

เอกสารอ้างอิง

- Amiot, J.M., Fleuriet, A., Cheynier, V., and Nicolas, J. (1997). Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables. In *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*. Tomas-Barberan, F.A. and Robins, R.J. (eds.). Clarendon Press, Oxford. pp 51-86.
- Artes, F., Castaner, M., and Gil, M.I. (1998). Review: Enzymatic browning in minimally processed fruit and vegetables. *Food Sci. Tech.* 4(6): 377-389.
- Duangmal, K. and Owusu-Apenten, R.K. (1999). A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). *Food Chem.* 64: 351-359.
- Galeazzi, M.A.M., Sgarbieri, V.C., and Constantinides, S.M. (1981). Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenoloxidases (PPO) from a dwarf variety of banana (*Musa cavendishi* L.). *J. Food Sci.* 46: 150-155.
- Iyengar, R. and McEvily, A.J. (1992). Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods. *Trends in Food Sci. Tech.* 3: 60-64.
- Janovitz-Klapp, A.H., Richard, F., and Nicolas, J. (1989). Polyphenoloxidase from apple: partial purification and some properties. *Phytochem.* 28(11): 2903-2907.
- Lee, C.Y. (1992). In *Encyclopedia of Food Science and Technology*. Hui, Y.H. (ed.), John Wiley & Son, Inc., New York. pp 224-230.
- Leoni, O., Palmieri, S., Lattanzio, V., and Sumere, C.F.V. (1990). Polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Food Chem.* 38: 27-39.
- Lopez-Nicolas, J.M., Perez-Lopez, A.J., Carbonell-Barrachina, A., and Garcia-Carmona, F. (2007). Use of natural and modified cyclodextrins as inhibiting agents of peach juice enzymatic browning. *J. Agric. Food Chem.* 55: 5312-5319.
- Lourenco, E.J., Neves, V.A., and Da Silva, M.A. (1992). Polyphenol oxidase from sweet potato: purification and properties. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2369-2373.
- Macheix, J.J., Sapis, J.C., and Fleuriet, A. (1991). Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *CRC Crit. Rev. Food Nutr.* 30(3): 441-486.
- Martinez, M.V. and Whitaker, J.R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Sci. Tech.* 6: 195-200.
- Mayer, A.M. and Harel, E. (1991). In *Food Enzymology*. Fox, P.F. (ed.), Elsevier Applied Science Ltd, London. pp 373-399.
- Ngalani, J.A., Signoret, A., and Crouzet, J. (1993). Partial purification and properties of plantain polyphenol oxidase. *Food Chem.* 48: 341-347.
- Osuga, D., Van der Schaaf, A., and Whitaker, J.R. (1994). In *Protein Structure-Function Relationships in Foods*. Yada, R.Y., Jackman, R.L., and Smith, J.L. (eds.), Blackie Academic & Professional, an imprint in Chapman & Hall, Glasgow. pp 62-88.
- Partington, J.C. and Bolwell, G.P. (1996). Purification of polyphenol oxidase free of the storage protein patatin from potato tuber. *Phytochem.* 42(6): 1499-1502.
- Pathak, S.U. and Ghole, V.S. (1994). Affinity purification and properties of polyphenoloxidase

- from *Solanum tuberosum*. *Phytochem.* 36(5): 1165-1167.
- Roudsari, M.H., Signoret, A., and Crouzet, J. (1981). Eggplant polyphenol oxidase: purification, characterization and properties. *Food Chem.* 7: 227-235.
- Sapers, G.M. (1993). Browning of foods: control by sulfites, antioxidants and other means. *Food Tech.* 47: 75-84.
- Sayavedra-Soto, L.A. and Montgomery, M.W. (1986). Inhibition of polyphenoloxidase by sulfite. *J. Food Sci.* 51: 1531-1536.
- Siddiq, M., Sinha, N.K., Cash, J.N., and Hanum, T. (1996). Partial purification of polyphenoloxidase from plums (*Prunus domestica* L. cv. Stanley). *J. Food Biochem.* 20: 111-123.
- Vamos-Vigyazo, L. (1981). Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.
- Vamos-Vigyazo, L. (1995). Prevention of enzymatic browning in fruits and vegetables: a review of principles and practice. In *Enzymatic Browning and Its Prevention*. Lee, C.Y. and Whitaker, J.R. (eds.), ACS Symposium Series 600, American Chemical Society: Washington, D.C. pp 49-62.
- Vaughn, K.C., Lax, A.R., and Duke, S.O. (1988). Polyphenoloxidase: the chloroplast oxidase with no established function. *Physiologia Plantarum.* 72: 659-665.
- Walker, J.R.L. (1995). Enzymatic browning in fruits: Its biochemistry and control. In *Enzymatic Browning and Its Prevention*. Lee, C.Y. and Whitaker, J.R. (eds.), ACS Symposium Series 600, American Chemical Society: Washington, D.C. pp 8-22.
- Wesche-Ebeling, P. and Montgomery, M.W. (1990). Strawberry polyphenoloxides: purification and characterization. *J. Food Sci.* 55(5): 1315-1319.
- Whitaker, J.R. (1995a). In *Food Enzymes: Structure and mechanism*. Wong, D.W.S. (ed.), Chapman and Hall, New York. pp 271-307.
- Whitaker, J.R. (1995b). Recent advances in chemistry of enzymatic browning: an overview. In *Enzymatic browning and its prevention*. Lee, C.Y. and Whitaker, J.R. (eds.), ACS Symposium Series 600: American Chemical Society, Washington, D.C. pp 1-7.
- Yoruk, R. and Marshall, M.R. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *J. Food Biochem.* 27: 361-422.
- Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., and Eskin, N.A.M. (1991). Polyphenol oxidase. In *Oxidative Enzymes in Foods*. Robinson, D.S. and Eskin, N.A.M. (eds.), Elsevier Applied Science Ltd., London. pp 217-273.
- Zhang, X. and Flurkey, W.H. (1999). Purification and partial characterization of tyrosinase isoforms from cap flesh of portabella mushrooms. *J. Food Biochem.* 23: 95-108.

Review of Design and Analysis of Computer Simulated Experiments

Anamai Na-udom ¹

Abstract

Recent advances in computational power have led to the study of physical process through deterministic computer simulated experiments. Usually these experiments are time-consuming and computationally expensive. Hence many efforts have gone into developing cheaper and reliable surrogate models to replace them. In a success of any statistical modeling methods, a choice of an experimental design is critical. A number of modeling methods have been proposed along with various classes of experimental design to construct a surrogate model. In this paper, we review the modeling methods for developing surrogate models for the response from computer simulated experiments: statistical modeling methods, classes of design, which are extensively used in this context. Further, recent studies and some conclusions that have been made from the literature are summarized. The conclusions on design and analysis of computer simulated experiments are presented in the last section.

1. Introduction

Recently computer simulated experiment (CSE) has increasingly replaced classical experiments to investigate a physical complex phenomenon, especially when classical (physical) experiments are not feasible. For instance, the use of reservoir simulator to predict ultimate recovery of oil (Cheong, 2005), the use of finite element codes to predict behaviour of a metal structure under stress (Koehler and Owen, 1996), and so on. CSE is deterministic in nature; hence identical settings of input variables always produce an identical set of output response.

Typically, the user specifies the combination of input values to the computer simulator from which the output values (response) are generated. At this stage, the computer simulator is like a black box (see Figure 1) and not known a priori.

As presented in Figure 1, all sets of input variables at which a black box is operated, is referred to as a design. Each set is referred to as a run ($X_i; i=1,2,\dots,n$). In general, CSEs are computationally expensive to run and may require a large number of input variables (Bates et al., 1996). It is a challenge to statisticians to develop an accurate

¹ Department of Mathematics, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok, 65000, E-mail: anamain@nu.ac.th



Figure 1 Description of computer simulated experiment

surrogate model based on a handful of runs (typically less than 30).

Simpson et al. (2001b) discussed the basic steps in the development of surrogate model which include: choice of experimental design, choice of statistical modeling method, development of surrogate model from observed data, and validation of surrogate model. The work flow of developing surrogate model for CSEs can be summarized as follows.

Step 1: The statement of the problem that we would like to investigate. This step is concerned with the identification of output response and the relevant input variables.

Step 2: The selection of input data points at which CSE will be performed. This is commonly referred to as Design of Experiments (DOE).

Step 3: Obtaining the output response by performing CSE at the design in Step 2.

Step 4: Using statistical modeling techniques to develop surrogate model, relating output response to input variables.

Step 5: Validating the accuracy of surrogate model by using additional test points.

A selection of settings of input variables to run CSEs is a main issue in this context (Step 2). The subject of DOE has extensively improved over

years to keep pace with the changes and development in the method of experimentation. Morris (2000) summarized the development of design of experiments into 3 classes. The first class is the construction of fractional factorial design (FFD) proposed by Box and Hunter in 1961. The FFD construction is based on the idea of the algebraic or geometric argument, involves a small number of level of input variables. The second class is the algorithm to generate the optimal design proposed by Mitchell in 1974 (Mitchell, 1974). The optimal design, however, depends largely on the numerical search scheme for a design under the specified optimality criteria. These two classes of design are extensively practiced in the area of physical experiment. The third class is the construction of design, called Latin hypercube design (LHD), proposed by McKay et al. (1979), used for CSEs. LHD usually involves a large number of settings of input variables and are widely used in CSEs. When using LHD, the output response is normally treated as a realization of a stochastic process generated from all combination of input variables (Sacks et al., 1989; Welch et al., 1992).

Let $X \in R^d$ be the vector of values of input variables for the CSE. The process of CSE can be mathematically expressed as

$$y = f(x) \quad (1)$$

From the equation (1), the computer simulation f computes the output responses based on various settings of input variables. Note that in the context of CSE the computer simulation f is an unknown function and may be taken as a black box. The time required to generate a y value depends largely on the dimension of the problem and the capacity of the computers itself. Usually the number of input variables is large, for example Bates et al. (1996) reported the experiment with 60 input variables. Implementation of a single run on a high speed computer could take up to a day.

CSEs are performed for a variety of purposes. The experimenters might wish to find a good choice of input variable X according to some desired criteria of the response. It is also desirable to find a simple approximation $\hat{f}$ which will act as cheaper surrogate model and offer high approximation accuracy. In order to meet these goals, choice of good design and statistical modeling techniques are critical.

This paper will present the overview of key issues in developing surrogate model for the response from CSE. Details of statistical modeling methods and the methods for evaluating surrogate models are presented in section 2. Design used in the context of CSE is presented in section 3. Summary of statistical modeling methods is presented in section 4 and summary of the designs for CSE is presented in section 5. Finally, the conclusions from all literature studies are summarized in section 6.

2. Statistical Modeling of Computer Simulated Experiments

The CSEs presented in equation (1), can be approximated by the following functional form

$$\hat{y} = g(x)$$

so

$$y = \hat{y} + \varepsilon \quad (2)$$

where, $g(x)$ is some known functions of input variables $x = (x_1, \dots, x_d)$ and ε is the approximation error. The function $g(x)$ is estimated by running CSE at various settings of input variables and recording the corresponding response. The resulting data is processed through statistical modeling techniques to develop functional form of $g(x)$. Different statistical modeling methods are employed based on the nature of the approximation error.

Assume that there are d input variables $(X_1, X_2, \dots, X_d)$ of interest in estimating $g(x)$. A total of n observations of output response (Y) are obtained at different settings of d input variables $x_{ij} (i=1, 2, \dots, n, j=1, 2, \dots, d)$ where x_{ij} denotes the i^{th} setting of j^{th} input variable. Different settings of input variables comprise of design, D , presented as follows

$$D = \begin{pmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1d} \\ x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2d} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{n1} & x_{n2} & \cdots & x_{nd} \end{pmatrix} \\ = (X_{\cdot 1} \quad X_{\cdot 2} \quad \cdots \quad X_{\cdot d}) \\ = (X_1 \quad X_2 \quad \cdots \quad X_n)^T$$

where

$X_{\cdot i} = (x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{id})$, denotes settings of i^{th} ($i = 1, 2, \dots, n$) run of all input variables.

$X_j = (x_{1j}, x_{2j}, \dots, x_{nj})^T$, denotes settings of j^{th} ($j = 1, 2, \dots, d$) input variables.

The vector of corresponding output response variable is denoted by

$$y_0 = (y_1^0, y_2^0, \dots, y_n^0)^T$$

A number of statistical modeling methods have been used in the context of CSE. Most commonly used methods are response surface modeling based on the assumption of random error and Kriging model to accommodate for systematic bias in error.

2.1 Response surface methodology

Response surface methodology (RSM) is one of the simplest techniques for building surrogate models. This method is based on the assumption of random error, arising from a large number of insignificant input variables that are omitted from statistical modeling exercise. Allen *et al.* (2003) and Simpson *et al.* (1997) rewrite the modeling equation (2) in the form

$$y = g(x) + \varepsilon \quad (3)$$

where ε is a random error which is assumed to be normally distributed with mean zero and variance σ^2 and is a $g(x)$ polynomial function of $(X_1, X_2, \dots, X_d)$. Commonly used form of the function $g(x)$ is

$$\hat{y}(x) = \beta_0 + \sum_{i=1}^d \beta_i x_i + \sum_{i=1}^d \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^d \sum_{i < j}^d \beta_{ij} x_i x_j \quad (4)$$

where $\beta_i, \beta_{ii} (i=1, 2, \dots, d)$ and $\beta_{ij} (i < j=1, 2, \dots, d)$ are unknown parameters to be estimated from the observed data. The model in equation (3), for the functional form of equation (4) in terms of the observed value is

$$y_i^0 = \beta_0 + \sum_{j=1}^d \beta_{ij} x_{ij} + \sum_{j=1}^d \beta_{jj} x_{ij}^2 + \sum_{j=1}^d \sum_{j < k}^d \beta_{jk} x_{ij} x_{ik} + \varepsilon_i, 1 \leq i \leq n \quad (5)$$

Equation (5) can be written in the matrix form using the data matrix X as

$$y_0 = X\beta + \varepsilon \quad (6)$$

where $y_0 = (y_1^0, y_2^0, \dots, y_n^0)^T$, X is a $n \times (d+1)$ design matrix, β is a $(\alpha+1)$ vector of the regression coefficients, and ε is a $(n+1)$ vector of random error, α is the number of coefficients to be estimated in the functional form of equation (5). For the functional form of equation (5) $\alpha = 2d + \binom{d}{2} + 1$. The vector of least squares estimators, $\hat{\beta}$, can be determined subject to the minimization of

$$L = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2 = (y_0 - X\beta)^T (y_0 - X\beta) \quad (7)$$

This condition is simplified to

$$X^T X \hat{\beta} = X^T y_0 \quad (8)$$

Therefore, the least squares estimator of β is

$$\hat{\beta} = (X^T X)^{-1} X^T y_0 \quad (9)$$

provided $(X^T X)$ that is invertible.

Once β is estimated, the equation (4) can be used to estimate the output response value at untried settings. In addition to the surrogate model the estimated values of β vectors provide the information on important factors and pairs influencing the response. This is vital to understand complex physical phenomenon and develop simple surrogate model. RSM is used in the context of CSE since it is simple to construct and provides information on input variables sensitivity. According to simulation studies conducted by Allen *et al.* (2003), RSM based methods provide a good approximate solution to even very complex problems.

However in some very complex non-linear problems it may not be possible to develop an accu-

rate surrogate model using equation (4). In these cases complicated statistical modeling methods may be more efficient. Furthermore whatever the functional form of equation (4) will be, it is vital that enough runs are obtained to enable the estimation of all parameters in equation (4). Further it is desirable that variance of the estimated parameter is as low as possible.

2.2 Kriging Model

Kriging model in the context of CSE was proposed by Sacks *et al.* (1989). This method is based on the idea that the response y can be modeled as a polynomial function of input variables and whatever is left can be regarded as a realization of stochastic process, $Z(x)$, with mean zero and some forms of correlation function. Typically is written as,

$$y = \sum_{j=1}^k \beta_j f_j(x) + Z(x) \quad (10)$$

To simplify the model, in most of the practical problems, the polynomial function part in equation (10) is taken as a constant (Sacks *et al.*, 1989; Welch *et al.*, 1992; Simpson, 1998),

$$y = \beta + Z(x) \quad (11)$$

Moreover the researchers believe that there is no effect in terms of prediction capability. The second part on the right of equation (10), $Z(x)$ is considered as a Gaussian correlation function (Sacks *et al.*, 1989; Welch *et al.*, 1992), the most frequently used form can be written as,

$$R(X_i, X_j) = \prod_{j=1}^d \exp(-\theta_j |X_{i,j} - X_{j,j}|^{p_j}) \quad (12)$$

where and $0 \leq p_j \leq 2$ and $\theta_j > 0$.

Normally Kriging model is fitted using the idea of generalized least squares method, and the

problem of estimating all unknown parameters is reduced to estimating the parameters of the correlation function which can be done by the method of maximum likelihood estimation (MLE) (Welch *et al.*, 1992). The maximum likelihood estimators can be obtained by maximizing the log likelihood function,

$$l(\beta, \sigma^2, \theta, p) = -\frac{1}{2} [n \ln \sigma^2 + \ln |R| + (y - I\beta)^T R^{-1} (y - I\beta) / \sigma^2] \quad (13)$$

Given the correlation parameters θ and in p equation (12), the generalized least squares estimate of β is, $\hat{\beta} = (I^T R^{-1} I)^{-1} I^T R^{-1} y$, and the MLE of σ^2 is

$$\hat{\sigma}^2 = 1/n (y - I\hat{\beta})^T R^{-1} (y - I\hat{\beta}) \quad (14)$$

Substituting $\hat{\beta}$ and $\hat{\sigma}^2$ into the likelihood function in equation (13), the problem is to numerically maximize

$$-\frac{1}{2} (n \ln \hat{\sigma}^2 + \ln |R|) \quad (15)$$

which is only a function of the correlation parameters and the data from the design used in data collection step.

After all unknown parameters are obtained, the next step is to build a predictor, $\hat{y}(x)$, of $y(x)$ to act as a cheap surrogate model for the complex computer simulator. The best linear unbiased predictor (BLUP) at an untried input is

$$\hat{y}(x) = \hat{\beta} + r^T(x) R^{-1} (y - I\hat{\beta}) \quad (16)$$

where $r(x)$ is the vector of correlation function between error ($Z(x)$) at design runs and untried input variables x .

Kriging model has received wide attention in many applications of CSEs due to its interpolation property (Bates *et al.*, 1996; Sacks *et al.*, 1989; Simpson, 1998). Simpson. (1998) reported that Kriging

was very flexible because of the wide range of choices of the correlation functions to be chosen.

2.3 Measuring Accuracy of Surrogate

Model

Once surrogate models have been constructed, they would be validated for prediction accuracy. To measure accuracy of the proposed surrogate model, the response $y_t = (Y_1^t, Y_2^t, \dots, Y_k^t)$ is obtained at additional k test points $(X_1^t, X_2^t, \dots, X_k^t)$ through CSE and via the surrogate model $(\hat{y}^t = (\hat{Y}_1^t, \hat{Y}_2^t, \dots, \hat{Y}_k^t))$. A measure of difference (residual) between y_t and $\hat{y}_t$ is calculated to quantify error. The accuracy of the proposed surrogate models can be measured through many criteria based on error. Commonly used measures in the context of CSE are

- Maximum absolute error (MAX)

$$MAX = \max_{1 \leq i \leq k} |y_i^t - \hat{y}_i^t| \quad (17)$$

- Root mean square error (RMSE)

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^k (y_i^t - \hat{y}_i^t)^2}{k}} \quad (18)$$

- Cross validated empirical root mean square error (CRMSE)

$$CRMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^k (y_i - \hat{y}_{-i})^2}{k}} \quad (19)$$

where k is the number of runs in the design, y_i is the actual response for the i^{th} run and $\hat{y}_{-i}$ is the predicted response for the i^{th} run, predicted from a surrogate model developed by deleting the i^{th} run.

The performance of surrogate models in terms of different measures of root mean square error depends on the statistical modeling method

used and the corresponding design points at which the observations are obtained. For example if we are using Kriging method, because it is interpolative in nature, a good spread of points is required in the design region. Whereas if we are using RSM, in which global model is constructed, it is important that observations are obtained at points of critical changes in the response surface. When the number of observation is limited, it is critical that observations are obtained at appropriate locations in design space. The choice of design point (Design) is critical for success of any statistical modeling method. The methods for selecting good design are presented in the next section.

3. Experimental Designs for Computer Simulated Experiments

As CSEs are computationally expensive to run, only a limited number of runs can be performed at given setting of input variables to generate output response. Hence it is essential that the design is selected in such a manner that all important features of the process under study are represented in the design.

As mentioned before the output responses from CSEs are deterministic, the principle of randomization, replication and blocking, used for physical experiments (Sacks et al., 1989) are irrelevant. Thus, the best approach is to fill the design points over the design region of interest (space filling design). There are many classes of experimental designs proposed in the context of CSE which will be described in the next section.

3.1 Latin hypercube design (LHD)

Latin hypercube design (LHD) has been extensively used in the context of CSE. It was originally proposed by McKay *et al.* (1979). LHD is a matrix (X), of n rows and d columns where n is the number of runs and is the number of input variables. LHD can be constructed based on the idea of stratified sampling (Box *et al.*, 2005) to ensure that all sub-regions in the divided input variable space will be sampled with equally probability. A Latin hypercube sampling has

$$X_{ij} = \frac{\pi_{ij} - U_{ij}}{n} \quad (20)$$

where π_{ij} are the elements of an $n \times d$ matrix comprising of columns $\pi_i (i=1, 2, \dots, d)$. Each column $\pi_i (i=1, 2, \dots, d)$ is independent random permutation of number $1, 2, \dots, n$ and U_{ij} are $n \times d$ values of *i.i.d.* uniform $U[0,1]$ random variables independent of the π_{ij} . The examples of LHD are presented in Figure 2.

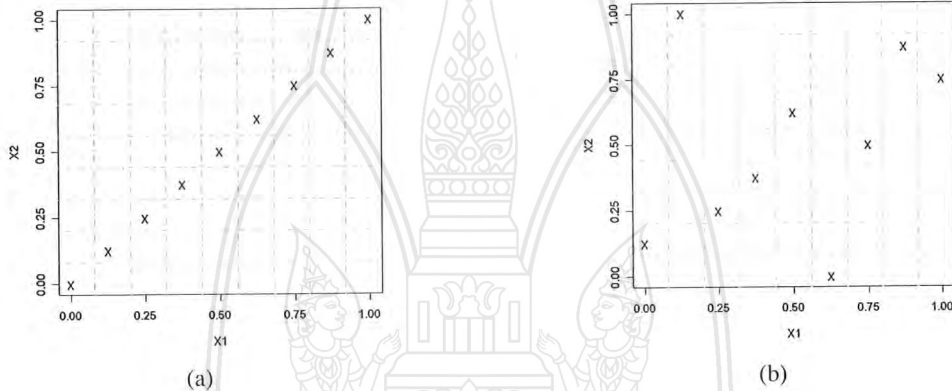


Figure 2 Random Latin hypercube designs

LHDs are easy to generate since they require only a random permutation of n levels for each column of input variables. Moreover, they ensure uniform coverage of each input variable in one dimensional space. However, this does not ensure uniform coverage in higher dimension. For example in Figure 2(a), although there is a uniform coverage of each variable on dimensional space, it represents a very bad coverage of design space in two dimensions. Such an LHD is not a good design. In practice a good LHD is selected, which covers the entire design space as uniformly as

possible. Normally the optimal LHD is generated through search algorithms (e.g. Columnwise-pairwise algorithm (CP), Simulated annealing algorithm (SA), Genetic algorithm (GA)) under pre-specified optimality criteria (e.g. entropy criterion, maximin distance criterion, ϕ_p criterion).

3.2 Symmetric Latin hypercube design (SLHD)

SLHD, proposed by Ye *et al.* (2000), comprises $n \times d$ LHD with levels from 1 to n , if $(a_1, a_2, \dots, a_d)$ is one of the rows, and then a vector

$(n+1-a_1, n+1-a_2, \dots, n+1-a_d)$ must be another row in the design matrix. In other words, if s_i is a design point in a SLHD, then there exists another point s_j in the design that is the reflection of s_i through the centre. An example of 5 x 4 SLHD is presented in Table 1.

Table 1 The SLHD

X_1	X_2	X_3	X_4
1	2	2	5
2	5	1	2
3	3	3	3
4	1	5	4
5	4	4	1

It is believed that this class of LHD provides the orthogonality among the input variables and the flexibility in run size. Like LHD, a good SLHD is selected, which covers the design space uniformly, via search algorithms and pre-specified optimality criteria

3.3 Fractional factorial designs (FFD)

A $n \times d$ LHD requires the experimenter to run experiment at n distinct setting of each input variable. There are some applications where LHD may not be the best to use. For instance, when the number of levels of input variables is small (e.g. gross rock volume in petroleum engineering) or the input variables are qualitative (e.g. porosity distribution or facies selection). In this case one can merge level of LHD (see Ye, 1998) to a small number of levels, but this may not be very effective, as this will introduce some correlation in the column of the design matrix. Avoiding such problems, Fractional factorial designs (FFD) can be effectively used. These designs are commonly used in physical experiments and their details can be found in many textbooks

(Box *et al.*, 2005; Montgomery, 2004).

The most basic experimental design for physical experiments is a full factorial design. The number of design points is specified by the combination of the levels for each input variables. The common design in this class is 2^k , the design with k input variables and 2 levels for each input variable. This design aims to evaluate the main and interaction effects. Another popular form is 3^k design, the design with k input variables with 3 levels for each input variable. This design is able to evaluate the main, linear and quadratic, and interaction effects respectively. The number of runs for a full factorial design increases exponentially when the number of input variables is large. This leads to costly experimentation when a large number of input variables are required. In such cases, FFDs are desirable to be much more economical for the experimenters. A Fractional factorial design is a fraction of a full factorial design. For example the commonly used 2^{k-p} design, with fraction $1/2^p$. The construction of FFD is illustrated in (Box *et al.*, 2005; Montgomery, 2004; Wu and Hamada, 2000).

FFD performs well because of the sparsity of effects principle. According to this principle every system can be described by few dominant main effects and low-order interactions. The construction of FFD needs to be practiced with great care to prevent any effects of interest from being aliased with each other. Some authors (Cheong, 2005; Gupta and Vijayan, 2003; Simpson, 1998) have reported that FFD can be used in the context of CSEs and are capable of leading to an accurate surrogate model with very little computational expense.

3.4 General design used for computer simulated experiments

Central composite design (CCD) consists of a factorial design with the corners at ± 1 of the cube, augmented by additional “star” and “center” points, which allow the estimation of the second-order polynomial equation. The star points refer to the distance $\pm\alpha$ from the origin. The distance α can be greater than 1 or can be specified based on the number of input variables. If $\alpha = 1$, then the design is called a face-centered CCD or CCF for short; if $\alpha < 1$, then the design is called inscribed CCD or CCI for short. CCDs require $2^d + 2d + 1$ points for fitting second-order polynomial with $(d+2)(d+1)/2$ coefficients where d is the number of input variables. CCDs are widely used in engineering computer applications along with second-order response surface models (Simpson, 1998).

Box-Behnken designs are a family of three-level designs and can be constructed by the combination of factorial and incomplete block designs (Montgomery, 2004). These designs are originally proposed to use in the fitting of second-order response surface models. They are used in some applications of CSEs (Cheong, 2005; Simpson, 1998). Two level Plackett-Burman (PB) designs (for more details see Montgomery, 2004) have also been used in the context of CSE. These designs are used to study $d = n-1$ variables in n runs where n is a multiple of 4. However, PB designs cannot be used when higher number of levels is required.

The orthogonal array (OA) design was proposed by Tang (1993) and has been used in the context of CSE by Butler (2001), Leary *et al.* (2003) and Simpson *et al.* (2001a). This design allows the estimation of each input variable independently.

For a given set of values of n and d , all of the designs discussed previously can be constructed theoretically or searched through algorithms to obtain an appropriate coverage of design space.

4. Summary of Statistical Modeling Methods

This section presents the summary of comparison of statistical modeling methods through a range of test problems, investigated by many authors in the context of CSE. Let us first look at the Kriging method proposed by Sacks *et al.* (1989) as presented in section (2.2). In this method the error is modeled as a realization of a stochastic process and the predictions are performed as adjusted interpolation between observations. In Sacks *et al.* (1989), a circuit simulator codes with 6 input variables were modeled for skew output using Kriging method (equation (11) and Gaussian correlation in equation (12)) and LHD design. The RMSE value was reported as 0.122 based on 100 external validation points. When skew output was modeled using RSM and the same LHD, RMSE was reported as 0.674. It is difficult to figure out the reason for poor performance of RSM because the design used was not the best suited for the modeling method. The design proposed later in the rejoinder of (Sacks *et al.* 1989) indicated that FFD was not too far out. The selection of optimal design was performed for choice of model correlation parameter as $\theta = 2$. In practice, the value of θ is not known, the values can only be guessed or referred to very limited empirical studies (Sacks *et al.*, 1989; Welch *et al.*, 1992), indicating $1 \leq \theta \leq 2$ as robust initial values. Although a single optimal design was used, the Kriging seems to be a good alternative to proceed.

Guinta et al. (1998) compared Kriging and RSM via a range of test problems of different dimensions. For 5 and 10 dimensional problems the RMSE of RSM is lower than Kriging. Simpson et al. (1998) applied these two methods to multidisciplinary designs of an aero spike nozzle, the goal of Simpson et al. (1998) is to examine the addition of computational expenses required to perform Kriging and to compare the prediction capability of Kriging and RSM models. The data used to fit the second order RSM and Kriging with a constant term are obtained from random orthogonal array. They found that there was no significant difference between the two models in terms of prediction capability based on RMSE values.

Allen et al. (2003) conducted a comparative study by considering RMSE and concluded that RSM was comparable to Kriging method. The authors also pointed out that choices of design used to construct a surrogate model have a strong effect on the prediction accuracy. Simpson et al. (2001a) compared between five experimental design classes and four techniques of approximation model with various sample sizes, the conclusion was that second order RSM performed very well and could be comparable to Kriging method.

From a large number of empirical studies conducted by various authors, it indicates that RSM cannot be discarded from choice of modeling method for CSEs. RSM may require less number of runs to give comparable results to Kriging or sometimes even better results. RSM is easy to implement and interpret, while Kriging with good choice of design, usually LHD can lead to more accurate results. The choice of design, usually LHD is straight forward in this case.

Empirical studies do not lead to an unequivocal conclusion on the best choice of statistical modeling method for CSEs. The choice of the statistical modeling method must be guided by the potential use of the desired model and restrictions on experimental resources. For example if the surrogate model is to be used for evaluating field economics via simulation, a Kriging type of model would be very tedious to implement. If we are restricted in terms of number of distinct levels setting of each input variable, LHD type design is not the best to use. In this case Kriging may not be efficient. On the other hand if the purpose of modeling exercise is to predict response at untried settings only, Kriging may be the right choice of method to use.

While Kriging and RSM have received wide attention in developing the surrogate models, there are many other types of statistical modeling methods such as Multivariate Adaptive Regression Splines (MARS), Radial Basis Functions (RBF) and Artificial Neural Network (ANN) that have been adopted to use in the context of CSE. Some comparative studies among those models have been reported. Simpson et al. (2001a) compared between RSM, Kriging, RBF and MARS. All combinations of design of experiments and approximation models were tested on two engineering applications (three and fourteen dimensional problems, respectively), which had a wide range of nonlinearity. Then, the model accuracy was measured by the maximum absolute error (MAX) and root mean square error (RMSE). The empirical studies indicated that MARS required a large number of runs compared to the other modeling methods to achieve comparable prediction accuracy, whereas the performance of RBF

was comparable to that of Kriging.

Hussain *et al.* (2002) did a comparison between RBF and polynomial approximation models. The study was conducted using 7 two-dimensional problems with design points from full factorial design and LHD. The statistical models were compared via mean squared error (MSE). The results showed that RBF models performed better than polynomial models for all test problems.

De Veaux *et al.* (1993) did a comparison between MARS and ANN using various complexity test problems. The study indicated that the MARS models performed better than ANN models in most cases. The generation of approximation models via MARS method is much faster than ANN. Although, no clear conclusion can be reached on the best statistical modeling method through empirical studies presented in literature studies, Kriging model continues to be the preferred method for modeling response from CSE.

5. Summary of Design of Experiments

Performance of any surrogate models depends on the statistical modeling method used and the data acquired to develop the surrogate model. For example, when using Kriging method, the data points should uniformly spread over the design region for interpolative strategy to work. Whereas when using RSM method, it may be sufficient to capture points that influence the global model.

Essentially, a good design should be capable of capturing all important features of the process under study. A basic approach is to first start with covering each feature uniformly in one dimension and then trying to control the spread of points in higher dimension. A design in which each

dimension is covered uniformly is referred to as Latin hypercube design, widely practiced in the context of CSE. These designs were proposed by McKay *et al.* (1979), as an extension of stratified sampling over design space to ensure uniform coverage of each input variable. The sampling plans (Simple random sampling, Stratified sampling and LHD) were compared through a 4 dimension problem, using 16 runs and 50 random replications of the design. The estimation of mean response was comparable across these sampling plans, whereas the variance in the estimation of mean response was the smallest for LHD sampling, nearly 1/4 of the variance under random sampling. Similar superiority of LHD was observed when estimating the variance and the distribution function in general.

To obtain more than one dimension uniform coverage of input variables, the uniform designs proposed by Fang and Wang (1994) can be used. These designs ensure uniform coverage of each input variable (like LHD) and uniform coverage across specified dimension s , where $s \geq 2, 3, \dots, d$. The best design is usually searched to optimize a discrepancy measure. Fang *et al.* (2000) reported that most of the uniform designs had orthogonality property, highly desirable from estimation point of view.

The idea of orthogonality was propagated in the development of LHD by Owen (1995), Tang (1993), Ye (1998) and Butler (2001). In general, uniform coverage over t (strength of OA) dimensional stratification can be obtained through this approach. Method proposed by Ye (1998) is simple and can accommodate for a range of optimality criteria. The only disadvantage of moving along the orthogonality issue is the limitation of run size.

For example, in method proposed by Ye (1998), run size is restricted to 2^m or $2^m + 1$ with $2^m - 2$ columns. In addition, in the technique proposed by Butler (2001) number of runs (n) should be prime and $d \leq (n-1)/2$.

The goodness of spreading design points over the design space can be measured through a range of optimality criteria (see Koehler and Owen, 1996; Morris and Mitchell, 1995; Sacks *et al.*, 1989 for more details). A number of proposed search algorithms (see Jin *et al.*, 2005; Leary *et al.*, 2003; Li and Wu, 1997; Li and Shigeru, 2001; Liefvendahl and Stocki, 2006; Morris and Mitchell, 1995; Park, 1994; Ye *et al.*, 2000) are available to search for an optimal design (usually LHD) for a given optimality criterion. Park (1994) proposed row exchange type algorithms, Li and Wu (1997) proposed CP exchange algorithm, while Morris and Mitchell (1995) proposed SA. GA in this context were implemented by Li and Shigeru (2001). Empirical studies presented in Li and Shigeru (2001), indicated that for the maximin optimality criterion, GA provides improvement over other algorithms (i.e. the efficiency ratio of 7.89% compared to 5.03% for SA and 3.34% for Park's algorithm when $n = 14$ and $d = 7$).

In spite of popularity of LHD, there are some applications where LHD may not be the best to use. For instance, when the number of levels of input variables is small or it is qualitative. In this case the levels of LHD can be merged to a smaller number of levels. As seen in Ye (1998), he constructed a 17-run OLHD, as one input variable can appeared at six levels only, he merged 17 levels of the corresponding column in the LHD to 6 levels. This is not the best practice as it would introduce

some correlation in the column of the design matrix. To avoid such problems, the designs for physical experiments (e.g. FFD) can be used.

Simpson *et al.* (2001b) reported that various classes of CCD, widely used in engineering applications, can be also used for CSEs. The CCD classes offer an efficient design for fitting second order response surface methodology.

Some authors (Gupta and Vijayan, 2003; Simpson *et al.*, 2001b) have reported that FFD can be used in the context of CSE and is capable of leading to an accurate surrogate model, and the computational expense is not required. The expert opinion can also be incorporated in selecting a correct fraction of FFD and estimating important interactions at least partially.

In the context of CSE, LHD continues to be the most widely practiced design due to its flexibility of run size and ease of experimentation implementation. Nevertheless the classical designs for physical experiment are still in existence.

6. Conclusions

Recently due to proliferation of digital technology, CSEs are widely used to investigate the complex physical phenomena, especially when the physical experiments are not feasible. Usually, CSEs are complex mathematical models that may take enormous amount of time to complete a single run. CSEs have no random error, that is every run with the same input value results in an identical output value. For end users, they are almost like a black box, the users provide the input values and obtain the output. Therefore a surrogate model of CSE is desired, that is transparent, easy to propagate for further applications and indicates the main charac-

teristics of the process. The traditional methods of physical experiments need to be modified to make allowance for characteristics of new method of experimentation. This paper has reviewed the work presented in literatures of CSE. Kriging statistical modeling method, which originated for modeling geological processes, is widely practiced for developing a surrogate model for CSEs. In Kriging, error structure is modelled as a realization of a stochastic process. The key part of the modeling involves estimation of the parameters of error structure. For Gaussian error structure the maximum likelihood method is being used. Care should be practiced in selecting input data points, as two nearby points can lead to nearly singular correlation matrix (R), causing huge errors in the MLE of error parameters. Due to interpolative nature, Kriging leads to good predictive property for complex process, however such developed surrogate models are unwieldy. The commonly used RSM for physical experiments is not far behind Kriging in terms of prediction capability. Other statistical modeling methods such as MARS, RBF and ANN also claimed to perform well in this area.

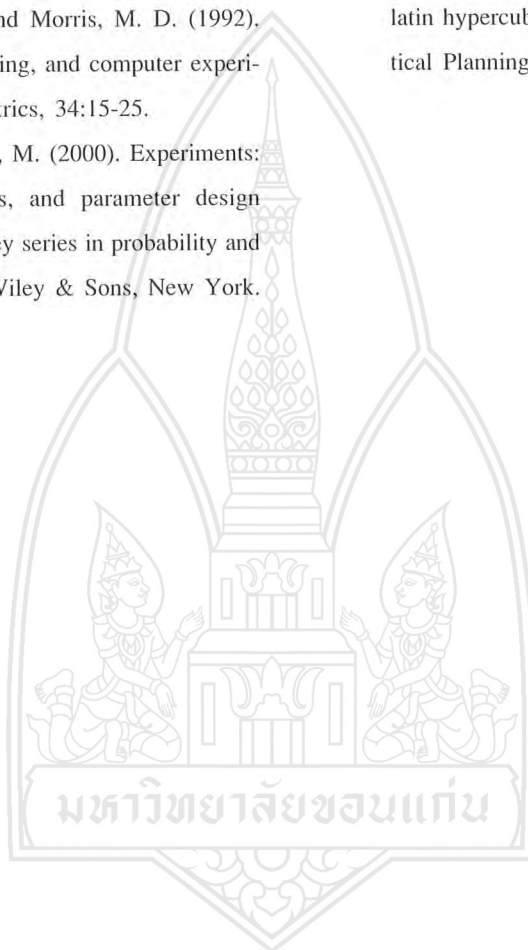
From the design methodology point of view, LHD class is widely used along with Kriging model. LHDs ensure uniform coverage of each input variable space and are flexible in run size. The uniform coverage across all input variable space is attained by searching for LHD satisfying a range of optimality criteria. However, in some applications, LHD may not be the best choice to use if the distinct levels of input variable are restricted. In this case, traditional designs for physical experiments (e.g. FFD, CCD) along with RSM model would be good alternative.

References

- Allen, T. T., Bernshteyn, M.A., and Kabiri-Bamoradian, K. (2003). Constructing meta-models for computer experiments. *Journal of Quality Technology*, 35:264-274.
- Bates, R. A., Buck, R. J., Riccomagno, E., and Wynn, H.P. (1996). Experimental design and observation for large systems. *Journal of the royal statistical society, Series B*, 58: 77-94.
- Box, G.E.P., Hunter, W. G., and Hunter, J.S. (2005). *Statistics for experimenters: Design, Innovation, and Discovery*, 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York.
- Butler, N.A. (2001). Optimal and orthogonal latin hypercube designs for computer experiments. *Biometrika*, 88(3):847-857.
- Choeng, Y.P. (2005). Experimental design and analysis methods in reservoir uncertainty studies. PhD thesis, Curtin University of Technology.
- De Veaux, R.D., Psychogios, D. C., and Ungar, L. H. (1993). A comparison of two nonparametric estimation schemes: Mars and neural networks, *Computer chem. Engng*, 17(8): 2-54.
- Fang, K.T., Lin, Dennis, K.J., Winker, P., and Zhang, Y. (2000). Uniform design: Theory and application. *Computer chem.. Engng*, 42(3): 237-248.
- Fang, K.T., Wang, Y. (1994). *Number-Theoretic Methods in Statistics*. Chapman & Hall, London.
- Guinta, A. Watson, L.T. and Koehler, J. (1998). A comparison of approximation modeling techniques: polynomial versus interpolating

- models. In proceeding of the 7th IAA/USAF/NASA/ISSMO Symposium on Multidisciplinary Analysis and Optimization, 1: 392-404.
- Gupta, R. and Vijayan, K. (2003). Methods for design and analysis of computer experiments. *Statistical Methods*, 5(2): 195-212.
- Hussian, M.F., Barton, R.R., and Joshi, S.B. (2002). Metamodeling: Radial basis functions, versus polynomials. *European Journal of Operation Research*, 138:142-154.
- Jin, R., Chen, W., and Sudjianto, A. (2005). An efficient algorithm for constructing optimal design of computer experiments. *Journal of Statistical Planning and Inference*, 134: 268-287.
- Koehler, J. and Owen, A.B. (1996). Computer experiments. *Handbook of Statistics*, volume 13, Elsevier Science, New York, 261-308.
- Leary, S., Bhaskar, A., and Keane, A. (2003). Optimal orthogonal-array-based latin hypercubes. *Journal of Applied Statistics*, 30(5):585-598.
- Li, W. and Wu, C.F.J. (1997). Columnwise-pairwise algorithms with applications to the construction of supersaturated designs. *Technometrics*, 39:171-179.
- Li, Z. and Shigeru, N. (2001). Maximin distance-lattice hypercube design for computer experiment based on genetic algorithm. *IEEE explore*, 2:814-819.
- Liefvandahl, M. and Stocki, R. (2006). Study on algorithms for optimization of latin hypercubes. *Journal of Statistical Planning and Inference*, 136:3231-3247.
- Mckay, M.D., Beckman, R.J., and Conover, W.J. (1979). A comparison of three methods for selecting values of input variables in the analysis of output from a computer code. *Technometrics*, 21:239-246.
- Mitchell, T. J. (1974). An algorithm for the construction of "d-optimal" experimental designs. *Technometrics*, 16: 211-220.
- Montgomery, D. C. (2004). *Design and Analysis of Experiments*, John Wiley & Sons, New York, 6th Edition.
- Morris, M.D. (2000). Three technometrics experimental design classics. *Technometrics*, 42(1): 26-27.
- Morris, M.D. and Mitchell, T.J. (1995). Exploratory design for computational experiments. *Journal of Statistical Planning and Inference*, 43:381-402.
- Owen, A. (1995). Orthogonal arrays for computer experiments, integration and visualization. *Statistica Sinica*, 2:439-452.
- Park, J.S. (1994). Optimal latin hypercube designs for computer experiments. *Journal of Statistical Planning and Inference*, 39:95-111.
- Sacks, J., Welch, W. J., Mitchell, T. J., and Wynn, H. P. (1989). Design and analysis of computer experiments. *Statistical Science*, 4(4):409-435.
- Simpson, T. W. (1998). A concept exploration method for product family design. PhD thesis, Georgia Institute of Technology.
- Simpson, T. W., Lin, D. K. J. and Chen, W. (2001a). Sampling strategies for computer experiments: Design and analysis. *International Journal of Reliability and applications*, 2(3):209-240.
- Simpson, T. W., Peplinski, J. D., Koch, P. N. and Allen, J. K. (2001b). Metamodels for computer-based engineering design: Survey

- and recommendations. *Engineering with Computers*, 17(2):129-150.
- Tang, B. (1993). Orthogonal array-based latin hypercubes. *Journal of the American Statistical Association*, 88:1392-1397.
- Welch, W. J., Buck, R. J., Sacks, J., Wynn, H. P., Mitchell, T. J., and Morris, M. D. (1992). Screening, predicting, and computer experiments. *Technometrics*, 34:15-25.
- Wu, C. F. J. and Hamada, M. (2000). *Experiments: planning, analysis, and parameter design optimization*. Wiley series in probability and statistics. John Wiley & Sons, New York.
- Ye, K. Q. (1998). Orthogonal column latin hypercube and their application in computer experiments. *Journal of the American Statistical Association*, 93:1430-1439.
- Ye, K. Q., Li, W., and Sudjianto, A. (2000). Algorithmic construction of optimal symmetric latin hypercube designs. *Journal of Statistical Planning and Inference*, 90:145-159.



การจำแนกสปีชีส์ของสัตว์ในส่วนผสมเนื้อสัตว์ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์เชิงซ้อน

Identification of Animal Species in Meat Mixtures by Multiplex PCR Technique

กัญญา จิระเจริญรัตน์¹, ฐาปนา เขมนิพิฐพนธ์¹, จุฑารัตน์ เศรษฐกุล¹

บทคัดย่อ

การจำแนกสปีชีส์ของเนื้อสัตว์ในเนื้อสัตว์ผสมหลังผ่านการตีบและปรุงสุกด้วยความร้อนเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถเพิ่มความมั่นใจของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปประเภทเนื้อสัตว์ได้ เทคนิคพีซีอาร์เชิงซ้อนถูกนำมาใช้ในการทดสอบโดยทำการออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อยีน 12S rRNA ในไมโทคอนเดรียของโค กระบือ และสุกร ซึ่งให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดแตกต่างกัน คือ 180 280 430 และ 670 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคพีซีอาร์เชิงซ้อนที่ออกแบบในการจำแนกดีเอ็นเอของสัตว์ พบว่าความไวในการตรวจสอบดีเอ็นเออยู่ที่ระดับ 0.1 นาโนกรัม ขณะที่ความสามารถในการตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมเนื้อสัตว์ อยู่ที่ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนัก รวมทั้งในเนื้อดิบและเนื้อที่ผ่านความร้อนที่ 82 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที อย่างไรก็ตาม เมื่อนำเนื้อสัตว์ผสมไปผ่านความร้อนที่ 116 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ 60 นาที ความสามารถในการตรวจสอบดีเอ็นเอของสุกรลดลงกว่าสัตว์ชนิดอื่นโดยสามารถตรวจสอบได้เมื่อใช้เนื้อสุกรในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า เทคนิคพีซีอาร์เชิงซ้อนที่ออกแบบในการทดลองครั้งนี้สามารถใช้ในการจำแนกดีเอ็นเอของโค กระบือ ไก่ และ สุกรในส่วนผสมเนื้อสัตว์ได้ การพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เชิงซ้อนให้มีประสิทธิภาพในการจำแนกดีเอ็นเอของสัตว์ให้สูงขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจสอบสปีชีส์ของสัตว์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปน่าจะเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคเป็นอย่างยิ่ง

Abstract

Identification of meat species in meat-based products after homogenization and cooking is one approach to increase consumer confidence. Multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR) was used in this experiment for meat species identification. A set of primers specific to 12S rRNA mitochondrial DNA of cow, chicken, buffalo and pig was designed and the product sizes after PCR amplification were 180, 280,

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

⁴ corresponding author, E-mail: kjkanya@kmitl.ac.th

430 and 670 base pairs, respectively. The DNA detection efficiency of the primer set was investigated. The results showed that the sensitivity of DNA detection was 0.1 nanogram. While the detection efficiency of the multiplex PCR in meat mixtures showed that the DNA of animal species was detected when the meats were mixed as little as 1%wt of the product either in raw meat or in the meat mixtures cooked at 82°C for 20 minutes. However, when the meat mixtures were cooked at 116°C for 30 minutes and 60 minutes, the efficiency of pig DNA detection decreased with pig meat proportions of 10%wt and 50%wt, respectively. The results indicated that the multiplex PCR could be used to identify the DNA of cow, buffalo, chicken and pig in meat mixtures. Development of a better efficiency multiplex PCR technique for identification of animal species in meat products would be beneficial for consumers.

คำสำคัญ: การจำแนก, เทคนิคพีซีอาร์เชิงซ้อน, สปีชีส์ของสัตว์, ส่วนผสมเนื้อสัตว์

Keywords: Identification; Multiplex PCR technique; Animal species; Meat mixture

บทนำ

ในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา ได้มีความพยายามที่จะจำแนกเนื้อสัตว์ที่ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ ทั้งอาหารสำหรับมนุษย์และอาหารสำหรับสัตว์เลี้ยง เพื่อให้เกิดความมั่นใจต่อผู้บริโภคและผู้เลี้ยงสัตว์ว่า อาหารนั้นมีส่วนประกอบที่ถูกต้องตามที่ระบุบนฉลากและไม่มีสัตว์อื่นปลอมปน เช่น เนื้อสัตว์ที่ราคาถูกกว่า เนื้อสัตว์ต้องห้ามตามหลักศาสนา หรือเนื้อสัตว์ต้องห้ามตามมาตรฐานอาหารยุโรป เช่น การปนเปื้อนของเนื้อโคซึ่งอาจเป็นโรควัวบ้าในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ หรือการปนเปื้อนเนื้อสุกรในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลสำหรับผู้บริโภคที่เป็นชาวมุสลิม รวมทั้งการตรวจสอบที่มาของเนื้อสัตว์ซึ่งอาจเป็นเนื้อสัตว์ป่าสงวนที่มีการลักลอบนำมาบริโภค

การพัฒนาเทคนิคการจำแนกสปีชีส์ของเนื้อสัตว์ในอาหารยังมีไม่มากนัก ในช่วงแรกได้มีการใช้เทคนิคการวิเคราะห์โปรตีน แต่เนื่องจากเมื่อโปรตีนผ่านความร้อนจะมีการการเสียสภาพของโปรตีน ทำให้การจำแนกสปีชีส์ของสัตว์ในผลิตภัณฑ์อาหารที่ปรุงสุกไม่ให้ผลการตรวจที่ดีเท่าที่ควร (Momcilovic and Avraham, 2000) ปัจจุบันจึงได้มีการนำเทคนิคทางดีเอ็นเอมาพัฒนาแทนที่โดยการใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนยีนด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง มี

ความแม่นยำและใช้ตัวอย่างตรวจที่มีปริมาณน้อย โดยสามารถทำการตรวจสอบสปีชีส์ของสัตว์ได้หลายวิธี เช่น การใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม ที่เรียกว่า PCR-Random Amplified Polymorphic DNA: PCR-RAPD (Lee and Chang, 1994; Martinez and Yman, 1999; Saez et al., 2003), การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือ PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism: PCR-RFLP (Aida et al., 2005; Meyer et al., 2002; Montiel-Sosa et al., 2000; Murray et al., 1995; Tartaglia et al., 1998; Wang et al., 2004; Zehner et al., 1998) และการออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อสปีชีส์เป้าหมาย หรือ Species-specific PCR (Bellagamba et al., 2003; Calvo et al., 2001; Calvo et al., 2002; Dalmaso et al., 2003; Di Pinto et al., 2004; Rajapaksha et al., 2002; Rodriguez et al., 2004; Tajima et al., 2002)

อย่างไรก็ตาม เทคนิคที่มีรายงานข้างต้นไม่สามารถแปลผลได้เมื่อมีการผสมเนื้อสัตว์หลายชนิดในตัวอย่างตรวจเดียวกัน ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาเทคนิคการเพิ่มจำนวนยีนโดยใช้ไพรเมอร์เชิงซ้อนที่ออกแบบให้จำเพาะต่อสปีชีส์ของสัตว์เป้าหมาย 4 สปีชีส์ ได้แก่ โค กระบือ ไก่ และสุกร ซึ่งเป็นสัตว์ที่นิยมนำเนื้อมาบริโภคในประเทศไทย โดยเทคนิคพีซีอาร์ที่ออกแบบสามารถทำการจำแนกสปีชีส์ของเนื้อสัตว์ทั้งสี่ชนิดได้ในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียวเท่านั้น

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างเนื้อสัตว์

เตรียมตัวอย่างเนื้อสัตว์โดยใช้เนื้อสัตว์จากสัตว์สองสปีชีส์ผสมกัน ได้แก่ เนื้อโคผสมเนื้อสุกร เนื้อไก่ผสมเนื้อสุกร และเนื้อโคผสมเนื้อกระบือ โดยผสมในสัดส่วนตั้งแต่ 0:100 1:99 5:95 10:90 25:75 50:50 75:25 90:10 95:5 99:1 และ 100:0 ให้น้ำหนักรวม 100 กรัม นอกจากนี้ ยังทำการผสมเนื้อโค เนื้อสุกร เนื้อไก่ และเนื้อกระบือ อย่างละ 25 กรัม เพื่อใช้ในการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบ

ตีบดส่วนผสมเนื้อสัตว์ให้เข้ากันด้วยเครื่องบดปั่นละเอียด (homogenizer: BRAUN) แบ่งส่วนผสมเป็น 4 ส่วน ส่วนที่ 1 เก็บเป็นเนื้อสด ส่วนที่ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 82 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ส่วนที่ 3 บ่มที่อุณหภูมิ 116 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และส่วนที่ 4 บ่มที่อุณหภูมิ 116 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เก็บตัวอย่างเนื้อสัตว์ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

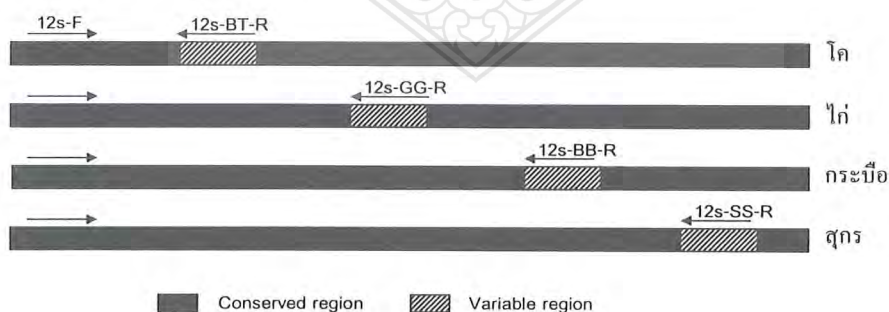
2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์โดยบดตัวอย่างเนื้อสัตว์ 50 มิลลิกรัมในสารละลาย Lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH7.5, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ข่อยโปรตีนในส่วนผสมที่ได้ด้วยเอนไซม์ Proteinase K (20 มิลลิกรัม/

มิลลิลิตร) 15 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และเก็บส่วนน้ำ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isopropanol 500 ไมโครลิตร และล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol 1 มิลลิลิตร ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ วัดความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Ultrospec 1100 pro, Biochrom, UK) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรและเก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

3. การออกแบบไพรเมอร์

ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 12S ribosomal RNA (12S rRNA) ที่อยู่บนสายดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียของสัตว์ โดยนำมาจากฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ สุกร (AY574048) โค (V00654) กระบือ (AY702618) และไก่ (AP003323) โดยใช้โปรแกรม ClustalW ได้ไพรเมอร์ร่วมเพื่อขยายยีนของสัตว์ทั้งสี่สปีชีส์ คือ 12s-F (5'-gtgccagccac-gcggtcata-3') และไพรเมอร์เพื่อขยายยีนย้อนกลับอย่างจำเพาะต่อโค ไก่ กระบือ และ สุกร ได้แก่ 12s-BT-R (5'-tctatagtgcgtcgctattgtag-3') 12s-GG-R (5'-agcgtttgt-gctcgtgatttctca-3') 12s-BB-R (5'-cgttgttgattgagct-tacttttga-3') และ 12s-SS-R (5'-gtctcttcttgcatggtt-gtgtaattg-3') โดยให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่คาดหวังมีความยาว 180, 280, 430, และ 670 คู่เบส ตามลำดับ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ชุดไพรเมอร์เชิงซ้อนที่ออกแบบจากยีน 12s-rRNA บนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ไพรเมอร์ 12s-F เป็นไพรเมอร์ร่วม ไพรเมอร์ 12s-BT-R 12s-GG-R 12s-BB-R และ 12s-SS-R เป็นไพรเมอร์ที่จับจำเพาะต่อดีเอ็นเอของโค ไก่ กระบือและสุกรตามลำดับ

4. การเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์

ปริมาณพีซีอาร์รวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอตั้งต้น 1 ไมโครลิตร 1XAmpliBuffer A (5 mM KCl, 1 mM Tris-HCl pH 9.1, 0.01% Triton™X-100), 1.5 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTPmix, ส่วนผสมไพรเมอร์ (0.8 μM 12s-F, 0.2 μM 12s-BT-R, 0.2 (M 12s-GG-R, 0.2 μM 12s-SS-R) และเอนไซม์ Taq DNA polymerase (Vivantis, USA) 1 ยูนิต เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่องพีซีอาร์ (T-personal, Biometra, Germany) โดยทำการแยกสายดีเอ็นเอ 1 รอบ ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายจำนวน 30 รอบ ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และสร้างสายดีเอ็นเอให้สมบูรณ์จำนวน 1 รอบ ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์ขนาดผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ 10 ไมโครลิตร แยกบนเจลอะกาโรส ด้วยกระแสไฟฟ้าและตรวจดูภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (SynGene, UK)

5. การทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของเทคนิคพีซีอาร์เชิงซ้อน

5.1 ความจำเพาะของไพรเมอร์เชิงซ้อน

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมของเนื้อสัตว์สี่ชนิดมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ 1 ไมโครลิตรในปฏิกิริยาพีซีอาร์ 25 ไมโครลิตร วิเคราะห์ ผลผลิตพีซีอาร์โดยการแยกบนเจลอะกาโรส ด้วยกระแสไฟฟ้า

5.2 ความไวของเทคนิคพีซีอาร์เชิงซ้อน

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อโค เนื้อสุกร เนื้อไก่ และเนื้อกระบือ มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 10-5-102 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ 1 ไมโครลิตรในปฏิกิริยาพีซีอาร์ 25 ไมโครลิตร

วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์โดยการแยกบนเจลอะกาโรส ด้วยกระแสไฟฟ้า

5.3 ความสามารถในการจำแนกสปีชีส์ของสัตว์ในส่วนผสมเนื้อสัตว์

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากส่วนผสมเนื้อสัตว์ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกันมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณ 1 ไมโครลิตรในปฏิกิริยาพีซีอาร์ 25 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์โดยการแยกบนเจลอะกาโรส ด้วยกระแสไฟฟ้า

ผลการวิจัย

1. ความจำเพาะของไพรเมอร์เชิงซ้อน

เมื่อทดสอบเทคนิคพีซีอาร์เชิงซ้อนโดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อโค ไก่ กระบือ และสุกร และทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้อุณหภูมิในการจับของไพรเมอร์ (annealing temperature) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พบว่า แลบดีเอ็นเอขนาด 180 คู่เบส ปรากฏเฉพาะเมื่อใช้ดีเอ็นเอของโคทั้งสายพันธุ์บราห์มันและกำแพงแสน แลบดีเอ็นเอขนาด 280 คู่เบส ปรากฏเฉพาะเมื่อใช้ดีเอ็นเอของไก่ แลบดีเอ็นเอขนาด 430 คู่เบส ปรากฏเฉพาะเมื่อใช้ดีเอ็นเอของกระบือ และแลบดีเอ็นเอขนาด 670 คู่เบส ปรากฏเฉพาะเมื่อใช้ดีเอ็นเอของสุกรทั้งสายพันธุ์ลาร์จไวท์ สายพันธุ์แลนด์เรซ สายพันธุ์คูร์รีอก และหมูป่า (รูปที่ 2) แสดงให้เห็นว่า ชุดไพรเมอร์เชิงซ้อนที่ออกแบบมีความจำเพาะต่อสปีชีส์ของสัตว์ทั้งสี่ชนิดโดยไม่มีการจับข้ามสปีชีส์แต่อย่างใด

2. ความไวของเทคนิคพีซีอาร์เชิงซ้อน

เทคนิคพีซีอาร์เชิงซ้อนมีความไวในการตรวจสอบ ดีเอ็นเอของโค กระบือ ไก่ และสุกร เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อสัตว์แต่ละสปีชีส์เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาณ 0.1 นาโนกรัม จัดได้ว่า เทคนิคพีซีอาร์เชิงซ้อนที่ออกแบบมีความไว

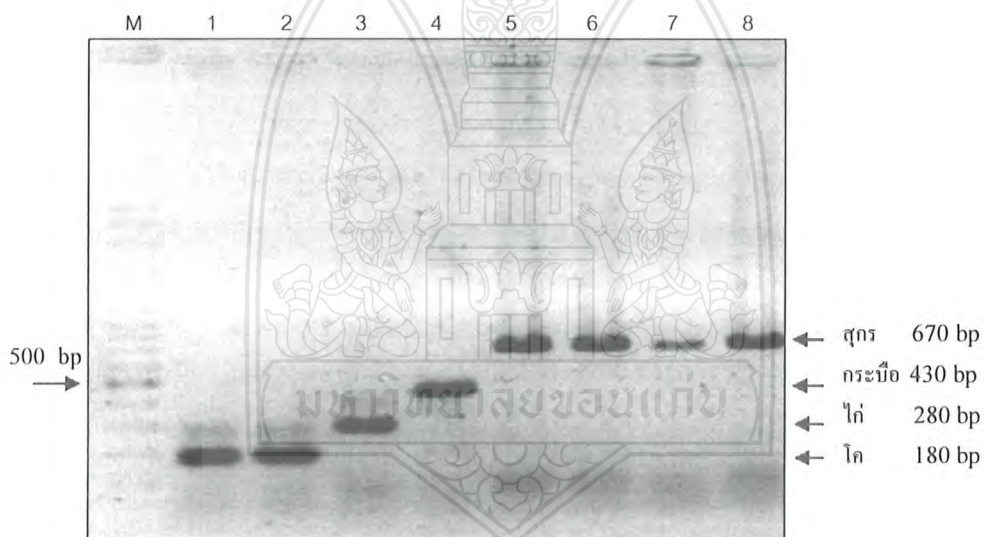
ในการตรวจสอบสปีชีส์ของโค กระบือ ไก่ และสุกร ก่อนข้างคี่

3. ความสามารถของเทคนิคพีซีอาร์เชิงซ้อน

ในการจำแนกสปีชีส์ของเนื้อสัตว์

เมื่อทำการจำแนกสปีชีส์ของสัตว์ทั้งสี่ชนิดในส่วนผสมเนื้อสัตว์ทั้งเนื้อดิบและเนื้อที่นำไปผ่านความร้อน ทั้งในส่วนผสมเนื้อสัตว์สองชนิดละสามชนิด พบว่า เทคนิคพีซีอาร์เชิงซ้อนสามารถจำแนกสปีชีส์ของโค กระบือ ไก่ และสุกร ได้ในส่วนผสมเนื้อดิบ เมื่อมีปริมาณเนื้อสัตว์เป้าหมายแต่ละชนิด 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักรวม เมื่อเนื้อสัตว์ผสมถูกนำไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 82 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และเมื่อนำไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 116 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่า เทคนิคพีซีอาร์เชิงซ้อนสามารถจำแนกเนื้อโค กระบือ และไก่ ได้เมื่อมีปริมาณของเนื้อสัตว์นั้นๆ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักรวม ขณะที่เมื่อมีส่วนผสมของเนื้อสุกรสามารถจำแนกได้เมื่อผสมเนื้อสุกรในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักรวม ต่อเมื่อเพิ่มเวลาในการให้ความร้อนต่อเนื้อผสมที่ 116 องศาเซลเซียส เป็น 60 นาที พบว่า เทคนิคพีซีอาร์เชิงซ้อนยังสามารถจำแนกเนื้อโค กระบือ และไก่ ได้เมื่อผสมอยู่ในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักรวม แต่ความสามารถในการจำแนกเนื้อสุกรลดลง โดยสามารถตรวจจับดีเอ็นเอของสุกรได้เมื่อใส่เนื้อสุกรปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ในส่วนผสมของเนื้อสัตว์ (ตารางที่ 1)



รูปที่ 2 ความจำเพาะของเทคนิคพีซีอาร์เชิงซ้อน แถว M แสดงแถบดีเอ็นเอขนาดมาตรฐานชนิด 100 bp DNA ladder แถวที่ 1-8 แสดงผลผลิตพีซีอาร์เมื่อใช้ดีเอ็นเอของโคพันธุ์รามัน โคพันธุ์กำแพงแสน ไก่ กระบือ สุกรพันธุ์รำจัวไท้ สุกรพันธุ์แลนด์เรซ สุกรพันธุ์คูร์โรค และหมูป่า ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ความสามารถของเทคนิคพีซีอาร์เชิงซ้อนในการจำแนกสปีชีส์ของเนื้อสัตว์

ตัวอย่างเนื้อผสม	ปริมาณเนื้อสัตว์ที่ตรวจวัดได้ (เปอร์เซ็นต์)			
	ไก่	โค	กระบือ	สุกร
เนื้อดิบ	1	1	1	1
ให้ความร้อนที่ 82 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที	1	1	1	10
ให้ความร้อนที่ 116 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที	1	1	1	10
ให้ความร้อนที่ 116 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที	1	1	1	10

สรุปและวิจารณ์ผล

เทคนิคพีซีอาร์เชิงซ้อนที่ออกแบบสามารถใช้จำแนกสปีชีส์ของเนื้อโค กระบือ ไก่ และสุกรที่ผสมในส่วนผสมเนื้อสัตว์ทั้งเนื้อดิบและเนื้อที่ผ่านความร้อนได้ในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว โดยพบว่า เทคนิคพีซีอาร์นี้มีความสามารถในการตรวจสอบดีเอ็นเอของโค กระบือ และไก่ ในส่วนผสมเนื้อสัตว์ในปริมาณขั้นต่ำ 1 เปอร์เซ็นต์ (1 กรัมในน้ำหนักเนื้อรวม 100 กรัม) ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองของ Rodriguez *et al.* (2004) ซึ่งทำการจำแนกเนื้อสุกร เนื้อโค เนื้อแกะ และเนื้อแพะ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 12S rRNA ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ และการทดลองของ Calvo *et al.* (2001) ซึ่งทำการตรวจวัดปริมาณการปนเปื้อนของเนื้อสุกรในผลิตภัณฑ์อาหารที่ระบุไว้บนฉลากสินค้าว่าผลิตมาจากเนื้อโคและเนื้อเป็ดโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน SINE ของสุกร

อย่างไรก็ตาม ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยไม่ได้ทดลองทำการผสมเนื้อสัตว์ในสัดส่วนที่ต่ำกว่า 1 กรัม ในส่วนผสมเนื้อสัตว์ 100 กรัม แต่เป็นไปได้ว่าเทคนิคพีซีอาร์เชิงซ้อนที่ออกแบบน่าจะมีความสามารถในการจำแนกเนื้อสัตว์ได้ในปริมาณที่ต่ำกว่านี้ เนื่องจากในการทดสอบกับดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อสัตว์แต่ละสปีชีส์โดยตรง พบว่า สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของสัตว์ทั้งสี่สปีชีส์ได้เมื่อใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นเพียงแค่ 0.1 นาโนกรัมเท่านั้น

นอกจากนี้ในการวิจัยยังพบว่า ความสามารถในการตรวจสอบดีเอ็นเอของสุกรนั้นลดลงเมื่อเนื้อสุกร

ถูกนำไปผ่านความร้อนสูงเป็นเวลานานขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอของสุกรถูกออกแบบให้เพิ่มจำนวนส่วนของยีนที่มีขนาด 670 คู่เบส ซึ่งมีความยาวกว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อโค ไก่ และกระบือ ที่มีขนาด 180 280 และ 430 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อนำเนื้อสัตว์ไปผ่านความร้อนสูงเป็นเวลานาน ดีเอ็นเอที่อยู่ในเซลล์สัตว์ได้เกิดการแตกหัก ทำให้ดีเอ็นเอของสุกรมีขนาดสั้นลงมีผลให้การเข้าจับดีเอ็นเอเป้าหมายของไพรเมอร์ลดลง ดังจะเห็นได้จากการทดลองของ Ebbehøj and Thomsen (1991) ซึ่งนำเนื้อไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที พบว่า ดีเอ็นเอมีการแตกหักเป็นท่อนสั้นๆขนาดสั้นกว่า 300 คู่เบส การออกแบบไพรเมอร์ให้สามารถเข้าจับดีเอ็นเอของสุกรได้ในตำแหน่งที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดสั้นลง น่าจะช่วยเพิ่มความสามารถในการตรวจสอบดีเอ็นเอของสุกรในเนื้อสัตว์ผสมได้ดีขึ้น ดังนั้น การออกแบบไพรเมอร์เชิงซ้อนให้สามารถตรวจจับดีเอ็นเอของสุกรได้ดีขึ้นในเนื้อที่ผ่านความร้อนสูง การเพิ่มความไวในการตรวจสอบ และการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเชิงปริมาณโดยใช้เทคนิคเทคนิคพีซีอาร์ชนิด Quantitative PCR ยังจะต้องทำการวิจัยและพัฒนาต่อไป ซึ่งเหล่านี้นี้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปตรวจวิเคราะห์มาตรฐานของผลิตภัณฑ์อาหารที่มีเนื้อสัตว์เป็นส่วนประกอบได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2549 และโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Aida, A.A., Che Man, Y.B., Wong, C.M.V.L., Raha, A.R. and Son, R. 2005. Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for Halal authentication. *Meat Sci.* 69(1):47-52.
- Bellagamba, F., Valfre, F., Panseri, S. and Moretti, V.M. 2003. Polymerase chain reaction-based analysis to detect terrestrial animal protein in fish meal. *J. Food Protect.* 66(4):682-685.
- Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P. 2002. Quantitative PCR detection of pork in raw and heated ground beef and pate. *J. Agr. Food Chem.* 50(19):5265-5267.
- Calvo, J.H., Zaragoza, P. and Osta, R. 2001. Technical note: A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment. *J. Anim. Sci.* 79(8):2108-2112.
- Dalmasso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Rosati, S. and Bottero, M.T. 2003. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Mol. Cell Probe.* 18(2):81-87.
- Di Pinto, A., Forte, V.T., Conversano, M.C. and Tantillo, G.M. 2004. Duplex polymerase chain reaction for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources. *Food Control.* 16(5): 391-394.
- Ebbehoj, K.F. and Thomsen, P.D. 1991. Species differentiation of treated meat products by DNA hybridization. *Meat Sci.* 30(3):221-234.
- Lee, J.C. and Chang, J.G. 1994. Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) fingerprints in forensic species identification. *Forensic Sci. Int.* 67(2):103-107.
- Martinez, I. and Yman, I.M. 1999. Identification in meat products by RAPD analysis. *Food Res Int.* 31(6-7):459-466.
- Meyer, R., Candrian, U. and Luthy, J. 2002. Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. *J. AOAC Int.* 77(3):617-622.
- Montiel-Sosa, J.F., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., Roncales, P., Lopez-Perez, M.J. and Perez-Martos, A. 2000. Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. *J. Agr. Food Chem.* 48(7):2829-2832.
- Momcilovic, D. and Avraham, R. 2000. Detection and analysis of animal materials in food and feed. *J. Food Protect.* 63(11):1602-1609.
- Murray, B.W., McClymont, R.A. and Strobeck, C. 1995. Forensic identification of ungulate species using restriction digests of PCR-amplified mitochondrial DNA. *J. Forensic Sci.* 40(6):943-951.

- Rajapaksha, W.R., Thilakaratne, I.D., Chandrasiri, A.D. and Niroshan, T.D. 2002. Development of PCR assay for differentiation of some important wild animal meat of Sri Lanka. *J. Vet. Med. B.* 49(7):322-324.
- Rodriguez, M.A., Garcia, T., Gonzalez, I., Asensio, L., Hernandez, P.E. and Martin, R. 2004. PCR identification of beef, sheep, goat, and pork in raw and heat-treated meat mixtures. *J. Food Protect.* 67(1):172-177.
- Saez, R., Sanz, Y. and Toldr, F. 2003. PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat Sci.* 66(3):659-665.
- Tajima, K., Enishi, O., Amari, M., Mitsumori, M., Kajikawa, H., Kurihara, M., Yanai, S., Matsui, H., Yasue, H., Mitsuhashi, T., Kawashima, T. and Matsumoto, M. 2002. PCR detection of DNAs of animal origin in feed by primers based on sequences of short and long interspersed repetitive elements. *Biosci. Biotech. Bioch.* 66(10):2247-2250.
- Tartaglia, M., Saulle, E., Pestalozza, S., Morelli, L., Antonucci, G. and Battaglia, P.A. 1998. Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: a molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials. *J. Food Protect.* 61(5):513-518.
- Wang, H.C., Lee, S.H., Chang, T.J. and Wong, M.L. 2004. Examination of meat components in commercial dog and cat feed by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLPs) technique. *J. Vet. Med. Sci.* 66(7):855-859.
- Zehner, R., Zimmermann, S. and Mebs, D. 1998. RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application. *Int. J. Legal Med.* 111(6):323-327.

การผลิตลิปิดจากจุลินทรีย์โดยยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูง

Microbial lipid production by locally isolated oleaginous yeast

รัตนภรณ์ ลีสิงห์¹

บทคัดย่อ

การผลิตลิปิดจากจุลินทรีย์โดยยีสต์ไขมันสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการหมักแบบกะ โดยยีสต์โอโซเลท OYS3 มีการสะสมลิปิดสูงสุดจากจำนวนทั้งหมด 10 โอโซเลท สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ยีสต์โอโซเลท OYS3 มีการผลิตลิปิดสูงสุด คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 90 กรัม/ลิตร หรือที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 197 ค่าความเป็นกรด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 5.0 ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 8 วัน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยให้ปริมาณลิปิดที่ 4.10 กรัมลิปิด/ลิตรหรือ 52.7% โดยน้ำหนักแห้ง และอัตราการผลิตลิปิด 0.518 กรัมลิปิด/ลิตร/วัน เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของลิปิดโดยแก๊สโครมาโตกราฟี พบว่า เป็นกรดไขมันชนิดสายยาวที่มีคาร์บอน 16 และ 18 อะตอม ซึ่งมีกรดโอเลอิก กรดสเตียริกและกรดปาล์มติกเป็นองค์ประกอบหลักเช่นเดียวกับที่พบในน้ำมันพืชซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพในการผลิตไบโอดีเซล

Abstract

Microbial lipid production by locally isolated oleaginous yeasts, were studied using glucose as a sole carbon source under batch fermentation. Among 10 yeast isolates were screened for high cellular lipid accumulation, isolate OYS3 was found to accumulate highest lipid on a cellular dry weight. The optimal conditions for lipid accumulation were obtained as follows: glucose as a carbon source 90 g/L; carbon to nitrogen ratio of 197; initial pH of 5.0; cultivated for 8 days at 30°C. Under these conditions, isolate OYS3 accumulated lipids up to 52.7% on a cellular dry weight and the corresponding lipid productivity reached 4.10 g/L and lipid production rate at 0.518 g/L/day. Gas chromatography analysis revealed that lipids from the isolate OYS3 contained mainly long-chain fatty acids with 16 and 18 carbon atoms. The three major constituent fatty acids were oleic acid, stearic acid and palmitic acid that are comparable to conventional vegetable oils. Based on these compositional data, microbial lipids from the oleaginous yeast isolate OYS3 are a potential alternative oil feedstock for biodiesel production.

คำสำคัญ : ยีสต์ไขมันสูง, ลิปิดจากจุลินทรีย์, ไบโอดีเซล

Keywords: Oleaginous yeast, microbial lipid, biodiesel

¹ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002, E-mail : ratlee@kku.ac.th

บทนำ

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสมลิปิดได้สูงกว่า 20 % โดยน้ำหนักแห้งเรียกว่า จุลินทรีย์ไขมันสูง (oleaginous microorganism) โดยจุลินทรีย์จะผลิตและสะสมลิปิดอยู่ในรูปหยดน้ำมันเล็กๆ (microdroplet oils) ภายในเซลล์ ส่วนใหญ่มักพบการสะสมลิปิดของจุลินทรีย์เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ เช่น กลีเซอรอล น้ำตาลโพลิแซคคาไรด์ และจำกัดปริมาณสารอาหารอื่นๆ โดยทั่วไปคือ ไนโตรเจน หรือกล่าวได้ว่า ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) มีผลต่อการสะสมลิปิดในเซลล์จุลินทรีย์ (Evan and Ratledge, 1984; Montet et al., 1985) ยีสต์บางสายพันธุ์ เช่น *Rhodospiridium* sp., *Rhodotulula* sp., *Lipomyces* sp. และ *Yarrowia lipolytica* สะสมลิปิดได้สูงกว่า 70% โดยน้ำหนักแห้ง โดยองค์ประกอบของลิปิดประมาณ 95% เป็นไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ที่ส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดปาลมิก (palmitic acid; C16 :0) กรดโอเลอิก (oleic acid; C18 :1) และกรดสเตียริก (stearic acid; C18 :0) ซึ่งมีความคล้ายกับน้ำมันจากเมล็ดพืช (Ratledge, 1981; Ratledge and Wynn, 2002; Tehlivets et al., 2007) ยีสต์บางสายพันธุ์สามารถใช้น้ำตาลเพนโตส บางสายพันธุ์ใช้สารประกอบกลีโคไลซิสและวัตถุดิบราคาถูกเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญและผลิตลิปิดได้ (Meesters et al., 1996; Papanikolaou and Chevalot, 2002; Dai et al., 2007)

จากวิกฤตการณ์น้ำมันปิโตรเลียมและภาวะโลกร้อน ทำให้มีการส่งเสริมการปลูกพืชน้ำมันเพื่อผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ โดยเฉพาะไบโอดีเซลมากขึ้น ส่งผลให้พืชอาหารราคาสูงขึ้นและเริ่มขาดแคลน ดังนั้น น้ำมันจากจุลินทรีย์จึงเป็นวัตถุดิบทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการใช้ทดแทนหรือร่วมกับน้ำมันจากเมล็ดพืชเพื่อผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์มีข้อได้เปรียบกว่าการปลูกพืชน้ำมัน เช่น เพาะเลี้ยงได้ตลอดปีไม่ขึ้นกับฤดูกาลและสภาพอากาศ เจริญเร็ว ทำให้ใช้เวลาเพาะเลี้ยงสั้น ใช้พื้นที่น้อย สามารถ

ควบคุมการผลิตและใช้วัตถุดิบราคาถูกได้หลากหลายชนิด (Papanikolaou et al., 2004; Xue et al., 2006) การใช้น้ำมันจากจุลินทรีย์เป็นเชื้อเพลิงเหลวไบโอดีเซลทำได้โดยนำน้ำมันมาผ่านวิธีทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) เช่นเดียวกับน้ำมันพืช (Chisti, 2007) การผลิตน้ำมันจากจุลินทรีย์เพื่อการค้าส่วนใหญ่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง ซึ่งน้ำมันที่ผลิตได้จำเป็นต้องมีความบริสุทธิ์และปลอดภัยสูง (Belarbi et al., 2000) ในขณะที่การนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลไม่ต้องการคุณสมบัติดังกล่าว ปัจจุบันงานวิจัยการผลิตไบโอดีเซลจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ศึกษาในสเกลขนาดเล็ก อย่างไรก็ตาม ยีสต์จัดเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการนำมาใช้ผลิตไบโอดีเซลเนื่องจากข้อได้เปรียบในการเพาะเลี้ยงที่เหนือกว่าจุลินทรีย์อื่น คือ เจริญเร็ว ใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกได้หลากหลาย และเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ง่าย (Xue et al., 2006; Xue et al., 2008) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกและเพาะเลี้ยงยีสต์พื้นถิ่นไขมันสูง (oleaginous yeast) เพื่อผลิตลิปิดด้วยการหมักแบบกะ (batch fermentation) ในฟลาสก์เขย่ารวมทั้งศักยภาพของลิปิดจากยีสต์ในการเป็นแหล่งวัตถุดิบเพื่อผลิตไบโอดีเซล โดยศึกษาชนิดและปริมาณกรดไขมันของลิปิดที่ผลิตได้

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

วัตถุดิบ

1. ยีสต์ไขมันสูง

ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษาเป็นยีสต์ไขมันสูงที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างดินและน้ำที่ปนเปื้อนไขมันในพื้นที่เขตมหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 10 ไอโซเลต คือ OYW1, OYW2, OYW3, OYW4, OYW5, OYW6, OYS1, OYS2 และ OYS3 โดยเก็บรักษายีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อผิวหน้าเยือก YPG ที่ประกอบด้วย yeast extract 10 กรัม/ลิตร, peptone 20 กรัม/ลิตร, glucose 20 กรัม/ลิตรและวุ้น 15 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 4°C

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะในการเพาะเลี้ยง

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมเชื้อตั้งต้น ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 20 กรัม/ลิตร, yeast extract 0.5 กรัม/ลิตร, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 กรัม/ลิตร, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัม/ลิตร, KH_2PO_4 1.0 กรัม/ลิตร ปรับ pH 5.0 ก่อนทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121°C 15 นาที (Li et al., 2006) เตรียมเชื้อตั้งต้นโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 130 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตลิปิด (lipid production medium) มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่มีปริมาณกลูโคส 70 กรัม/ลิตร

2.3 สภาวะในการเพาะเลี้ยง คือ การหมักแบบกะ ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร โดยใช้เชื้อตั้งต้น 10% (v/v) บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 130 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30°C

วิธีการศึกษา

1. การคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตลิปิดสูง

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ 10 ไสโซเลท ในอาหารเลี้ยงเชื้อข้อ 2.2 ตามสภาวะการเพาะเลี้ยงในข้อ 2.3 เป็นเวลา 6 วัน (Li et al., 2006) คัดเลือกยีสต์ไอโซเลทที่ให้ปริมาณลิปิดสูงสุดเพื่อศึกษาในข้อ 2)

2. ระยะเวลาการเจริญและการผลิตลิปิดของยีสต์ไขมันสูง

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลทที่ให้ลิปิดสูงสุดที่คัดเลือกแล้วจากข้อ 1) ในอาหารเลี้ยงเชื้อข้อ 2.2 ตามสภาวะการเพาะเลี้ยงในข้อ 2.3 ระยะเวลาเพาะเลี้ยงจนกระทั่งยีสต์เจริญเข้าสู่ปลาย exponential phase หรือต้น stationary phase จากนั้นคัดเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมที่ยีสต์มีการผลิตลิปิดสูงสุดเพื่อศึกษาในข้อ 3)

3. ผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ต่อการผลิตลิปิด

การศึกษาโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลทที่ให้ลิปิดสูงสุดที่คัดเลือกแล้วจากข้อ 1) ตามสภาวะการเพาะเลี้ยงในข้อ 2.3 และระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่คัดเลือกจากข้อ 2) ในอาหารเลี้ยงเชื้อข้อ 2.2 โดยคงที่ปริมาณไนโตรเจน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 กรัม/ลิตร และแปรผันปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 กรัม/ลิตร หรือมีค่า C/N ratio เท่ากับ 88, 110, 132, 154, 176, 197 และ 219 ตามลำดับ

4. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมัน

เพาะเลี้ยงยีสต์ตามสภาวะที่เซลล์ให้ปริมาณลิปิดสูงตามข้อ 3) จากนั้นนำตัวอย่างยีสต์ 1.0 กรัม มาสกัดน้ำมันโดยวิธี Soxhlet extraction (Baker, 1984) โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ นำน้ำมันที่สกัดได้มาทำการไฮโดรไลซ์กรดไขมันและเติมหมู่เมทิลโดยเติมคลอโรฟอร์ม 3 มิลลิลิตร และไดเอทิลอีเทอร์ 3 มิลลิลิตร ลงในสารละลายน้ำมันและนำไประเหยที่อุณหภูมิ 40°C จากนั้นเติม 10% BF_3 2 มิลลิลิตร และเมทานอล 1 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ที่ 100°C เป็นเวลา 45 นาที ทิ้งให้เย็น เติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร เขกเซน 1 มิลลิลิตร เติมน้ำ Na_2SO_4 เขย่า 1 นาที และทิ้งให้แยกชั้น นำสารละลายชั้นบนไปวิเคราะห์กรดไขมันด้วยเครื่อง Gas Chromatography (Shimadzu, Japan) กรดไขมันแต่ละชนิดรายงานในรูปของเปอร์เซ็นต์กรดไขมันต่อกรดไขมันทั้งหมด

5. การตรวจวิเคราะห์

1) วัดการเจริญ โดยหาค่าน้ำหนักแห้ง โดยเก็บเซลล์ยีสต์ด้วยการปั่นเหวี่ยงน้ำหนักปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง อบแห้งที่อุณหภูมิ 90°C จนน้ำหนักคงที่

2) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการของ DNS (Miller, 1959)

3) การวิเคราะห์ปริมาณลิปิด โดยเก็บเซลล์ยีสต์ด้วยการปั่นเหวี่ยงน้ำหมักปริมาตร 20 มิลลิเมตร ที่ความเร็ว 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำสารแขวนลอยเซลล์ในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นของเซลล์ 0.1 กรัม/มิลลิเมตร และนำไปวิเคราะห์ปริมาณลิปิดตามวิธีการของ Know and Rhee (1986) และ อัจฉรวรรณ (2530) ปริมาณลิปิดคำนวณต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์

คำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate: μ , d^{-1}) ดังสมการ $\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1)$ เมื่อ X_1 และ X_2 คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร) ที่เวลา t_1 และ t_2 ตามลำดับ ผลผลิตของเซลล์ (growth yield หรือ cell yield: $Y_{x/s}$) ดังสมการ $Y_{x/s} = (X_2 - X_1) / (S_1 - S_2)$ เมื่อ S_1 และ S_2 คือ ปริมาณกลูโคส (กรัม/ลิตร) ที่เวลา t_1 และ t_2 ตามลำดับ

ผลการศึกษา

1. การคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตลิปิดสูง

การศึกษาศาสมารถในการผลิตลิปิดของยีสต์ไขมันสูง 10 ไอโซเลทโดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 70 กรัม/ลิตร บ่มเขย่าที่ 130 รอบ/

นาที อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 6 วัน พบว่า ยีสต์แต่ละไอโซเลทมีการเจริญและให้ปริมาณลิปิดต่างกัน โดยยีสต์ไอโซเลท OYS3 ให้ปริมาณลิปิดสูงสุด 3.06 กรัม/ลิตร หรือปริมาณลิปิด (lipid content) 36.4 % โดยน้ำหนักแห้ง และอัตราการผลิตลิปิดเท่ากับ 0.510 กรัมลิปิด/ลิตร/วัน ยีสต์ไอโซเลท OYW5 ให้ปริมาณเซลล์แห้งสูงสุดที่ 9.1 กรัม/ลิตร ปริมาณลิปิด 28.0% โดยน้ำหนักแห้ง และอัตราการผลิตลิปิด 0.425 กรัมลิปิด/ลิตร/วัน ส่วนยีสต์ไอโซเลท OYW6 ให้ปริมาณเซลล์และลิปิดต่ำสุดที่ 3.0 กรัม/ลิตร และ 0.84 กรัมลิปิด/ลิตร ตามลำดับ และอัตราการผลิตลิปิดเท่ากับ 0.140 กรัมลิปิด/ลิตร/วัน ดังตารางที่ 1 เมื่อพิจารณาจากผลการศึกษาดังกล่าวเลือกไอโซเลท OYS3 ที่เจริญได้ดีและให้อัตราการผลิตลิปิดสูงเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

2. ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่อการเจริญและการผลิตลิปิด

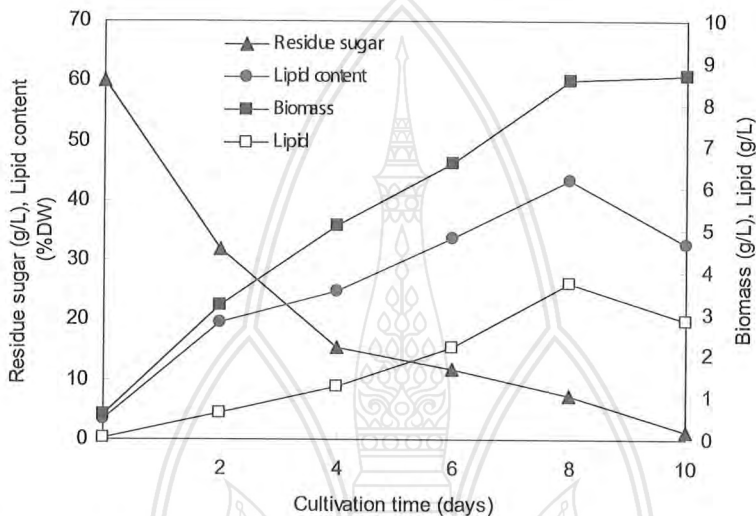
เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท OYS3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 70 กรัม/ลิตร บ่มแบบเขย่าที่ 130 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 10 วัน พบว่า การเจริญของยีสต์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตามปริมาณการใช้

ตารางที่ 1 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณลิปิด และอัตราการผลิตลิปิดของยีสต์ไขมันสูงทั้ง 10 ไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 70 กรัม/ลิตร บ่มแบบเขย่าที่ 130 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 6 วัน

ยีสต์ไอโซเลท	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณลิปิด (กรัมลิปิด/ลิตร)	ปริมาณลิปิด (% โดยน้ำหนักแห้ง)	อัตราการผลิตลิปิด (กรัมลิปิด/ลิตร/วัน)
OYW1	4.2	1.02	24.4	0.170
OYW2	7.2	2.13	29.7	0.355
OYW3	6.0	1.71	28.4	0.185
OYW4	7.8	2.28	29.0	0.380
OYW5	9.1	2.55	28.0	0.425
OYW6	3.0	0.84	28.4	0.140
OYW7	9.0	2.04	22.7	0.340
OYS1	7.2	1.89	26.2	0.315
OYS2	5.4	1.59	29.5	0.265
OYS3	8.4	3.06	36.4	0.510

กลูโคสและให้ปริมาณเซลล์และลิปิดสูงสุดเมื่อยีสต์เข้าสู่การเจริญในช่วงสุดท้ายของระยะ exponential phase หรือช่วงต้นของระยะ stationary phase ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ปริมาณเซลล์แห้งที่ 8.6 กรัม/ลิตร และปริมาณเซลล์เริ่มคงที่หลังจากวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง การสะสมลิปิดของยีสต์จะเพิ่มขึ้นพร้อม

กับการเจริญโดยให้ปริมาณลิปิดสูงสุดที่ 3.73 กรัมลิปิด/ลิตร หรือ 43.2 % โดยน้ำหนักแห้งในวันที่ 8 และลดลงที่ 2.83 กรัมลิปิด/ลิตร หรือ 32.5% โดยน้ำหนักแห้งในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ดังรูปที่ 1 จากผลการศึกษาจึงเลือกระยะเวลาเพาะเลี้ยง 8 วัน ซึ่งเซลล์มีการเจริญและสะสมลิปิดได้สูงเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป



รูปที่ 1 กราฟแสดงการเจริญและการผลิตลิปิดของยีสต์ไขมันสูงโอยโซเลท OYS3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 70 กรัม/ลิตร บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่ 130 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 °C

3. ผลของอัตราส่วนของคาร์บอน ต่อไนโตรเจน

การศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่มีต่อการเจริญและการผลิตลิปิดของยีสต์โอยโซเลท OYS3 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 กรัม/ลิตร หรือค่า C/N ratio ระหว่าง 88-219 บ่มแบบเขย่าที่ 130 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 8 วัน พบว่า เมื่อปริมาณกลูโคสสูงขึ้นหรือที่ค่า C/N ratio สูงขึ้นอัตราการเจริญของยีสต์โอยโซเลท OYS3 ลดลงโดยยีสต์มีการเจริญสูงสุดเมื่อค่า C/N ratio เท่ากับ 88 ซึ่งให้ปริมาณเซลล์แห้ง 10.2 กรัม/ลิตร อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.290 d⁻¹ และผลผลิตเซลล์ ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.290 แต่พบว่า เซลล์ให้ปริมาณลิปิด

ต่ำสุดที่ 2.2 กรัมลิปิด/ลิตร หรือ 21.2 % โดยน้ำหนักแห้ง และอัตราการผลิตลิปิดเท่ากับ 0.270 กรัมลิปิด/ลิตร/วัน และเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี C/N ratio สูงสุดที่ 219 พบว่า ยีสต์มีอัตราการเจริญต่ำที่สุด โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะที่ 0.230 d⁻¹ และให้ปริมาณเซลล์แห้งที่ 6.3 กรัม/ลิตร ปริมาณลิปิด 2.6 กรัมลิปิด/ลิตร หรือ 41.0 % โดยน้ำหนักแห้ง และอัตราการผลิตลิปิดที่ 0.323 กรัมลิปิด/ลิตร/วัน และเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า C/N ratio ที่ 197 พบว่า มีการเจริญไม่สูงมากนักโดยให้ปริมาณเซลล์แห้งที่ 7.9 กรัม/ลิตร อัตราการเจริญจำเพาะที่ 0.258 d⁻¹ แต่ที่ค่า C/N ratio ที่ 197 เซลล์ให้ปริมาณลิปิดสูงสุดที่ 4.1 กรัมลิปิด/ลิตร หรือ 52.7% โดยน้ำหนักแห้ง และอัตราการผลิตลิปิดสูงสุดที่ 0.518 กรัมลิปิด/ลิตร/วัน ดังตารางที่ 2

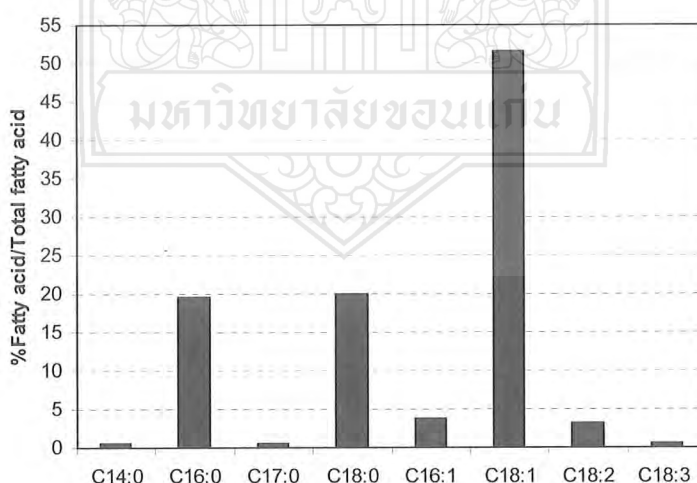
ตารางที่ 2 ปริมาณน้ำหนักรวม อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ปริมาณลิกปิด ผลผลิตเซลล์ ($Y_{x/s}$) และอัตราการผลิตลิกปิดของยีสต์โอโซเลท OYS3 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันค่า C/N ratio เป็นเวลา 8 วัน pH เริ่มต้น 5.0 ที่อุณหภูมิ 30°C

กลูโคส (กรัม/ลิตร)	C/N ratio	น้ำหนักรวม (กรัม/ลิตร)	μ (d ⁻¹)	$Y_{x/s}$	ปริมาณลิกปิด (กรัมลิกปิด/ลิตร)	ปริมาณลิกปิด (% โดยน้ำหนักรวม)	อัตราการผลิตลิกปิด (กรัมลิกปิด/ลิตร/วัน)
40	88	10.2	0.290	0.290	2.2	21.2	0.270
50	110	9.5	0.281	0.233	2.5	26.0	0.308
60	132	9.0	0.275	0.164	2.9	32.7	0.368
70	154	8.7	0.270	0.147	3.9	44.8	0.488
80	176	8.3	0.265	0.126	3.9	47.1	0.491
90	197	7.9	0.258	0.111	4.1	52.7	0.518
100	219	6.3	0.230	0.082	2.6	41.0	0.323

4. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมัน

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันของลิกปิดหรือน้ำมันยีสต์ที่สกัดได้จากยีสต์โอโซเลท OYS3 โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี พบว่าประกอบด้วยกรดไขมันหลัก 3 ชนิด คือ กรดโอเลอิก (oleic acid; C18:1) กรดสเตียริก (stearic acid; C18:0) และกรดปาล์มมิก (palmitic acid; C16:0) ในปริมาณ

51.6, 20.1 และ 19.6 % ของกรดไขมันทั้งหมดตามลำดับ กรดไขมันชนิดอื่นที่พบ คือ กรดไมริสติก (myristic acid; C14:0) กรดเซปตาเดคาโนอิก (heptadecanoic acid; C17:0) กรดปาล์มมิกโตเลอิก (palmitoleic acid; C16:1) กรดลิโนเลอิก (linoleic acid; C18:2) และกรดลิโนเลนิก (linolenic acid; C18:3) ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ชนิดและปริมาณกรดไขมันที่พบในยีสต์ไขมันสูง OYS3 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 90 กรัม/ลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (C/N ratio 197) pH เริ่มต้น 5.0 บ่มแบบเขย่าที่ 130 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 วัน

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษาความสามารถในการผลิตลิปิดในยีสต์ไขมันสูงจำนวน 10 โอโซเลท ที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างดินและน้ำที่ปนเปื้อนไขมันในเขตมหาวิทยาลัยขอนแก่น ด้วยการหมักแบบกะป๋องในฟลาสก์เขย่า พบว่ายีสต์โอโซเลท OYS3 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตลิปิด โดยสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ยีสต์โอโซเลท OYS3 มีการผลิตลิปิดสูง คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 90 กรัม/ลิตร หรือ C/N ratio ที่ 197 ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 5.0 ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 8 วัน อุณหภูมิ 30 °C โดยยีสต์ให้ปริมาณเซลล์แห้ง 7.9 กรัม/ลิตร ปริมาณลิปิด 4.1 กรัมลิปิด/ลิตร หรือ 52.7% โดยน้ำหนักแห้ง และอัตราการผลิตลิปิด 0.518 กรัมลิปิด/ลิตร/วัน การผลิตและสะสมลิปิดของเซลล์ยีสต์โอโซเลท OYS3 จะเกิดขึ้นในช่วงที่เซลล์เพิ่มการเจริญจนถึงช่วงสุดท้ายของการเจริญระยะ exponential phase (Moreten, 1988) โดยจะเห็นว่า ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงปริมาณเซลล์และปริมาณลิปิดจะเพิ่มขึ้นสูงสุดและลดลงในวันที่ 10 ซึ่งเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตลิปิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งคาร์บอนลดลง ซึ่งอาจไม่เพียงพอต่อการเจริญของเซลล์และอาจมีการสะสมของเสียในช่วงท้ายของการเจริญ

จากผลการศึกษาจะเห็นว่า ยีสต์โอโซเลท OYS3 สามารถเจริญได้ทุกค่าของ C/N ratio โดย C/N ratio สูง จะเหมาะสำหรับการผลิตลิปิดมากกว่าการเจริญหรือการเพิ่มปริมาณเซลล์ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Turcotte และ Kosaric (2004), Hassan et al., (1996) Papanikolaou et al., (2004) ซึ่งสรุปว่าค่า C/N ratio ต่ำหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงนั้นเหมาะต่อการเจริญหรือเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่ในช่วงของการผลิตลิปิดนั้นเซลล์ต้องการคาร์บอนสูงเพื่อเข้าไปเปลี่ยนเป็นลิปิด จึงต้องการ C/N ratio สูง ยีสต์ *Lipomyces starkeyi* เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า C/N ratio ที่ 150 เซลล์สะสมลิปิดสูงที่ 68% โดยน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ C/N ratio ที่ 60

เซลล์สะสมลิปิดเพียง 40% โดยน้ำหนักแห้ง (Anger-bauer et al., 2008) นอกจากนั้นการลดกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนหรือการเจริญของจุลินทรีย์โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนหรือที่ค่า C/N ratio สูงนั้น เซลล์จะลดการใช้ NADPH ในการสังเคราะห์โปรตีนหรือการเจริญและเมื่อเซลล์มีการสะสม NADPH มากขึ้น จะทำให้จะเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ลิปิดสูงขึ้น (Yamane et al., 1997; Johnson and Schroeder, 1996) ผลการศึกษาในยีสต์โอโซเลท OYS3 พบว่า เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ C/N ratio สูงสุดที่ 219 พบว่า เซลล์มีอัตราการเจริญและผลิตลิปิดต่ำอาจเนื่องมาจากปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำไม่เพียงพอต่อการส่งเสริมการเจริญ อีกทั้งยังมีผลของการยับยั้งการเจริญเมื่อเซลล์เจริญในอาหารที่มีปริมาณกลูโคสที่สูงเกินไป เช่น การเจริญและผลิตลิปิดของยีสต์ *Rhodospiridium toruloides* Y4 ลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณกลูโคสสูงกว่า 120 กรัม/ลิตร (Li et al., 2007) จากผลการศึกษาในครั้งนี้ที่เพาะเลี้ยงด้วยการหมักแบบกะป๋อง พบว่า ยีสต์โอโซเลท OYS3 เจริญและให้ลิปิดสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณกลูโคสไม่เกิน 90 กรัม/ลิตร ซึ่งการผลิตลิปิดในจุลินทรีย์ต้องการค่า C/N ratio สูง หรือในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสหรือแหล่งคาร์บอนสูง ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์โอโซเลท OYS3 ด้วยการหมักแบบกะป๋อง (fed-batch fermentation) ที่มีการเติมกลูโคสเป็นช่วงๆ เพื่อควบคุมปริมาณกลูโคสให้อยู่ในระดับที่เพียงพอต่อการเจริญและทำให้เซลล์สะสมลิปิดสูงขึ้น เนื่องจากไม่มีผลการยับยั้งการเจริญอันเนื่องมาจากปริมาณกลูโคสที่สูงเกินไป เช่น Li และคณะ (2007) เพาะเลี้ยงยีสต์ *Rhodospiridium toruloides* Y4 ด้วยการหมักแบบกะป๋องโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เซลล์สะสมลิปิดสูงถึง 67.5% โดยน้ำหนักแห้ง และให้ผลผลิตลิปิดเท่ากับ 0.54 กรัมลิปิด/ลิตร/ชั่วโมง ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Cryptococcus curvatus* ด้วยการหมักแบบกะป๋องในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและจำกัดปริมาณไนโตรเจน Hassan et al.,

(1996) พบว่า ยีสต์มีการสะสมลิพิดภายในเซลล์สูงถึง 53% ในเวลา 172 ชั่วโมง และน้ำมันที่ผลิตได้ประกอบด้วยกรดโอเลอิก กรดปาล์มติก และกรดสเตียริก

เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของลิพิดที่ผลิตโดยยีสต์โอโซเลท OYS3 พบว่า ประกอบด้วยกรดไขมันหลักๆ คือ กรดโอเลอิก กรดปาล์มติก และกรดสเตียริก ซึ่งมีความคล้ายกับองค์ประกอบของน้ำมันพืช และสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลได้ โดยสอดคล้องกับการรายงานของ Li et al., (2007) ที่รายงานว่า ส่วนประกอบของน้ำมันที่สกัดจากยีสต์ *Rhodospiridium toruloides* Y4 ประกอบด้วยกรดไขมันหลัก คือ กรดปาล์มติก กรดโอเลอิก กรดสเตียริก และกรดลิโนเลอิก โดยลิพิดที่สกัดได้มีสมบัติที่เหมาะสมสำหรับผลิตไบโอดีเซล จากผลการศึกษาวินิจฉัยจะเห็นว่า ยีสต์โอโซเลท OYS3 มีศักยภาพในการนำผลิตน้ำมันไตรกลีเซอไรด์เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากองค์ประกอบของน้ำมันที่สกัดได้ประกอบด้วยกรดไขมันหลักที่มีความคล้ายคลึงกับกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักที่พบในน้ำมันพืช แต่อย่างไรก็ดี การผลิตลิพิดจากยีสต์ OYS3 โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้มีต้นทุนสูง ดังนั้น การศึกษาในขั้นต่อไปจึงต้องศึกษาถึงแหล่งคาร์บอนราคาถูกชนิดอื่นๆ เพื่อลดต้นทุนการผลิต เช่น วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร กากน้ำตาล น้ำกากส่า และกลีเซอรอลดิบ ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซล ศึกษาการผลิตด้วยการหมักแบบกะป้อนเพื่อหาแนวทางในการเพิ่มผลผลิตลิพิด รวมทั้งศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันจากเซลล์ยีสต์ และการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันยีสต์ที่สกัดได้โดยผ่านกระบวนการทรานส์เอสเตอร์ฟิเคชัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคุณพิมลพร ศรีราช ที่ช่วยเหลือในการคัดเลือกยีสต์ไขมันสูง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และสนับสนุนวัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ในการศึกษาวินิจฉัย

บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด จังหวัดขอนแก่น ในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน

เอกสารอ้างอิง

- อัจฉราวรรณ ทองมี. (2530). การสกัดลิพิดจากยีสต์โรโดโทรูลา กราซิลิส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M., Guebitz, G.M. (2008). Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Biores Technol.*, 99: 3051-3056.
- Baker, D. (1984). Fat in flour, acid analysis method. In: Official method of analysis of the AOAC (William S. ed., 14th ed.) Virginia: The William Byrd Press. Inc. 251-252.
- Belarbi, E.H., Molina Grima, E., Chiti, Y. (2000). A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentanoic acid esters from microalgae and fish oil. *Enzyme Microbiol., Technol.* 26:516-259.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25:294-306.
- Dai, C-C, Tao, J., Xie, F., Dai, Y-J, Zhao, M. (2007). Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *African Journal of Biotechnology*, 6(18): 2130-2134.
- Evan, C.T., Ratledge, C. (1984). Influence of nitrogen metabolism on lipid accumulation in oleaginous yeasts. *J. Gen. Microbiol.*, 130: 1693-1704.

- Hassan, M., Blanc, P.J., Grangerf, M.L., Pareilleux, A., Goma, G. (1996). Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture. *Process Biochem.* 31:355-361.
- Johnson, E.A., Schroeder, W.A. (1996). Microbial carotenoids. In: Fiechter, A., editor. *Advances in Biochemistry Engineering Biotechnology*. New York: Springer, p. 119-178.
- Kwon D.Y., Rhee, J.S. (1986) A Simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *J Am. Oil Chem. Soc.* 63:89-92
- Li, Y.-H., L., Bo, L., Zong-Bao, Z., Feng-Wu, B. (2006). Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Chinese J. Biotechnol.*, 22: 650-656.
- Li, Y, Zhao, Z., Bai, F. (2007). High cell-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme Microbiol. Technol.* 41:312-317.
- Meesters, P.A.E.P., Huijberts, G.N.M., Eggink, G. (1996). High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45:575-579.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 426-428.
- Montet, D. Ratamahenina, R., Galzy, P., Pina, M., Graille, A. (1985). A study of the influence of the growth media on the fatty acid composition in *Candida lipolytica* diddens and lodder. *Biotechnol. Lett.* 7: 733-744.
- Moreten, R.S. (1988). Physiology of lipid accumulation yeast, In: Moreten, R.S., editor. *Single cell oil*. London: Longman. P. 1-32.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I. (2002). Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 308-318.
- Papanikolaou, S., Komaitis, M., Aggelis, G. (2004). Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Biores. Technol.* 95: 287-291.
- Ratledge, C. (1981). Yeast and mould as sources of oils and fats: New sources of fat and oils. In eds. Mukherjee, K.D. *American Oil Chemists Society Champaigne, IL*. Pp. 159-169.
- Ratledge, C., Wynn, J.P. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 51: 1-51.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Bebermann, J., Roessler, P. (1998). A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program- Biodiesel from algae. NREL/TP-580-24190. National Renewable Energy Laboratory, U.S. Department of Energy's Office of fuels development. Colorado, USA.
- Tehlivets, O., Scheuringer, K., Kohlwein, S.D. (2007). Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1771: 255-270.
- Turcotte, A., Kosaric, N. (1989). The effect of C/N ratio on lipid production by *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788. *Biotechnol. Lett.* 9: 637-642.

- Yamane, Y.M., Higashida, K., Nakashimada, Y., Kakizono, T., Nisho, N. (1997). Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyme* in batch and fed-batch culture: kinetic and stoichiometric analysis. Environ. Microbiol., 63; 4471-4478.
- Xue, F., Zhang, X., Luo, H., Tan, T. (2006). A new method for preparing raw material for biodiesel production. Process Biochem. 41:1699-1702.
- Xue, F., Miao, J., Zhang, X., Luo, H., Tan, T. (2008). Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. Biores. Technol. 99:5923-5927.



พัฒนาการของลูกปลานวลจันทร์ (*Cirrhinus microlepis*) วัยอ่อน Development of *Cirrhinus microlepis* larvae

ชุติมา หาญจวนิช ^{1*} และปรัชญา สนิท ²

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาพัฒนาการและการปรากฏของอวัยวะต่างๆ ของลูกปลานวลจันทร์ (*Cirrhinus microlepis*) วัยอ่อนตั้งแต่อายุ 1 วันถึง 16 วัน โดยศึกษาลักษณะภายนอกจากการสังเกตด้วยตาเปล่า วัดขนาดความยาวลำตัวของลูกปลา และจากตัวอย่างสไลด์ถาวรลูกปลาที่เตรียมด้วยกรรมวิธีพาราฟิน ตัดเนื้อเยื่อหนา 5 ไมโครเมตร และย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีอีมาที่ออกซิไลน์และอีโอซิน ผลการศึกษา พบว่า ความยาวลำตัวของลูกปลานวลจันทร์อายุ 1 วัน ถึง 4 วันเพิ่มขึ้นทีละน้อยจาก 4.60 ± 0.84 เป็น 5.90 ± 0.88 มิลลิเมตร ($n=10$) หลังจากอายุ 5 วัน ลูกปลามีการเจริญและความยาวลำตัวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว พัฒนาการของลูกปลา พบว่า ตาเริ่มปรากฏเป็นก้อนกลมมีลักษณะใสเมื่ออายุ 1 วัน และตาเริ่มมีสารสีดำเมื่ออายุครบ 3 วัน ไข่แดงยุบหมดเมื่ออายุครบ 6 วัน ครีบต่างๆ ของลูกปลาเริ่มพัฒนาเต็มที่และมีลักษณะเหมือนครีบของตัวเต็มวัยเมื่อลูกปลาอายุครบ 12 วัน ลูกปลาอายุ 1 วัน พบว่า มีสมองส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนท้าย ส่วนประกอบต่างๆ ของตา ช่องว่างหู โนโตคอร์ดี หลอดอาหาร หัวใจ ไข่แดง ลำไส้ ไชสันหลัง และเยื่อครีบหาง ลูกปลาอายุ 3 วัน เริ่มปรากฏเหงือก ดับกระเพาะลม และไต ลูกปลาอายุ 5 วัน ปากเริ่มเปิด และลำไส้เริ่มมีกากอาหารตกค้าง ลูกปลาอายุ 10 วัน และอายุ 16 วัน มีอวัยวะต่างๆ เหมือนลูกปลาอายุ 5 วัน แต่เจริญดีกว่า และเหงือกแตกแขนงมากขึ้น

Abstract

An objective of this research is to study development and appearance of organs of *Cirrhinus microlepis* larvae from day 1 to day 16. Morphology of larvae was observed by naked eye. The body length of larvae was measured ($n=10$). Permanent slides were prepared by paraffin method and cut at 5 μ m thick. Serial sections were stained with haematoxylin and eosin (H&E). The body length of larvae increased gradually from day 1 (4.60 ± 0.84 mm) to day 4 (5.00 ± 0.88 mm) ($n=10$). The larval growth and body length increased rapidly after 5 days old. The development of 1-day larvae showed eye with clear nodule and pigmented sclera appeared on the 3rd day. The yolk sac disappeared on the 6th day. All fins of larvae fully

¹ ศูนย์อนุรักษ์ทรัพยากรประมงภาค 4 สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

² สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

* corresponding author, E-mail: chuhan@kku.ac.th

developed and appeared similar to those adults by day 12. Histological structures of 1-day larvae showed forebrain, midbrain and hindbrain, eye components, auditory vesicle, notochord, esophagus, heart, yolk sac, intestine, spinal cord and fin fold. Three-day larvae showed gill, liver, air bladder and kidney. Five-day larvae showed opening mouth and food remnants in intestine. Ten-day larvae and 16-day larvae showed branching gills and fully developed various organs which were similar to those of 5-day larvae.

คำสำคัญ: ปลานวลจันทร์ วัยอ่อน พัฒนาการ

Key words: *Cirrhinus microlepis*, larvae, development

บทนำ

ปลานวลจันทร์เป็นปลาน้ำจืด อยู่ในวงศ์ปลาตะเพียน (Family Cyprinidae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Cirrhinus microlepis* (กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2545) มีลักษณะลำตัวเรียวยาว รูปร่างทรงกระบอก หัวโต ปากและตาเล็ก เก็ดเล็ก หัวและลำตัวมีสีเงินอมเหลืองทอง (ลุ่มน้ำเจ้าพระยา) หรือสีเงินอมชมพู (ลุ่มน้ำโขง) ครีบหลังยกสูง ครีบหางเว้าลึก ครีบก้นเล็ก อาหารที่กิน ได้แก่ อินทรีย์สาร สัตว์น้ำดิน แพลงก์ตอน และแมลง ปลานวลจันทร์มีพฤติกรรมวางไข่ในแหล่งน้ำหลากหลายและเลี้ยงตัวเองจนน้ำลดแล้วจึงว่ายกลับลงสู่แม่น้ำ มีถิ่นอาศัยในแม่น้ำสายหลักและแหล่งน้ำหลากหลาย สถานภาพหายาก ปัจจุบันสูญพันธุ์ไปจากแม่น้ำเจ้าพระยา (ชาลิต วิทยานนท์, 2547)

ปลาเป็นทรัพยากรที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจมากเป็นสินค้าส่งออกและบริโภคภายในประเทศ ตลอดจนใช้เลี้ยงเป็นปลาสวยงามเพื่อความเพลิดเพลิน ปัจจุบันปลาจากแหล่งน้ำธรรมชาติลดลงไปจากเดิมมาก สาเหตุมาจากการใช้เครื่องมือประมงที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าในอดีต และมีการทำประมงที่ผิดกฎหมาย ทำให้ปริมาณปลาลดน้อยลงมาก การศึกษาพัฒนาการของการเจริญเติบโตของลูกปลาวัยอ่อนจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะทราบถึงปริมาณปลาที่มีการสืบพันธุ์ในแต่ละปี รวมทั้งทราบการแพร่กระจายและฤดูกาลวางไข่ แหล่งวางไข่ และการเลี้ยงตัวอ่อน ซึ่งจะช่วยในการจัดการทรัพยากรปลาได้เป็นอย่างดี ความรู้เบื้องต้นโดยทั่วไปของลูกปลาและไข่ปลานในพื้นที่ต่าง ๆ ว่า มีลักษณะ

รูปร่าง พฤติกรรม การแยกชนิดและการแพร่กระจายเป็นอย่างไรนั้น สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ในเชิงการเพาะเลี้ยง ข้อมูลเกี่ยวกับไข่ปลาและลูกปลายังสามารถนำมาใช้ในการคำนวณหาปริมาณของพ่อ-แม่ และปริมาณปลาเต็มวัยที่จะได้จากลูกปลาเหล่านั้นในอนาคต เพื่อที่จะใช้ในการอนุรักษ์พันธุ์ปลาต่อไป นอกจากนี้ ลูกปลาวัยอ่อนยังเป็นส่วนประกอบอย่างหนึ่งในแหล่งน้ำธรรมชาติ การเปลี่ยนแปลงในแง่ปริมาณของไข่ปลา และลูกปลาในสายใยอาหาร (food web) จะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการทำนายการเปลี่ยนแปลงปริมาณของปลาเพื่อการอนุรักษ์ทรัพยากรปลาต่อไปในอนาคต หรืออาจใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงผลกระทบที่เกิดจากมลพิษแพร่กระจายเข้ามาในแหล่งน้ำนั้น เนื่องจากลูกปลาวัยอ่อนเป็นระยะที่ไวต่อมลพิษ หรือการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ของสภาพทางนิเวศวิทยาของแหล่งน้ำ (อภิชาติ เดิมวิชากร, 2546)

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพัฒนาการ และการปรากฏของอวัยวะต่าง ๆ ของลูกปลานวลจันทร์วัยอ่อนอายุตั้งแต่ 1 วัน ถึง 16 วัน ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้อาจใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาพัฒนาการของลูกปลาชนิดต่าง ๆ และอาจนำไปประยุกต์เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงและอนุรักษ์ปลาชนิดต่าง ๆ ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สัตว์ทดลอง

ลูกปลานวลจันทร์อายุ 1-16 วัน จำนวน 20 ตัวต่อวัน จากสี่แพนฟาร์ม บ้านยางน้อย อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม

2. การศึกษาลักษณะภายนอกของลูกปลานวลจันทร์วัยอ่อน

สังเกตลักษณะภายนอกลูกปลาวัยอ่อนอายุ ตั้งแต่ 1 วันถึง 16 วัน ด้วยตาเปล่า พร้อมทั้งวัดขนาดความยาวลำตัวของลูกปลาอายุแต่ละวัน จำนวน 10 ตัวต่อวัน ด้วยเวอร์เนีย

3. การเตรียมสไลด์ถาวรด้วยกรรมวิธีพาราฟิน (Paraffin method)

นำตัวอย่างลูกปลานวลจันทร์อายุ 1-16 วัน อายุละ 5 ตัวมาสลบด้วยน้ำเย็นจัดที่แช่ด้วยน้ำแข็ง และรักษาสภาพตัวอย่างลูกปลาทันที โดยแช่ในน้ำยารักษาสภาพ 10% neutral buffered formalin (10% NBF) นานอย่างน้อย 1 วัน ต่อมานำตัวอย่างลูกปลาอายุต่าง ๆ มาดิ่งแคลเซียมออก (decalcify) โดยแช่ในสารละลาย EDTA นาน 1 วัน หลังจากนั้นนำตัวอย่างลูกปลา มาล้างด้วยน้ำประปานาน 10 นาทีเพื่อล้างเอาสารละลาย EDTA ออก และนำตัวอย่างทั้งหมดมาดิ่งน้ำออกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่ำไปสูง และทำให้ใส

ด้วยไซลีน (xylene) โดยเข้าเครื่อง automatic tissue processor (Leica TP 1020) ต่อมานำตัวอย่างลูกปลามาฝังด้วยพาราฟินเหลวด้วยเครื่อง paraffin embedding center (Leica EG 1160) ตัดเนื้อเยื่อลูกปลาทั้งตัวเป็น serial sections หนา 5 ไมโครเมตร และย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี haematoxylin และ eosin (H&E) ตรวจสอบเนื้อเยื่อตัวอ่อนลูกปลาวัยอ่อนอายุต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และถ่ายรูป

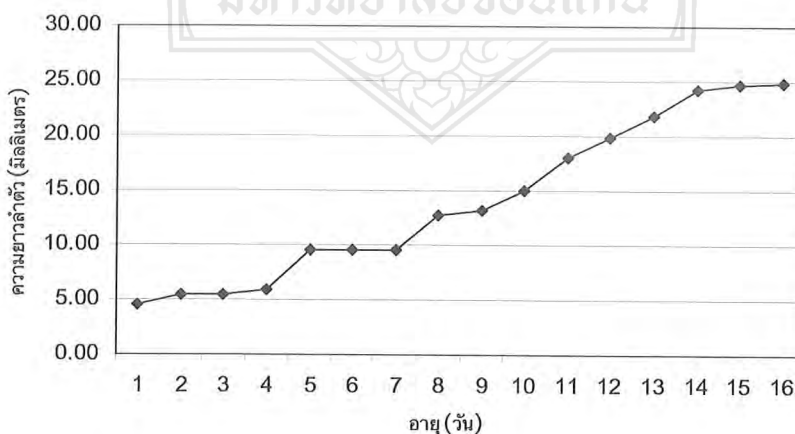
4. การตรวจสอบอวัยวะต่าง ๆ ที่ปรากฏในลูกปลานวลจันทร์วัยอ่อนอายุต่าง ๆ

การแปลผลลักษณะโครงสร้างทางจุลกายวิภาคลูกปลานวลจันทร์วัยอ่อนอายุต่าง ๆ ใช้เอกสารต่อไปนี้ ได้แก่ โสภณ จันทรรัตน์ (2519), นันทนา ศรีรัตนกุล (2531), จันทวรจักร จันทรสารทูล (2532), Freeman and Bracegirdle (1975) เป็นเกณฑ์

ผลการศึกษา

1. ผลการเจริญเติบโตของลูกปลาวัยอ่อนอายุต่าง ๆ

จากการวัดความยาวลำตัวเฉลี่ย (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของลูกปลาอายุต่าง ๆ ได้ผลดังตารางที่ 1 และรูปที่ 1



รูปที่ 1 ความยาวลำตัวเฉลี่ยของลูกปลานวลจันทร์อายุ 1-16 วัน (n=10)

ตารางที่ 1 พัฒนาการของลูกปลานวลจันทร์วัยอ่อนอายุ 1 วัน ถึง 16 วัน

อายุ (วัน)	ความยาวลำตัว (มม.) (n=10)	ลักษณะภายนอก	ลักษณะโครงสร้างของอวัยวะที่พบในลูกปลา ตัดตามขวาง
1	4.60 ± 0.84	ตามีลักษณะกลมใส มีถุงไข่แดง มีทวารหนัก มีข้อครีบก	พบส่วนประกอบของตา ได้แก่ เลนส์ เรตินา และ ชั้นสเกลอรา สมองส่วนหน้า สมองส่วนกลาง สมอง ส่วนท้าย ไขสันหลัง หลอดอาหาร โนโตคอร์ด ช่องว่างของหู หัวใจ ถุงไข่แดง และลำไส้
2	5.50 ± 0.85	ลักษณะเหมือนกับอายุ 1 วัน	
3	5.50 ± 0.85	ตามีสีดำ ทางเดินอาหารและเส้นข้าง ลำตัวเริ่มปรากฏ ครีบทงมีลักษณะโค้งมน	ชั้นสเกลอรา มีสารสีดำ และถุงไข่แดงมีสัดส่วนลดลง พบเหงือก คับ ถุงลม ไต
4	5.90 ± 0.88	แผ่นปิดเหงือกเริ่มปรากฏ	
5	9.50 ± 1.27	ปากเริ่มเปิด ลำไส้มีกากอาหาร ครีบทงเริ่มปรากฏ	ปากเปิด ชั้นสเกลอราหนาขึ้น เหงือกเริ่มแตกแขนง ถุงไข่แดงมีสัดส่วนลดลง
6	9.60 ± 0.97	ถุงไข่แดงยุบหมดสมบูรณ์	
7	9.60 ± 1.35	ลักษณะเหมือนกับอายุ 6 วัน	
8	12.70 ± 1.64	ครีบทงและครีบทงเริ่มปรากฏ ครีบทงเริ่มแยกเป็นรูปตัว V	
9	13.20 ± 0.92	ลักษณะเหมือนกับอายุ 8 วัน	
10	15.00 ± 1.05	ลักษณะเหมือนกับอายุ 8 วัน	เรตินาแบ่งเป็นชั้นชัดเจน เหงือกมีแขนงมากขึ้น คับมีขนาดใหญ่ ลำไส้คุดอยู่ในส่วนทง และ พบกากอาหาร
11	18.10 ± 0.74	ครีบทงเริ่มปรากฏ	
12	19.90 ± 1.20	ครีบทงทุกครีบทงมีความสมบูรณ์	
13	21.80 ± 1.87	ลักษณะเหมือนกับอายุ 11 วัน	
14	24.30 ± 1.70	ผิวหนังตัวหนาทำให้มองไม่เห็นอวัยวะ ภายใน ลำตัวเริ่มมีรูปร่างเป็นทรงกระบอก	
15	24.70 ± 1.57	ลักษณะเหมือนกับอายุ 14 วัน	
16	24.80 ± 2.10	ลักษณะเหมือนกับอายุ 14 วัน	สมองทุกส่วนพัฒนาดี หัวใจมีขนาดใหญ่ เหงือกมี แขนงมากมาย

2. พัฒนาการของลูกปลานวลจันทร์วัยอ่อนอายุต่าง ๆ

จากการสังเกตลักษณะภายนอกของลูกปลาวัยอ่อนอายุต่าง ๆ ด้วยตาเปล่า ได้ผลนี้

ลูกปลาอายุ 1 วัน ตา (eye) เริ่มปรากฏ และมีลักษณะกลมใส ถุงไข่แดง (yolk sac) มีลักษณะเรียวยาวเป็นรูปไข่ และมีสัดส่วนเป็นครึ่งหนึ่งของลำตัว ทวารหนัก (anus) มีลักษณะเป็นรูเปิดอยู่ถัดจากถุงไข่แดง อวัยวะภายในมีลักษณะใส มัดกล้ามเนื้อ (somite) ปรากฏเป็นรูปตัว V เยื่อครีบ (fin fold) มีลักษณะเป็นเยื่อพองออกจากกึ่งกลางลำตัวทั้งด้านหลังและด้านท้อง ในลักษณะแนวตั้งยาวไปตามลำตัวจนเชื่อมกันที่หาง (รูปที่ 2A)

ลูกปลาอายุ 2 วัน ถุงไข่แดงมีสัดส่วนเป็น 1 ใน 3 ของลำตัว ลักษณะของอวัยวะที่ปรากฏเหมือนกับลูกปลาอายุ 1 วัน (รูปที่ 2B)

ลูกปลาอายุ 3 วัน ตาเริ่มมีสีดำ เพราะชั้นสเคลอรา (sclera) ซึ่งเป็นชั้นนอกสุดเริ่มมีสารสีดำ ถุงไข่แดงมีสัดส่วนเป็น 1 ใน 5 ของลำตัว ทางเดินอาหารเริ่มปรากฏ เส้นข้างตัว (lateral line) เริ่มปรากฏเห็นเป็นแถบสีขาวจากหลังตาถึงหาง ครีบหาง (caudal fin) เริ่มปรากฏ และมีรูปร่างโค้งมน (รูปที่ 2C)

ลูกปลาอายุ 4 วัน ถุงไข่แดงมีขนาดลดลงมาก แผ่นปิดเหงือก (operculum) เริ่มปรากฏเด่นชัด (รูปที่ 2D)

ลูกปลาอายุ 5 วัน เลนส์ตา (lens) มีลักษณะสีฟ้าใส เรตินา (retina) มีลักษณะเป็นสีดำ ถุงไข่แดงมีขนาดลดลงมาก ปาก (mouth) เริ่มเปิด ทางเดินอาหารปรากฏเด่นชัด และเริ่มพบกากอาหารในลำไส้ (intestine) ฝักลำตัวเริ่มมีสารสีดำปรากฏเป็นจุดกระจายทั่วลำตัว เส้นข้างตัว (lateral line) เริ่มมีสารสีดำปรากฏเป็นจุดยาวจากหัวถึงหาง ครีบหลัง (dorsal fin)

เริ่มปรากฏเป็นครีบเดียวในลักษณะแนวตั้งและทอดยาวไปตามด้านหลังของลำตัว (รูปที่ 2E)

ลูกปลาอายุ 6 วัน มีอวัยวะต่าง ๆ เหมือนกับลูกปลาอายุ 5 วัน ถุงไข่แดงยุบหมด (รูปที่ 2F)

ลูกปลาอายุ 7 วัน มีอวัยวะต่าง ๆ เหมือนกับลูกปลาอายุ 5 วัน (รูปที่ 2G)

ลูกปลาอายุ 8 วัน ฝักลำตัวเริ่มหนาขึ้น ครีบท้อง (pelvic fin) ปรากฏเป็นครีบลอยอยู่น้ำทวารหนัก ครีบก้น (anal fin) ปรากฏเป็นครีบเดี่ยวอยู่หลังทวารหนัก ปลายครีบหางเริ่มปรากฏเป็นแฉกรูปตัว V (รูปที่ 2H)

ลูกปลาอายุ 9 วัน มีอวัยวะต่าง ๆ เหมือนกับลูกปลาอายุ 8 วัน (รูปที่ 2I)

ลูกปลาอายุ 10 วัน แผ่นปิดเหงือกมีความหนามากขึ้น ครีบหลัง ครีบก้น และครีบท้องมีความยาวมากขึ้น (รูปที่ 2J)

ลูกปลาอายุ 11 วัน ครีบหู (pectoral fin) เริ่มปรากฏเป็นครีบลู่ มีลักษณะบางใส อยู่บริเวณส่วนต่อระหว่างหัวกับท้อง (รูปที่ 2K)

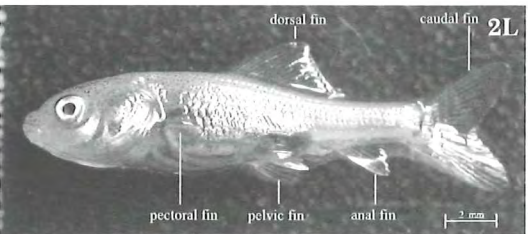
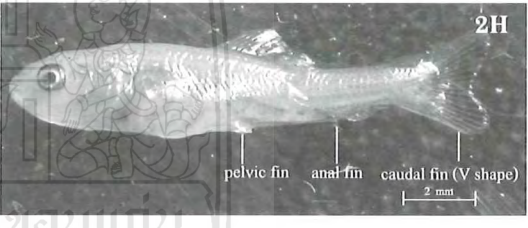
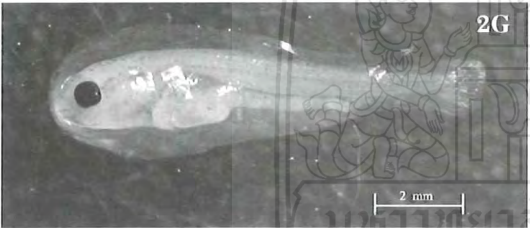
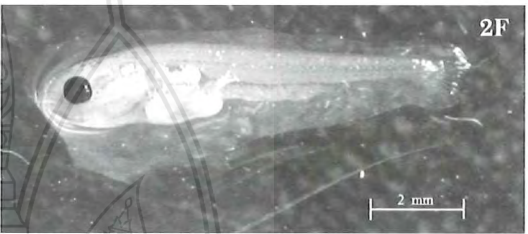
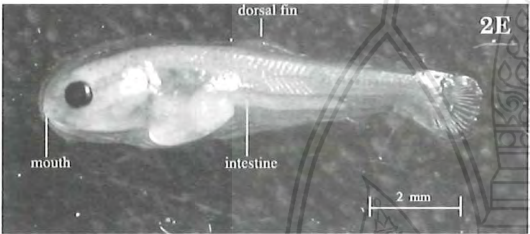
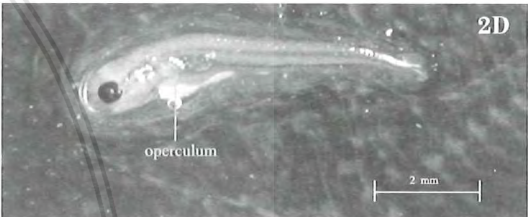
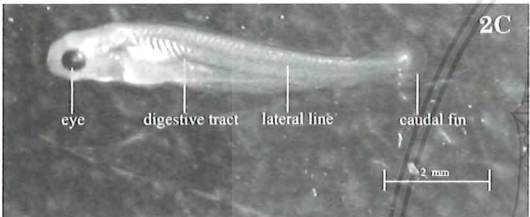
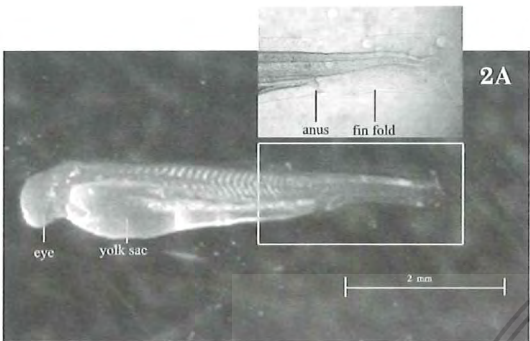
ลูกปลาอายุ 12 วัน ครีบทุกชนิดมีพัฒนาการเต็มที่และมีลักษณะเหมือนครีบของตัวโตเต็มวัยเมื่อลูกปลาอายุครบ 12 วัน (รูปที่ 2L)

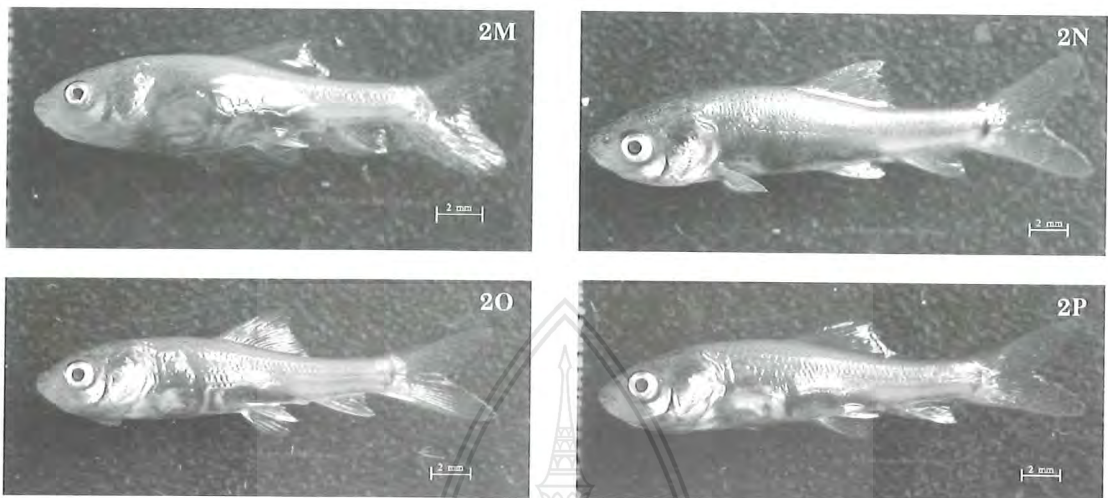
ลูกปลาอายุ 13 วัน ฝักลำตัวมีสารสีดำเป็นจุด และกระจายทั่วลำตัว (รูปที่ 2M)

ลูกปลาอายุ 14 วัน ฝักลำตัวมีความหนามากขึ้นและมีสารสีดำเป็นจุดกระจายทั่วลำตัว ทำให้มองไม่เห็นอวัยวะภายใน ลำตัวเริ่มมีรูปร่างเป็นทรงกระบอก (รูปที่ 2N)

ลูกปลาอายุ 15 วัน มีอวัยวะต่าง ๆ เหมือนกับลูกปลาอายุ 14 วัน (รูปที่ 2O)

ลูกปลาอายุ 16 วัน มีอวัยวะต่าง ๆ เหมือนกับลูกปลาอายุ 14 วัน (รูปที่ 2P)





รูปที่ 2 ลักษณะภายนอกของไข่และลูกปลานวลจันทร์วัยอ่อน

รูปที่ 2 ลักษณะภายนอกของลูกปลาวัยอ่อนอายุตั้งแต่ 1 วัน ถึง 16 วัน

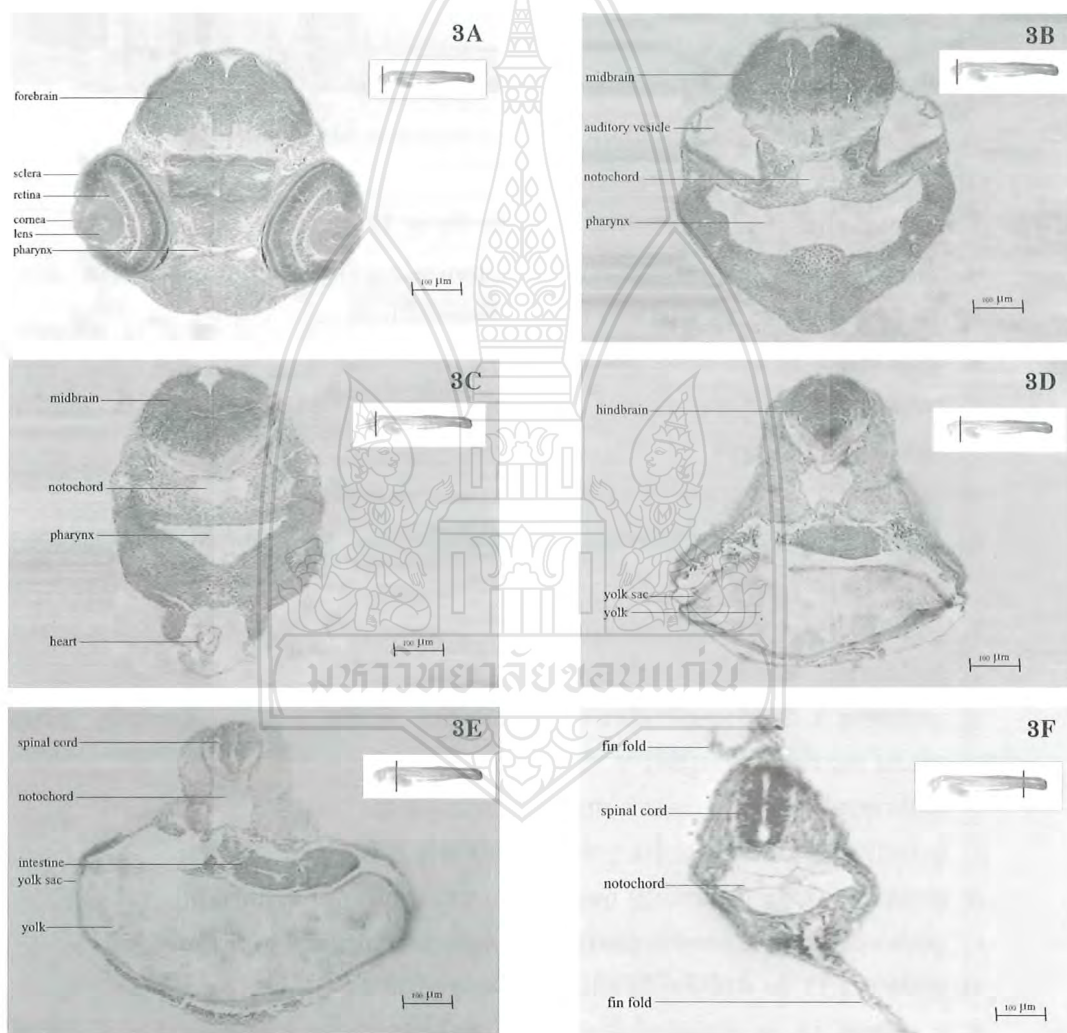
- A. ลูกปลาอายุ 1 วัน สังเกตถุงไข่แดง (yolk sac) มีขนาดใหญ่ ตา (eye) มีลักษณะกลมใส เชือกครีบ (fin fold) มีลักษณะใส ทวารหนัก (anus) มีลักษณะเป็นรูเปิด
- B. ลูกปลาอายุ 2 วัน มีลักษณะเหมือนลูกปลาอายุ 1 วัน
- C. ลูกปลาอายุ 3 วัน สังเกต ครีบหาง (caudal fin) มีลักษณะโค้งมน ตา (eye) มีสีดำ เส้นข้างตัว (lateral line) ปรากฏชัด
- D. ลูกปลาอายุ 4 วัน สังเกตแผ่นปิดเหงือก (operculum) ปรากฏชัด
- E. ลูกปลาอายุ 5 วัน สังเกตปาก (mouth) เปิด ครีบหลัง (dorsal fin) ปรากฏชัด ลำไส้ (intestine) มีกากอาหาร
- F. ลูกปลาอายุ 6 วัน สังเกตถุงไข่แดงยุบหมด
- G. ลูกปลาอายุ 7 วัน มีลักษณะเหมือนลูกปลาอายุ 5 วัน
- H. ลูกปลาอายุ 8 วัน สังเกตครีบท้อง (pelvic fin) และ ครีบก้น (anal fin) ปรากฏชัด ครีบหาง (caudal fin) เริ่มแตกเป็นรูปตัว V
- I. ลูกปลาอายุ 9 วัน มีอวัยวะต่าง ๆ เหมือนลูกปลาอายุ 8 วัน
- J. ลูกปลาอายุ 10 วัน มีอวัยวะต่าง ๆ เหมือนลูกปลาอายุ 8 วัน
- K. ลูกปลาอายุ 11 วัน สังเกตครีบทู (pectoral fin) ปรากฏให้เห็นเป็นแผ่นบางใส
- L. ลูกปลาอายุ 12 วัน สังเกตครีบทูทุกครีบพัฒนาเต็มที่และมีลักษณะเหมือนตัวเต็มวัย
- M. ลูกปลาอายุ 13 วัน ผิวลำตัวมีสีดำเป็นจุดและกระจายทั่วลำตัว
- N. ลูกปลาอายุ 14 วัน สังเกตผิวหนังหนาทำให้มองไม่เห็นอวัยวะภายใน และลำตัวเริ่มมีรูปร่างเป็นทรงกระบอก
- O. ลูกปลาอายุ 15 วัน มีอวัยวะต่าง ๆ เหมือนลูกปลาอายุ 14 วัน
- P. ลูกปลาอายุ 16 วัน มีอวัยวะต่าง ๆ เหมือนลูกปลาอายุ 14 วัน

3. การปรากฏของอวัยวะต่าง ๆ ของลูกปลา นวลจันทร์วัยอ่อนอายุต่าง ๆ

จากการศึกษาลักษณะโครงสร้างทางจุลกายวิภาคของลูกปลาวัยอ่อนอายุต่าง ๆ พบว่าลูกปลา อายุ 2 วัน มีอวัยวะต่าง ๆ เหมือนลูกปลาอายุ 1 วัน แต่พัฒนาดีกว่า ในที่นี้จึงเลือกรายงานลูกปลาวัยอ่อนที่มีโครงสร้างหรืออวัยวะต่าง ๆ เพิ่มเติมจากลูกปลาวัยอ่อนอายุต้น ๆ ได้ผลนี้

ลูกปลาอายุ 1 วัน ปรากฏสมองส่วนต้น

(forebrain) สมองส่วนกลาง (midbrain) และสมองส่วนท้าย (hindbrain) ส่วนประกอบต่างๆ ของตา ได้แก่ สเคลอรา กระจุกตา (cornea) เลนส์ เรตินา ช่องว่างหู (auditory vesicle) โนโตคอร์ด (notochord) หลอดอาหาร (esophagus) หัวใจ (heart) ถุงไข่แดง ถ้าได้มีลักษณะเป็นท่อแบนยาว ไขสันหลัง (spinal cord) และเยื่อครีบหาง (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ลักษณะโครงสร้างของอวัยวะตัดตามขวางบริเวณต่างๆ ของลูกปลานวลจันทร์อายุ 1 วัน (H&E)

A. บริเวณหัว

B. บริเวณตา

C. บริเวณหัวใจ

D. บริเวณถุงไข่แดง

E. บริเวณลำไส้

F. บริเวณหาง

ลูกปลาอายุ 3 วัน เริ่มปรากฏเหงือก (gill) ตับ (liver) กระเพาะลม (gas bladder) และไต (kidney) (รูปที่ 4)

ลูกปลาอายุ 5 วัน ปากเริ่มเปิด ลำไส้เริ่มมีกากอาหาร สัตว์ส่วนของถุงไข่แดงต่อลำตัวลดลงเมื่อลูกปลามีอายุมากขึ้น และยุบหมดเมื่อลูกปลาอายุครบ 6 วัน (รูปที่ 5)

ลูกปลาอายุ 10 วัน มีอวัยวะต่างๆ เหมือนลูกปลาอายุ 5 วัน เเรตินาแบ่งเป็นชั้นชัดเจน เหงือกแตกแขนง ตับมีขนาดใหญ่ขึ้น ลำไส้มีกากอาหารตกค้าง (รูปที่ 6)

ลูกปลาอายุ 16 วัน สมองส่วนต่างๆ พัฒนาคิด หัวใจมีขนาดใหญ่ขึ้น เหงือกแตกแขนงมากขึ้น (รูปที่ 7)

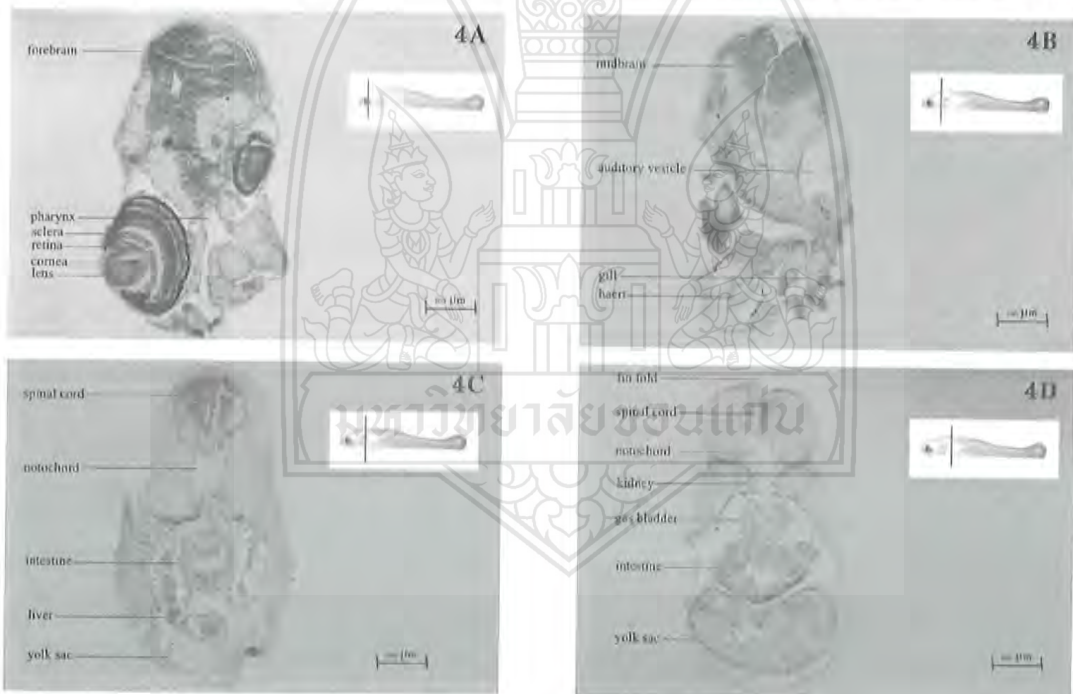
ผลการพัฒนาการและการปรากฏของอวัยวะต่าง ๆ ของลูกปลานวลจันทร์วัยอ่อนอายุ 1 วัน ถึง 16 วัน ได้สรุปในตารางที่ 1

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

1. การเจริญเติบโตของลูกปลานวลจันทร์วัยอ่อน อายุ 1 วัน ถึง 16 วัน

ผลการเจริญเติบโตจากการวัดความยาวลำตัว พบว่า ลูกปลาช่วงอายุ 1-4 วันมีความยาวลำตัวเพิ่มขึ้นทีละน้อย จาก 4.60 ± 0.84 มิลลิเมตรในวันที่ 1 ถึง $5.90(0.88)$ มิลลิเมตรในวันที่ 5 เพราะช่วงนี้ลูกปลายังไม่กินอาหาร แต่ใช้อาหารจากไข่แดงที่สะสมไว้ หลังจากอายุ 5 วัน ลูกปลาเริ่มมีการเจริญและความยาวลำตัวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

จากการศึกษาลักษณะภายนอก พบว่า ปากเริ่มเปิดเมื่อลูกปลาอายุครบ 5 วัน ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะทางโครงสร้างของอวัยวะตัดตามขวางบริเวณท้อง คือ พบมีกากอาหารที่ลำไส้ แสดงว่า ลูกปลาเริ่มกินอาหาร เมื่อมีอายุ 5 วัน ต่อมาลูกปลาเริ่มมีความยาวของลำตัวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว รัชช ศรีวิระชัย และคณะ (2548) ได้รายงานว่าการให้อาหารแก่ลูกปลาวัยอ่อนนั้น ควรเริ่ม



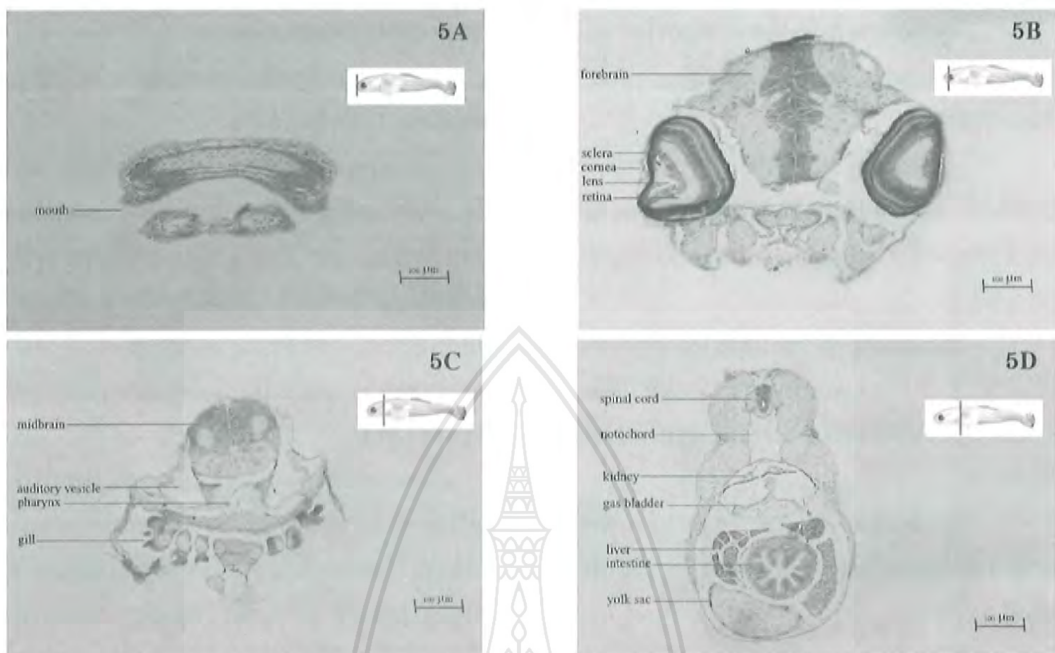
รูปที่ 4 ลักษณะโครงสร้างของอวัยวะตัดตามขวางบริเวณต่างๆ ของลูกปลานวลจันทร์อายุ 3 วัน (H&E)

A. บริเวณตา

B. บริเวณเหงือก

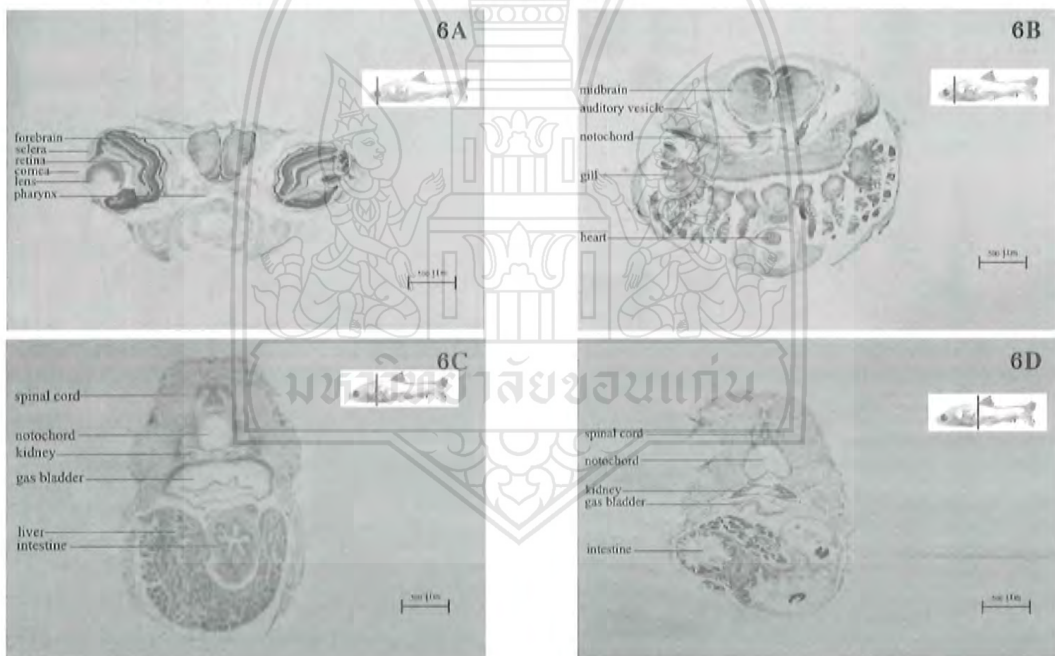
C. บริเวณหลังเหงือก

D. บริเวณกลางลำตัว



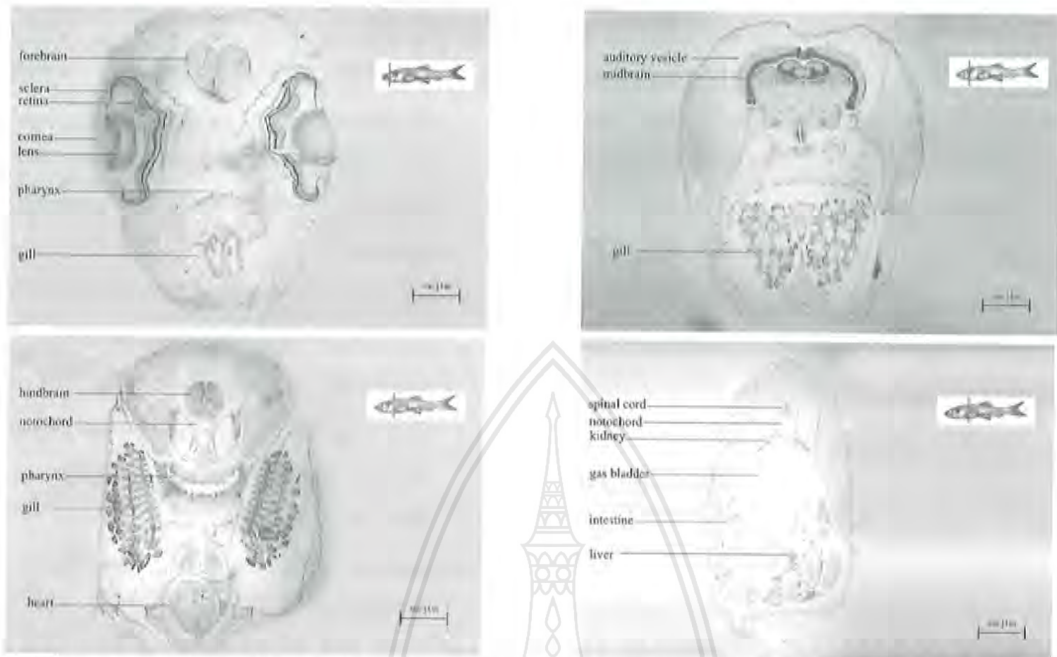
รูปที่ 5 ลักษณะโครงสร้างของอวัยวะตัดตามขวางบริเวณต่างๆ ของลูกปลานวลจันทร์อายุ 5 วัน (H&E)

- A. บริเวณปลายสุดของหัว B. บริเวณตา
C. บริเวณหลังเหงือก D. บริเวณกลางลำตัว



รูปที่ 6 ลักษณะโครงสร้างของอวัยวะตัดตามขวางบริเวณต่างๆ ของลูกปลานวลจันทร์อายุ 10 วัน (H&E)

- A. บริเวณตา B. บริเวณเหงือก
C. บริเวณกลางลำตัวส่วนหลังของครีบหู D. บริเวณกลางลำตัวส่วนหน้าของครีบท้อง



รูปที่ 7 ลักษณะโครงสร้างของอวัยวะตัดตามขวางบริเวณต่างๆ ของลูกปลานวลจันทร์อายุ 16 วัน (H&E)

A. บริเวณตา

B. บริเวณเหงือก

C. บริเวณหลังเหงือก

D. บริเวณกลางลำตัว

ให้อาหารตั้งแต่ปากของลูกปลาเริ่มเปิด เพื่อลูกปลาจะได้กินอาหารทันทีเมื่อลูกปลาพร้อม และทำให้ลูกปลามีพลังงานที่จะใช้ในการพัฒนาของร่างกายได้อย่างต่อเนื่อง ดังนั้น การให้อาหารลูกปลานวลจันทร์ควรให้เมื่อลูกปลาอายุ 5 วัน เพื่อลูกปลาจะได้กินอาหารทันทีที่ปากเปิด

2. พัฒนาการและลักษณะโครงสร้างของอวัยวะที่ปรากฏในลูกปลานวลจันทร์วัยอ่อนอายุ 1 วัน ถึง 16 วัน

พัฒนาการของลูกปลานวลจันทร์มีลักษณะเหมือนกับลูกปลาแคร์พ (*Cyprinus carpio*) (นันทนา ศรีรัตนกุล, 2531) ลูกปลาดุกอุย (*Clarius macrocephalus*) (จันทวรรัตน์ จันทราพรกุล, 2532) และ ลูกปลากะรังจุดฟ้า (*Plectropomus leopardus*) (ธวัช ศรีวิระชัย และคณะ, 2548) คือ ลูกปลาแรกฟัก ตามีลักษณะใส เมื่อลูกปลามีอายุมากขึ้น ตาเริ่มมีสีดำ แต่พัฒนาการ

ของครีบหูแตกต่างจากปลาแคร์พ ปลาดุกอุย และปลากะรังจุดฟ้า คือ ครีบหูของปลานวลจันทร์จะปรากฏเมื่ออายุ 11 วัน ส่วนครีบหูของปลาแคร์พ ปลาดุกอุย และปลากะรังจุดฟ้าปรากฏตั้งแต่ลูกปลาอายุ 1 วัน โดยมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ ความสมบูรณ์ของครีบทุกครีบของปลานวลจันทร์เหมือนกับปลาดุกอุย คือ มีความสมบูรณ์เมื่ออายุ 12 วัน แต่แตกต่างจากลูกปลาแคร์พ และลูกปลากะรังจุดฟ้าที่มีความสมบูรณ์ของครีบเมื่ออายุ 15 วัน และ 20 วัน ตามลำดับ (นันทนา ศรีรัตนกุล, 2531; ธวัช ศรีวิระชัย และคณะ, 2548)

พัฒนาการของอวัยวะต่าง ๆ ของลูกปลานวลจันทร์ ได้แก่ สมอง ตา ช่องว่างหู หัวใจ หลอดอาหาร ไข่แดง ลำไส้ ทวารหนัก ไชสันหลัง และโนโตคอร์ด มีลักษณะเหมือนกับลูกปลาแคร์พ ลูกปลาดุกอุย และลูกปลากะรังจุดฟ้า คือ อวัยวะทั้งหมดที่กล่าวมานี้เริ่มปรากฏตั้งแต่ลูกปลาอายุ 1 วัน และมีพัฒนาการดีขึ้นตามอายุ ส่วนไข่แดงของลูกปลา

นวลจันทร์ขุมหมดเมื่ออายุครบ 6 วัน ซึ่งใช้เวลานานกว่าลูกปลาการ์ฟ ลูกปลาดุกอุย และลูกปลากระรังจุดฟ้าที่ใช้เวลา 3 วัน 5 วัน และ 4 วัน ตามลำดับ ส่วนปากของลูกปลานวลจันทร์เริ่มเปิดเมื่ออายุครบ 5 วัน ซึ่งใช้เวลานานกว่าลูกปลาการ์ฟ ลูกปลาดุกอุย และลูกปลากระรังจุดฟ้าที่มีปากเปิดเมื่ออายุครบ 2 วัน ส่วนเหงือกของลูกปลานวลจันทร์เริ่มปรากฏเมื่ออายุครบ 3 วัน ใช้เวลานานกว่าลูกปลาการ์ฟ ลูกปลาดุกอุย และลูกปลากระรังจุดฟ้าที่ใช้เวลา 1 วัน 1 วัน และ 2 วัน ตามลำดับ

ผลการศึกษาลักษณะโครงสร้างของอวัยวะที่ปรากฏในลูกปลานวลจันทร์วัยอ่อนอายุต่าง ๆ ทำให้ได้ข้อมูลว่า ลูกปลานวลจันทร์วัยอ่อนอายุใดที่ใช้อาหารจากถุงไข่แดงจนหมด และลูกปลานวลจันทร์อายุใดเริ่มมีการเจริญของระบบทางเดินอาหาร ระบบประสาท ระบบไหลเวียนโลหิต ระบบขับถ่าย และระบบหายใจ เป็นต้น ซึ่งข้อมูลเกี่ยวกับพัฒนาการและลักษณะโครงสร้างของอวัยวะของลูกปลานวลจันทร์วัยอ่อนระยะต่าง ๆ ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ อาจนำไปใช้ประยุกต์และเผยแพร่ให้แก่ผู้เพาะเลี้ยงลูกปลานิตต่าง ๆ ว่าควรเริ่มให้อาหารทันทีแก่ลูกปลาที่มีปากเปิด และอาจเลือกชนิดของอาหารที่เหมาะสมให้แก่ลูกปลาเพื่อเร่งให้ลูกปลาโตเร็วกว่ากำหนด ทั้งนี้เพื่อย่นระยะเวลาการจับและจำหน่ายลูกปลา นอกจากนี้ ความรู้เกี่ยวกับพัฒนาการของลูกปลาวัยอ่อนระยะต่าง ๆ อาจช่วยให้นักวิจัยที่สนใจจะใช้ลูกปลาวัยอ่อนเป็นสัตว์ทดลองเกี่ยวกับผลกระทบของมลพิษที่มีต่อสัตว์น้ำว่า ควรจะเลือกลูกปลาวัยอ่อนอายุเท่าใดนำมาทดสอบ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และขอขอบคุณเจ้าของสี่แพนฟาร์ม บ้านยางน้อย อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างปลาในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2545). รูปปลาและสัตว์น้ำของไทย. สุพิศ ม่วงสวย และ รสสุคนธ์ ชมกนิษฐ์ (บรรณาธิการ) (พิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพฯ: องค์การก๊าซของอุตสาหกรรม. หน้า 164.
- จันทร์จรรย์ จันทร์สารทูล. (2532). ผลของฮอร์โมนต่อการพัฒนาของไข่ปลาดุกอุยและปลาดุกค้ำและลักษณะทางเนื้อเยื่อของปลาวัยอ่อน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาวิทยาลัย สาขาวิทยาศาสตร์การประมง บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชาลิต วิทยานนท์. (2547). คู่มือปลาน้ำจืด. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์กรุงเทพ. หน้า 148.
- ธวัช ศรีวิระชัย, ชัชวาล วุฒินธิ และจุฑารัตน์ ศิริสมบัติ. (2548). กัพพะและพัฒนาการของลูกปลากระรังจุดฟ้า *Plectropomus leopardus*. วารสารการประมง 58(4): 343-353.
- นันทนา ศรีรัตนกุล. (2531). ผลของไข่เทียมไรโอซัลเฟตต่ออัตราการฟักและลักษณะทางเนื้อเยื่อของปลาการ์ฟวัยอ่อน (*Cyprinus carpio*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาวิทยาลัย สาขาวิทยาศาสตร์การประมง บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- โสภณ จันทร์ดั้น. (2519). การศึกษาการเจริญเติบโตของไข่และตัวอ่อนปลาแดง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาวิทยาลัย สาขาสัตววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อภิชาติ เต็มวิชากร. (2546). ลูกปลาน้ำจืดวัยอ่อน. กรุงเทพฯ: พี.เอ.ดี.พี.จี. จำกัด. 130 หน้า.
- Freeman, W.H. and Bracegirdle, B. 1975. An Atlas of Embryology. London: Heinemann Educational Books Ltd. 107 pp.

ประสิทธิภาพของวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบทั่วไป ของการเลือกลำดับที่ของชุดตัวอย่างเมื่อจัดลำดับแบบสมบูรณ์ Efficiency of General Ranked Set Sampling with Perfect Ranking

นวกา ปลุกปลื้ม¹ ชัชวาลย์ เรืองประพันธ์² และ อโนทัย ตีรวานิช^{3*}

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติและประสิทธิภาพของตัวประมาณค่าเฉลี่ยของประชากรเมื่อใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบทั่วไปของการเลือกลำดับที่ของชุดตัวอย่าง (GRSS) ภายใต้ข้อจำกัดว่า ไม่มีความคลาดเคลื่อนในการให้ลำดับให้กับหน่วยตัวอย่าง ผลการวิจัยพบว่า ตัวประมาณค่าเฉลี่ยประชากรมีคุณสมบัติไม่เอนเอียง ($p > 0.05$) และมีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบเลือกลำดับที่ของชุดตัวอย่าง (RSS) แบบสุ่มอย่างง่ายชนิดแบ่งกลุ่ม (CLRS) แบบสุ่มอย่างง่ายชนิดมีชั้นภูมิ (SSRS) และแบบสุ่มอย่างง่าย (SRS) ในระดับก่อนข้างมากเมื่อประชากรมีการแจกแจงแบบสมมาตร แต่หากประชากรมีการแจกแจงเบ้จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าในระดับเล็กน้อยถึงปานกลาง นอกจากนี้ ขนาดตัวอย่าง ขนาดของชุดตัวอย่างและจำนวนรอบที่ทำการสุ่มตัวอย่างซ้ำ มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพของตัวประมาณค่าเฉลี่ยประชากรแบบ GRSS โดยประสิทธิภาพของตัวประมาณค่าเฉลี่ยประชากรแบบ GRSS จะเพิ่มขึ้น ถ้าค่าดังกล่าวมีค่ามาก

Abstract

The purpose of this research was to study the characteristic and efficiency of general ranked set sampling (GRSS) estimator of a population mean on the basis of perfect ranking. The results of this study can be concluded as follow: The sample mean which selected by GRSS is unbiased estimator and has highest efficiency, following with the RSS, CLRS, SSRS and SRS. This is very obvious for symmetry distribution. In addition, the value of n , m and r has significantly influenced on the efficiency of GRSS. The efficiency of GRSS increases when n (r or m) increases.

คำสำคัญ : การสุ่มตัวอย่างแบบทั่วไปของการเลือกลำดับที่ของชุดตัวอย่าง, การสุ่มตัวอย่างแบบเลือกลำดับที่ของชุดตัวอย่าง

Key words: general ranked set sampling, ranked set sampling

¹ ธนาคารทหารไทย มาทชน จำกัด (สำนักงานใหญ่) กรุงเทพมหานคร

² ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

³ corresponding author, E-mail: anothai@kku.ac.th

1. บทนำ

วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบเลือกลำดับที่ของชุดตัวอย่าง (Ranked Set Sampling: RSS) ได้ถูกเสนอครั้งแรกโดย McIntyre ในปี ค.ศ. 1952 เพื่อใช้ในการประมาณปริมาณหญ้าและหญ้าอ่อน วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบนี้ดัดแปลงมาจากวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบสุ่มอย่างง่าย (Simple Random Sampling : SRS) และเหมาะสำหรับสถานการณ์ที่สามารถกำหนดลำดับที่กับหน่วยตัวอย่าง โดยเฉพาะการสุ่มตัวอย่างทางการเกษตร เนื่องจากเป็นวิธีที่ต้องใช้การสังเกตด้วยตาและตัดสินใจ เลือกหน่วยตัวอย่างให้กับสิ่งทดลอง เช่น การประเมิน ปริมาณผลผลิตของพืชที่ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า ตัวประมาณค่าเฉลี่ยประชากรเมื่อสุ่มตัวอย่างแบบ RSS เป็นตัวประมาณที่ไม่เอนเอียง (unbiased estimator) จนกระทั่ง Hall and Dell (1966) ใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างนี้ในการประมาณน้ำหนักของต้นหญ้าในป่าสน โดยพบว่า เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพดีกว่าการสุ่มตัวอย่าง แบบสุ่มอย่างง่าย โดยกำหนดวิธีการสุ่มไว้ว่า ครั้งแรก หน่วยตัวอย่างจะถูกสุ่มเลือกเป็นชุดตัวอย่าง จากนั้นหน่วยตัวอย่างจะถูกนำมาจัดลำดับที่ในแต่ละชุดตัวอย่าง แล้วเลือกมาเพียงหนึ่งหน่วยตัวอย่างเท่านั้น ในแต่ละชุดตัวอย่างเพื่อวัดค่าคุณลักษณะที่สนใจ ต่อมา Patil *et al.* (1994) ได้นำเอา RSS มาประยุกต์ใช้ในการสุ่มตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อมและทางนิเวศวิทยา โดยการให้ลำดับที่กับหน่วยตัวอย่างที่ถูกเลือกตามคุณลักษณะที่สนใจ โดยการตรวจสอบด้วยสายตาหรือวิธีการแบบคร่าวๆ โดยไม่ต้องทำการวัดอย่างแท้จริง จนกระทั่ง Wang *et al.* (2004) ได้เสนอแนวคิดในการเลือกหน่วย ตัวอย่าง τ หน่วย ในแต่ละชุดตัวอย่าง เมื่อ $\tau > 1$ เพื่อวัดค่าลักษณะที่สนใจที่เรียกว่า การสุ่มตัวอย่างแบบทั่วไปของการเลือกลำดับที่ของชุดตัวอย่าง (General Ranked Set Sampling : GRSS) ภายใต้แผนแบบที่มีการกระจายตัวอย่างในแต่ละชุดตัวอย่างจำนวนเท่ากัน แต่ไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบอื่น ๆ

ดังนั้น คณะวิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาคุณสมบัติและเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบทั่วไปของการเลือกลำดับที่ของชุดตัวอย่างกับการสุ่มตัวอย่างวิธีการอื่น ๆ ได้แก่ แบบเลือกลำดับที่ของชุดตัวอย่าง (RSS) แบบสุ่มอย่างง่ายชนิดแบ่งกลุ่ม (CLRS) แบบสุ่มอย่างง่ายชนิดมีชั้นภูมิ (SSRS) และแบบสุ่มอย่างง่าย (SRS) เมื่อประชากรมีการแจกแจงแบบสมมาตร และแบบเบ้ เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างได้อย่างเหมาะสมกับแต่ละสถานการณ์ต่อไป

2. วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบทั่วไปของการเลือกลำดับที่ของชุดตัวอย่าง (General Ranked Set Sampling : GRSS)

เป็นวิธีการสุ่มเลือกตัวอย่างที่หน่วยตัวอย่างจะถูกสุ่มเลือกเป็นชุดตัวอย่าง จากนั้นหน่วยตัวอย่างถูกนำมาจัดลำดับที่ในแต่ละชุดตัวอย่าง และเลือกมามากกว่าหนึ่งหน่วยตัวอย่างในแต่ละชุดตัวอย่างเพื่อวัดค่าคุณลักษณะที่สนใจ มีขั้นตอนการสุ่มตัวอย่าง ดังนี้

สำหรับการสุ่มเลือกตัวอย่างรอบที่ 1

ขั้นตอนที่ 1 สุ่มตัวอย่างแบบง่าย m^* หน่วยจากประชากรขนาด N แล้วกระจายหน่วยตัวอย่างโดยสุ่มออกเป็น m ชุดๆ ละ m หน่วย

ขั้นตอนที่ 2 ให้ลำดับที่กับหน่วยตัวอย่างในแต่ละชุด โดยหน่วยตัวอย่างที่มีขนาดเล็กที่สุดจะมีลำดับที่ 1 หน่วยตัวอย่างที่มีขนาดรองลงมาจะมีลำดับที่ 2 เรื่อยๆ ไป จนกระทั่งหน่วยตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่ที่สุดจะมีลำดับที่เป็น m

ขั้นตอนที่ 3 เลือกหน่วยตัวอย่างในแต่ละชุดตัวอย่างที่มีการให้ลำดับที่จากขั้นตอนที่ 2 สมมติว่าเลือกมา 2 หน่วย ($\tau = 2$ หน่วย) โดยเลือกหน่วยตัวอย่างที่ได้รับการจัดลำดับที่เป็นลำดับที่ 1 และ 2 จากชุดตัวอย่าง

ที่ 1 เลือกหน่วยตัวอย่างที่ได้รับการจัดลำดับที่เป็นลำดับที่ 1 และ 3 จากชุดตัวอย่างที่ 2 เรื่อยๆ ไป และกระทำซ้ำจนกระทั่งได้ m ชุดที่เป็นไปได้ทั้งหมด ดังนั้น หน่วยตัวอย่างที่ถูกเลือกในรอบที่ 1 มีจำนวน $2\binom{m}{r}$ หน่วยกระทำในทำนองเดียวกันในกรณีต้องการเลือกหน่วยตัวอย่าง τ หน่วย เมื่อ $\tau > 1$ ในแต่ละชุดตัวอย่างที่มีการให้ลำดับที่จากขั้นตอนที่ 2 และกระทำซ้ำจนกระทั่งได้ m ชุดที่เป็นไปได้ทั้งหมด ดังนั้น หน่วยตัวอย่างที่ถูกเลือกในรอบที่ 1 มีจำนวน $\tau\binom{m}{r}$ หน่วย

สำหรับการสุ่มเลือกตัวอย่างรอบที่ r

ขั้นตอนที่ 4 กระทำเช่นเดียวกับการสุ่มตัวอย่างรอบที่ 1 คือ ทำตามขั้นตอนที่ 1 ถึง 3 จนกระทั่งได้จำนวนรอบในการสุ่มตัวอย่างครบ r รอบ จะทำให้หน่วยตัวอย่างที่ถูกเลือกเพื่อทำการวัดค่าคุณลักษณะที่สนใจจากการสุ่มเลือกหน่วยตัวอย่างมาทั้งหมด $r\tau\binom{m}{r}$ หน่วย

ขั้นตอนที่ 5 เก็บรวบรวมข้อมูลจากหน่วยตัวอย่างที่เลือก จำนวน $r\tau\binom{m}{r}$ หน่วย

ขั้นตอนที่ 2 - 5 สามารถแสดงประกอบด้วยแผนผังต่อไปนี้ โดยสมมติให้มีการสุ่มชุดตัวอย่าง จำนวน 3 ชุดๆ ละ 3 หน่วย ($m = 3$) และทำการสุ่มเลือกตัวอย่างซ้ำจำนวน 2 รอบ ($r = 2$) เลือกหน่วยตัวอย่าง 2 หน่วยในแต่ละชุดตัวอย่างที่มีการให้ลำดับที่ ($\tau = 2$)

รอบที่	ชุดตัวอย่างที่	ลำดับที่		
		1	2	3
1	1	☀	☀	●
	2	☀	●	☀
	3	●	☀	☀
2	1	☀	●	☀
	2	☀	●	☀
	3	●	☀	☀

แต่ละแถวคือ หน่วยตัวอย่างที่มีการให้ลำดับที่ในแต่ละชุดตัวอย่าง และหน่วยตัวอย่างที่ทำเครื่องหมาย ☀ แสดงว่าเป็นหน่วยตัวอย่างที่ถูกเลือก (เลือกหน่วยตัวอย่าง 2 หน่วย ในแต่ละชุดตัวอย่าง) ดังนั้น หน่วยตัวอย่างทั้งหมดที่ถูกสุ่มเลือกมาใน 2 รอบ มีจำนวน 18 หน่วย แต่จะมีหน่วยตัวอย่างที่ถูกเลือกมาเป็นตัวอย่างเพียง 12 หน่วยเท่านั้น

ให้ x_{aij} เป็นค่าที่แสดงคุณลักษณะของหน่วยตัวอย่างที่ a รอบที่ i เมื่อ $1 \leq a \leq m$ และ $i = 1, 2, \dots, r$ ข้อมูลที่ได้จากกระบวนการข้างต้น คือ $\{(x_{aij}, x_{bij}) : 1 \leq a < b \leq m; i = 1, 2, \dots, r\}$ ซึ่งแต่ละคู่ของหน่วยตัวอย่างเป็นอิสระกัน

สำหรับการสุ่มตัวอย่างแบบทั่วไปของเลือกลำดับที่ของชุดตัวอย่าง เมื่อ $1 \leq \tau \leq m$ โดยที่หน่วยตัวอย่างถูกเลือก τ หน่วย ในแต่ละชุดตัวอย่างที่มีการให้ลำดับที่จนครบ m ชุด ดังนั้น หน่วยตัวอย่างที่ถูกเลือกในแต่ละรอบมีจำนวน $\tau \binom{m}{\tau}$ หน่วย

ให้ $y_{r_j l}$ เป็นค่าที่แสดงคุณลักษณะของหน่วยตัวอย่างที่ j จากชุดที่ r_j รอบที่ i เมื่อ $1 \leq r_j \leq m$; $1 \leq j \leq \tau$; $1 \leq \tau \leq m$ และ $i = 1, 2, \dots, r$ ข้อมูลที่ได้แสดงดังนี้

$$\left\{ (y_{r_1 l}, y_{r_2 l}, \dots, y_{r_\tau l}) : 1 \leq r_1 \leq r_2 \leq \dots \leq r_\tau \leq m ; i = 1, 2, \dots, r ; 1 \leq \tau \leq m \right\}$$

จะได้ว่า
$$\bar{y}_{GRSS}(m, \tau) = \frac{1}{r \tau \binom{m}{\tau}} \sum_{i=1}^r \sum_{1 \leq r_1 \leq r_2 \leq \dots \leq r_\tau \leq m} \sum_{j=1}^{\tau} y_{[r_j] l}$$

คือ ตัวประมาณค่าเฉลี่ยประชากรที่ไม่เอนเอียงเมื่อสุ่มตัวอย่างด้วยวิธี GRSS และ

$$\sigma_{\bar{y}_{GRSS}}^2(m, \tau) = \frac{1}{r \tau \binom{m}{\tau}} \sum_{1 \leq r_1 \leq r_2 \leq \dots \leq r_\tau \leq m} Var\left(\sum_{j=1}^{\tau} y_{[r_j]}\right)$$

คือ ความแปรปรวนของ $\bar{y}_{GRSS}(m, \tau)$

โดย
$$Var(y_{[r_j]}) = \frac{1}{rm} \sum_{i=1}^r \sum_{l=1}^m (y_{[r_j] l} - \bar{y}_{[r_j]})^2 ; j = 1, 2, \dots, \tau$$

$$\bar{y}_{[r_j]} = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^r \sum_{l=1}^m y_{[r_j] l}$$

ตัวอย่าง สมมติให้คะแนนสอบกลางภาควิชาสถิติวิเคราะห์ 1 ซึ่งมีคะแนนเต็ม 30 คะแนน ของนักศึกษาภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 40 คน ปรากฏดังนี้

9	6	16	2	18	1	9	8	21	16
8	2	3	7	22	10	14	9	15	20
5	4	11	24	8	2	12	16	18	26
25	20	24	6	8	14	15	19	6	6

ถ้าต้องการสุ่มเลือกนักศึกษามา 12 คน ด้วยวิธีสุ่มตัวอย่างแบบ GRSS เพื่อประมาณค่าเฉลี่ยของคะแนนสอบวิชาสถิติวิเคราะห์ 1 ของนักศึกษา ทำได้ดังนี้

จากโจทย์ต้องการขนาดตัวอย่างเท่ากับ 12 ($n = 12$) ดังนั้น เราสมมติให้ขนาดของชุดตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 3 ($m = 3$) จากแต่ละชุดตัวอย่างสุ่มตัวอย่างมา 2 หน่วย ($\tau = 2$) และทำซ้ำในทำนองเดียวกัน 2 รอบ ($r = 2$) ดังนั้น ในแต่ละรอบมีวิธีการสุ่มตัวอย่างดังนี้

ขั้นที่ 1 สุ่มเลือกหน่วยตัวอย่างแบบสุ่มอย่างง่ายจากประชากรขนาด 40 หน่วย มาจำนวน 3 ชุดตัวอย่าง ชุดละ 3 หน่วย รวมเป็น 9 หน่วย

ขั้นที่ 2 ให้ลำดับที่กับหน่วยตัวอย่างในแต่ละชุดจากน้อยไปหามาก

ขั้นที่ 3 ทำการเลือกตัวอย่างในแต่ละชุดตัวอย่างจากขั้นตอนที่ 2 ชุดละ 2 หน่วย โดยเลือกหน่วยตัวอย่างที่ได้รับการจัดลำดับที่เป็น 1 และ 2 จากชุดตัวอย่างที่ 1 เลือกหน่วยตัวอย่างที่ได้รับการจัดลำดับที่เป็น 1 และ 3 จากชุดตัวอย่างที่ 2 และเลือกหน่วยตัวอย่างที่ได้รับการจัดลำดับที่เป็น 2 และ 3 จากชุดตัวอย่างที่ 3 ดังนั้น หน่วยตัวอย่างที่ถูกเลือกได้ทั้งหมดจะมีจำนวน 6 หน่วย (ซึ่งคือ กลุ่มตัวอย่างที่ได้จากการสุ่มเลือกตัวอย่างในรอบที่ 1)

แล้วกระทำในทำนองเดียวกันตั้งแต่ขั้นที่ 1 - ขั้นที่ 3 (เป็นการสุ่มเลือกตัวอย่างรอบที่ 2) ซึ่งหน่วยตัวอย่างที่ถูกเลือกในทั้งสองรอบมีจำนวนรวมทั้งหมด 12 หน่วย ปรากฏดังนี้

รอบ	ชุดตัวอย่างที่	หน่วยตัวอย่างที่			ลำดับที่		
		1	2	3	1	2	3
1	1	15	8	6	6	8	15
	2	9	2	22	2	9	22
	3	1	11	8	1	8	11
2	1	16	25	21	16	21	25
	2	18	19	9	9	18	19
	3	21	2	14	2	14	21

จากข้อมูล 12 หน่วยที่สุ่มได้ประกอบด้วย 6, 8, 2, 22, 8, 11, 16, 21, 9, 19, 14 และ 21 ดังนั้น ค่าเฉลี่ยคะแนนสอบวิชาสถิติวิเคราะห์ 1 ของนักศึกษา เมื่อสุ่มตัวอย่างด้วยวิธี GRSS คือ

$$\bar{y}_{GRSS}(m,\tau) = \frac{1}{r\tau} \sum_{l=1}^r \sum_{1 \leq r_1 \leq r_2 \leq \dots \leq r_\tau \leq m} \sum_{j=1}^{\tau} y_{[r_j]l}$$
$$\bar{y}_{GRSS}(3,2) = \frac{1}{2 \times 2 \times \binom{3}{2}} (6+8+2+\dots+21) = \frac{1}{12} \times 157 = 13.08$$

และความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยคะแนนสอบวิชาสถิติวิเคราะห์ 1 ของนักศึกษา เมื่อสุ่มตัวอย่างด้วยวิธี GRSS คือ

$$\sigma^2_{\bar{y}_{GRSS}}(m,\tau) = \frac{1}{\tau \binom{m}{\tau}} \sum_{1 \leq r_1 \leq r_2 \leq \dots \leq r_\tau \leq m} Var(\sum_{j=1}^{\tau} y_{[r_j]})$$

$$\sigma_{Y_{GRSS}}^2(3,2) = \frac{1}{2 \binom{3}{2}} \{ Var(Y_{[r_1]}) + Var(Y_{[r_2]}) \}$$

โดย ค่าข้อมูลของหน่วยแรกในแต่ละชุดตัวอย่าง : $Y_{[r_1]} = \{6, 2, 8, 16, 9, 14\}$ และ
 $Var(Y_{[r_1]}) = 22.138$

ค่าข้อมูลของหน่วยที่สองในแต่ละชุดตัวอย่าง : $Y_{[r_2]} = \{8, 22, 11, 21, 19, 21\}$ และ
 $Var(Y_{[r_2]}) = 29.667$

เพราะฉะนั้น ได้ $\sigma_{Y_{GRSS}}^2(3,2) = \frac{1}{2 \binom{3}{2}} \{ 22.138 + 29.667 \} = \frac{1}{6} \times 51.805 = 8.63$

3. วิธีดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ อาศัยข้อมูลที่จำลองขึ้น โดยกำหนดให้ข้อมูลของประชากรมีลักษณะตามแต่ละสถานการณ์ที่ศึกษาด้วยเทคนิคมอนติคาร์โลบนเครื่องไมโครคอมพิวเตอร์โดยโปรแกรม MATLAB หลังจากนั้น สุ่มเลือกหน่วยตัวอย่างมาตามขนาดตัวอย่าง (n) ที่กำหนดไว้ด้วยการอาศัยวิธีการสุ่มเลือกตัวอย่างแบบต่าง ๆ 5 วิธี ได้แก่ สุ่มเลือกตัวอย่างแบบสุ่มอย่างง่าย แบบสุ่มอย่างง่ายชนิดมีชั้นภูมิ แบบสุ่มอย่างง่ายชนิดแบ่งกลุ่ม แบบเลือกลำดับที่ของชุดตัวอย่าง และแบบทั่วไปของการเลือกลำดับที่ของชุดตัวอย่าง แล้วบันทึกค่าสังเกตของหน่วยตัวอย่างที่ตกเป็นกลุ่มตัวอย่าง พร้อมคำนวณค่าเฉลี่ยตัวอย่าง ($\bar{y}_{jk}$) และค่าความแปรปรวนตัวอย่าง ($v(\bar{y}_{jk})$) ของชุดตัวอย่างซ้ำที่ k ใด ๆ ; $k = 1, 2, \dots, 500$ ตามสูตรของแต่ละวิธีการสุ่มเลือกตัวอย่างแบบที่ j ใด ๆ ($j = 1, 2, \dots, 5$) เมื่อครบ 500 ซ้ำแล้ว คำนวณค่าเฉลี่ยของค่าเฉลี่ยตัวอย่าง ($\bar{y}_j = \sum_{k=1}^{500} \frac{\bar{y}_{jk}}{500}$) และค่าเฉลี่ยของค่าความแปรปรวนตัวอย่าง ($v(\bar{y}_j) = \sum_{k=1}^{500} \frac{v(\bar{y}_{jk})}{500}$) สำหรับวิธีการสุ่มตัวอย่างแต่ละแบบที่ j ใดๆ หลังจากนั้นทดสอบยืนยันว่าตัวประมาณค่าเฉลี่ยของแต่ละวิธีการสุ่มตัวอย่างเป็นตัวประมาณที่ไม่เอนเอียงของค่าเฉลี่ยประชากรด้วยการใช้แบบทดสอบ z test ในกรณีประชากรมีการแจกแจงแบบปกติหรือกลุ่มตัวอย่างมีขนาดใหญ่ และ Wilcoxon signed rank test ในกรณีประชากรไม่มีการแจกแจงแบบปกติและกลุ่มตัวอย่างมีขนาดเล็ก ส่วนค่าประสิทธิภาพสัมพัทธ์ (Relative Efficiency : R.E) ของวิธี GRSS เทียบกับวิธี RSS (หรือเทียบกับ CLRS / SSRS / SRS) คำนวณจากสูตร

$$R.E. = \frac{v(\bar{y}_A)}{v(\bar{y}_B)}$$

เมื่อ $v(\bar{y}_A) =$ ค่าเฉลี่ยของความแปรปรวนตัวอย่างของ $\bar{y}_A$ เมื่อสุ่มตัวอย่างแบบวิธี A (ซึ่งได้แก่ วิธี RSS / CLRS / SSRS / SRS)

$v(\bar{y}_B) =$ ค่าเฉลี่ยของความแปรปรวนตัวอย่างของ $\bar{y}_B$ เมื่อสุ่มตัวอย่างแบบวิธี GRSS

โดย ถ้าค่า R.E. มากกว่า 1.00 แสดงว่า การสุ่มตัวอย่างแบบวิธี GRSS มีประสิทธิภาพสูงกว่าการสุ่มตัวอย่างวิธีการแบบวิธี A ทั้งนี้เมื่อ A และ B เป็นตัวประมาณที่ไม่เอนเอียงของค่าเฉลี่ยประชากร

สำหรับสถานการณ์ที่ศึกษาในการวิจัยนี้กำหนดให้มีลักษณะดังนี้

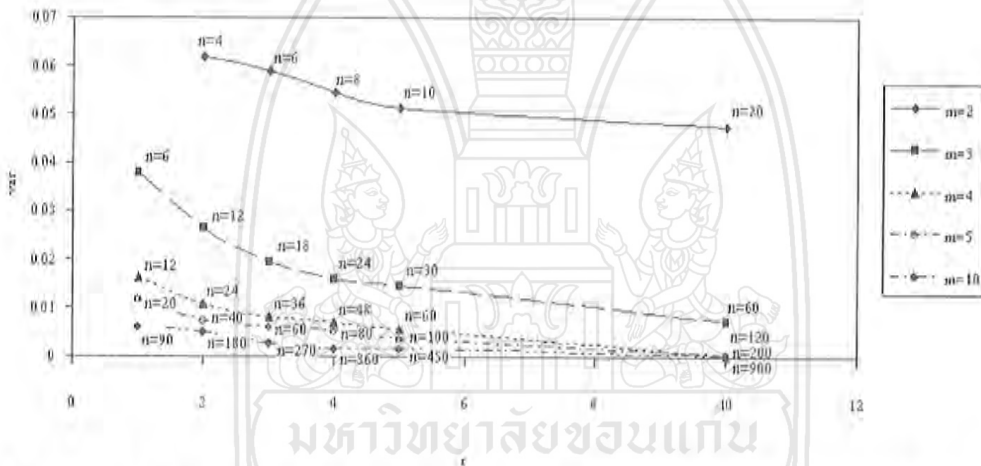
1. สมมติให้ประชากรที่มีการแจกแจงแบบปกติมาตรฐาน แบบสม่ำเสมอต่อเนื่องในช่วง $(0,1)$ และแบบเอ็กซ์โพเนนเชียลที่มีพารามิเตอร์ $\lambda = 0.5, 1$ และ 3

2. ขนาดของชุดตัวอย่าง (m) มีค่าเท่ากับ 2, 3, 4, 5 และ 10 จำนวนรอบที่ทำการสุ่มตัวอย่างซ้ำ (r) มีค่าเท่ากับ 1, 2, 3, 4, 5 และ 10 และจำนวนหน่วยตัวอย่างที่เลือกจากแต่ละชุดตัวอย่าง (n) มีค่าเท่ากับ 1 และ 2 โดยขนาดตัวอย่างที่สุ่มมาทั้งหมดในแต่ละครั้งของการสุ่ม (n) เท่ากับ $nr \binom{m}{r}$ หน่วย

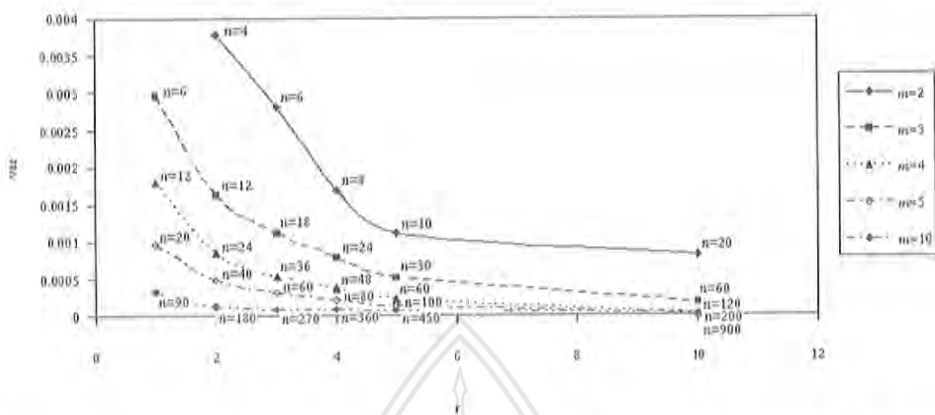
4. ผลการวิจัย

4.1 คุณสมบัติของตัวประมาณค่าเฉลี่ย

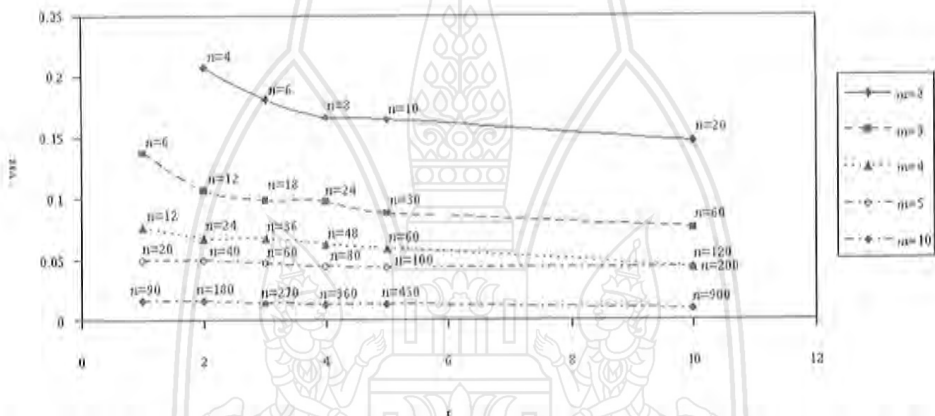
คุณสมบัติของตัวประมาณค่าเฉลี่ยเมื่อสุ่มตัวอย่างด้วยวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบทั่วไปของการเลือกลำดับที่ของชุดตัวอย่าง ได้ผลสรุปในทำนองเดียวกันทั้ง 3 ลักษณะการแจกแจงที่ศึกษา นั่นคือ ค่าเฉลี่ยที่ประมาณได้เป็นตัวประมาณที่ไม่มีอคติสำหรับค่าเฉลี่ยประชากร ($p > 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อขนาดตัวอย่าง n มีค่าเพิ่มขึ้น ค่าความแปรปรวนตัวอย่างของตัวประมาณค่าเฉลี่ยจะมีค่าลดลง เช่นเดียวกันเมื่อจำนวนของชุดตัวอย่าง m มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนรอบที่ทำการสุ่มตัวอย่างซ้ำ r มีค่าคงที่ หรือจำนวนรอบที่ทำการสุ่มตัวอย่างซ้ำ r มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนของชุดตัวอย่าง m มีค่าคงที่ ค่าความแปรปรวนตัวอย่างของตัวประมาณค่าเฉลี่ยจะมีค่าลดลง ดังรูปที่ 1-รูปที่ 3



รูปที่ 1 กราฟแสดงค่าความแปรปรวนตัวอย่างของตัวประมาณค่าเฉลี่ยจากการสุ่มตัวอย่างแบบ GRSS เมื่อสุ่มตัวอย่างจากประชากรที่มีการแจกแจงแบบปกติมาตรฐาน โดย $m = 2, 3, 4, 5, 10$ และ $r = 1, 2, 3, 4, 5, 10$



รูปที่ 2 กราฟแสดงค่าความแปรปรวนตัวอย่างของตัวประมาณค่าเฉลี่ยจากการสุ่มตัวอย่างแบบ GRSS เมื่อสุ่มตัวอย่างจากประชากรที่มีการแจกแจงแบบสม่ำเสมอในช่วง (0,1) โดย $m = 2, 3, 4, 5, 10$ และ $r = 1, 2, 3, 4, 5, 10$



รูปที่ 3 กราฟแสดงค่าความแปรปรวนตัวอย่างของตัวประมาณค่าเฉลี่ยจากการสุ่มตัวอย่างแบบ GRSS เมื่อสุ่มตัวอย่างจากประชากรที่มีการแจกแจงแบบเอกซ์โปเนนเชียล ($\lambda = 1$) โดย $m = 2, 3, 4, 5, 10$ และ $r = 1, 2, 3, 4, 5, 10$

4.2 ประสิทธิภาพของตัวประมาณค่าเฉลี่ย

4.2.1 เมื่อสุ่มตัวอย่างจากประชากรที่มีการแจกแจงแบบปกติมาตรฐาน ทุกสถานการณ์ที่ศึกษาวิธีการสุ่มตัวอย่าง GRSS มีประสิทธิภาพมากกว่าทุกวิธี และถ้าขนาดตัวอย่าง (n) มีค่าเพิ่มมากขึ้น ประสิทธิภาพในการประมาณค่าก็จะเพิ่มมากขึ้น โดยค่าประสิทธิภาพสัมพัทธ์ของ GRSS เทียบกับ RSS ($R.E._1$) : GRSS เทียบกับ CLRS ($R.E._2$) : GRSS เทียบกับ SSRS ($R.E._3$) : GRSS เทียบกับ SRS ($R.E._4$) ตามลำดับ สำหรับขนาดตัวอย่างใหญ่มีค่าประมาณ 4 : 5 : 7 : 10 ส่วนเมื่อขนาดตัวอย่างเล็กและขนาดของชุดตัวอย่าง ($m = 4, 5$) จะมีค่าประมาณ 5 : 3.5 : 6 : 7 กล่าวโดยสรุป ประสิทธิภาพของวิธีการสุ่มตัวอย่างต่างๆ เมื่อเรียงลำดับจากมากไปหาน้อยปรากฏดังนี้คือ วิธี GRSS RSS CLRS SSRS และ SRS ตามลำดับ

4.2.2 เมื่อสุ่มตัวอย่างจากประชากรที่มีการแจกแจงแบบสม่ำเสมอต่อเนื่องในช่วง (0,1) ทุกสถานการณ์ที่ศึกษาวิธีการสุ่มตัวอย่าง GRSS มีประสิทธิภาพมากกว่าทุกวิธี และถ้าขนาดตัวอย่าง (n) มีค่าเพิ่มมากขึ้น ประสิทธิภาพในการประมาณค่าก็จะเพิ่มมากขึ้นตาม โดยค่า $R.E._1 : R.E._2 : R.E._3 : R.E._4$ มีค่าประมาณ 8 : 13 : 16 : 20 ดังนั้น ประสิทธิภาพของวิธีการสุ่มตัวอย่างเมื่อเรียงจากมากไปหาน้อยเป็นดังนี้ วิธี GRSS RSS CLS SSRS และ SRS ตามลำดับ

4.2.3 เมื่อสุ่มตัวอย่างจากประชากรที่มีการแจกแจงแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล ($\lambda = 0.5, 1, 3$) ทุกสถานการณ์ที่ศึกษาวิธีการสุ่มตัวอย่าง GRSS มีประสิทธิภาพมากกว่าทุกวิธีโดยเรียงลำดับจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ คือ วิธี GRSS RSS CLRS SSRS และ SRS ตามลำดับ นอกจากนี้ ถ้าขนาดตัวอย่าง (n) มีค่าเพิ่มมากขึ้น ประสิทธิภาพในการประมาณค่าก็จะเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งเมื่อค่าพารามิเตอร์ λ มีค่าเพิ่มมากขึ้น ประสิทธิภาพในการประมาณค่ามีค่าเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย เช่น เมื่อ $\lambda = 0.5$ และ $\lambda = 1$ พบว่า สถานการณ์ที่ศึกษาส่วนมากมีค่า โดย $R.E._1 : R.E._2 : R.E._3 : R.E._4$ มีค่าประมาณ 1.4 : 2 : 2.5 : 3 สำหรับ $\lambda = 0.5$ และประมาณ 1.2 : 2 : 3.5 : 5 สำหรับ $\lambda = 1.0$ แต่มีบางกรณีที่มีขนาดตัวอย่าง (n) มีขนาดเล็ก และขนาดของชุดตัวอย่าง ($m = 2$) ได้ค่า ซึ่ง $R.E._1 : R.E._2 : R.E._3 : R.E._4$ มีค่าประมาณ 1.9 : 1.3 : 1.5 : 1.6 สำหรับ $\lambda = 0.5$ และประมาณ 1.4 : 1.2 : 2.6 : 3.2 สำหรับ $\lambda = 1.0$ แต่เมื่อ $\lambda = 3$ พบว่า สถานการณ์ที่ศึกษาส่วนมากค่าประสิทธิภาพสัมพัทธ์เรียงอยู่ในลักษณะ $R.E._2 < R.E._1 < R.E._3 < R.E._4$ โดยมีค่า $R.E._1 : R.E._2 : R.E._3 : R.E._4$ ประมาณ 1.3 : 1.6 : 2 : 3 บางกรณีเมื่อขนาดตัวอย่างเล็กและขนาดของชุดตัวอย่างเท่ากัน 2 ($m = 2$) ค่าประสิทธิภาพสัมพัทธ์เรียงอยู่ในลักษณะ $R.E._2 < R.E._1 < R.E._3 < R.E._4$ ซึ่งค่า $R.E._1 : R.E._2 : R.E._3 : R.E._4$ มีค่าประมาณ 2 : 1.5 : 2.4 : 2.6 รายละเอียดอื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวประมาณค่าเฉลี่ยเมื่อสุ่มเลือกหน่วยตัวอย่างด้วยวิธี GRSS เทียบกับวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบอื่นๆ

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพ	การแจกแจงแบบปกติมาตรฐาน	การแจกแจงแบบสม่ำเสมอต่อเนื่องในช่วง (0,1)	การแจกแจงแบบเอ็กซ์โพเนนเชียลเมื่อ $\lambda = 0.5, 1, 3$
1. วิธีการสุ่มตัวอย่าง GRSS เทียบกับ RSS	- ทุกสถานการณ์ ค่า $R.E. > 1$ - n เพิ่มขึ้น ค่า $R.E.$ ลดลง - r เพิ่มขึ้น n คงที่ ค่า $R.E.$ เพิ่มขึ้น	- ทุกสถานการณ์ ค่า $R.E. > 1$ - n เพิ่มขึ้น ค่า $R.E.$ ลดลง - r เพิ่มขึ้น n คงที่ ค่า $R.E.$ เพิ่มขึ้น	- กรณีที่ศึกษาส่วนมาก มีค่า $R.E. > 1$ - n เพิ่มขึ้น ค่า $R.E.$ ลดลง - n เพิ่มขึ้น m คงที่ ค่า $R.E.$ เพิ่มขึ้น - n ลดลง m คงที่ ค่า $R.E.$ ลดลง - เมื่อ λ มีค่าเพิ่มมากขึ้น ค่า $R.E.$ มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย
2. วิธีการสุ่มตัวอย่าง GRSS เทียบกับ Cluster	- กรณีที่ศึกษาส่วนมาก มีค่า $R.E. > 1$ - n เพิ่มขึ้น ค่า $R.E.$ ลดลง	- ทุกสถานการณ์ ค่า $R.E. > 1$ - n เพิ่มขึ้น ค่า $R.E.$ ลดลง	- ทุกสถานการณ์ ค่า $R.E. > 1$ - n เพิ่มขึ้น ค่า $R.E.$ ลดลง - เมื่อ λ มีค่าเพิ่มมากขึ้น ค่า $R.E.$ มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย

ตารางที่ 1 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวประมาณค่าเฉลี่ยเมื่อสุ่มเลือกหน่วยตัวอย่างด้วยวิธี GRSS เทียบกับวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบอื่นๆ (ต่อ)

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพ	การแจกแจงแบบปกติมาตรฐาน	การแจกแจงแบบสมมาตรต่อเนื่องในช่วง (0,1)	การแจกแจงแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล เมื่อ $\lambda = 0.5, 1, 3$
3. วิธีการสุ่มตัวอย่าง GRSS เทียบกับ SSRS	- ทุกสถานการณ์ ค่า R.E. > 1 - n เพิ่มขึ้น ค่า R.E. ลดลง	- ทุกสถานการณ์ ค่า R.E. > 1 - n เพิ่มขึ้น ค่า R.E. ลดลง	- ทุกสถานการณ์ ค่า R.E. > 1 - n เพิ่มขึ้น ค่า R.E. ลดลง - เมื่อ λ มีค่าเพิ่มมากขึ้น R.E. มีค่าเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย
4. วิธีการสุ่มตัวอย่าง GRSS เทียบกับ SRS (แบบใช้คืนและไม่ใช้คืน)	- ทุกสถานการณ์ ค่า R.E. > 1 - n เพิ่มขึ้น ค่า R.E. ลดลง	- ทุกสถานการณ์ ค่า R.E. > 1 - n เพิ่มขึ้น ค่า R.E. ลดลง	- ทุกสถานการณ์ ค่า R.E. > 1 - n เพิ่มขึ้น ค่า R.E. ลดลง - เมื่อ λ มีค่าเพิ่มมากขึ้น R.E. มีค่าเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย

5. สรุปผลการวิจัย

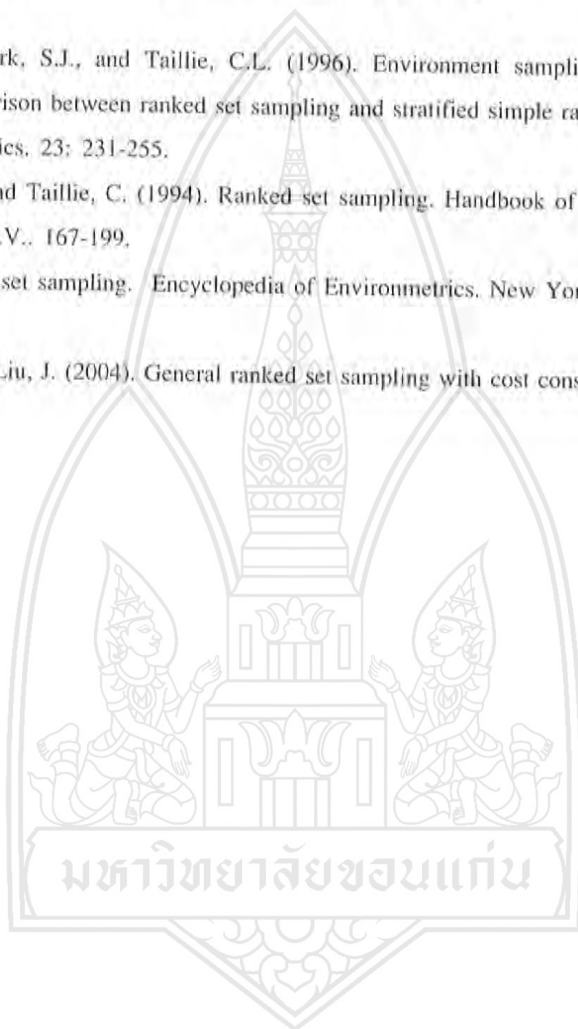
การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้พบว่า ตัวประมาณค่าเฉลี่ยของประชากรจากวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบ GRSS เป็นตัวประมาณที่ไม่มีความเอนเอียง ($p > 0.05$) และมีประสิทธิภาพสูงสุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อประชากรมีลักษณะการแจกแจงแบบสมมาตร GRSS มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการสุ่มตัวอย่างอื่นๆ ในระดับค่อนข้างมาก เช่น ประชากรมีการแจกแจงแบบปกติมาตรฐาน ประสิทธิภาพสัมพัทธ์ของ GRSS เทียบกับ RSS, เทียบกับ CLRS, เทียบกับ SSRS และ เทียบกับ SRS มีค่าประมาณ 4, 5, 7 และ 10 ตามลำดับ หรือประมาณ 8, 13, 16 และ 20 ตามลำดับ สำหรับประชากรที่มีการแจกแจงแบบสมมาตรต่อเนื่อง แต่หากประชากรมีการแจกแจงแบบเบ้ GRSS มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบอื่นๆ ในระดับเล็กน้อยถึงปานกลาง เช่น เมื่อประชากรมีการแจกแจงแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล ที่ $\lambda = 0.5$ ค่าประสิทธิภาพสัมพัทธ์ประมาณ 1.4, 2.0, 2.5 และ 3 ตามลำดับ หรือประมาณ 1.2, 2.0, 3.5 และ 5 ตามลำดับ สำหรับเมื่อ $\lambda = 1$ นอกจากนี้ พบว่าขนาดตัวอย่าง (n) ขนาดของชุดตัวอย่าง (m) และจำนวนรอบที่ทำการสุ่มตัวอย่างซ้ำ (r) มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพของตัวประมาณค่าเฉลี่ยประชากรแบบ GRSS โดยวิธี GRSS มีประสิทธิภาพในการประมาณค่าสูงที่สุด ลำดับถัดไปส่วนใหญ่ ได้แก่ วิธี RSS, CLRS, SSRS และ SRS ตามลำดับ สำหรับเมื่อใช้ตัวอย่างขนาดใหญ่ แต่ถ้าตัวอย่างมีขนาดเล็กถึงปานกลาง ลำดับถัดไป ได้แก่วิธี CLRS, RSS, SSRS และ SRS ตามลำดับ

6. ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบ GRSS ในครั้งต่อไป ควรศึกษาภายใต้ข้อกำหนดว่ามีความคลาดเคลื่อนในการให้ลำดับที่กับหน่วยตัวอย่าง
2. กำหนดให้การกระจายของข้อมูลมีค่ามากขึ้นและหลากหลายค่า
3. ในการศึกษาครั้งนี้กำหนดให้แต่ละชุดตัวอย่างมีจำนวนเท่ากัน (balance) ดังนั้น ในการศึกษาครั้งต่อไป ควรกำหนดให้แต่ละชุดตัวอย่างมีจำนวนไม่เท่ากัน
4. ควรศึกษาถึงประสิทธิภาพของ GRSS เมื่อมีการกำหนดจำนวนชุดตัวอย่าง (r) มีค่าระดับอื่น ๆ เช่น 3, 4, 5 เป็นต้น

7. เอกสารอ้างอิง

- นวกา ปลุกปลื้ม. (2549). ประสิทธิภาพของวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบทั่วไปของการเลือกลำดับที่ของชุดตัวอย่างเมื่อจัดลำดับแบบสมบรูณ์. รายงานการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสถิติประยุกต์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- Dell, T.R., and Clutter, J.L. (1972). Ranked set sampling theory with order statistics background. *Biometrics*, 28: 545-553.
- Halls, L.S., and Dell, T.R. (1966). Trial of ranked set sampling for forage yields. *Forest Science*, 12 : 22-26.
- Kaur, A., Patil, G.P., Shirk, S.J., and Taillie, C.L. (1996). Environment sampling with a concomitant variable: a comparison between ranked set sampling and stratified simple random sampling. *Journal of Applied Statistics*, 23: 231-255.
- Patil, G.P., Shinha, A.K, and Taillie, C. (1994). Ranked set sampling. *Handbook of statistics*. Netherlands: Elsevier Science B.V., 167-199.
- . (2002). Ranked set sampling. *Encyclopedia of Environmetrics*. New York: John Wiley & Sons. 1684-1690.
- Wang, Y.G., Chen, Z. and Liu, J. (2004). General ranked set sampling with cost considerations. *Biometrics*, 60 : 556-561.



ข้อแนะนำในการเขียนบทความลงวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ประเภทของเรื่องที่จะตีพิมพ์

1. รายงานผลการวิจัยและค้นคว้าหรือการสำรวจที่ยังไม่เคยตีพิมพ์ในวารสารหรือหนังสืออื่นมาก่อน
2. บทความปริทัศน์ ได้แก่ งานเขียนที่รวบรวมหรือเรียบเรียงจากเอกสารหรือหนังสือต่าง ๆ เพื่อเผยแพร่และฟื้นฟูงานด้านวิชาการระดับต่าง ๆ
3. บทความแสดงข้อคิดเห็นหรือข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในด้านวิชาการ เรื่องแปล ข่าววิชาการ ข้อความจากงานวิจัยหรือหนังสือใหม่ที่น่าสนใจ

รูปแบบของการเขียนและเตรียมต้นฉบับ

1. ต้นฉบับ ต้องเป็นตัวพิมพ์ Angsana New
 - 1.1 ชื่อเรื่อง ขนาดตัวอักษร 20 ตัวเต็ม ตำแหน่งตรงกลาง มีทั้งชื่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ
 - 1.2 ชื่อผู้เขียน ขนาดตัวอักษร 16 เชน ตำแหน่งขวาสุด และใส่หมายเลขไว้ท้ายนามสกุล เพื่อการระบุที่อยู่ด้านล่าง
 - 1.3 หัวข้อใหญ่ในแต่ละส่วน ขนาดตัวอักษร 16 ตัวเต็ม ตำแหน่งซ้ายสุด ยกเว้น บทคัดย่อ และ Abstract อยู่ตรงกลาง หัวข้อย่อยตามความเหมาะสม
 - 1.4 เนื้อความ ขนาดตัวอักษร 14
 - 1.5 คำว่า รูปที่ x และตารางที่ x ขนาดตัวอักษร 14 ตัวเต็ม ส่วนข้อความบรรยายล่อท้ายตัวปกติ
 - 1.6 ที่อยู่ ขนาดอักษร 12
 - 1.7 ช่องว่างระหว่างบรรทัดตามมาตรฐาน
 - 1.8 พิมพ์ลงในกระดาษขาว A4 (โรเนียวสัน) โดยใช้กระดาษหน้าเดียว ความยาวไม่เกิน 10 หน้า สั่งต้นฉบับ 2 ชุด (ไม่ต้องส่งแผ่นดิสก์ หรือแผ่นซีดีในขั้นตอนนี้ เมื่อได้รับแจ้งว่าได้ลงพิมพ์แล้ว ผู้เขียนส่งฉบับแก้ไข 1 ชุด พร้อมแผ่นดิสก์ หรือแผ่นซีดี)
2. ต้นฉบับ จะถูกพิจารณาโดยกองบรรณาธิการ และจะตอบรับการได้รับบทความโดยไม่ส่งต้นฉบับคืน ผู้เขียนควรจะอัดสำเนาเก็บไว้เป็นหลักฐานของตัวเอง 1 ฉบับ
3. ต้นฉบับ จะต้องมีความถูกต้องทั้งในด้านเนื้อหา และการใช้ภาษา รวมทั้งมีความสมบูรณ์ในรูปแบบพร้อมที่จะนำลงตีพิมพ์ได้
 4. ชื่อเรื่อง ให้ใช้ภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ ไม่ยาวเกินไป และหลีกเลี่ยงการใช้คำย่อโดยไม่จำเป็น
 5. ชื่อผู้เขียน เขียนชื่อภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษพร้อมทั้งบอกสถานที่ทำงานให้ชัดเจน
 6. เนื้อเรื่อง ใช้ได้ทั้งภาษาไทยล้วนและภาษาอังกฤษล้วน ถ้าใช้ภาษาไทย ภาษาอังกฤษที่ใช้ปนกับภาษาไทยนั้นให้พยายามแปลเป็นไทยเท่าที่จะทำได้ และให้เขียนคำเดิมกำกับในวงเล็บ การทับศัพท์ภาษาอังกฤษตลอดทั้งการเขียนตัวสะกด การันต์ ในภาษาไทยให้ใช้ตามแบบราชบัณฑิตยสถาน

ข้อแนะนำในการเขียนบทความลงวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

7. ในกรณีของบทความวิจัย ต้องมีบทคัดย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ และแบ่งเนื้อหาของบทความเป็นบทนำ วิธีดำเนินงาน ผลการวิเคราะห์ บทสรุปและวิจารณ์

8. เชิงอรรถ (footnote) ใช้เฉพาะที่จำเป็นเพื่อขยายหรือให้รายละเอียดเพิ่มเติมแก้ไขความเฉพาะตอนในบทความ

9. ตารางและภาพประกอบ คำบรรยายประกอบตารางหรือภาพประกอบควรจะสั้นและชัดเจน ถ้าเป็นภาพถ่ายให้ใช้ภาพขาว-ดำ ขนาดโปสเตอร์ ภาพเขียนลายเส้นควรเขียนด้วยหมึกดำ ภาพที่เขียนต้องชัดเจนและมีขนาดที่เหมาะสม

10. เอกสารอ้างอิง หรือบรรณานุกรม แนะนำให้เขียนตามแบบที่ทางวารสารกำหนด

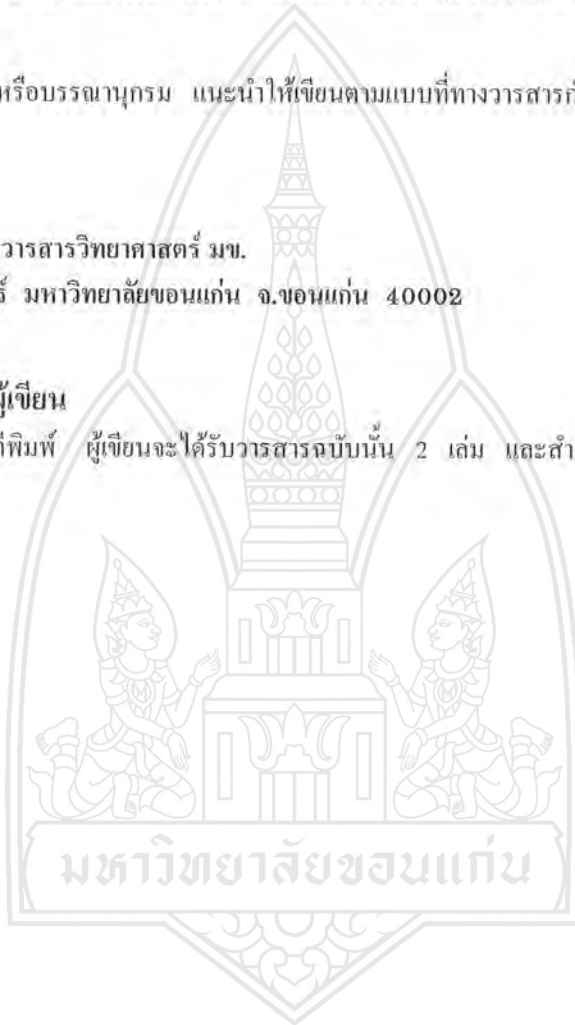
ส่งต้นฉบับมาที่

กองบรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

อภินันทนาการสำหรับผู้เขียน

เรื่องที่ได้รับการตีพิมพ์ ผู้เขียนจะได้รับวารสารฉบับนั้น 2 เล่ม และสำเนาพิมพ์อีก 15 ชุด



ตัวอย่าง

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันและกรดไขมันของจิ้งหรีดทองลาย (*Gryllus* sp.)
ที่เลี้ยงเพื่อการค้า

บรรจง เชื้อเมืองพาน¹ วิรัช ว่องพัฒน์กุล² และ ปวีณา พงษ์คันธี^{1*}

บทคัดย่อ

XX
XX

บทนำ

XX
XX
XX

วิธีการ

XX
XX
XX

รูปที่ 1 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

ตารางที่ 1 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

¹ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002
² ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002
^{*} correspondening author, E-mail

การเขียนเอกสารอ้างอิงในวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

เอกสารอ้างอิง (Reference) หมายถึง เอกสารหรือส่วนหนึ่งของเอกสารที่อ้างอิงถึงหรือแปลมาโดยตรง การเขียนเอกสารอ้างอิงในเนื้อหานั้น ให้ใช้ระบบชื่อและปี เช่น Williams (2001) รายงานว่า... หรือ... (Williams, 2001) การเขียนเอกสารอ้างอิงในตอนท้ายบทความนั้น ให้ใส่เฉพาะเล่มที่มีการอ้างอิงไว้แล้ว ในเนื้อหาเท่านั้น หากอ้างอิงจากเล่มภาษาไทย ต้องเขียนทั้งชื่อและนามสกุล

บรรณานุกรม (Bibliography) หมายถึง เอกสารที่ใช้อ้างอิงในลักษณะที่สรุปเป็นหลักการหรือทฤษฎีโดยมิได้อ้างอิงหรือแปลมาโดยตรง

การเขียนเอกสารอ้างอิง หรือบรรณานุกรม มีแนวทางการเขียนดังนี้

1. หนังสือ

ก. ภาษาไทย

ชื่อตัว นามสกุลของผู้แต่ง. (เลขปี พ.ศ.) ชื่อหนังสือ. (เล่มที่). (พิมพ์ครั้งที่). เมืองที่พิมพ์: โรงพิมพ์ หรือสำนักพิมพ์. เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง.

ข. ภาษาอังกฤษ

ชื่อสกุล, อักษรย่อชื่อต้น. อักษรย่อชื่อรอง. (เลขปี ค.ศ.). ชื่อหนังสือ. (เล่มที่). (พิมพ์ครั้งที่). เมืองที่พิมพ์: โรงพิมพ์หรือสำนักพิมพ์. เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง.

2. เอกสารราชการ

ชื่อหน่วยราชการ. (เลขปี พ.ศ. หรือ ค.ศ.). ชื่อเรื่อง. ชื่อหนังสือ. เมืองที่พิมพ์: โรงพิมพ์ หรือสำนักพิมพ์.

3. วารสาร

ก. ภาษาไทย

ชื่อตัว นามสกุลของผู้แต่ง. (เลขปี พ.ศ.). ชื่อบทความ. ชื่อวารสาร. เล่มที่ (ฉบับที่): เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้าย.

ข. ภาษาอังกฤษ

ชื่อสกุล, อักษรย่อชื่อต้น. อักษรย่อชื่อรอง. (เลขปี ค.ศ.). ชื่อบทความ. ชื่อวารสาร. เล่มที่ (ฉบับที่): เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าสุดท้าย.

หมายเหตุ

1. กรณีที่เป็นเอกสารอ้างอิงจากแหล่งอื่น ๆ นอกเหนือจากที่กำหนดข้างต้น เช่น จุลสาร หนังสือพิมพ์ ฯลฯ ให้ยึดหลักการเขียนตามแบบข้างต้นโดยอนุโลม
2. กรณีที่มีผู้เขียน 2 คน ให้เขียนตามแบบของผู้เขียนคนแรก แต่ให้เติมคำว่า “และ” หรือ “and” หน้าชื่อสุดท้ายในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ
3. กรณีที่มีผู้เขียนมากกว่า 2 คนขึ้นไป ให้ใส่เฉพาะผู้แต่งชื่อแรกและใส่คำว่า “และคณะ” หรือ “et al.” ในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ (เฉพาะในเนื้อหาเท่านั้น)
4. ถ้าเอกสารที่ถูกอ้างอิงอยู่ในระหว่างตีพิมพ์ ให้บอกรายละเอียดมากที่สุดและใช้คำว่า “ระหว่างตีพิมพ์” หรือ “in press” ในกรณีของภาษาไทย หรือภาษาอังกฤษตามลำดับ โดยวงเล็บต่อท้ายเอกสารอ้างอิงนั้น



วิทยาลัย เทคโนโลยี (043) 221938, 220128
Fax : 043 22012938 อีเมล : kku@kku.ac.th 2551

E-mail : kk_p902@hotmail.com
E-mail : khonkaenprint@yahoo.com

หนังสือในโครงการผลิตตำรา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น



สถิติพื้นฐาน

พร้อมตัวอย่างการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม
MINITAB SPSS และ SAS

รองศาสตราจารย์รัชชาลัย เรืองประพันธ์
พิมพ์ครั้งที่ 5 2543 • 510 หน้า

ISBN 974-675-666-4

ราคา 180 บาท



สเปกโทรสโกปี ในการพิสูจน์ โครงสร้างของสารอินทรีย์

รองศาสตราจารย์ ดร. สมเดช กนกมธากุล

2547 • 238 หน้า

ISBN 974-435-348-1

ราคา 150 บาท



หลักการเบื้องต้นและการประยุกต์ใช้ เทคนิคต่างๆในเคมีวิเคราะห์

รองศาสตราจารย์ ดร. ทัดถิณี จันทร์ไทย

2543 • 202 หน้า

ISBN 974-678-333-2

ราคา 150 บาท



สมการเชิงอนุพันธ์สามัญ

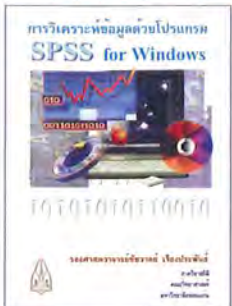
Ordinary Differential Equations

รองศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ ไวย่างกูร

2550 • 470 หน้า

ISBN 978-974-7707-55-7

ราคา 240 บาท



การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS for Windows

รองศาสตราจารย์รัชชาลัย เรืองประพันธ์

2544 • 620 หน้า

ISBN 974-654-608-2

ราคา 300 บาท



เคมีเฮเทอโรไซคลิกแอโรแมติก

Aromatic Heterocyclic Chemistry

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิวัฒน์ หาญวงษ์

2550 • 122 หน้า

ISBN 978-974-7707-71-7

ราคา 90 บาท



การวิเคราะห์ฟังก์ชันนัลขั้นพื้นฐาน

รองศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ ไวย่างกูร

2547 • 344 หน้า

ISBN 974-367-958-8

ราคา 200 บาท



หลักการของพันธุวิศวกรรมในโปรคาริโอต

Principles of Genetic Engineering in Prokaryotes

รองศาสตราจารย์ ดร. นิรันดร์ สัตยาภัย

2551 • 164 หน้า

ISBN 978-974-10-2673-9

ราคา 120 บาท



แมงป่องช้าง

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทัดถิณี จันทร์ไทย

นางสาวนันทวัน เอื้อวงศ์

2547 • 64 หน้า

ISBN 974-435-571-9

ราคา 160 บาท

ท่านที่สนใจหนังสือในโครงการผลิตตำรา ติดต่อสั่งซื้อได้ที่... รองศาสตราจารย์รัชชาลัย เรืองประพันธ์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002 โทรศัพท์โทรสาร 04320-2375 E-mail: chatchav@kku.ac.th

