KKU SCIENCE JOURNAL

วารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ปีที่ 39 ฉบับที่ 1 (ม.ค. - มี.ค. 2554) Vol. 39 No. 1 (Jan. - Mar. 2011)

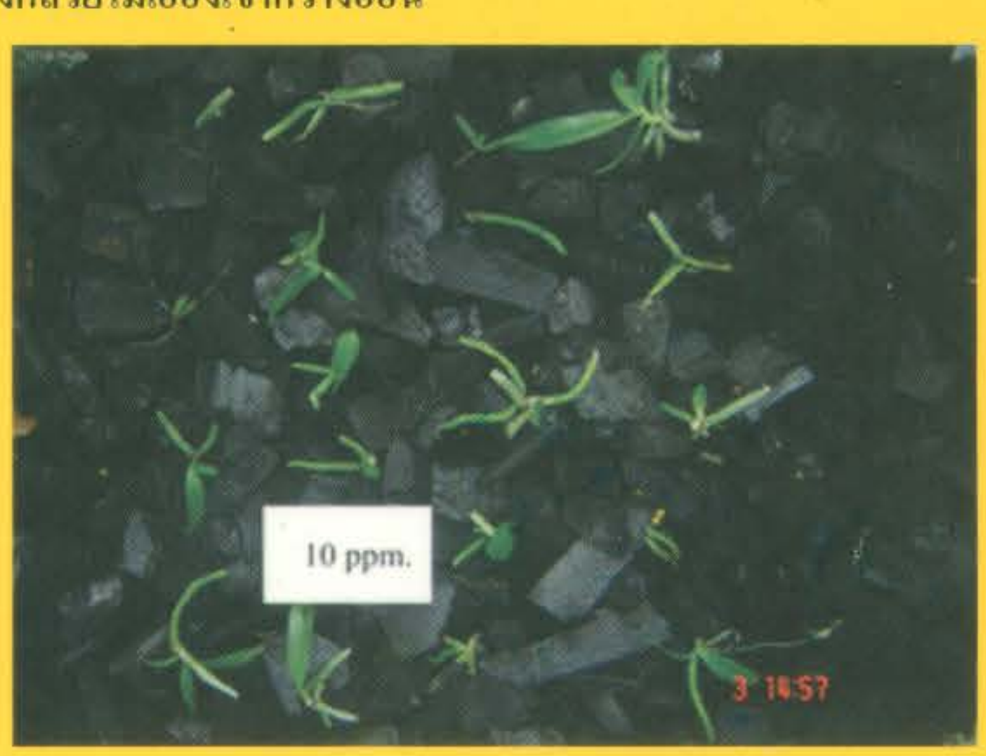
ISSN : 0125-2364

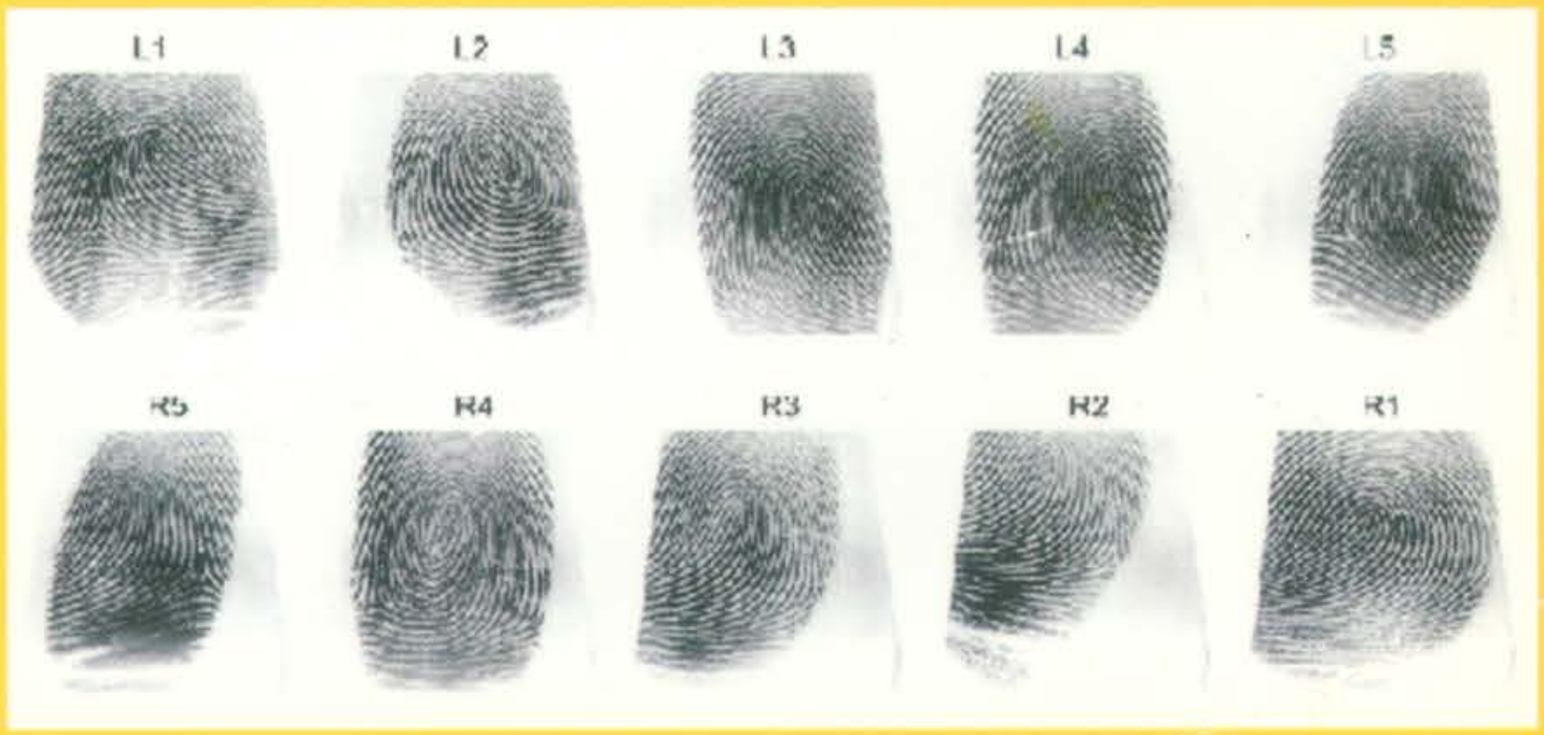
พืชดัดแปลงพันธุกรรมกับการถ่ายฝากสารพันธุกรรมด้วย *Agrobacterium tumefaciens*



การเพาะเลี้ยงกล้วยไม้เอื้องเขากวางอ่อน







การศึกษาเบื้องต้น : ลายนิ้วมือและพหุปัญญา

KKU SCIENCE JOURNAL

วารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ปีที่ 39 ฉบับที่ 1 (ม.ค. - มี.ค. 54) Vol. 39 No. 1 (Jan. - Mar. 2011)

ISSN 0125 - 2364

เจ้าของ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สำนักงาน

คณะวิทยาศาสตร์ ตึก 6 มหาวิทยาลัยขอนแก่น
อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002
โทรศัพท์ 0-4320-2372 โทรสาร 0-4320-2371

วัตถุประสงค์

1. เพื่อส่งเสริมและเผยแพร่วิทยาการในสาขาวิชาต่าง ๆ ทางด้านวิทยาศาสตร์
2. เพื่อเผยแพร่ผลงานทางด้านการวิจัย และการศึกษา ค้นคว้าของอาจารย์และนักศึกษา
3. เพื่อเป็นสื่อกลางการแลกเปลี่ยนความรู้ และแนวความคิดทางวิชาการระหว่างอาจารย์นักศึกษาและผู้สนใจ ทั้งภายในและภายนอกสถาบัน

กำหนดออก ปีละ 4 ฉบับ

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

ที่ปรึกษา

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
(ผศ.ดร.เกียรติ แสงอรุณ)

(รักษาการแทน) บรรณาธิการ

รศ.ดร.ศักดา ดาดวง มหาวิทยาลัยขอนแก่น

กองบรรณาธิการ

ศ.ดร.ม.ร.ว.ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ.ดร.สุพจน์ หารหนองบัว จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศ.ดร.ชิดชนก เหลือสินทรัพย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศ.ดร.ชูกิจ ลิมปิจำนง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ศ.ดร.อารันต์ พัฒโนทัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ.ดร.ชุติมา หาญจวณิช มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ.ดร.ศาสตรา วงศ์ธนวสุ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ.ดร.ศุภลักษณ์ ศรีจารนัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ.ดร.สมเดช กนกเมธากุล มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ.ดร.สุจิตรา ยังมี มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ.กิตติ เอกอำพน มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ.สุพรรณี อึ้งปัญสัตวงศ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ.อำนวย มณีศรีวงศ์กูล มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผศ.ดร.กิตติกร นาคประสิทธิ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผศ.ดร.งามนิจ อาจอินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผศ.ดร.วิไลลักษณ์ ศิริพรอดุลศิลป์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผศ.ดร.ศรีประจักร์ ครองสุข มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ผศ.ดร.อัจฉราภรณ์ ภักดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ดร.กัลยา กองเงิน มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ดร.เกียรติสุดา นาคประสิทธิ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ดร.นงลักษณ์ มีทอง มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ดร.พรพิมล เจียระนัยปรีเปรม มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ดร.พลสัณห์ มหาขันธ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ดร.รินา ภัทรมานนท์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ดร.วิจารณ์ สดศิริ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ฝ่ายศิลป์และภาพ

นายกิเลน ติณนรเศรษฐ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ฝ่ายจัดการและเลขานุการ

นางสาวสุภาพร พิมพ์วาปี มหาวิทยาลัยขอนแก่น
นางสาวพิกุล ราชพลแสน มหาวิทยาลัยขอนแก่น
นางสาวจิราภรณ์ พิมพ์ภูมี มหาวิทยาลัยขอนแก่น
นางสาวจรูญลักษณ์ สุพร มหาวิทยาลัยขอนแก่น
นายศักดิ์สิทธิ์ สุวรรณ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

"ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา"

บทความหรือข้อคิดเห็นใด ๆ ในวารสารนี้เป็นของผู้เขียน ไม่จำเป็นต้องสอดคล้องกับทัศนะของกองบรรณาธิการ

สารบัญ Table of Contents

KKU SCIENCE JOURNAL

วารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ปีที่ 39 ฉบับที่ 1 (ม.ค. - มี.ค. 54) Vol. 39 No. 1 (Jan. - Mar. 2011)

ISSN 0125 - 2364

30 JUN 2011

Stang Mongkolsuk Library
Faculty of Science, Mahidol University

บรรณาธิการแถลง

บทความ

❐ ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและไนโตรจีเนสในการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพของไซยาโนแบคทีเรีย
Factors Influencing Hydrogenase and Nitrogenase Activity in Cyanobacterial Biohydrogen Production
วุฒินันท์ รักษาจิตร์
คมสัน สัจจะสถาพร..... 1

❐ พืชดัดแปลงพันธุกรรมกับการถ่ายฝากสารพันธุกรรมด้วยแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens*
Genetically Modified Plants with *Agrobacterium tumefaciens* : a tool for Plant Transformation
ภพเก้า พุทธรักษ์..... 14

❐ การเตรียมซีรัมด้วยเทคนิคอย่างง่ายเพื่อการค้นพบสารบ่งชี้ทางชีวภาพ
Simple Techniques for Serum Preparations in Biomarkers Discovery
ศิริพร ภัทรกิจกำจร
มนทิรา จะนันท์..... 28

❐ แนวโน้มการใช้ประโยชน์จากอาร์เคียชอบเค็ม
Trend of Usage from Halophilic Archaea
ศิริลักษณ์ นามวงษ์..... 36

สารบัญ Table of Contents

KKU SCIENCE JOURNAL

วารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ปีที่ 39 ฉบับที่ 1 (ม.ค. - มี.ค. 54) Vol. 39 No. 1 (Jan. - Mar. 2011)

ISSN 0125 - 2364

บทความ

❐ พลาสติกชีวภาพสังเคราะห์: ชนิด การสังเคราะห์ และสมบัติของพอลิแลคติกแอซิด
Synthetic Bioplastics: Types, Synthesis and Properties of Poly(lactic acid)s
มังกร ศรีสะอาด
ยอดธง ใบมาก..... 52

❐ ตัวทำความร้อน PTCR-$BaTiO_3$
PTCR-$BaTiO_3$ Heating Element
สุธรรม ศรีหล่มสัก..... 71

งานวิจัย

❐ คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของผลผลิตจากปฏิกิริยาเมลลาร์ดของไคโตแซนและน้ำตาล
Antioxidant Activity of Maillard Reaction Product from Chitosan and Sugar
นพรัตน์ มะเห
ผุสดี มุหะหมัด
อุไรวรรณ วัฒนกุล..... 80

❐ คุณลักษณะและอายุการเก็บรักษาของน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็น
Characterization and Shelf Life of Cold Pressed Organic Jasmine Rice Bran oil
ภัทราภรณ์ แก้วกูล..... 96

สารบัญ Table of Contents

KKU SCIENCE JOURNAL

วารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ปีที่ 39 ฉบับที่ 1 (ม.ค. - มี.ค. 54) Vol. 39 No. 1 (Jan. - Mar. 2011)

ISSN 0125 - 2364

งานวิจัย

❐ ลายนิ้วมือและพหุปัญญา: การศึกษาเบื้องต้น
Fingerprint Pattern and Multiple Intelligence: a Preliminary Study
Somsong Nanakorn
Niyada Honark
Supannee Ungpansattawong
Wichuda Chaisiwamongko
Amnuay Maneesriwongu
Rassame Suwanwerakamtorn
Sarintip Raksasataya
Kusuma Chusilp..... 105

❐ Effect of Chitosan on Growth and Development of *Phalaenopsis cornucervi* (Breda) Blume & Rchb.f.
Somporn Prasertsongskun
Witool Chaipakdee..... 113

❐ การวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์อย่างง่ายในตัวอย่างยาด้วยเทคนิคสเปคโตรโฟโตเมตรีโดยใช้ 8 - ไฮดรอกซีควิโนลีนเป็นรีเอเจนต์ในการทำปฏิกิริยาร่วม
Simple Analytical Method for the Determination of Sulfonamides in Pharmaceutical Preparations by Spectrophotometry Using 8-Hydroxyquinoline as Coupling Reagent
อริศรา จรากร
วิภารัตน์ เชื้อชวด
รัตนา สนั่นเมือง..... 120

สารบัญ Table of Contents

KKU SCIENCE JOURNAL

วารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ปีที่ 39 ฉบับที่ 1 (ม.ค. - มี.ค. 54) Vol. 39 No. 1 (Jan. - Mar. 2011)

ISSN 0125 - 2364

งานวิจัย

❐ การคำนวณปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้ในบรรยากาศของประเทศไทย
Calculation of Precipitable Water Vapor in the Atmosphere of Thailand
สายันต์ โพธิ์เกตุ..... 130

❐ การประยุกต์เทคโนโลยีภูมิสารสนเทศเพื่อศึกษาการถือครองที่ดินเขตพื้นที่ชายแดน: กรณีศึกษาองค์การบริหารส่วนตำบลโนนดินแดง อำเภอโนนดินแดง จังหวัดบุรีรัมย์
An Application of Geoinformation Technology to Study Ownership in Margin Areas : A Case Study in Non Din Deang Sub-district Administrative Organization, Amphoe Non Din Deang, Buriram Province
ครรชิต พิระภาค..... 137

❐ ตัวประมาณอัตราส่วนตัวใหม่ของค่าเฉลี่ยประชากรในการสุ่มตัวอย่างแบบอย่างง่าย
A new Ratio Estimator of a Population in Random Sampling
จันทรา ประเสริฐสกุล
นิภาดา พาภักดี..... 149

KKU SCIENCE JOURNAL
วารสารวิทยาศาสตร์ มข.
ปีที่ 39 ฉบับที่ 1 (ม.ค. - มี.ค. 54) Vol. 39 No. 1 (Jan. - Mar. 2011)
ISSN 0125 - 2364

Publisher

Faculty of Science, Khon Kaen University, Thailand.

Office

Faculty of Science, Building 6, Khon Kaen University. Khon Kaen 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

Advisory Committee

Dean, Faculty of Science, Khon Kaen University
(Assist. Prof. Dr. Kiat Sangaroon)

Act for Editor

Assoc. Prof. Dr. Sakda Daduang — Khon Kaen University

Editorial Board

Prof. Dr. M.R. Jisnuson Svasti	Mahidol University
Prof. Dr. Supot Hannongbua	Chulalongkorn University
Prof. Dr. Chidchanok Lursinsap	Chulalongkorn University
Prof. Dr. Sukit Limpijumnong	Suranaree University of Technology
Prof. Dr. Arun Puttanothai	Khon Kaen University
Assoc. Prof. Dr. Chutima Hanjavanit	Khon Kaen University
Assoc. Prof. Dr. Sartra Wongthanavasu	Khon Kaen University
Assoc. Prof. Dr. Supalax Srijaranai	Khon Kaen University
Assoc. Prof. Dr. Somdej Kanokmedhakul	Khon Kaen University
Assoc. Prof. Dr. Sujitra Youngme	Khon Kaen University
Assoc. Prof. Kitti Akamphon	Khon Kaen University
Assoc. Prof. Supunnee Ungpansattawong	Khon Kaen University
Assoc. Prof. Amnuay Maneesriwongkul	Khon Kaen University
Assist. Prof. Dr. Kittikorn Nakprasit	Khon Kaen University
Assist. Prof. Dr. Ngamnit Art-In	Khon Kaen University
Assist. Prof. Dr. Wilailak Siripornadulsil	Khon Kaen University
Assist. Prof. Dr. Sriprajak Krongsuk	Khon Kaen University
Assist. Prof. Dr. Adcharaporn Pagdee	Khon Kaen University
Dr. Kanlaya Kong-ngern	Khon Kaen University
Dr. Keaitsuda Nakprasit	Khon Kaen University
Dr. Nonglak Meethong	Khon Kaen University
Dr. Pornpimol Jieranaipreeprem	Khon Kaen University
Dr. Polson Mahakhan	Khon Kaen University
Dr. Rina Pattaramanon	Khon Kaen University
Dr. Wijarn Sodsiri	Khon Kaen University

Artists

Mr.Kilen Tinnoraset — Khon Kaen University

Managing Staff and Secretary

Miss Suphaporn Phimwapi	Khon Kaen University
Miss Phikun Ratphonsan	Khon Kaen University
Miss Jiraporn Pimphumee	Khon Kaen University
Miss Jaroonluk Suporn	Khon Kaen University
Mr.Saksit Suwan	Khon Kaen University

" With the Financial Support of the Commission on Higher Education "

The views and opinions expressed in this journal are those of the author(s), and do not necessarily reflect the views and opinions of the editorial board.

บรรณาธิการ แถลง

เรียน **ท่านผู้อ่านที่เคารพรักทุกท่าน**

ขึ้นศักราชใหม่ ก็ขออวยพรให้ท่านโชคดีมีชัยตลอดปี 2554 นี้นะครับ และพร้อมกันนี้ก็ต้องขอขอบคุณ รศ.ดร.สมปอง ธรรมศิริรักษ์ ที่ท่านได้เสียสละอุทิศแรงกายและใจ เป็นบรรณาธิการให้กับวารสารของเราติดต่อกันกว่า 2 ปี ทั้ง ๆ ที่ท่านก็มีภารกิจมากมาย และก็ต้องขอแสดงความยินดีกับ อ.สมปอง ที่ท่านได้รับความไว้วางไว้ให้ดำรงตำแหน่ง ผู้ช่วยอธิการบดีฝ่ายวิจัย ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ก็ขอเอาใจช่วยให้ท่านประสบผลสำเร็จในหน้าที่การงานนะครับ ส่วนตัวผมเอง ก็รักษาการบรรณาธิการไปพลางก่อน จนกว่าจะได้ผู้เสียสละที่จะมาดำรงตำแหน่งบรรณาธิการคนใหม่

สำหรับในเล่มนี้ เราก็ได้บทความและงานวิจัยหลายเรื่อง ล้วนแต่น่าสนใจทั้งสิ้น ซึ่งจะสังเกตได้ว่า งานวิจัยของประเทศเรามีการพัฒนาไปมากในรอบ 4-5 ปีที่ผ่านมา ทำให้เราได้รับความกรุณาจากนักวิจัย ได้บทความที่มีมาตรฐานด้านการวิจัยสูง ส่งเข้าตีพิมพ์ในฉบับของเราอย่างต่อเนื่อง และคาดหมายว่า จะมีงานวิจัยดีๆ มาที่เรา ช่วยให้วารสารของเราออกสู่สายตาของท่านได้สม่ำเสมอ และมีมาตรฐานสูงตามไปกับงานของท่านด้วย

ขอขอบคุณนักวิจัยที่ให้เราได้เป็นเวทีเล็กๆ อันหนึ่งที่ช่วยให้ผู้เขียนได้พบกับผู้อ่าน และขอขอบคุณผู้อ่านที่ท่านให้ความสนใจวารสารและบทความของเรา ความกรุณาของท่านมิอาจลืมเลือนได้ หากท่านได้นำข้อความในวารสารนี้ไปใช้ประโยชน์ และกรุณาอ้างอิงบทความในวารสารของเราเล่มนี้

ขอบคุณครับ และพบกันใหม่ฉบับหน้า

รศ.ดร.ศักดา ดาดวง
รองคณบดีฝ่ายวิจัยและวิเทศสัมพันธ์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รักษาการบรรณาธิการ

ว.วิทย. มข. 39(1) 1-13 (2554) KKU Sci. J.39(1) 1-13 (2011)

KKU SCIENCE JOURNAL

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส และไนโตรจีเนสในการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพของไซยาโนแบคทีเรีย

Factors Influencing Hydrogenase and Nitrogenase Activity in Cyanobacterial Biohydrogen Production

วุฒินันท์ รักษาจิตร์ [1*] *คมสัน สัจจะสถาพร* [1]

บทนำ

วิกฤตการณ์ด้านพลังงานและปัญหาสิ่งแวดล้อมเริ่มส่งผลกระทบโดยตรงต่อวิถีการดำรงชีวิตของมนุษย์ในปัจจุบัน เช่น ปัญหาวิกฤตน้ำมัน ราคาน้ำมันที่มีความผันผวนและพุ่งสูงขึ้นในช่วงเวลาที่ผ่านมา และคาดว่าจะมีราคาสูงขึ้นอีกในอนาคตอันใกล้ ซึ่งเกิดจากความต้องการใช้พลังงานที่มากเกินแหล่งพลังงานหลักของประเทศได้จากการสันดาป (combustion) เชื้อเพลิงฟอสซิลหรือน้ำมันดิบ ส่งผลให้ในปัจจุบันเกิดความขาดแคลนพลังงานฟอสซิลจนอยู่ในขั้นวิกฤต อีกทั้งการสันดาปเชื้อเพลิงฟอสซิลทำให้เกิดก๊าซเรือนกระจก (greenhouse gas) อันได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) มีเทน (CH_4) และไดไนโตรเจนมอนอกไซด์ (N_2O) เป็นต้น ก๊าซดังกล่าวส่งผลต่อการเกิดภาวะโลกร้อน (global warming) โดยตรงตามมา ในปัจจุบันการศึกษาค้นคว้าวิจัยเพื่อเสาะหาแหล่งพลังงานทดแทนในรูปแบบอื่นเข้ามาใช้เพื่อลดการใช้พลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลและช่วยลดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม พลังงานไฮโดรเจน (hydrogen energy) เป็นแหล่งพลังงานทางเลือกอีกรูปแบบหนึ่งที่สามารถนำมาทดแทนได้ ด้วยเหตุผลเชิงบวกหลายอย่าง เช่น ในด้านสิ่งแวดล้อม พลังงานไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงที่สะอาด (clean fuel) เป็นก๊าซที่ไม่มีสีและไม่มีกลิ่น เมื่อถูกเผาไหม้ด้วยออกซิเจนให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อนซึ่งไม่มีก๊าซเรือนกระจกเกิดขึ้นจึงเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Lindblad, 1999) ปัจจุบันมีการใช้พลังงานไฮโดรเจนที่ผลิตขึ้นจากกระบวนการทางเคมีเป็นเชื้อเพลิงในหลายด้าน แต่ต้นทุนการผลิตยังคงสูงอยู่ นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกจึงหันมาสนใจศึกษาพลังงานไฮโดรเจนจากแบคทีเรีย หรือที่เรียกว่า ไฮโดรเจนชีวภาพ (biohydrogen) เนื่องจากเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่ากระบวนการทางเคมี แบคทีเรียที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพ ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรีย แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงและแบคทีเรียชนิดไม่ใช้ออกซิเจน เป็นต้น

[1] ภาควิชาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

* Corresponding Author, E-mail: cvtwnr@ku.ac.th

ไซยาโนแบคทีเรีย หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (cyanobacteria หรือ blue-green algae หรือ cyanophytes) จัดอยู่ในอาณาจักรโปรคาริโอตา (kingdom of prokaryota) ดิวิชันไซยาโนไฟตา (division of cyanophyta) (Oren, 2004) การจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรีย ในระดับของจีนัสและสปีชีส์จะอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Rippka, 1988) โดยพิจารณาจากลักษณะการเจริญเติบโต เป็นเซลล์เดี่ยวรวมกันเป็นกลุ่ม หรือเรียงตัวกันอยู่เป็นเส้นสาย และลักษณะของโคโลนีบนอาหารแข็ง (solid agar) เป็นต้น ไซยาโนแบคทีเรียมีรูปร่าง 2 แบบ คือ (1) เป็นโคโลนีหรือเซลล์เดี่ยวที่ไม่เป็นเส้นสาย (single cell, unicellular or non filamentous form) เช่น *Chroococcus* sp., *Eucapsis* sp., *Merismopedia* sp. และ *Anacystis* sp. เป็นต้น (2) มีรูปร่างเป็นเส้นสาย (filamentous form) เซลล์จะเรียงต่อกันเป็นเส้นสายตรงและเรียบไม่มีการแตกแขนง เช่น *Anabaena* sp., *Lyngbya* sp., *Nostoc* sp. และ *Oscillatoria* sp. เป็นต้น หรือเซลล์บิดเป็นเกลียว เช่น *Spirulina* sp. เป็นต้น โครงสร้างเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย ประกอบด้วยผนังเซลล์ (cell wall) ภายในเซลล์มีไรโบโซม (ribosome) ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส มีไทลาคอยด์ (thylakoid) และมีคลอโรฟิลล์เอ (chlorophyll a) ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง นอกจากนี้ยังมีเม็ดสีพวกแคโรทีนอยด์ (carotenoid) ไฟโคบิลิน (phycobilin) ซึ่งประกอบด้วย ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) และไฟโคอิริทริน (phycoerythrin) (Oren, 2004)

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่อาศัยได้ดี และที่สำคัญไซยาโนแบคทีเรียสามารถนำพลังงานแสงอาทิตย์และคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้เป็นแหล่งพลังงานได้โดยตรงในรูปของน้ำตาลกลูโคสผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงซึ่งเป็นการช่วยลดปริมาณก๊าซเรือนกระจกและเพิ่มปริมาณออกซิเจนได้ ไซยาโนแบคทีเรียนับเป็นผู้ผลิตเบื้องต้น (primary producer) และเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีคุณค่าเช่นเดียวกับพืชชั้นสูง (oxygenic photosynthesis plant) ด้วยคุณสมบัติเชิงบวกหลายด้านของไซยาโนแบคทีเรีย นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกจึงนิยมใช้ไซยาโนแบคทีเรียเป็นต้นแบบในงานวิจัยทางชีวเคมี พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพ บทความนี้กล่าวถึงลักษณะสมบัติของเอนไซม์ 2 กลุ่ม ได้แก่ ไนโตรจีเนส (nitrogenase) และไฮโดรจีเนส (hydrogenase) (Das and Veziroglu, 2001; Tamagnini et al., 2007) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพในไซยาโนแบคทีเรีย รวมทั้งกล่าวถึงปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอกที่มีอิทธิพลโดยตรงต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งสองในการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพด้วย

ไนโตรจีเนส (nitrogenase) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในโครงสร้างเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) ของไซยาโนแบคทีเรียแบบเส้นสาย (filamentous cyanobacteria) ที่เจริญเติบโตในสภาวะที่ขาดไนโตรเจน (nitrogen deficiency) ภายในเฮเทอโรซิสต์ ไซยาโนแบคทีเรียจะตรึงไนโตรเจนในอากาศแล้วเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนียกับไฮโดรเจนโดยใช้พลังงาน ATP (รูปที่ 1) ไนโตรจีเนส ที่พบในไซยาโนแบคทีเรียมีรูปแบบที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบ ซึ่งแบ่งตามชนิดของโลหะที่เป็นองค์ประกอบร่วมในโครงสร้าง ได้แก่ โมลิปดีนัมไนโตรจีเนส (Mo-containing nitrogenase) (Thiel, 1993) วาเนเดียมไนโตรจีเนส (V-containing nitrogenase) (Kentemich et al., 1991) และไอออนไนโตรจีเนส (Fe-containing nitrogenase) (Bishop and Premakumar, 1992) โครงสร้างประกอบด้วยโปรตีน 2 หน่วย คือ ไดไนโตรจีเนสและไดไนโตรจีเนส รีดัคเทส (Flores and Herrero, 1994; Orme-Johnson, 1992)

1. ไดไนโตรจีเนส (dinitrogenase) เป็นเอนไซม์ซึ่งถูกถอดรหัสและแปลรหัสจากยีน *nifD* และ *nifK* ประกอบด้วยโปรตีน 2 หน่วยย่อย คือ โปรตีน NifD และโปรตีน NifK ตามลำดับ โครงสร้างของไดไนโตรจีเนสเป็น heterotetramer (NifD-α 2 หน่วย และ NifK-β 2 หน่วย) มีขนาดโมเลกุลประมาณ 220

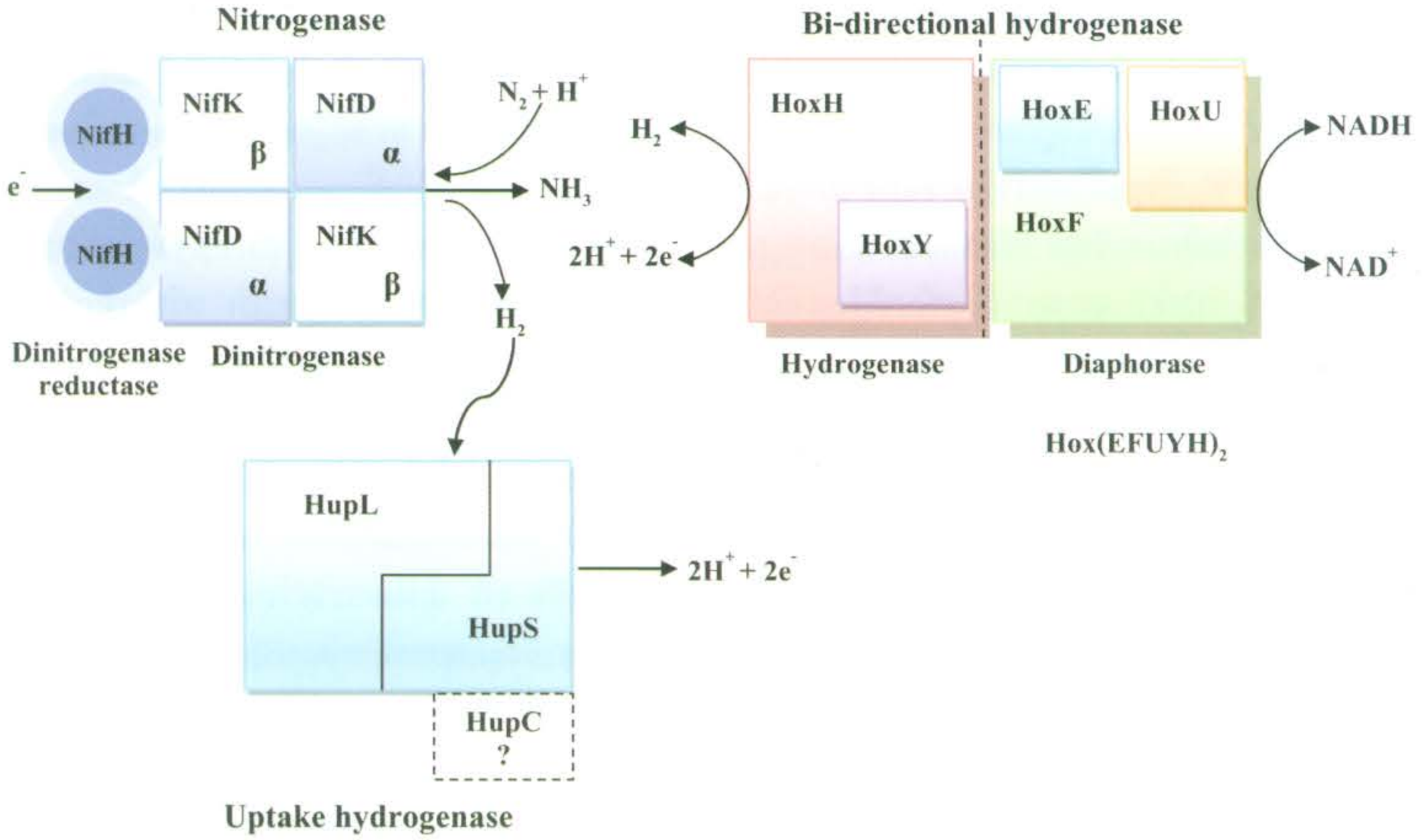
ถึง 240 กิโลดาลตัน (Tamagnini et al., 2007)

2. ไดไนโตรจีเนส รีดักเทส (dinitrogenase reductase) เป็นเอนไซม์ซึ่งถูกถอดรหัสและแปลรหัสจากยีน *nifH* ประกอบด้วยโปรตีน NifH 2 หน่วย โครงสร้างของไดไนโตรจีเนส รีดัคเทสเป็น homodimer มีขนาดโมเลกุลประมาณ 60 ถึง 70 กิโลดาลตัน ไดไนโตรจีเนส รีดัคเทส มีหน้าที่เป็นตัวกลางขนส่งอิเล็กตรอนจาก ferredoxin หรือ flavodoxin ไปให้กับไดไนโตรจีเนส (Masepohl et al., 1997)

ไฮโดรจีเนส (hydrogenase)

1. อัพเทค ไฮโดรจีเนส (uptake hydrogenase) เป็นเอนไซม์ซึ่งถูกถอดรหัสและแปลรหัสจากยีน hupSL(C) ประกอบด้วยโปรตีน 3 หน่วยย่อย คือ โปรตีน HupL ขนาดโมเลกุลประมาณ 60 กิโลดาลตัน โปรตีน HupS ขนาดโมเลกุลประมาณ 35 กิโลดาลตัน และโปรตีน HupC ซึ่งยังไม่ได้รับการยืนยันคุณสมบัติและหน้าที่ (รูปที่ 1) เอนไซม์อัพเทค ไฮโดรจีเนส สามารถพบได้ที่เยื่อไทลาคอยด์ของเฮเทอโรซิสต์ของไซยาโนแบคทีเรียแบบเส้นสาย ได้แก่ *Anabaena* strain PCC 7120, *Nostoc* strain PCC 73102, *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, *Anabaena variabilis* ATCC 29413, *Lyngbya majuscule* CCAP 1446/4 (Happe et al., 2000; Linberg et al., 2000; Leitão et al., 2005) และ *Gloeothece* sp. ATCC 27152 (Oliveira et al., 2004) เป็นต้น เอนไซม์อัพเทค ไฮโดรจีเนส มีหน้าที่รับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลไฮโดรเจนไปส่งให้กับโมเลกุลออกซิเจนของกระบวนการหายใจระดับเซลล์

2. ไบไดเร็คชันนัล ไฮโดรจีเนส (bidirectional hydrogenase) หรือเรียกอีกชื่อว่า รีเวอร์สสิเบิล ไฮโดรจีเนส (reversible hydrogenase) เป็นเอนไซม์ที่พบบริเวณเยื่อไซโตพลาสซึมของเซลล์ แต่กลไกการทำงานที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่ชัด สันนิษฐานว่ามีบทบาทเป็นตัวรับอิเล็กตรอนจาก NADH หรือ H_2 (Boison et al., 1999) (รูปที่ 1) เอนไซม์ไบไดเร็คชันนัล ไฮโดรจีเนส ซึ่งถูกถอดรหัสและแปลรหัสจากยีน *hoxEFUYH* ประกอบด้วยโปรตีนหลัก 2 ส่วนทำงานร่วมกัน (dimeric protein association) (Schmitz et al., 1995; 2002) คือ (1) ส่วนของไฮโดรจีเนส (hydrogenase subunit) ซึ่งถูกถอดรหัสและแปลรหัสจากยีน *hoxYH* ประกอบด้วยโปรตีน 2 หน่วยย่อย คือ โปรตีน HoxH และโปรตีน HoxY ขนาดโมเลกุลประมาณ 49 และ 24 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (2) ส่วนของไดอะโฟเรส (diaphorase subunit) ซึ่งถูกถอดรหัสและแปลรหัสจากยีน *hoxEFU* ประกอบด้วยโปรตีน 3 หน่วยย่อย คือ โปรตีน HoxE, โปรตีน HoxU และโปรตีน HoxF ขนาดโมเลกุลประมาณ 20, 28 และ 61 กิโลดาลตัน ตามลำดับ พบเอนไซม์ไบไดเร็คชันนัล ไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Synechocystis* strain PCC 6803, *Synechococcus* strain 6301, *Anabaena* strain PCC 7120, *Anabaena variabilis* strain ATCC 29413, *Anabaena variabilis* strain IAM M58 (Schmitz et al., 1995; 2002), *Microcystis aeruginosa* (Asada et al., 1987) และ *Spirulina maxima* (Llama et al., 1979) เป็นต้น

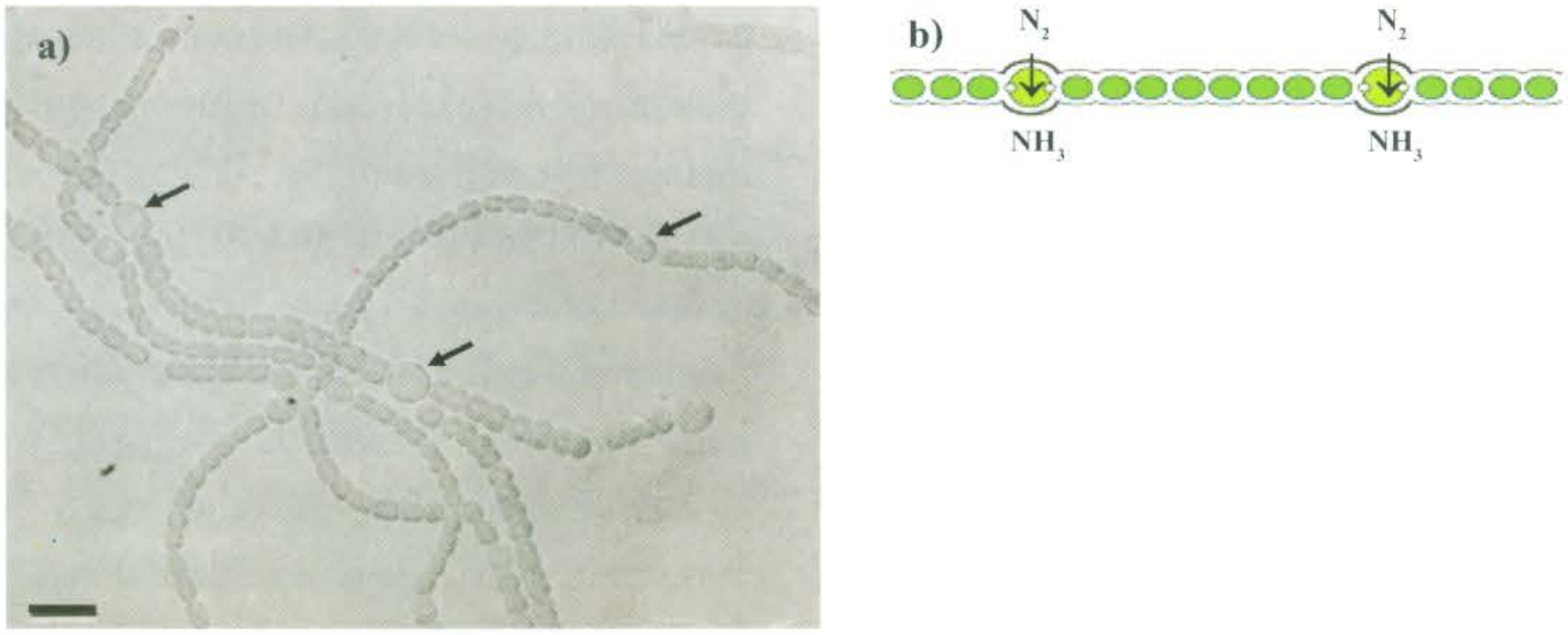


รูปที่ 1 กลไกลการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับไฮโดรเจนเมตาบอลิสมในไซยาโนแบคทีเรีย ประกอบด้วย (1) เอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) ซึ่งพบได้ในโครงสร้างเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) ทำหน้าที่ตรึงโมเลกุลไนโตรเจนและเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนียและโมเลกุลไฮโดรเจน กลไกการทำงานเริ่มจากหน่วยย่อยไดโตรจีเนส รีดัคเทส (NifH) รับอิเล็กตรอนภายนอกจากตัวให้อิเล็กตรอน ferredoxin หรือ flavodoxin แล้วส่งอิเล็กตรอนให้หน่วยย่อยไดไนโตรจีเนส (NifDK) จากนั้นไดไนโตรจีเนสจะรีดิวซ์โมเลกุลไนโตรเจนเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนีย และโมเลกุลไฮโดรเจนซึ่งในกระบวนการต้องใช้พลังงาน ATP (2) เอนไซม์อัพเทค ไฮโดรจีเนส (uptake hydrogenase, HupSL(C)) ซึ่งพบได้ที่เยื่อไทลาคอยด์ของเฮเทอโรซิสต์ ทำหน้าที่ออกซิไดซ์โมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นไฮโดรเจนไอออน (H^+) และอิเล็กตรอน (3) เอนไซม์ไบไดเร็คชันนัล ไฮโดรจีเนส (bidirectional hydrogenase) ซึ่งพบได้บริเวณเยื่อไซโตพลาสซึมของเซลล์ ทำหน้าที่รีดิวซ์ไฮโดรเจนไอออนกลับไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน กลไกการทำงานยังไม่ทราบแน่ชัด สันนิษฐานว่าเป็นการทำงานควบคู่กันของหน่วยย่อยไฮโดรจีเนส (HoxHY) และไดอะโฟเรส (HoxEFU) ในการรับอิเล็กตรอนจาก NADH แล้วส่งอิเล็กตรอนให้กับไฮโดรเจนไอออนเกิดผลิตผลเป็นโมเลกุลไฮโดรเจนและ NAD^+ (Tamagnini et al., 2007)

ไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มที่มีโลหะนิกเกิล (Ni) เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างเช่นเดียวกับเอนไซม์ยูรีเอส (urease) และคาร์บอน มอนอกไซด์ดีไฮโดรจีเนส (carbon monoxide dehydrogenase) (Casalot and Rousset, 2001) กลุ่มเอนไซม์เหล่านี้ต้องการโปรตีนตัวช่วย (auxiliary protein หรือ accessory protein) ในการทำงาน จากการศึกษาคุณลักษณะสมบัติของโปรตีนตัวช่วย พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์มีความคล้ายกันและอนุรักษ์ (homology and conservation) ในกลุ่มแบค เรีย (Lutz et al., 1991) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียมีโปรตีนตัวช่วยร่วมทำงานเช่นกัน คือ กลุ่มโปรตีน Hyp (HypB, HypA, HypE, HypD, HypC และ HypF) ซึ่งถูกถอดรหัสและแปลรหัสจากยีน *hypBAEDCF* (Wünschiers et al., 2003) กลุ่มโปรตีน Hyp พบในไซยาโนแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ อาทิ *Trichodesmium erythraeum* IMS101, *Anabaena* strain PCC 7120 และ *Synechocystis* strain PCC 6803, *Synechococcus* strain 6301, *Nostoc* strain PCC 73102, *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, *Anabaena variabilis* ATCC 29413 และ *Lyngbya majuscule* CCAP 1446/4 (Happe et al., 2000; Linberg et al., 2000; Leitão et al., 2005; Tamagnini et al., 2007)

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพในไซยาโนแบคทีเรีย

ปัจจัยภายใน (Intrinsic factors) อาทิเช่น การควบคุมการทำงานของเอนไซม์ในเมตาบอลิสม และการสังเคราะห์เซลล์พิเศษ เป็นต้น เซลล์มีกลไกในการควบคุมการทำงานของเอนไซม์อัพเทค ไฮโดรโรจีเนสและเอนไซม์ไบไดเร็คชันนัล ไฮโดรจีเนส เพื่อช่วยรักษาสมดุลไฮโดรเจนภายในเซลล์ อาทิ การลดแอคติวิตีของเอนไซม์อัพเทค ไฮโดรจีเนส ควบคู่กับการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ไบไดเร็คชันนัล ไฮโดรจีเนส (Tamagnini et al., 2002) การทำให้ยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์อัพเทค ไฮโรจีเนสเสียหน้าที่ไป (*hup* gene knock-out) ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ (Tamagnini et al., 2002) ไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc muscorum* ที่ไม่มียีน *hupL* นั้นไม่สามารถออกซิไดซ์โมเลกุลไฮโดรเจนได้ (Axelsson et al., 1999) เมื่อระดับการแสดงออกของโปรตีน HupL ของ *Lyngbya majuscule* เพิ่มขึ้น พบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์อัพเทค ไฮโดรจีเนสเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน (Leitão et al., 2005) แอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและไฮโดรจีเนส ถูกยับยั้งด้วยโมเลกุลออกซิเจนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ไซยาโนแบคทีเรียจึงมีกลไกในการปกป้องไม่ให้เอนไซม์สัมผัสกับโมเลกุลออกซิเจนได้โดยตรง อาทิเช่น (1) การสร้างเซลล์พิเศษขึ้นในไซยาโนแบคทีเรียชนิดตรึงไนโตรเจน เรียกว่า เฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) (รูปที่ 2) ช่วยในการตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic condition) เฮเทอโรซิสต์ไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ดังนั้น จึงไม่มีการปลดปล่อยออกซิเจน เอนไซม์ไนโตรจีเนสจึงทำงานได้ปกติ (Lang et al., 1987; Fay, 1992; Adams, 2000) (2) มีการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและไฮโดรจีเนสในช่วงสภาวะที่ไม่มีแสง ความเข้มแสงน้อยหรือที่มืด เพื่อลดโอกาสสัมผัสกับโมเลกุลออกซิเจนที่ถูกผลิตขึ้นขณะสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งกระบวนการนี้จะพบได้ในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างเฮเทอโรซิสต์ (Bergman et al., 1997)



รูปที่ 2 การปรากฏของเฮเทอโรซิสต์ (heterocysts) a) ไซยาโนแบคทีเรียชนิดตรึงไนโตรเจน *Anabaena variabilis* (ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือเฮเทอโรซิสต์) ภาพขยาย 300 เท่า (bar ——; 20 ไมโครเมตร) (Lang et al., 1987) b) แสดงตำแหน่งของเฮเทอโรซิสต์ที่มีการตรึงไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนีย

ปัจจัยภายนอก (Extrinsic factors or environmental factors) ที่มีผลเชิงบวกและเชิงลบต่อการเพิ่มผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย ได้แก่ แสง อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ความเพียงพอของสารอาหาร แร่ธาตุ และปัจจัยอื่นๆ (ตารางที่ 1)

1. แสง ไซยาโนแบคทีเรียใช้แสงเป็นแหล่งพลังงานหลักของเซลล์และแสงเป็นตัวแปรสำคัญที่ควบคุมการแสดงออกของยีนและโปรตีนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง พบว่า เมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้นเป็น 250-300 µmol photons/m^2/sec เซลล์ *Synechocystis* sp. PCC 6803 เพิ่มการแสดงออกของยีน *psbA2*, *psbD2* และ *hypA* (slr1675) มากกว่าสภาวะปกติ (Hihara et al., 2001; Gill et al., 2002) เป็นต้น แม้ว่าไซยาโนแบคทีเรียหลายสายพันธุ์จะเจริญเติบโตได้ดีในช่วงแสงความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร แต่ความต้องการแสงในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพกลับแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ อาทิเช่น ไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina platensis* (Aoyama et al., 1997) และ *Synechococcus* PCC 7942 (Asada and Miyake, 1999) ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ในที่มืด อุณหภูมิประมาณ 32 องศาเซลเซียส และปราศจากออกซิเจน ไซยาโนแบคทีเรียชนิดตรึงไนโตรเจน *Oscillatoria* sp., *Anabaena variabilis* ATCC 29413 และ *Anabaena variabilis* PK84 ผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพได้ดีในที่มีแสงเพียงพอและมีคาร์บอนไดออกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (Stal and Krumbein, 1985; Tsygankov et al., 1999) ขณะที่เซลล์ *Anabaena cylindrica* ผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพได้ในสภาวะที่มีความเข้มแสงน้อยและมีก๊าซอาร์กอนสมบูรณ์ (Jeffries et al., 1978) และเซลล์ *Nostoc muscorum* ผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพได้ทั้งในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง แต่ปริมาณการผลิตในช่วงที่มีแสงมีมากกว่าในช่วงที่ไม่มีแสง (Shah et al., 2003)

2. อุณหภูมิ Dutta et al. (2005) ได้รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพในไซยาโนแบคทีเรียอยู่ในช่วงกว้างระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส ไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc muscorum* ผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Ernst et al., 1979) และมีปริมาณสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 2.5 เท่า (Shah et al., 2003) แอคติวิตีของเอนไซม์ไบไดเร็คชันนัลไฮโดรจีเนส (bidirectional-hox-hydrogenase) ของ *Synechocystis* sp. PCC 6803 เพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิตั้งแต่ 30 องศาเซลเซียส ถึง 60 องศา

เซลเซียส และเอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (Baebprsert et al., 2010) ขณะที่ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena variabilis* SPU 003 ผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Datta et al., 2000) ไซยาโนแบคทีเรีย *Calothrix336/3* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพเพิ่มขึ้น 2 เท่า สูงกว่า *Calothrix336/3* ที่เลี้ยง ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Allahverdiyeva et al., 2010)

3. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* PCC 7120 ที่ pH 7.5 มากกว่าที่ pH 8.2 ขณะที่ไซยาโนแบคทีเรีย *Calothrix* XPORK5E ผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพที่ pH 7.5 มากกว่าที่ pH 6.8 (Allahverdiyeva et al., 2010)

4. แหล่งอาหารคาร์บอน ไซยาโนแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพิ่มการผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพ เช่น ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena variabillis* และ *Anabaena* CH3 (Reddy et al., 1996; Chen et al., 2008) สามารถใช้น้ำตาลฟรักโตสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน *Synechocystis* sp. PCC 6803 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรักโตสและน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพได้ ซึ่งกลูโคสให้ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนมากที่สุด (Baebprasert et al., 2010)

5. แหล่งอาหารไนโตรเจน สารประกอบไนโตรเจนในรูปไนไตรต์ (NO_2^-), ไนเตรต (NO_3^-) และแอมโมเนีย (NH_3) มีผลกระทบต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพในไซยาโนแบคทีเรีย เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนที่เติมเพิ่มลงไปในอาหารจะยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรจีเนส (Rawson, 1985) สารประกอบไนไตรต์ ไนเตรต และแอมโมเนียยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena cylindrica* และ *Anabaena variabilis* SPU 003 ส่งผลให้ระดับการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพลดลง (Lambert et al., 1979; Datta et al., 2000) อย่างไรก็ดีเมื่อลดปริมาณแอมโมเนียมในอาหารเลี้ยงเชื้อลงเป็น 0.10 มิลลิโมลาร์ การผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena cylindrica* กลับไม่ถูกยับยั้ง (Jeffries et al., 1978) ในสภาวะที่มีไนโตรเจนปริมาณจำกัด (nitrogen limitation) พบว่าไซยาโนแบคทีเรีย *Gloeocapsa alpicola* มีการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ ไบไดเร็คชันนัลไฮโดรจีเนส มากขึ้น (Sheremetieva et al., 2002) ในทำนองเดียวกัน พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *hox* และแอคติวิตีของเอนไซม์ ไบไดเร็คชันนัลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 เพิ่มขึ้นในทิศทางเดียวกันในสภาวะที่มีปริมาณไนโตรเจนจำกัด (Antal et al., 2006)

6. แหล่งแร่ธาตุ ธาตุบางชนิดไซยาโนแบคทีเรียต้องการในปริมาณน้อยแต่ขาดไม่ได้ เนื่องด้วยแร่ธาตุเหล่านี้มีบทบาทสำคัญต่อเมตาบอลิสมของเซลล์และมีผลกระทบต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพ อาทิเช่น แร่ธาตุซัลเฟอร์ และเหล็ก (Fe) เป็นองค์ประกอบสำคัญบริเวณแอคทีฟ ไซต์ (active site) ของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ขณะที่ แร่ธาตุนิกเกิล (Ni) และเหล็ก (Fe) เป็นองค์ประกอบสำคัญบริเวณแอคทีฟ ไซต์ (active site) ของเอนไซม์ไบไดเร็คชันนัล ไฮโดรจีเนส (Tamagnini et al., 2002) เป็นต้น ไซยาโนแบคทีเรีย *Arthrospira maxima* ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้มากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณแร่ธาตุนิกเกิลในอาหารเลี้ยง (Carrieri et al., 2008) ขณะที่ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena cylindrica* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงที่มี 5.0 มิลลิกรัมเหล็กต่อลิตร สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 2 เท่าของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena cylindrica* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงที่มี 0.5 มิลลิกรัมเหล็กต่อลิตร (Jeffries et al., 1978) ไซยาโนแบคทีเรีย *Gloeocapsa alpicola* และ *Synechocystis* sp. PCC 6803 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้เช่นกันในสภาวะที่ขาดแร่ธาตุซัลเฟอร์ (sulfur deficiency) ภายใต้สภาวะที่มีก๊าซมีเทน (CH_4) (Antal and Linblad, 2005)

จะเห็นได้ว่า การผลิตไฮโดรเจนชีวภาพของไซยาโนแบคทีเรียนั้นต้องการปัจจัยที่เหมาะสมและเพียงพอต่อการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เพื่อให้ได้มาซึ่งผลผลิตที่เพิ่มขึ้นของไฮโดรเจนชีวภาพ การเลือกสภาวะที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ไม่เพียงแต่ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ ยังมีแบคทีเรียอีกหลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้เช่นกัน อาทิเช่น แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสง *Rhodobacter sphaeroides* ผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้จากการย่อยสลายกรดอินทรีย์ (organic acids) เช่น กรดอะซีติก ภายใต้สภาวะไร้อากาศ และไม่มีแสง (Nath et al., 2005) แบคทีเรียชนิดไม่ใช้ออกซิเจน *Clostridium acetobutylicum* ผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ผ่านกระบวนการหมักภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสง โดยเชื้อแบคทีเรียจะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และโมเลกุลไฮโดรเจนชีวภาพ (Zhanga et al., 2006) แบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนและเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ดีภายใต้กระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ pH เท่ากับ 6.0 (Niu et al., 2010) เป็นต้น กระบวนการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพของไซยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรียมีทั้งข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกันไปตามเงื่อนไขและสภาพแวดล้อม เช่น สิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดต้องการปัจจัยภายนอก อาทิ แหล่งอาหาร ความเข้มแสง อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้น ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและไฮโดรจีเนสในการเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนชีวภาพเหมือนกัน สิ่งที่แตกต่างกัน คือ ไซยาโนแบคทีเรียสามารถนำคาร์บอนไดออกไซด์หรือก๊าซเรือนกระจกมาใช้เป็นแหล่งพลังงานและสามารถผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ ขณะที่แบคทีเรียชนิดไม่ใช้ออกซิเจนผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้แต่กลับให้ผลผลิตเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาด้วยซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณก๊าซเรือนกระจก แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสง สามารถใช้กรดอินทรีย์เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนและเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนชีวภาพได้ ซึ่งต่างจากไซยาโนแบคทีเรียเป็นต้น อย่างไรก็ดี แม้ว่ากระบวนการทางชีวภาพจะเป็นแนวทางที่น่าสนใจและมีประสิทธิภาพ แต่กระบวนการทางชีวภาพยังมีข้อจำกัดอยู่บ้าง คือ อัตราการผลิตไฮโดรเจนยังไม่สูงมากนักเมื่อเทียบกับกระบวนการทางเคมี ดังนั้น การนำเทคโนโลยีทางชีวเคมีและอณูชีวโมเลกุลเข้ามาใช้ปรับปรุงสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรีย คงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มอัตราการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพ

ตารางที่ 1 สภาวะที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพในไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรีย	คำบรรยายลักษณะ	ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้	สภาวะที่ใช้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจน
Cyanothece 7822	Heterocyst	0.92 μmol/mg chl a/h	N_2 with 5% CO_2
Anabaena sp. PCC 7120	Heterocyst	2.60 μmol/mg chl a/h	Air, 60 $\mu E/m^2/s$
Anabaena cylindrica IAMM-1	Heterocyst	2.01 μmol/mg chl a/h	Air, 60 $\mu E/m^2/s$
Anabaena variabilis IAMM-58	Heterocyst	4.20 μmol/mg chl a/h	Air, 60 $\mu E/m^2/s$
Anabaena cylindrica UTEX B 629	Heterocyst	0.91 μmol/mg chl a/h	Air, 60 $\mu E/m^2/s$
Anabaena flos-aquae UTEX 1444	Heterocyst	1.70 μmol/mg chl a/h	Air, 60 $\mu E/m^2/s$
Anabaena flos-aquae UTEX LB 2558	Heterocyst	3.20 μmol/mg chl a/h	Air, 60 $\mu E/m^2/s$
Anabaenopsis circularis IAM M-13	Heterocyst	0.31 μmol/mg chl a/h	Air, 60 $\mu E/m^2/s$
Nostoc muscorum IAM M-14	Heterocyst	0.60 μmol/mg chl a/h	Air, 60 $\mu E/m^2/s$

ตารางที่ 1 (ต่อ) สภาวะที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนชีวภาพในไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรีย	คำบรรยายลักษณะ	ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้	สภาวะที่ใช้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจน
Nostoc linckia IAM M-30	Heterocyst	0.17 μmol/mg chl a/h	Air, 60 $\mu E/m^2/s$
Nostoc commune IAM M-13	Heterocyst	0.25 μmol/mg chl a/h	Air, 60 $\mu E/m^2/s$
Anabaena variabilis PK84	Heterocyst	32.3 μmol/mg chl a/h	Argon environment.
Anabaena variabilis PK84	Heterocyst	167.6 μmol/mg chl a/h	93%Ar, 5%N_2, 2% CO_2, 90 $\mu E/m^2/s$
Anabaena variabilis PK84	Heterocyst	0.11 μmol/mg chl a/h	Air, 2% CO_2, 400 W/m^2
Anabaena variabilis ATCC 29413	Heterocyst	45.16 μmol/mg chl a/h	93%Ar, 5%N_2, 2% CO_2, 90 $\mu E/m^2/s$
Anabaena variabilis ATCC 29413	Heterocyst	0.05 μmol/mg dry wt/h	Ar, 5% CO_2, 5000 lx /Tween 85 (77 mM)
Anabaena variabilis ATCC 29413	Heterocyst	39.40 μmol/mg chl a/h	Argon environment
Anabaena variabilis 1403/4B	Heterocyst	20.0 μmol/mg chl a/h	25 $\mu E/m^2/s$ on top;13 $\mu E/m^2/s$ on bottom of bioreactor
Anabaena azollae	Heterocyst	38.50 μmol/mg chl a/h	Argon environment.
Anabaena variabilis PK17R	Heterocyst	59.18 μmol/mg chl a/h	93%Ar, 5%N_2, 2% CO_2, 90 $\mu E/m^2/s$
Synechococcus PCC 6830	Non-heterocyst	0.26 μmol/mg chl a/h	Ar with CO (13.4 μmol), C_2H_2 (1.34 μmol); darkness
Synechococcus PCC 602	Non-heterocyst	0.66 μmol/mg chl a/h	Ar with CO (13.4 μmol);20–30 $\mu E/m^2/s$
Synechococcus PCC 6307	Non-heterocyst	0.02 μmol/mg chl a/h	Ar (100%), 20–30 $\mu E/m^2/s$
Synechoccus PCC 6301	Non-heterocyst	0.09 μmol/mg chl a/h	Ar with C_2H_2 (1.34 μmol), 20–30 $\mu E/m^2/s$
Microcystis PCC 7820	Non-heterocyst	0.16 μmol/mg chl a/h	Ar with CO (13.4 μmol), C_2H_2 (1.34 μmol), 20–30 $\mu E/m^2/s$
Gloebacter PCC 7421	Non-heterocyst	1.38 μmol/mg chl a/h	Ar with CO (13.4 μmol), C_2H_2 (1.34 μmol), 20–30 $\mu E/m^2/s$
Synechocystis PCC 6308	Non-heterocyst	0.13 μmol/mg chl a/h	Ar with CO (13.4 μmol), C_2H_2 (1.34 μmol), 20–30 $\mu E/m^2/s$
Synechocystis PCC 6714	Non-heterocyst	0.07 μmol/mg chl a/h	Ar with CO (13.4 μmol), 20–30 $\mu E/m^2/s$
Aphanocapsa montana	Non-heterocyst	0.40 μmol/mg chl a/h	Ar (100%), 20-30 $\mu E/m^2/s$
Oscillatoria limosa	Non-heterocyst	0.83 μmol/mg chl a/h	Air, 16h light, 8h dark

ที่มา: Dutta et al., 2005

สรุป

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรีย เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหามลพิษจากก๊าซเรือนกระจกและเป็นการทดแทนการใช้เชื้อเพลิงจากฟอสซิลในการผลิตพลังงานในอนาคต การศึกษาระบบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพในไซยาโนแบคทีเรียจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจและอาจจะเป็นกุญแจสำคัญในการแก้ไขและบรรเทาปัญหาทางด้านวิกฤติพลังงานและปัญหาสภาวะเรือนกระจกต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Adams, D. G. (2000). Heterocyst formation in cyanobacteria. Curr. Opin. Microbiol. 3: 618-624.

Allahverdiyeva, Y., Leino, H., Saari, L., Fewer, D. P., Shunmugam, S., Sivonen, K. and Aro, E. M. (2010). Screening for biohydrogen production by cyanobacteria isolated from the Baltic Sea and Finnish lakes. Int. J. Hydrogen Energy. 35: 1117-1127.

Antal, T. K. and Lindblad, P. (2005). Production of H_2 by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH. J. Appl. Microbiol. 98: 14-120.

Antal, T. K., Oliveira, P. and Lindblad, P. (2006). The bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. Int. J. Hydrogen Energ. 31: 1439-1444.

Aoyama, K., Uemura, I., Miyake, J. and Asada, Y. (1997). Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium, *Spirulina platensis*. J. Ferment. Bioeng. 83: 17-20.

Asada, Y., Kawamura, S. and Ho, K. K. (1987). Hydrogenase from the unicellular cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. Phytochem. 26: 637-640.

Asada, Y. and Miyake, J. (1999). Photobiological hydrogen production. J. Biosci. Bioeng. 88: 1-6.

Axelsson, R., Oxelfelt, F. and Lindblad, P. (1999). Transcriptional regulation of *Nostoc* uptake hydrogenase. FEMS Microbiol. Lett. 170: 77-81.

Baebprasert, W., Lindblad, P. and Incharoensakdi, I. (2010). Response of H_2 production and Hox-hydrogenase activity to external factors in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. Int. J. Hydrogen Energ. 35: 6611-6616.

Bergman, B., Gallon, J. R., Rai, A. N. and Stal, L. J. (1997). N_2 fixation by non-heterocystous cyanobacteria. FEMS Microbiol. Rev. 19: 139-185.

Bishop, P. E. and Premakumar, R. (1992). Alternative nitrogen fixation systems. In Biological nitrogen fixation. Edited by: Stacey G, Burris RH, Evans HJ. New York: Chapman & Hall. 736-762.

Boison, G., Bothe, H., Hansel, A., and Lindblad, P. (1999). Evidence against a common use of the diaphorase subunits by the bidirectional hydrogenase and by the respiratory complex I in cyanobacteria. FEMS Microbiol. Lett. 174: 159-165.

Carrieri, D., Ananyev, G., Costas, A. M. G., Bryant, D. A. and Dismukes G. C. (2008). Renewable hydrogen production by cyanobacteria: Nickel requirements for optimal hydrogenase activity. Int. J. Hydrogen Energ. 33: 2014-2022.

Casalot, L. and Rousset, M. (2001). Muturation of the [NiFe] hydrogenase. Trends Microbiol. 9: 228-237.

Chen, P. C., Fan, S. H., Chiang, C. L. and Lee, C. M. (2008). Effect of growth conditions on the hydrogen production with cyanobacterium *Anabaena* sp. strain CH3. Int. J. Hydrogen Energ. 33: 1460-1464.

Das, D. and Veziroglu, T. N. (2001). Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. Int. J. Hydrogen Energ. 26:13-28.

Datta, M., Nikki, G. and Shah, V. (2000). Cyanobacterial hydrogen production. World J. Microbiol. Biotechnol. 16: 8-9.

Dutta, D., De, D., Chaudhuri, S. and Bhattacharya, S. K. (2005). Hydrogen production by

cyanobacteria. Microb. Cell. Fact. 4: 36-47.

Ernst, A., Kerfin, W., Spiller, H. and Boger, P. (1979). External factors influencing light-induced H_2 evolution by the blue-green algae, *Nostoc muscorum*. Z. Naturforsch. 34: 820-825.

Fay, P. (1992). Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. Microbiol. Rev. 56: 340-373.

Flores, E. and Herrero, A. (1994). Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. In The molecular biology of cyanobacteria Edited by: Bryant, D. A. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 487-517.

Gill, R. T., E. Katsoulakis, W. Schmitt, G. Taroncher-Oldenburg, J. Misra, and G. Stephanopoulos. (2002). Genome-wide dynamic transcriptional profiling of the light-to-dark transition in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. J. Bacteriol. 184: 3671-3681.

Happe, T., Schütz, K. and Böhme, H. (2000). Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. J. Bacteriol. 182: 1624-1631.

Hihara, Y., Kamei, A., Kanehisa, M., Kaplan, A., and Ikeuchi, M. (2001). DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. Plant Cell. 13: 793-806.

Jeffries, T. W., Timourien, H. and Ward, R. L. (1978). Hydrogen production by *Anabaena cylindrica*: effect of varying ammonium and ferric ions, pH and light. Appl. Environ. Microbiol. 35: 704-710.

Kentemich, T., Haverkamp, G. and Bothe, H. (1991). The expression of a third nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. Z. Naturforsch. 46: 217-222.

Lambert, G. R., Daday, A. and Smith, G. D. (1979). Hydrogen evolution from immobilized cultures of cyanobacterium *Anabena cylindrica*. FEBS Lett. 101: 125-128.

Lang, N. J., Krupp, J. M. and Koller, A. L. (1987). Morphological and ultrastructural changes in vegetative cells and heterocysts of *Anabaena variabilis* grown with fructose. J. Bacteriol. 169: 920-923.

Leitão, E., Oxelfelt, F., Oliveira, P., Moradas-Ferreira, P. and Tamagnini, P. (2005). Analysis of the *hupSL* operon of the nonheterocystous cyanobacterium *Lyngbya majuscula* CCAP 1446/4: regulation of transcription and expression under a light-dark regime. Appl. Environ. Microbiol. 71: 4567-4576.

Lindberg, P., Hansel, A. and Lindblad, P. (2000). hupS and hupL constitute a transcription unit in the cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 73102. Arch. Microbiol. 174: 129-133.

Lindblad, P. (1999). Cyanobacterial H_2 metabolism: knowledge and potential/strategies for a photobiotechnological production of H_2. Biotecnol. Apl. 16: 141-144.

Llama, M. J., Serra, J. L., Rao, K. K. and Hall, D. O. (1979). Isolation and characterization of the hydrogenase activity from the non-heterocystous cyanobacterium *Spirulina maxima*. FEBS Lett. 98: 342-346.

Lutz, S., Jacobi, A., Schlensog, V., Böhm, R., Sawers, G. and Böck, A. (1991). Molecular characterization of an operon (hyp)

necessary for the activity of the three hydrogenases isoenzymes in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 5: 123-135.

Masepohl, B., Schoelisch, K., Goerlitz, K., Kutzki, C. and Bhme, H. (1997). The heterocyst-specific *fdxH* gene product of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 is important but not essential for nitrogen fixation. Mol. Gen. Genet. 253: 770-776.

Nath, K., Kumar, A. and Das, D. (2005). Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* strain O.U.001 using spent media of *Enterobacter cloacae* strain DM11. Appl. Microbiol. Biotechnol. 68: 533-541.

Niu, K., Zhang, X., Tan, W. S. and Zhu, M. L. (2010). Characteristics of fermentative hydrogen production with *Klebsiella pneumoniae* ECU-15 isolated from anaerobic sewage sludge. Int. J. Hydrogen Energ. 35: 71-80.

Oliveira, P., Leitão, E., Tamagnini, P., Moradas-Ferreira, P. and Oxelfelt, F. (2004). Characterization and transcriptional analysis of *hupSLW* in Gloeothece sp. ATCC 27152: an uptake hydrogenase from a unicellular cyanobacterium. Microbiol. 150: 3647-3655.

Oren, A. (2004). A proposal for further integration of the cyanobacteria under the bacteriological code. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1895-1902.

Orme-Johnson, W. H. (1992). Nitrogenase structure: where to now? Science. 257: 1639-1640.

Rawson, D. M. (1985). The effects of exogenous aminoacids on growth and nitrogenase activity in the cyanobacterium *Anabena cylindrica* PCC 7122. J. Gen. Microbiol. 134: 2549-2544.

Reddy, P.M., Spiller, H., Albrecht, S.L. and Shanmugam, K.T. (1996). Photodissimilation of fructose to H_2 and CO_2 by a dinitrogen-fixing cyanobacterium, *Anabaena variabilis*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1220-1226.

Rippka, R. (1988). Recognition and identification of cyanobacteria. Meth. Enzymol. 167: 28-67.

Schmitz, O., Boison, G., Hilscher, R., Hundeshagen, B., Zimmer, W., Lottspeich, F. and Bothe, H. (1995). Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria. Eur. J. Biochem. 233: 266-276.

Schmitz, O., Boison, G., Salzmann, H., Bothe, H., Schütz, K., Wang, S. and Happe, T. (2002). HoxE-a subunit specific for the pentameric bidirectional hydrogenase complex (HoxEFUYH) of cyanobacteria. Biochim. Biophys. Acta. 1554: 66-74.

Shah, V., Garg, N. and Madamwar, D. (2003). Ultrastructure of the cyanobacterium *Nostoc muscorum* and exploitation of the culture for hydrogen production. Folia. Microbiol. 48: 65-70.

Sheremetieva, M. E., Troshina, O. Y., Serebryakova, L. T., and Lindblad, P. (2002). Identification of *hox* genes and analysis of their transcription in the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 growing under nitrate-limiting conditions. FEMS. Microbiol. Lett. 214: 229-233.

Stal, L. J., Krumbein, W. E. (1985). Oxygen protection of nitrogenase the aerobically nitrogen fixing, non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. Arch. Microbiol. 143: 72-76.

Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wünschiers, R. and Lindblad, P. (2002). Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66: 1-20.

Tamagnini, P., Leitao, E. Oliveira, P., Ferreira, D., Pinto, F., Harris D. J., Heidon, T. and Linblad, P. (2007). Cyanobacterial hydrogenase: diversity, regulation and applications. FEMS Microbiol. Rev. 31: 692-720.

Thiel, T. (1993). Characterization of genes for an alternative nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. J. Bacteriol. 175: 6276-6286.

Tsygankov, A. A., Borodin, V. B., Rao, K. K. and Hall, D. O. (1999). H_2 photoproduction by batch culture of *Anabaena variabilis* ATCC 29413 and its mutant PK84 in a photobioreactor. Biotechnol. Bioeng. 64: 709-715.

Wünschiers, R., Batur, M. and Lindblad, P. (2003). Presence and expression of hydrogenase specific C-terminal endopeptidases in cyanobacteria. BMC Microbiol. 3: 8-20.

Zhanga, H., Brunsb, M. A., Logana, B. E. (2006). Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. Water Res. 40: 728-734.

❑❑❑❑❑

ว.วิทย. มข. 39(1) 14-27 (2554) KKU Sci. J.39(1) 14-27 (2011)

KKU SCIENCE JOURNAL

พืชดัดแปลงพันธุกรรมกับการถ่ายฝากสารพันธุกรรม ด้วยแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens*

Genetically Modified Plants with *Agrobacterium tumefaciens* : a tool for Plant Transformation

ภพเก้า พุทธรักษ์ [1]

บทนำ

การศึกษาสารพันธุกรรมทางด้านโครงสร้าง การทำงาน และการแสดงออกของยีนในพืชได้มีมาเป็นเวลานานแล้ว และในปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมมาประยุกต์ใช้ดัดแปลงพันธุกรรมพืช และได้มีการพัฒนาและนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ถูกนำมาประยุกต์ใช้และประสบความสำเร็จอย่างมากในหลายด้าน เช่น การชะลอการสุกของมะเขือเทศ เพื่อให้สามารถเก็บรักษาได้ในระยะเวลานาน การสร้างพืชที่มีคุณค่าทางอาหารทำให้ได้ธัญพืชที่ให้ผลผลิตที่มีวิตามินเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความต้านทานต่อโรคและแมลง เช่น การผลิตมะละกอที่ทนต่อโรคไวรัสวงแหวน หรือผลิตต้นฝ้ายที่ทนทานต่อแมลง ปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีปริมาณสารที่ต้องการสารใดสารหนึ่งออกมา เป็นต้น ในการสร้างพืชดัดแปลงพันธุ์จำเป็นที่จะต้องอาศัยเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรม ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถดัดแปลงพันธุ์พืชให้มีคุณสมบัติตามที่ต้องการได้ และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการเกษตร เช่น ปรับปรุงพันธุ์ และคัดเลือกพันธุ์ เป็นต้น ในการปรับปรุงพันธุ์พืชวิธีการดั้งเดิมนั้นจะต้องใช้เวลานาน ใช้แรงงานมาก ใช้พื้นที่ในการทดลองจำนวนมาก การปรับปรุงพันธุ์โดยการใช้เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมมีข้อดีกว่าการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบดั้งเดิม คือ สามารถส่งถ่ายยีน (gene) ที่ต้องการให้กับพืชแต่ละชนิดได้โดยตรงในระดับพันธุกรรม โดยไม่ต้องกังวลถึงข้อจำกัดของสภาพที่เข้ากันไม่ได้ (incompatibility) จากการผสมข้ามชนิด (species) ต่างสกุล (genus) หรือต่างวงศ์ (family) นอกจากนั้นยังเลือกใส่เฉพาะยีนที่ต้องการโดยตรง ซึ่งถือว่าเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการยกระดับผลผลิตและคุณภาพของผลผลิตให้สูงขึ้น (นเรศ ดำรงชัย, 2543) แต่การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยอาศัยเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมนั้นต้องอาศัยการส่งถ่ายยีนเพื่อสร้างพืชดัดแปลงพันธุ์ (transgenic plant) ซึ่งมีหลายวิธีทั้งการถ่ายยีนโดยตรง (direct gene transfer) ตัวอย่างเช่น การใช้กระแสไฟฟ้าแรงสูง (electroporation) เพื่อ

1 สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จ.พะเยา 56000

E mail: su_buddha@hotmail.com

ชักนำให้ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์พืช (Chaudhury et al., 1995) การใช้สารเคมีโพลีเอทีลีนไกลคอล (polyethylene glycol หรือ PEG) (Weissinger, 1992) การใช้เข็มฉีด (microinjection) (อารีย์ วรัญญูวัฒนก์, 2541) การใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle gun bombardment หรือ microprojectile bombardment) (Gordon-Kamm et al., 1990) การใช้เทคนิคไอออนบีม (ion beam) ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืช (Yu et al., 1993) รวมถึงสามารถนำเทคนิคไอออนบีมพลังงานต่ำมาใช้ในการส่งถ่ายพลาสมิด ดี เอ็น เอ (plasmid DNA) เข้าสู่แบคทีเรีย (Anuntalabhochai et al., 2001) และการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยอาศัยแบคทีเรียเป็นพาหะ ได้แก่ *Agrobacterium* (*agrobacterium* - mediated gene transfer) (Weising and Kahl, 1996) เป็นต้น

การศึกษาการส่งถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรีย Agrobacterium มีรายงานว่าแบคทีเรียดังกล่าว เป็นแบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดปุ่มปมได้ในพืชหลายชนิด ซึ่งการส่งถ่ายโดยวิธีนี้ประสบความสำเร็จในพืชที่ใช้บริโภคเป็นอาหาร รวมทั้งไม้ดอกไม้ประดับที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจหลายชนิด และยังมีรายงานความสำเร็จอื่นๆ อีกอย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตามยังมีข้อสงสัยว่าเทคนิคการส่งถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium* สามารถส่งถ่ายยีนประสบความสำเร็จเฉพาะในพืชใบเลี้ยงคู่เท่านั้นหรือไม่ ดังนั้น ในบทความนี้จะนำเสนอรายงานการวิจัยและความสำเร็จของการดัดแปลงหรือปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* ซึ่งจะสามารถตอบข้อสงสัยดังกล่าวได้

ประวัติแนวความคิด และการทดลองเกี่ยวกับสารพันธุกรรม

ในช่วงเริ่มต้นประวัติของการศึกษาและแนวคิดเกี่ยวกับสารพันธุกรรม พบว่า ในปี ค.ศ.1944 ออสวาลด์ แอเวอรี (Oswald Avery) คอลิน แมกเลียด (Colin Macleod) และ แมคลิน แมกคาร์ที (Maclyn Macarty) ได้ศึกษาพบว่า เมื่อแยกดีเอ็นเอออกจากสายพันธุ์ S (smooth colony) ไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสายพันธุ์ R (rough colony) เจริญอยู่ สายพันธุ์ R จะถูกเปลี่ยนไปเป็นสายพันธุ์ S ได้ จึงสรุปว่าเกิดกระบวนการแปลงพันธุ์ หรือ ทรานสฟอร์มเมชั่น (transformation) ขึ้นในแบคทีเรียที่ทำการศึกษา

ปี ค.ศ.1946 โจฌาลีเดอร์เบิร์ก (Joshva Lederberg) และเอควอร์ด ทาทัม (Edward Tatum) ค้นพบการแลกเปลี่ยนยีนในแบคทีเรีย ขณะที่ทำการผสมสายพันธุ์ของ *Escherichia coli* กับสายพันธุ์อื่นๆ พวกเขาสังเกตการผสมระหว่างสายพันธุ์ของพ่อแม่ที่แตกต่างกัน และไม่เหมือนกับการแปลงพันธุ์ ซึ่งต้องการดีเอ็นเอจากแบคทีเรียถ่ายทอดไปยังอีกแบคทีเรียหนึ่ง โดยตอนหลังพบว่าเป็นการถ่ายโอนดีเอ็นเอในรูปของพลาสมิด (plasmid) เรียกว่า การจับคู่หรือคอนจูเกชั่น (conjugation)

ต่อมาในปี ค.ศ. 1952 อัลเฟรด เฮอร์เฌย์ (Alfred Hershey) และมาร์ทา เชซ (Martha Chase) ได้มีการพิสูจน์เพิ่มเติมว่าดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมอย่างแน่นอน โดยทดลองกับฟาจ T (phage T) ของ *E. coli* หลังจากนั้นในปี ค.ศ. 1953 นอร์ตัน ซินเดอร์ (Norton Zinder) และโจฌาลีเดอร์เบิร์ก (Joshva Lederberg) พบกลไกการถ่ายโอนยีนระหว่างแบคทีเรียโดยฟาจของ *Salmonella typhimurium* สามารถนำดีเอ็นเอจากแบคทีเรียหนึ่งไปยังแบคทีเรียหนึ่งได้ การถ่ายโอนแบบนี้ต้องอาศัยฟาจเป็นตัวกลาง ซึ่งวิธีการนี้เรียกว่าการถ่ายโอนยีนหรือทรานสดักชั่น (transduction)

ปี ค.ศ.1953 เจมส์ วอตสัน (Jams Watson) และฟรานซิสคริก (Francis Crick) ได้เสนอโครงสร้างของ ดีเอ็นเอ (DNA) และกลไกการถ่ายแบบดีเอ็นเอเป็นแบบกึ่งอนุรักษ์ (semiconservative mechanism) ทำให้เข้าใจถึงโครงสร้างของดีเอ็นเอเป็นอย่างดี

ปี ค.ศ.1958 แมททิว เมสเชลสัน (Matthew Meselson) และแฟรงคลิน สตาห์ล (Franklin Stahl) ศึกษาการถ่ายแบบดีเอ็นเอในแบคทีเรีย และยืนยันว่ากลไกการถ่ายแบบดีเอ็นเอเป็นแบบกึ่งอนุรักษ์

ปี ค.ศ.1961 ซีดนีย์ เบรนเนอร์ (Sydney Brenner) ฟรองซัว จาคอบ (Franklin Jacope) ศึกษาการถ่ายแบบดีเอ็นเอในแบคทีเรียและยืนยันว่ากลไกการถ่ายแบบดีเอ็นเอเป็นแบบกึ่งอนุรักษ์

ปี ค.ศ.1964 ยานอฟสกี (Yanofsky) และคณะและเบรนเนอร์ (Brenner) ได้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างยีนและพอลิเปปไทด์

ปี ค.ศ.1983 บาร์บารา แมคคลินทอก (Barbara Mcclintock) ได้รับรางวัลโนเบลจากการค้นพบว่าสารพันธุกรรมหรือยีนบางตัวสามารถเคลื่อนย้ายตำแหน่งบนโครโมโซมได้

ปี ค.ศ.1958 เริ่มมีการค้นพบวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่าพอลิเมอเรสเชนรีแอกชัน (polymerase chain reaction) หรือเรียกสั้น ๆ ว่า PCR ต่อมาประเทศสหรัฐอเมริกาได้ริเริ่มโครงการจีโนมมนุษย์ (The Human Genome Project) เรียกย่อๆ ว่า HGP เพื่อหาว่าดีเอ็นเอทั้ง 46 โครโมโซมของมนุษย์มีลำดับเบสเป็นอย่างไร โครงการนี้เริ่มตั้งแต่ ค.ศ. 1990 โดยมีกำหนดเสร็จสิ้นโครงการนี้ ค.ศ. 2005 นี้รวมระยะเวลาทั้งสิ้น 15 ปี ปัจจุบันโครงการได้ดำเนินการใกล้เสร็จสมบูรณ์แล้วได้มีการประกาศความสำเร็จในเบื้องต้นเมื่อ ค.ศ. 2000 ความสำเร็จเป็นการอ่านรหัสพันธุกรรมมนุษย์ (สมพร ประเสริฐส่งสกุล, 2546)

สารพันธุกรรมคืออะไร

สารพันธุกรรม คือ สารชีวโมเลกุล (biomolecules) ที่ทำหน้าที่เก็บข้อมูลรหัสพันธุกรรมสำหรับการทำงานของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เอาไว้ สารชีวโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นสารพันธุกรรมในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ซึ่งพบได้จากนิวเคลียสของเซลล์ เรียกรวมว่า กรดนิวคลีอิค (nucleic acid) โดยคุณสมบัติทางเคมีแบ่งกรดนิวคลีอิคออกได้เป็น 2 ชนิดย่อย คือ อาร์เอ็นเอ (RNA) และดีเอ็นเอ สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอ ยกเว้นไวรัสบางชนิดเป็นอาร์เอ็นเอ (ไวรัสส่วนมาก มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอ) รหัสบนสารพันธุกรรมหากมีการถอดรหัส (transcription) ออกมาได้ เรียกรหัสส่วนนั้นว่ายีน (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2548)

โครงสร้างของสารพันธุกรรม

กรดนิวคลีอิก หรือสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ทำหน้าที่เป็นยีนและช่วยในการแสดงออกของยีน ประกอบด้วยเบส น้ำตาล และหมู่ฟอสเฟต เรียกว่า กรดนิวคลีอิค กรดนิวคลีอิกแบ่งออกเป็นสองประเภท ซึ่งแตกต่างกันที่น้ำตาล กรดนิวคลีอิกที่มีน้ำตาลไรโบส (D-ribose) เป็นส่วนประกอบเรียกว่า กรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid) หรือเรียกย่อๆ ว่า อาร์เอ็นเอ พวกที่ประกอบด้วยน้ำตาลดีออกซีไรโบส (2' D-deoxyribose) เรียกว่า กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid) หรือดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอมีอยู่ในนิวเคลียส (nucleus) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และคลอโรพลาสท์ (chloroplast) ทำหน้าที่เป็นสารพันธุกรรม (genetic material) หรือยีนโดยทั่วไป อาร์เอ็นเอนั้นมีอยู่ในส่วนของเซลล์ที่มีดีเอ็นเอ และยังพบมากในไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ด้วย อาร์เอ็นเอมักทำหน้าที่ช่วยการแสดงออกของยีน นอกจากนี้ยังมีอาร์เอ็นเอที่เป็นสารพันธุกรรมของไวรัสและฟาจ (phage) เบสที่พบในธรรมชาติมีอยู่ 2 พวก พวกแรก ได้แก่ พวกพิริมิดีน (pyrimidine) ซึ่งมีอนุพันธ์สามตัวที่พบมาก คือ ไซโตซีน (cytocine) ยูราซิล (uracil) และไธมีน (thymine) ส่วนพวกที่สองได้แก่ เพียวรีน (purine) มีอนุพันธ์สองตัวที่พบบ่อย คือ อะดินีน (adenine) และกวานีน (guanine) เบสเหล่านี้เป็นสารประกอบไนโตรเจนประเภทอาโรมาติค (aromatic) สามารถดูดแสงอัลตราไวโอเลทที่ความยาวคลื่น 200 - 280 นาโนเมตร (ภิญโญ พานิชพันธ์, 2543) อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างทางพันธุกรรมสามารถนำไปสู่การแตกแขนงเป็นชนิดพันธุ์ใหม่เพิ่มขึ้นได้ หรือที่เรียกว่า การกลายพันธุ์ (mutation) การกลายพันธุ์ เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นในระดับยีน ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตเปลี่ยนแปลงลักษณะพันธุกรรมไปจากรุ่นพ่อรุ่นแม่ การเกิดการกลายพันธุ์ทำให้รหัส

พันธุกรรมในโครโมโซมมีความหลากหลายและมีการปรับเปลี่ยน ส่งผลถึงลักษณะที่แสดงออกมา ซึ่งจะแตกต่างจากลักษณะเดิมเกิดความแตกต่างของพันธุกรรม และเมื่อมีการถ่ายทอดพันธุกรรมชุดใหม่ออกไปโดยผ่านกระบวนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ผ่านการคัดเลือกของธรรมชาติแล้วสิ่งมีชีวิตที่มีชุดพันธุกรรมใหม่จะกลายเป็นสิ่งมีชีวิตสายพันธุ์ใหม่ (new species) นำไปสู่ความหลากหลายทางชีวภาพต่อไป

หน้าที่ของสารพันธุกรรม

การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมในช่วงแรกๆ แม้จะมีการเข้าใจน้อยมากเกี่ยวกับธรรมชาติของยีนในระดับโมเลกุล แต่อย่างน้อยก็พบว่า สารพันธุกรรมไม่ว่าจะเป็นสารเคมีประเภทไหนจะต้องมีหน้าที่ 3 ประการ

1. ทำหน้าที่เก็บและถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมอย่างถูกต้องจากรุ่นพ่อแม่ไปยังลูกหลานและต่อๆ ไป

2. ควบคุมพัฒนาการของลักษณะต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต คือ เป็นตัวกำหนดกระบวนการเจริญและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะของเซลล์และเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตจากไซโกท (zygote) จนเป็นสิ่งมีชีวิตตัวเต็มวัย

3. ต้องสามารถเปลี่ยนแปลงหรือที่เรียกว่าเกิดการกลายพันธุ์ได้ เพื่อที่สิ่งมีชีวิตจะสามารถปรับตัวให้อยู่รอดได้เมื่อสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนไป เพราะถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงก็ไม่มีวิวัฒนาการเกิดขึ้น (หัทยา กาวีวงศ์, 2548)

หลักการส่งถ่ายยีนโดยอาศัยแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium เป็นแบคทีเรียแกรมลบซึ่งอาศัยอยู่ในดิน สามารถบุกรุก (infection) เข้าสู่ต้นพืชได้บริเวณที่มีบาดแผล ทำให้เกิดปุ่มปม (tumour) หรือก้อนเนื้อตรงจุดนั้น เรียกว่า crown gall disease (Weising and Kahl, 1996) เมื่อนำเนื้อเยื่อบริเวณที่เป็นปุ่มปมนั้นมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ จะสามารถคงสภาพเช่นเดิมอยู่ได้ คือ เจริญเติบโตได้เร็วและโตได้ไม่จำกัดในสภาพแคลลัส (callus) โดยไม่ต้องใส่ฮอร์โมนพืชหรือสารเร่งการเจริญเติบโตชนิดใด แม้ว่าจะกำจัดแบคทีเรียออกไปแล้วก็ตาม แต่จะไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ กลไกที่ทำให้เกิดสภาพเช่นนี้ พบว่ามีสาเหตุมาจากพลาสมิดขนาดใหญ่ประมาณ 140 - 235 กิโลเบสที่พบใน *Agrobacterium* จึงเรียกพลาสมิดนี้ว่าพลาสมิด Ti (tumour inducing plasmid) (อารีย์ วรัญญูวัฒนก์, 2541) เชื้อ *Agrobacterium* อีกชนิดหนึ่งทำให้เกิดราก ณ บริเวณที่มีการบุกรุก (infection) ของแบคมีเรีย คือ *A. rhizogenes* ซึ่งมีพลาสมิด Ri (root inducing plasmid) เนื้อเยื่อปุ่มปมที่เกิดจากการบุกรุกของ *A. tumefaciens* จะมี ดีเอ็นเอบางส่วนของพลาสมิด Ti ขนาดประมาณ 20 กิโลเบส ถูกส่งถ่ายเข้าไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของพืชที่บุกรุก เรียกดีเอ็นเอที่ถูกส่งถ่ายนี้ว่า T-DNA (transferred DNA) พลาสมิด Ti ที่พบมาก ได้แก่ ชนิด octopine และ nopaline เป็นต้น และจะประกอบด้วยส่วนต่างๆ ที่มีส่วนของ virulence (*vir*) gene ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการส่งถ่าย T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช โดยยีน *virA* ทำหน้าที่เป็นตัวจดจำ สาร phenolic compound ที่พืชผลิตขึ้น จากนั้นยีน *virA* จะสร้าง effector เพื่อกระตุ้นการเปิด *virG* operon โดยสร้าง receiver-effector ที่อยู่ในสภาพ inactive เมื่อมี effector จากนั้น *virA* เข้าเกาะก็จะเปลี่ยนเป็นสภาพ active แล้วเข้าไปเกาะกับ operator ของ *vir* ยีนต่างๆ เพื่อเปิด operon โดย *virD1* และ *virD2* operon ถูกเปิดเพื่อสร้าง endronucleolytic cleavage ซึ่งมีตำแหน่งจดจำอยู่ที่เบสตำแหน่งที่ 3 และ 4 ของสายล่างของดีเอ็นของ T-DNA ที่ตำแหน่ง LB และ RB โดยจะตัดพันธะ phosphodiester bond (nick) ทำให้เกิด T-DNA สายเดี่ยวหลุดออกมา (ในเวลาเดียวกัน ก็มีการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ขึ้นมาทดแทนสายที่ขาดหายไป) *virC* หน้าที่ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าเกี่ยวของกับกระบวนการ T-DNA processing (กระบวนการตัดและต่อชิ้นดีเอ็นเอ) โดย *virC* ทำหน้าที่

ผลิตโปรตีนแล้วเข้าเกาะกับบริเวณ enhancer ที่อยู่ใกล้กับ RB จากนั้น *virE* ทำหน้าที่สร้างโปรตีน (single strand DNA binding protein) เพื่อเข้าเกาะกับ T-DNA สายเดี่ยวที่ถูกตัดออกมา ทำให้ T-DNA สายเดี่ยวนั้นมีความมั่นคงในระหว่างการส่งถ่ายยีน *virB* ทำหน้าที่สร้างโปรตีนแล้วเข้าไปเกาะกับเยื่อหุ้มเมมเบรนของพืช ทำให้เกิดรู เพื่อส่งถ่าย T-DNA เข้าสู่เซลล์พืช (virE ทำหน้าทีคล้ายกับ *tra* gene) integration of T-strand in plant cell DNA ปลาย 3' OH ของ single strand T-DNA จะเข้าไป synapsis กับส่วนของ small homologies ของ plant cell DNA เกิดจุดแตกหักบนสายหนึ่งของ plant cell DNA (สายล่าง) ปลาย 5' P ของ single strand T-DNA เข้าไปเชื่อมต่อกับ plant cell DNA ที่เกิดจุดแตกหัก ซึ่งมีรายงานว่า *virD* อาจมีส่วนช่วยในกระบวนการ DNA repair nick and gap มีการเชื่อมต่อบริเวณ nick และ gap โดยการทำงานของ *virD* คล้ายกับการทำงานของ ligase ภายในส่วน T-DNA มียีนกำหนดการสร้างสาร opine เช่น nopaline synthase (*nos*), octopine synthase (*ocs*), agroclinoline synthase (*acs*) และ agropine synthase (*ags*) ส่วนอื่นๆ ภายใน Ti - plasmid ได้แก่ จุดเริ่มต้นการจำลองโมเลกุล (ORI) ส่วนที่ควบคุมการส่งถ่ายพลามิด โดยวิธีคอนจูเกชั่น ยีนที่กำหนดให้เซลล์แบคทีเรียสามารถใช้สารพวก opine เป็นแหล่งพลังงาน เมื่อแบคทีเรียส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืชแล้ว เซลล์ของพืชบริเวณที่ถูกบุกรุกจึงสามารถสร้างสาร opine ขึ้นได้ตามชนิดของพลาสมิด Ti นั้น ส่วน *Agrobacterium* ก็สามารถเจริญเติบโตได้โดยใช้สาร opine ที่พืชสร้างขึ้นเป็นแหล่งพลังงานได้ และเมื่อกำจัดแบคทีเรียออกไป พืชยังคงสังเคราะห์สาร opine ได้ เนื่องจาก T-DNA ถูกส่งเข้าไปอยู่ในเซลล์พืชอย่างถาวรแล้ว (อารีย์ วรัญญูวัฒนก์, 2541)

ในส่วนของ T-DNA นอกจากจะมียีนที่กำหนดการสังเคราะห์สาร opine แล้ว ยังมียีนที่กำหนดการสร้างฮอร์โมนพืช (phytohormone) พวกออกซินและไซโตไคนินด้วย เป็นเหตุให้เซลล์พืชที่ได้รับ T-DNA มีการเจริญเติบโตแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วและไม่จำกัด ทำให้เกิดเป็นก้อนเนื้อเยื่อปุ่มปมที่ไม่สามารถพัฒนาเป็นยอดหรือรากได้ ยีนที่กำหนดการสร้างฮอร์โมนพืชที่พบ คือ trytophan monooxygenase (*tms1*), indoleacetamide hydrolase (*tms2*) และ isopentenyl transferase (*tmr*) โดยพบว่า ยีน *tms1* และ *tms2* กำหนดการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสาร trytophan เป็น indoleacetamide และเปลี่ยนต่อไปเป็น indoleacetic acid (IAA) ซึ่งเป็นสารพวกออกซิน ส่วนยีน *tmr* เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สร้าง isopentenyl adenosine (IPA) ซึ่งเป็นสารพวกไซโตไคนิน ขอบเขตของ T-DNA ที่จะส่งถ่ายไปยังเซลล์พืชจะควบคุมและกำหนดโดยลำดับเบสซ้ำๆ (terminal repeat) 25 คู่เบส จะมีอยู่ทั้ง 2 ข้างของ T-DNA เรียก left border (LB) และright border (RB) (อารีย์ วรัญญูวัฒนก์, 2541) การส่งถ่ายยีนโดย *Agrobacterium* ซึ่งเป็นวิธีการที่อาศัยธรรมชาติของแบคทีเรียโรคพืชที่มีชื่อว่า *A. tumefaciens* ช่วยในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืช พืชต้นใหม่ที่ได้เรียกว่าพืชดัดแปลงพันธุ์ (transgenic plant) หลักการถ่ายยีนโดยวิธีนี้คือนำเนื้อเยื่อของพืชมาทำให้เกิดรอยแผล แล้วเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียจากนั้นกำจัดแบคทีเรียด้วยยาปฏิชีวนะ ก่อนที่จะนำชิ้นส่วนของพืชไปเลี้ยงคัดเลือกในอาหาร เซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนจะเจริญเติบโตได้แล้วนำไปชักนำให้เกิดเป็นต้นพืช จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของยีนเพื่อยืนยันผลอีกครั้งหนึ่ง โดยยีนที่ถูกส่งถ่ายโดยส่วนใหญ่มี 2 แบบ คือ sense และ antisense ซึ่งพืชชนิดแรกที่ได้รับการถ่ายฝากยีนโดย *Agrobacterium* คือ *Daucus carota* (อารีย์ วรัญญูวัฒนก์, 2541)

การส่งถ่ายยีนโดยวิธี Sense และ Antisense

Van der Kroll et al. (1990) พบว่า การเปลี่ยนแปลงใดๆ ที่เกี่ยวข้องกับยีน dihydroflavonol - 4-reductase (*DFR*) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานิน จะส่งผลต่อการ

แสดงออกของสีในที่สุด ไม่ว่าการเปลี่ยนแปลงนั้นจะเกิดขึ้นเนื่องจากการส่งถ่ายยีนโดยวิธี antisense เพื่อยับยั้งหรือลดการแสดงออกของยีน (suppression) หรือส่งถ่ายยีนโดยวิธี sense เพื่อเพิ่มการสะสมและแสดงออกของยีนให้มากขึ้น (over expression) การส่งถ่ายยีนโดยใช้วิธี antisense นั้นเป็นกระบวนการถ่ายฝากยีนที่ต่อกลับทิศทาง เมื่อเกิดการลอกรหัสจากยีนที่ถ่ายฝากเข้าไป จะได้อาร์เอ็นเอสายที่เป็นคู่สมกับอาร์เอ็นเอของยีน ในพืช เมื่อเกิดการจับเข้าคู่กัน ทำให้ไม่มีการแปลรหัสเป็นโพลีเพพไทด์หรือโปรตีน และไม่เกิดการสร้างเอ็นไซม์หรือสารซึ่งเป็นผลลัพธ์ของยีนดังกล่าว การส่งถ่ายยีนโดยวิธี antisense เพื่อยับยั้งหรือลดการแสดงออกของยีน โดยที่ antisense *DFR* gene ทำให้ปริมาณรงควัตถุลดลงในพิทูเนีย หรือการส่งถ่าย antisense *DFR* gene เข้าสู่เยอบีราสามารถเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีชมพู และสำหรับพืช lisianthus พบว่าเกิดการเปลี่ยนสีจากม่วงไปเป็นขาว นอกจากนี้ การส่งถ่าย antisense *DFR* gene ทำให้ *Torenia hybrida* เปลี่ยนจากดอกสีน้ำเงินเป็นสีน้ำเงินอ่อนได้ (Aida et al., 2000) ดังนั้น จึงนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาการส่งถ่ายยีน *DFR* เข้าพืชปทุมมา โดยกลไกการเกิดสีในพืชเกี่ยวข้องกับเอนไซม์หลายชนิด เอนไซม์ที่สำคัญ คือ เอนไซม์ *DFR* ซึ่งทำหน้าที่ในขั้นตอนปฏิกิริยารีดักชัน เปลี่ยนสารตัวกลาง (intermediate) dihydroflavonols เป็น leucoanthocyanidin ซึ่งสารตัวนี้เปลี่ยนไปตามลำดับ จนกระทั่งเป็นสารกลุ่ม cyanidine, pelargonidine และ delphinidin ซึ่งเป็นรงควัตถุแอนโทไซยานิน โดยยีน *DFR* กำหนดการสร้างเอนไซม์ดังกล่าว ดังนั้น ถ้ามีการส่งถ่ายยีน *DFR* โดยวิธี antisense เพื่อยับยั้งหรือลดการแสดงออกของยีน (suppression) อาจทำให้ไม่มีหรือลดการสร้างสารในกลุ่ม cyanidine, pelargonidine และdelphinidin และส่งผลต่อการแสดงออกของสีในที่สุด

สำหรับการส่งถ่ายยีน โดยวิธี sense ซึ่งเป็นกระบวนการแทรกยีนที่มีชิ้นส่วนครบถ้วนสมบูรณ์ (full length gene) เข้าสู่สิ่งมีชีวิตที่ต้องการเพื่อให้สิ่งมีชีวิตชนิดนั้นสามารถสร้างโปรตีนซึ่งเป็นผลลัพธ์ของยีนที่แทรกเข้าไปนั้นออกมาได้ โดยยีนที่ว่านี้อาจได้มาจากสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นเองหรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นก็ได้ ปัจจุบันเทคนิคนี้ถูกนำมาใช้ในการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมหลายชนิด เช่น ข้าว Golden Rice และฝ้าย BT เป็นต้น การส่งถ่ายยีน *DFR* โดยวิธี Sense เพื่อเพิ่มการสะสมและแสดงออกของยีนให้มากขึ้น (over expression) นั้น อาจทำให้มีการสร้างสารในกลุ่ม cyanidine, pelargonidine และ delphinidin เพิ่มขึ้น ส่งผลต่อการแสดงออกของสีที่มากขึ้นด้วยเช่นกัน รายงานของ Holton (1996) ศึกษาการส่งถ่าย Sense DFR gene พบว่า การส่งถ่าย sense *DFR* gene จากพิทูเนีย ทำให้ดอกสีขาวของ *Dianthus caryophyllus* เปลี่ยนเป็นดอกสีม่วง นอกจากนี้มีรายงานการส่งถ่ายยีน *DFR* โดยวิธี RNA interference (RNAi) ซึ่งเป็นกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA โดยหากเกิดอาร์เอ็นเอสายคู่ขึ้นภายในเซลล์ อาร์เอ็นเอสายคู่ที่เกิดขึ้นนี้จะถูกทำลายโดยกลุ่มของเอนไซม์นิวคลีเอสที่เรียกว่า RNA-induce silencing complex (RISC) ให้เกิดเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 22 นิวคลีโอไทด์ เรียกว่า small interfering RNA (siRNA) ซึ่ง siRNA ที่เกิดขึ้นนี้จะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการทำลาย mRNA ที่มีลำดับเบสเหมือนกันต่อไป ซึ่งเชื่อว่ากลไกที่เกิดขึ้นนี้มีประโยชน์ในการช่วยให้สิ่งมีชีวิตสามารถต้านทานต่อไวรัสบางชนิดได้ และยังใช้ในการควบคุมการแสดงออกของยีนให้แตกต่างกันไปตามช่วงการพัฒนาระยะต่างๆ ได้ มีรายงานการศึกษาการส่งถ่ายยีน *DFR* โดยวิธี RNA interference (RNAi) เพื่อการสร้างกุหลาบดอกสีน้ำเงินโดยสถาบัน CSIRO โดย Wang และคณะ (1997) ได้ใช้ RNAi (RNA interference) หยุดการทำงานของยีน *DFR* ในกุหลาบสีแดง เพื่อยับยั้งปฏิกิริยา cyanidin pathway คือ การสร้างสารกลุ่ม cyanidin (สีแดง) ในขณะเดียวกันก็เพิ่มการสังเคราะห์สารในกลุ่ม delphinidin (ซึ่งให้สีน้ำเงิน) ได้อย่างสมบูรณ์ และนักวิจัยจากสถาบันวิจัย Suntory ได้ใช้

หลักการเดียวกันนี้ สามารถยับยั้งการสร้างสีชมพูในกุหลาบสายพันธุ์สีชมพูเพื่อให้เกิดการสังเคราะห์สีน้ำเงินทดแทนได้ นอกจากยับยั้งการสร้างเม็ดสีแล้วยังสามารถยับยั้งการสร้าง เอทิลีน จากรายงานของ Huang et al. (2007) ได้ศึกษาการถ่ายฝากยีนเข้าดอกพิทูเนียด้วย *Agrobacterium* โดยใช้ยีน antisense *BoACS1* และ antisense *BoACO1* รหัสลำดับของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอทิลีนในพืชผักชนิดหนึ่ง พบว่ายีน antisense *BoACO1* สามารถลดการสังเคราะห์เอทิลีนและทำให้ดอกพิทูเนียเหี่ยวเฉาช้าลง นอกจากนี้มีรายงานการถ่ายฝากยีนด้วย *Agrobacterium* ในมะเขือเทศ โดยใช้ยีน *ACC* oxidase strong 1 พบว่า สามารถยับยั้งการสุกของมะเขือเทศได้ในระดับ mRNA (Shaharuddin et al., 2006)

รายงานความสำเร็จของการส่งถ่ายยีน ในพืชใบเลี้ยงคู่

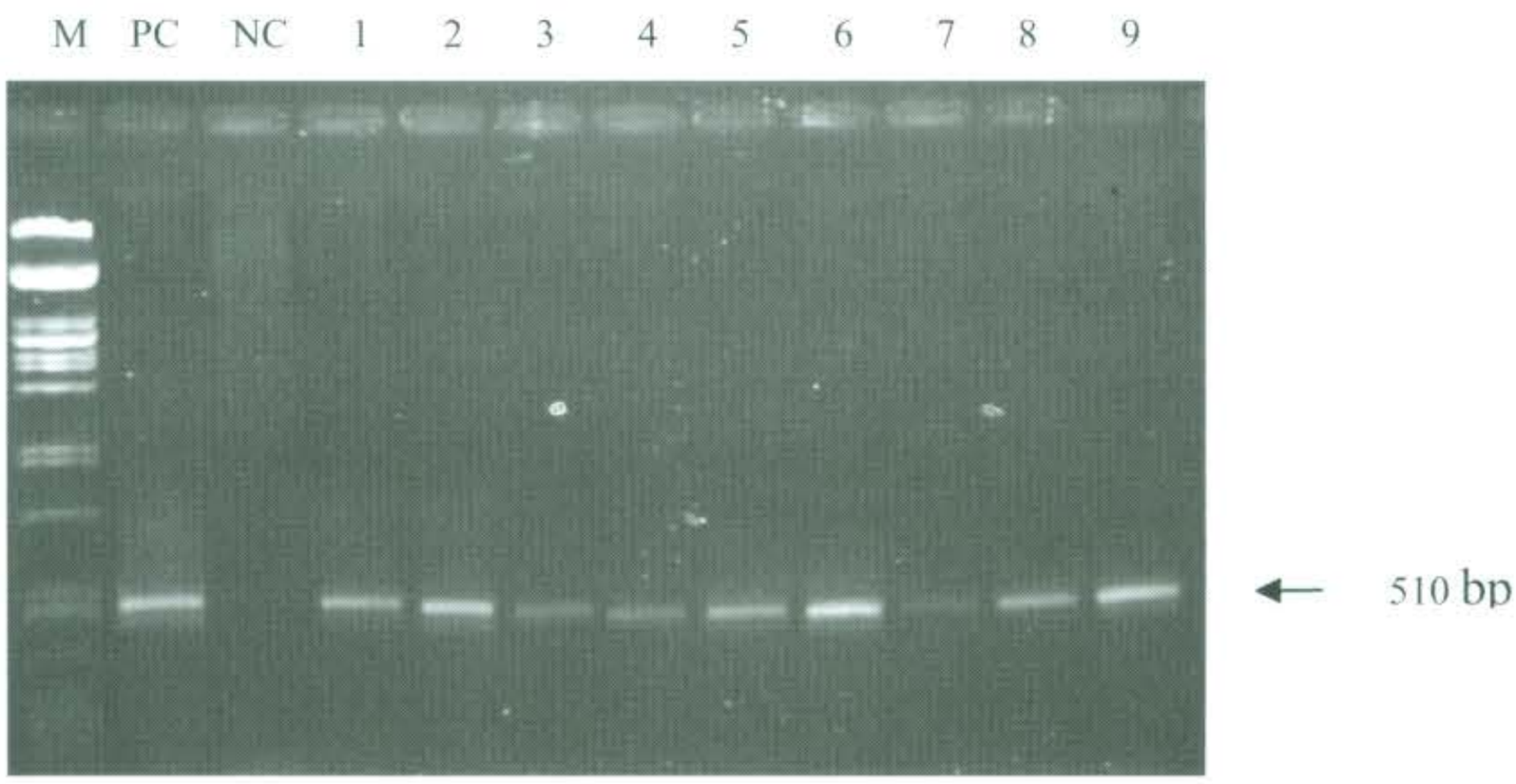
ในบทความนี้จะขอนำเสนอการส่งถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับรงควัตถุแอนโทไซยานินและทำให้ดอกของพืชเปลี่ยนสี จากรายงานของ Shimada et al. (2001) สามารถส่งถ่าย sense ของยีน flavonoid 3',5'-hydroxylase (*F3'5'H*) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานินทำให้ดอกสีชมพูเปลี่ยนเป็นสีม่วง และเมื่อส่งถ่าย antisense ของยีน (*F3'5'H*) สามารถทำให้เกิดดอกสีน้ำเงินในพิทูเนียเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือน้ำเงินซีดได้ นอกจากนี้ Aida et al. (2000) ได้ศึกษาการส่งถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานิน คือ ยีน *DFR* และ ยีน chalcone synthase (*CHS*) โดยวิธี antisense พบว่าการส่งถ่ายยีน *DFR* ทำให้ดอกแววมยุรามีสีน้ำเงินและสีขาวปะปนกันอยู่ และจากการศึกษาของ Ueyama et al. (2002) ได้รายงานถึงการศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาของดอกแววมยุรา พบว่าดอกแววมยุราในระยะต่างๆ มีการแสดงออกของสีและการสังเคราะห์เอนไซม์ในกลุ่มรงควัตถุ แอนโทไซยานินที่ไม่เหมือนกันเช่นเดียวกับ Jaakola et al. (2002) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับรงควัตถุแอนโทไซยานินในระหว่างการพัฒนาการสุกของผลบิลเบอรี พบว่าสีของผลบิลเบอรีในระยะต่างๆ ของการสุกมีการสะสมเอนไซม์และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับรงควัตถุแอนโทไซยานิน การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติบางประการของพืช มีจุดประสงค์เพื่อให้ได้พืชที่มีคุณสมบัติที่ต้องการหรือเพื่อปรับปรุงคุณภาพให้ดีขึ้น การปรับปรุงสีของดอกไม้ ก็เป็นสิ่งหนึ่งที่กำลังเป็นที่สนใจ และมีงานวิจัยที่ประสบผลสำเร็จ โดยการส่งถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานิน การส่งถ่าย antisense *CHS* gene ใน *Gebera hybrida* โดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่า สามารถยับยั้งการสังเคราะห์รงควัตถุ แอนโทไซยานิน ในดอก *Gebera hybrida* ได้ จากรายงานของ Spelt et al. (2000) ศึกษาการส่งถ่าย *DFR* gene ในดอกพิทูเนียโดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่า การแสดงออกของยีน *DFR* และสีดอกของพิทูเนียเปลี่ยนแปลงไป สอดคล้องกับ Yan et al. (2001) ศึกษาการส่งถ่ายยีน *chalcone synthase* A gene ในดอกพิทูเนีย โดยใช้ *A. tumefaciens* LBA4404 /pBI121 plasmid พบว่าสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีดอกของพิทูเนียได้ โดยเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีขาว และขาวสลับม่วง นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ทำในพืชชนิดอื่น และให้ผลที่มีการเปลี่ยนแปลงที่สีของดอก หรือใบพืชได้ Liu et al. (2001) ศึกษาส่งถ่าย tag1-gene ที่เกี่ยวข้องการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานินในยาสูบ โดยใช้ *A. tumefaciens* พบว่า สามารถทำให้สีดอกของยาสูบ เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีแดงที่จางลงได้ ในปี 2010 Grosser et al. ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของส้มลูกผสมโดยการส่งถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* โดยถ่ายฝากยีน *egfp-nptII* ภายใต้การควบคุมของ CaMV 35S promoter พบประสิทธิภาพของการถ่ายฝากยีนร้อยละ 18 และในปีเดียวกัน Figueiredo et al. (2010) ได้ศึกษาการถ่ายฝากยีนเข้า *Guignardia citricarpa* ด้วย *Agrobacterium tumefaciens* โดยใช้พลาสมิด pPZP201BK พบว่ามีประสิทธิภาพการถ่ายฝากยีนร้อยละ 93.75 นอกจากนี้

ผู้เขียนยังได้ทำการศึกษาการส่งถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* และประสบความสำเร็จในพืชอัญชัน ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ผลการศึกษาส่งถ่ายยีน *DFR* เข้าสู่อัญชัน หลังจาก co-cultivation 4 เดือน นำเนื้อเยื่ออัญชันมาทำการตรวจสอบโดยเทคนิค GUS histochemical assay (GUS expression) พบว่าเกิดจุดสีน้ำเงิน (รูปที่ 1) ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง X-gluc และ ณ คิดเป็นร้อยละ 20 และตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบแถบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR สำหรับยีน *GUS* ทุกต้นและได้แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 510 (รูปที่ 2) (Buddharak et al., 2009)



(ก) (ข)

รูปที่ 1 GUS expression ของอัญชัญ อายุ 4 เดือน หลัง co-cultivation โดยใช้ *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO (ก) อัญชัญที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน (control) (ข) อัญชัญที่ได้รับการส่งถ่าย AGLO/ pBI121- *DFR* (ที่มา: Buddharak et al., 2009)



รูปที่ 2 ผลของปฏิกิริยา PCR สำหรับยีน GUS

M : Lamda / PstI (marker)

NC : อัญชัญที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน (control)

PC : พลาสมิด pBI121

Lane1-9 : อัญชัญส่งถ่ายยีน (AGLO/pBI121/*DFR*) (ที่มา: Buddharak et al., 2009)

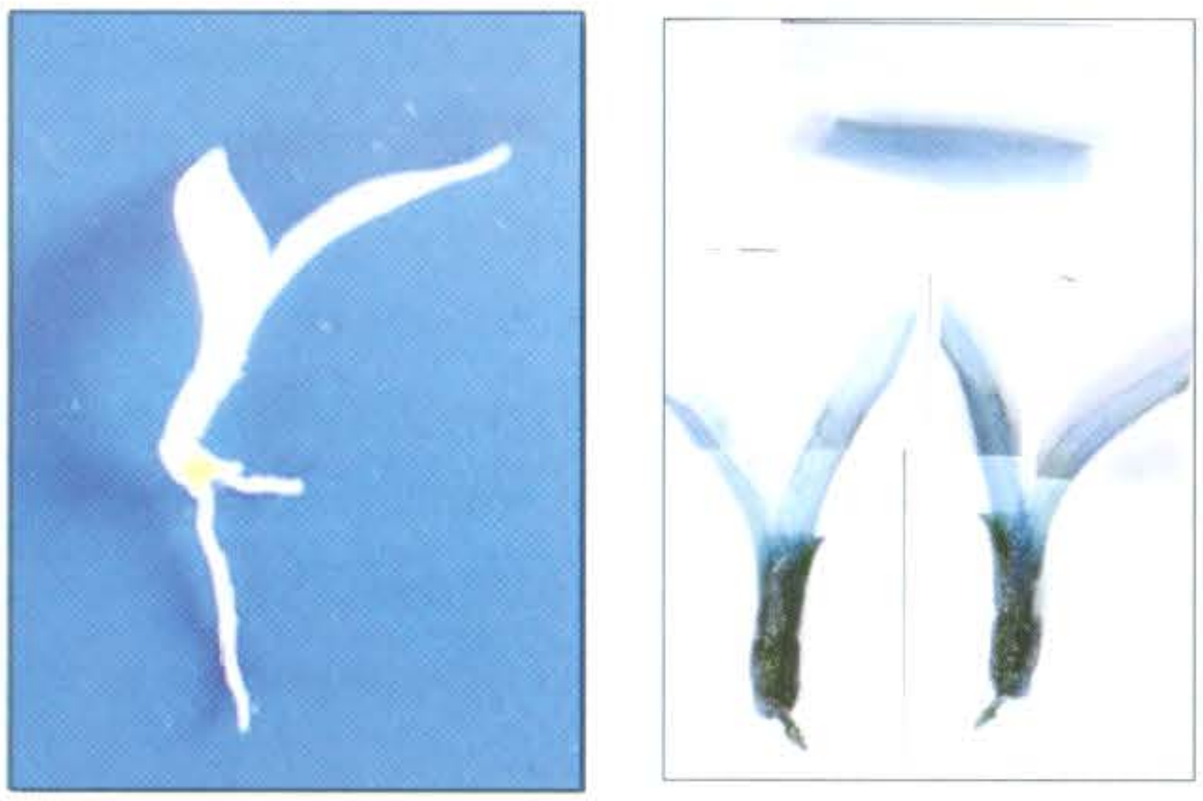
รายงานความสำเร็จของการส่งถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

การถ่ายทอดยีนโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium* ได้ผลดี และมีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนสูงในพืชใบเลี้ยงคู่ ไม่ค่อยได้ผลกับพวกธัญพืช รวมถึงพวกพืชใบเลี้ยงเดี่ยวชนิดอื่น แต่อย่างไรก็ตาม ก็ได้มีการทดลองใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium* ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้เป็นผลสำเร็จแล้วในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวบางชนิด (Conner and Dommisse, 1992; Rashid et al., 1996) โดยเฉพาะ Rashid et al. (1996) รายงานการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว indica พบว่าสามารถส่งถ่ายได้เป็นผลสำเร็จและสามารถถ่ายทอดไปส่งรุ่น T1 ได้ และมีการกระจายของยีนเป็นไปตามกฎของเมนเดล ต่อมาในปี Wang et al. (1997) ปรับปรุงประสิทธิภาพและการแสดงออกของยีนที่ส่งถ่ายเข้าสู่ข้าวโดยศึกษาจากยีนเครื่องหมายที่มี intron พบว่ายีนที่มี intron มีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายสูงกว่ายีนที่ไม่มี intron ต่อมาในปี 1999 Mohanty et al. ปรับปรุงการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นโดยส่งถ่ายเข้าสู่ indica rice พันธุ์ *pusa basmati* 1 พบว่ามีแคลลัสที่ต้านทานต่อ hygromycin B สูงถึงร้อยละ 56 และมีจำนวน copy ตั้งแต่ 1-4 copy และมีการกระจายตัวของยีนสู่รุ่นลูกมีทั้งที่เป็นไปตามกฎของเมนเดลและไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล นอกจากข้าวก็พบว่ามีการศึกษาการส่งถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้พวก phalaenopsis โดย Belarmino et al. (2000) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนของ *A.tumefaciens* 2 สายพันธุ์ คือ LBA4404 และ EHA101 โดยส่งถ่ายยีน *GUS* พบว่า *A. tumefaciens* ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนเท่าๆ กัน และ Liew et al. (1998) ศึกษาการแสดงออกของยีน *DFR* พบว่าในเนื้อเยื่อทุกส่วนที่มีสีม่วงของกล้วยไม้มีการแสดงออกของยีน *DFR* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงวัตถุแอนโทไซยานิน และจากการศึกษาของ Boase et al. (1998) ศึกษาการส่งถ่ายยีน *GUS* เข้าสู่ Chrysanthemum พันธุ์ต่าง ๆ โดย *A. tumefaciens* 4 สายพันธุ์ ได้แก่ EHA105, LBA4404, MOG101 และ MOG301 เวคเตอร์ที่ใช้ส่งถ่ายคือ pMOG410 และ pKIWI110 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการส่งถ่าย พบว่า เบญจมาศแต่ละพันธุ์ก็เหมาะกับ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ที่ต่างกัน

ในงานวิจัยขั้นต่อมาก็คือการทดลองส่งถ่ายยีนอื่นที่สนใจ (นอกเหนือจาก *GUS* gene) เข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยว ซึ่งก็พบว่าประสบผลสำเร็จเช่นกัน ดังรายงานการวิจัยของ Datta et al. (2000) ที่ศึกษาการส่งถ่ายยีนใน indica rice โดย A. tumefaciens satrain LBA4404 (pNO1) และ A281 (pNO1) พบว่า *A. tumefaciens* ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถส่งถ่าย *chitinase* gene เข้าสู่ embrgogenic calli ของข้าวได้ และพบการแสดงออกของ *chitinase* gene จากข้าวที่พัฒนาเป็นต้นได้ จากการส่งถ่ายด้วย *A. tumefaciens* ทั้ง 2 สายพันธุ์ นอกจากนี้มีรายงานประสิทธิภาพและความสำเร็จในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอื่น ๆ หลายชนิด เช่น Kamo (1997) ได้รายงานการส่งถ่ายยีนใน *Gladiolus* พบว่ามีประสิทธิภาพการส่งถ่ายร้อยละ 0.5 จากการศึกษาการส่งถ่ายยีนของ Wang and Ge (2005) ซึ่งได้ศึกษาการส่งถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว *Fetuca aundinacea* ด้วย *A.tumefaciens* EHA105 กับพลาสมิด pCAMBIA1305.2 พบว่ามีประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนร้อยละ 1.9 Ledger et al. (1997) ส่งถ่ายยีนใน lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) พบว่ามีประสิทธิภาพการส่งถ่ายร้อยละ 1.9 เช่นกัน ในขณะที่ Akasaka-Kennedy, Tomita and Ezura (2004) ศึกษาการส่งถ่ายยีนใน *Cucumis melo* L. พบว่า มีประสิทธิภาพร้อยละ 2.3 Shrawat et al. (2007) ได้ศึกษาการพัฒนาประสิทธิภาพของการถ่ายฝากยีนด้วย *Agrobacterium tumefaciens* ของข้าวบาร์เล่ย์ โดยใช้ *Agrobacterium* strain harboring LBA4404 ที่มี binary vector pUGAB7 ซึ่งประกอบด้วยยีน *bar* และยีน *uidA* หรือ pYF133 ซึ่งประกอบด้วยยีน *hpt* และยีน *GFP* พบการส่งถ่ายยีนที่ต้านทานต่อ bialaphos และ hygromycin โดยมีประสิทธิภาพการถ่ายฝากตั้งแต่ร้อยละ 2.6-5.6 และร้อยละ 3.3-6.7 ตามลำดับ

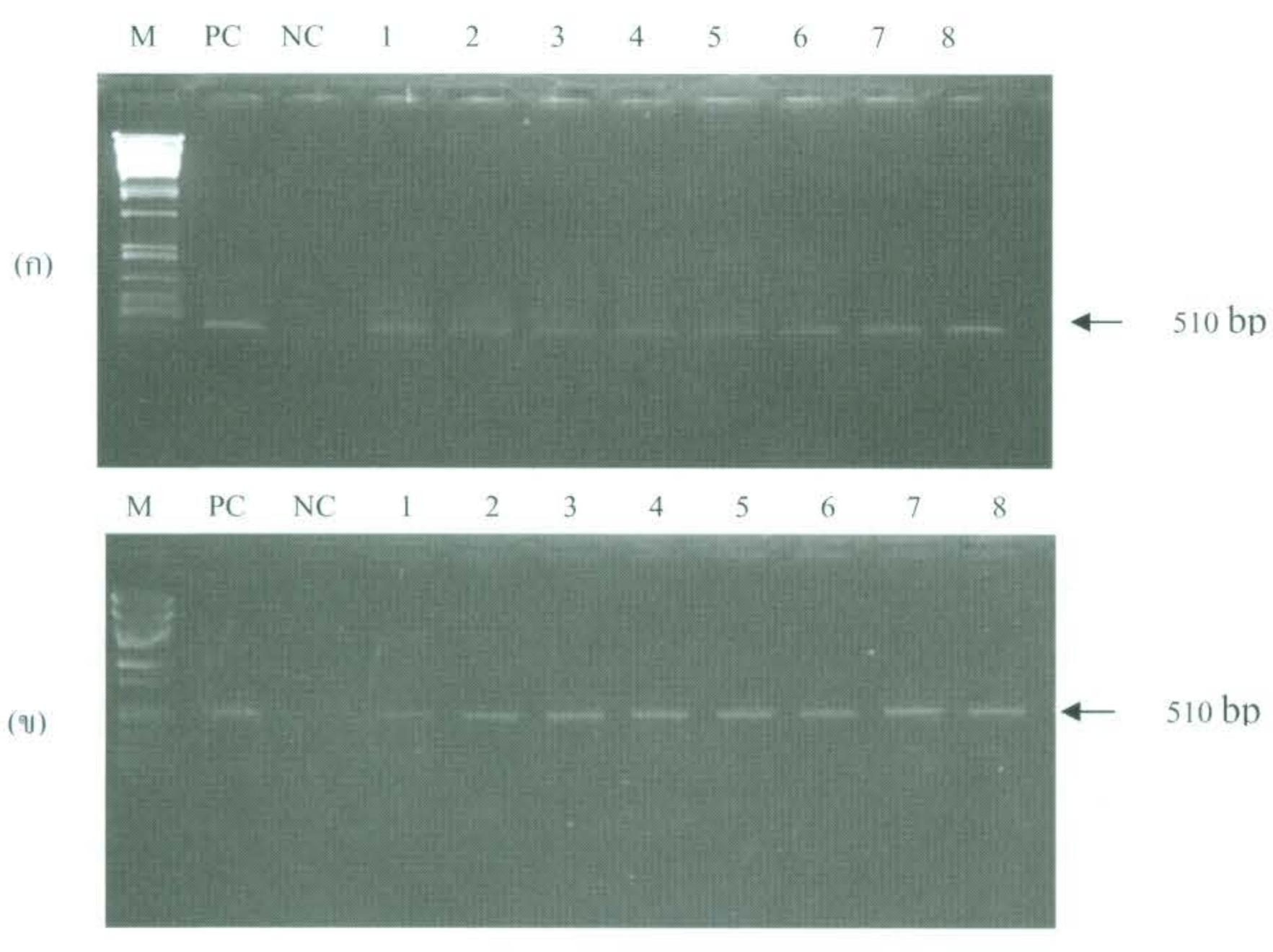
สำหรับการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมของหญ้าอาหารสัตว์ (*Festuca pratensis*) โดยศึกษาการถ่ายฝากยีนเข้า embryogenic callus ใช้ *A. tumefaciens* strain AGL1 ที่มี binary vector pDM805 ประกอบด้วยยีน *acetyltransferase phosphinothricin (bar)* และยีน *b*- glucuronidase (uidA) พบการแสดงออกของยีน *uidA* ร้อยละ 82 (Gao et al., 2009) การเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมของข้าวด้วย *Agrobacterium* โดยใช้ *phosphomannose isomerase* (*pim*) เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือก พบประสิทธิภาพการถ่ายฝากยีนร้อยละ 16.5 (Yu-Xiang et al., 2006) และการถ่ายฝากยีนเข้า *Aloe barbadensis* ด้วย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ *EHA105* และ *C58C1* พบว่ามีประสิทธิภาพการถ่ายฝากยีนร้อยละ 80.0 และร้อยละ 30.0 ตามลำดับ (He et al., 2007) การศึกษาประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวของ Frame et al. (2002) พบว่าการส่งถ่ายยีนในข้าวโพดโดยใช้ *A. tumefaciens* strain EHA101 containing the standard binary vector pTE102 สามารถส่งถ่ายยีน *GUS* เข้าสู่ embryos ของข้าวโพด โดยพบการแสดงออกของยีน *GUS* ซึ่งมีประสิทธิภาพการส่งถ่ายร้อยละ 5.5 และก็สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ นอกจากนี้ผู้เขียนยังได้ทำการศึกษาการส่งถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* และประสบความสำเร็จในพืชดอกหลายชนิด เช่น ปทุมมา ซึ่งเป็นพืชใบเลี่ยงเดี่ยว โดยมีรายงานพอสรุปได้ว่าจากการทดลองส่งถ่ายยีน *GUS* เข้าสู่ช่อดอกย่อย (coinflorescense) ของปทุมมาโดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ด้วยพลาสมิด 4 ชนิด คือ pSCV1.6 pBI121 pCAMBIA1303 และ pCAMBIA1304 ตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีน โดยเทคนิค GUS histochemical assay พบว่าเนื้อเยื่อช่อดอกย่อยของปทุมมาที่ส่งถ่ายด้วย pSCV1.6 เมื่อนำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงิน (transient expression) คิดเป็นร้อยละ 65 ซึ่งมากที่สุดโดยพบจุดสีน้ำเงินเข้มเกิดขึ้นทั่วทั้งเนื้อเยื่อที่จะเจริญไปเป็นต้น ส่วนเนื้อเยื่อปทุมมาที่ส่งถ่ายด้วย pBI121 เมื่อนำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงิน (transient expression) คิดเป็นร้อยละ 40 โดยพบจุดสีน้ำเงินที่เนื้อเยื่อแต่สีไม่เข้มเท่ากับเนื้อเยื่อปทุมมาที่ส่งถ่ายด้วย pSCV1.6 แต่ในการส่งถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้เนื้อเยื่อปทุมมาที่ส่งถ่ายด้วย pCAMBIA 1303 และ pCAMBIA 1304 เมื่อนำมาตรวจสอบพบการเกิดจุดสีน้ำเงิน (transient expression) คิดเป็นร้อยละ 5 เท่ากัน โดยพบจุดสีน้ำเงินเพียงเล็กน้อยและมีสีจาง

จากนั้นยังได้ทำการส่งถ่ายยีน *DFR* เข้าสู่เนื้อเยื่อปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) โดยหลังจาก co-cultivation 5 เดือน นำเนื้อเยื่อปทุมมามาทำการตรวจสอบโดยเทคนิค GUS histochemical assay (GUS expression) พบว่าเกิดจุดสีน้ำเงิน (รูปที่ 3) ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง X-gluc และ GUS คิดเป็นร้อยละ 5 และตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบแถบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR สำหรับยีน *GUS* และ 35S promotor ทุกต้น (รูปที่ 4) (ภพเก้า พุทธรักษ์, 2550) จากรายงานการวิจัยและความสำเร็จของการส่งถ่ายยีนโดยแบคทีเรีย *A. tumefaciens* ทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นพื้นฐานพอจะสรุปในเบื้องต้นได้ว่าการส่งถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* นั้น ในปัจจุบันสามารถทำได้ในพืชใบเลี้ยงคู่จำนวนมาก และก็พบความสำเร็จในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิด อย่างไรก็ตามวิธีการส่งถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรียก็ไม่สามารถทำได้ในพืชทุกชนิด ดังนั้นวิธีการนี้จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะถูกนำมาใช้เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะตามต้องการ โดยในปัจจุบันวิธีดังกล่าวสามารถส่งถ่ายยีนประสบความสำเร็จพบได้ทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่



(ก) (ข)

รูปที่ 3 GUS expression ของปทุมมา อายุ 5 เดือน หลัง co-cultivation โดยใช้ *A. tumefasiens* สายพันธุ์ AGLO (ก) ปทุมมาที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน (control) (ข) ปทุมมาที่ได้รับการส่งถ่าย AGLO/ pBI121-*DFR* (ที่มา: ภพเก้า พุทธรักษ์, 2550)



รูปที่ 4 ผลของปฏิกิริยา PCR สำหรับยีน *GUS* (ก) และ 35S promoter primer (ข) M : Lamda / P*st*I (marker) NC : ปทุมมาที่ไม่ได้ส่งถ่ายยีน (control) PC : พลาสมิด pBI121 Lane1-8 : ปทุมมาส่งถ่ายยีน (AGLO/pBI121/*DFR*) (ที่มา: ภพ เก้า พุทธรักษ์, 2550)

เอกสารอ้างอิง

นเรศ ดำรงชัย. (2543). ผลกระทบของ GMOs ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์และข้อเสนอแนะเชิงนโยบาย. โครงการศึกษานโยบายด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC). พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2548). พันธุวิศวกรรม. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์เกษตรศาสตร์.

สมพร ประเสริฐส่งสกุล. (2546). พันธุศาสตร์โมเลกุล. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โฟร์เพซ.

ภิญโญ พานิชพันธ์. (2543).โครงสร้างและสมบัติทางกายภาพของกรดนิวคลีอิค. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : พิมพ์ที่มหาวิทยาลัยมหิดล.

ภพเก้า พุทธรักษ์. (2550). การส่งถ่ายยีนเข้าพืชปทุมมาโดยแบคทีเรีย *A. tumefaciens*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ) บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิยาลัยนเรศวร. พิษณุโลก.

หัทยา กาวีวงศ์. (2548). อณูพันธุศาสตร์. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่ : จัดพิมพ์โดยห้างหุ้นส่วนจำกัด บุญไชยการพิมพ์.

อารีย์ วรัญญูวัฒนก์. (2541). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. นครราชสีมา.

Aida, R., Yoshida, K., Kondo, T., Kishimoto, S and Shibata, M. (2000). Copigmentation gives bluer flowers on transgenic torenia plants with the antisense dihydroflavonol-4-reductase gene. Plant Sci. 160: 49-56.

Akasaka-Kennedy, Y., Tomita, K and Ezuara, H. (2004). Efficient plant regeneration and *Agrobacterium* - mediated transformation via somatic embryogenesis in melon (*Cucumis melo* L.). Plant Sci . 166: 763-769.

Anuntalabhochai, S., Chandej R., Panchaisri, B., Yu, L. D. Vilaithing, T. and Brown, I. G. (2001). Ion -beam-induced deoxyribose nucleic acid transfer. Appl. Phys. Lett. 78(16): 2393-2395.

Belarmino, M. M. and Mii, M. (2000). *Agrobacterium* -mediated genetic transformation of a phalaenopsis orchid. Plant Cell Rep. 19: 435-442.

Buddharak, P., Chundet, R., Sanguansermsri, M and Anuntalabhochai, S. (2009). Isolation of Dihydroflavonal reductase (*DFR*) gene and Genetics Transformation in *Clitoria ternatea* Linn. via *Agrobacterium tumefaciens*. The Proceeding of 5th Naresuan Environmental Annual Conference, June 15-16, 2009. Phitsanuloke : Thailand.

Boase, M. R., Butler, R. C., and Borst, N. K. (1998). Chrysanthemum cultivar - *Agrobacterium* interactions revealed by *GUS* expression time course experiments. Sci. Hort. 77: 89-107.

Chaudhury, A., Maheshwari, S. C. and Tyagi, A. K. (1995). Transient expression of *gus* gene in intact seed embryos of *Indica* rice after electroporation-mediated gene delivery. Plant Cell Rep. 14: 215-220.

Conner, A. J., and Dommisse, E. M. (1992). Monocotyldonous plants as hosts for *Agrobacterium*. Plant Sci. 135(4): 550-555.

Datta, K., Koukolíková-Nicola, Z., Baisakh, N. and Datta, S. K. (1999). *Agrobacterium*-

mediated engineering for sheath blight resistance of indica rice cultivars from different ecosystems. Theor. Appl. Genet. 100: 832-839.

Figueiredo. J. G., Goulin. E. H., Tanaka. F., Stringari. D., Kava-Cordeiro. V., Galli-Terasawa. L. V., Staats. C. C., Schrank., A. and Glienke, C. (2010). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*. Microbiol. Meth. 80: 143-147.

Frame, B. R., Shou, H., Chikwamba, R. K., Zhang, Z., Xiang, C., Fonger, T. M., Pegg, S. E. K., Li, B., Nettleton, D. S., Pei, D. and Wang, K. (2002). *Agrobacterium tumefacieens* - Mediated Transformation of Maize Embryos Using a Standard Binary Vector System. Plant Physiol. 129: 13-22.

Gao, C., Liu, J. and Nielsen. K. K. (2009). *Agrobacterium*-mediated transformation of meadow fescue (Festuca pratensis Huds.). Plant Cell Rep. 28: 1431-1437.

Grosser, J. W., Dutt. M. and Madhavaraj, J. (2010). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation and plant regeneration from a complex tetraploid hybrid citrus rootstock. Scientia Hort. 123: 454-458.

Gordon-Kamm J. W., Spencer M. T., Mongano L. M. (1990). Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. Plant Cell. 2: 603-618.

Holton, T. A. (1996). Transgenic plants exhibiting altered flower color and methods for producing the same. WO 96/36716.

He, C., Zhang. J., Chen, J., Ye, X., Du, L., Zhao, H. and Dong, Y. (2007). Genetic transformation of *Aloe barbadensis* miller by *Agrobacterium tumefaciens*. Post. Biol. Tec. 34: 1053-1060.

Huang, L. C., Lai, U. L., Yang, S. F., Chu, M. J., Kuo, C. I., Tsai, M. F. and Sun, C. W. (2007). Delayed flower senescence of *Petunia hybrida* plants transformed with antisense broccoli ACC synthase and ACC oxidase genes. Post. Biol. Tec. 46: 147-53.

Jaakola, L., Maatta, K., Pirttila, M. P., Torronen, R., Karenlampi, S. and Hohtola, A. (2002). Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin and flavonol levels during Billerry fruit development. Plant Physio. 130: 729-739.

Kamo, K. (1997). Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gusA expression and opine synthesis in Gladiolus. Plant Cell Rep. 16: 389 - 392.

Liu, D., Galli, M. and Crawford, N. M. (2001). Engineering Variegated Floral Patterns in Tobacco Plants Using the *Arabidopsis* Transposable Element Tag1. Plant Cell Physiol. 42(4): 419-423.

Ledger, S. E., Deroles, S. C and Manson, D. G. (1997). Transformation of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). Plant Cell Rep. 16: 853-858.

Liew, C. F., Loh, C. S., Goh, C. J. and Lim, S. H. (1998). The isolation molecular characterization and expression of dihydroflavonol 4-redutase cDNA in the orchid *Bromheodia finlaysoniana*. Plant Sci. 135: 161-169.

Mohanty, A., Sarma, N. P. and Tyagi, A. K. (1999). *Agrobacterium* - mediated high frequency transformation of elite indica rice variety Pusa Basmati 1 and transmission of the

transgenic to R2 progeny. Plant Sci. 147: 127-137.

Rashid, H., Yokoi, S., Toriyama, K. and Hinata, K. (1996). Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *Indica* rice. Plant Cell Rep. 15: 727-730.

Shrawat, A. K., Becker, D. and Lorz, H. (2007). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformationof barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Sci. 172: 281-290.

Shaharuddin, N. A., Han, Y., Li, H. and Grierson, D. (2006). The mechanism of graft transmission of sense and antisense gene silencing in tomato plants. Post. Biol. Tec. 46: 6579-6586.

Shimada, Y., Ohbayashi, M., Nakano-Shimada, R., Okinaka, Y., Kiyokawa, S and Kiyuchi, Y. (2001). Genetic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway with flavonoid-3',5'- hydroxylase : specific switching of the pathway in petunia. Plant Cell Rep. 20: 456-462.

Spelt, C., Quattrocchio, F., Mol, J. N. M. and Koes, R. (2000). *Anthocyanin1* of Petunia Encodes a Basic Helix-Loop-Helix Protein that Directly Activates Transcription of Structural Anthocyanin Genes. The Plant Cell. 12: 1619-1631.

Ueyama, Y., Suzuki, K. I., Fukuchi-Mizutani, F., Fukui, Y., Miyazaki, K., Ohkawa, H., Kusumi, T and Tanaka, Y. (2002). Molecular and biochemical characterization of torenia flavonoid 3'-hydroxylase and flavone synthase II and modification of flower color by modulating the expression of these genes. Plant Sci. 163: 253-263.

Van der krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J. N. P. and Stuitje, A. R. (1990). Flavonoid Genes in Petunia: Addition of a Limited Number of Eene May Lead to a Suppression of Gene Expression. The Plant Cell. 2: 291-229.

Wang, Z. Y and Ge, Y. (2005). *Agrobacterium* - mediated high efficiency transformation of tall fescue (*Festuca arundinacea*). Plant Physiol. 162: 103-113.

Wang M. B., Upadhyaya N. M., Brettell R. I. S. and Waterhouse P. M. (1997). Intron-mediated improvement of a selectable marker gene for plant transformation using *Agrobacterium tumefaciens*. J. Genet. and Breed. 51: 165-171.

Weissinger, A. K. (1992). Physical methods for plant transfer. Biotech. crop improve. in Asia. 213-233.

Weising, K. and Kahl, G. (1996). Natural genetic engineering of plant cells: the molecular biology of crown gall and hairy root disease. Micro. Biotech. 12: 327-351.

Yu-Xiang, J., Zai-Song, D., Ming, J., Liang-Bi, L. and Ting-Yun, K. (2006). Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of rice by phosphomannose isomerase/mannose selection. Plant Molec. Biol. Rep. 24: 295-303.

Yan, L., Youwei, X., Zhongkai, Z., Xingqi, H. and Yi, L. (2001). Co-suppression in transgenic *Petunia hybrid* expressing chalcone synthase A (chsA). Sci. in China. 44 (6): 661-668.

Yu, Z., Yang, J., and Wu, Y. (1993). Transfering of *GUS* gene into intact rice cell by low energy ion beam. Nucl. Instr. Meth. 80: 1328-1331.

ว.วิทย. มข. 39(1) 28-35 (2554) KKU Sci. J.39(1) 28-35 (2011)

KKU SCIENCE JOURNAL

การเตรียมซีรัมด้วยเทคนิคอย่างง่ายเพื่อการค้นพบสารบ่งชี้ทางชีวภาพ

Simple Techniques for Serum Preparations in Biomarkers Discovery

ศิริพร ภัทรกิจกำจร [1,2*] *มนทิรา จะนันท์* [3]

บทนำ

ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนด้วยเทคนิคทางโปรติโอมิคส์ (proteomics) ได้เข้ามามีบทบาทอย่างมากในการค้นหาสารบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarkers) รวมทั้งอาจนำไปสู่การค้นพบเป้าหมาย (targets) ในการออกแบบเกี่ยวกับยารักษาโรค (Garbis et al.,2005) ทั้งนี้เทคนิคทางโปรติโอมิคส์ อาทิ two dimensional gel electrophoresis (2DE) และแมสสเปกโทรเมทรี (mass spectrometry) เป็นเทคนิคที่มีความไวสูงในการวิเคราะห์โปรตีนได้ระดับนาโนโมลถึงเฟมโตโมล (Kenny et al.,1992; Gatlin et al., 1998) ทั้งยังได้มีการพัฒนาประสิทธิภาพอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นด้วยเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงนี้น่าจะนำไปสู่การค้นพบสารบ่งชี้ทางชีวภาพ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่องานทางด้านการแพทย์มากยิ่งขึ้น (Aebersold et al., 2003; Khan et al., 2005)

การค้นพบโปรตีนที่เป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพมีบทบาทในการป้องกัน การวินิจฉัยโรค การติดตามอาการของผู้ป่วยได้ รวมทั้งระดับของสารบ่งชี้ทางชีวภาพที่ตรวจพบในแต่ละระยะนั้นยังสามารถเป็นข้อมูลในการวางแผนการรักษาได้อีกด้วย ในปัจจุบันมีการนำสารบ่งชี้มะเร็ง (tumor markers) หลายชนิดมาใช้ในงานทางคลินิก ซึ่งสารบ่งชี้มะเร็งในแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะต่อมะเร็งที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น สารพรอสเตทสเปคซิฟิคแอนติเจน (prostate specific antigen, PSA) ในซีรัมจะใช้บ่งชี้มะเร็งต่อมลูกหมากและสารอัลฟาฟีโตโปรตีน (alpha-fetoprotein, AFP) ในซีรัมจะใช้บ่งชี้มะเร็งตับ เป็นต้น อย่างไรก็ดีสารบ่งชี้เหล่านั้นยังไม่เหมาะสมทางคลินิกในการตรวจพบมะเร็งในระยะแรกๆ เนื่องจากมีข้อจำกัดเกี่ยวกับความไวและความจำเพาะในการตรวจวัด (Block et al., 2005; Sardana et al., 2007; Sardana et al., 2008)

[1] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

[2] ศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ในตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

[2] สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

* Corresponding Author, E-mail: sirpat@kku.ac.th

วิธีมาตรฐานที่นำมาใช้ในการตรวจหาความผิดปกติในผู้ป่วยมะเร็งหลายชนิด ได้แก่ การตัดชิ้นเนื้อที่มีพยาธิสภาพจากผู้ป่วยเพื่อหาความผิดปกตินั้นๆ อย่างไรก็ตาม วิธีการดังกล่าวเป็นวิธีที่ไม่เหมาะจะใช้ในการตรวจหาความผิดปกติในระยะแรก รวมทั้งการเก็บชิ้นเนื้อต้องอาศัยผู้ชำนาญและอาจสร้างความไม่สะดวกแก่ผู้ป่วย ในการวิเคราะห์หาโปรตีนจากสิ่งส่งตรวจต่างๆ เช่น ซีรัมและปัสสาวะ ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีความเหมาะสม เนื่องจากสามารถเจาะและเก็บได้ง่าย (Luque-Garcia et al., 2007; Zhang et al., 2007)

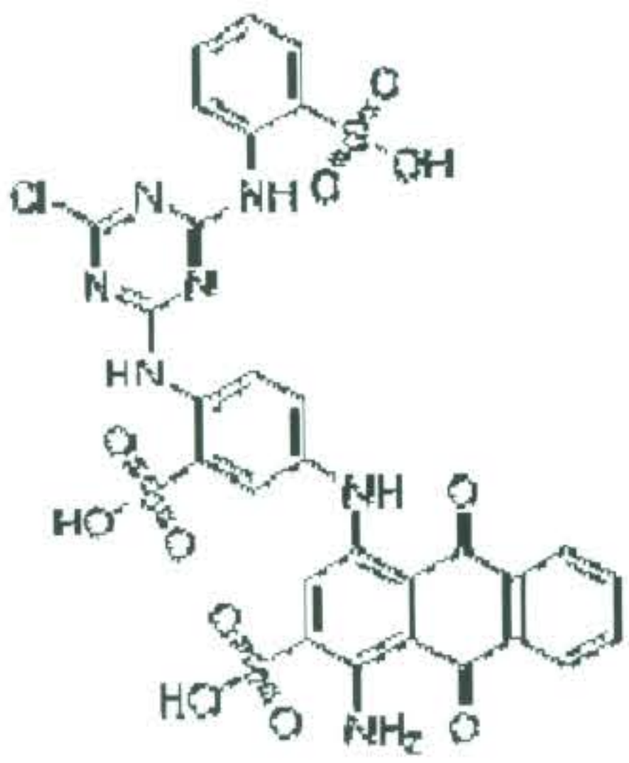
สำหรับปัญหาของการนำซีรัมมาใช้ในการศึกษาเพื่อค้นหาสารบ่งชี้ทางชีวภาพที่มีความจำเพาะนั้นคือมีการบดบังของโปรตีนที่มีปริมาณมาก (high abundance proteins) โดยกว่าร้อยละ 95 ของโปรตีนทั้งหมด เป็น อัลบูมิน (albumin), อิมมูโนกลอบบูลิน (immunoglobulins), ทรานสเฟอริน (transferin), แอนติทริปซิน (α-1-antitrypsin), แฮปโตกลอบบูลิน (haptoglobulin) เป็นต้น โดยโปรตีนที่มีปริมาณมากเหล่านี้จะบดบังโปรตีนที่มีปริมาณน้อย (low abundance proteins) ซึ่งมักเป็นกลุ่มโปรตีนที่มีความสำคัญทางคลินิก (Anderson, 2005; Xue et al., 2010)

การเตรียมตัวอย่างก่อนการตรวจวิเคราะห์จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งที่จะช่วยลดข้อจำกัดดังกล่าวได้ โดยหลักการอย่างง่ายเป็นแบบ affinity ซึ่งสามารถทำได้สองประการ สำหรับประการแรก คือ การแยกเอาโปรตีนที่มีปริมาณมากออกจากตัวอย่าง (removal techniques) (Ahmed et al., 2003; Bjorhall et al., 2005; Zolotarjova et al., 2005) ประการที่สองคือการแย่งจับของโปรตีนที่ต้องการ (enrichment techniques) (Boschetti et al., 2008; Keidel et al., 2010) ทั้งสองวิธีสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ของโปรตีนที่มีปริมาณน้อย ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มโอกาสในการค้นพบโปรตีนที่มีความสำคัญทางคลินิก ในที่นี้ขอยกตัวอย่างเทคนิคอย่างง่ายที่สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการที่ไม่ต้องการเครื่องมือพิเศษ ได้แก่ การใช้ cibacron blue gels และ immunoaffinity depletion method (Bodzon-Kulakowska et al., 2007) โดยทั้งสองเทคนิคนี้จะเป็นการแยกเอาโปรตีนที่มีปริมาณมากออกจากตัวอย่าง ซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิมที่มีการใช้อย่างกว้างขวางในห้องปฏิบัติการ ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคใหม่ขึ้นมาเรียกว่า equalizer bead technology ซึ่งเป็นการแย่งจับของโปรตีนที่ต้องการ เป็นวิธีใหม่จึงยังไม่แพร่หลายมากนัก (Garbis et al., 2005) วิธีนี้จะสามารถลดข้อจำกัดของวิธีการดั้งเดิม โดยจะได้กล่าวรายละเอียดหลักการของแต่ละวิธี รวมทั้งข้อดีและข้อจำกัด และการประยุกต์การใช้งานต่อไป

การแยกเอาโปรตีนที่มีปริมาณมากออกจากตัวอย่าง (removal techniques)

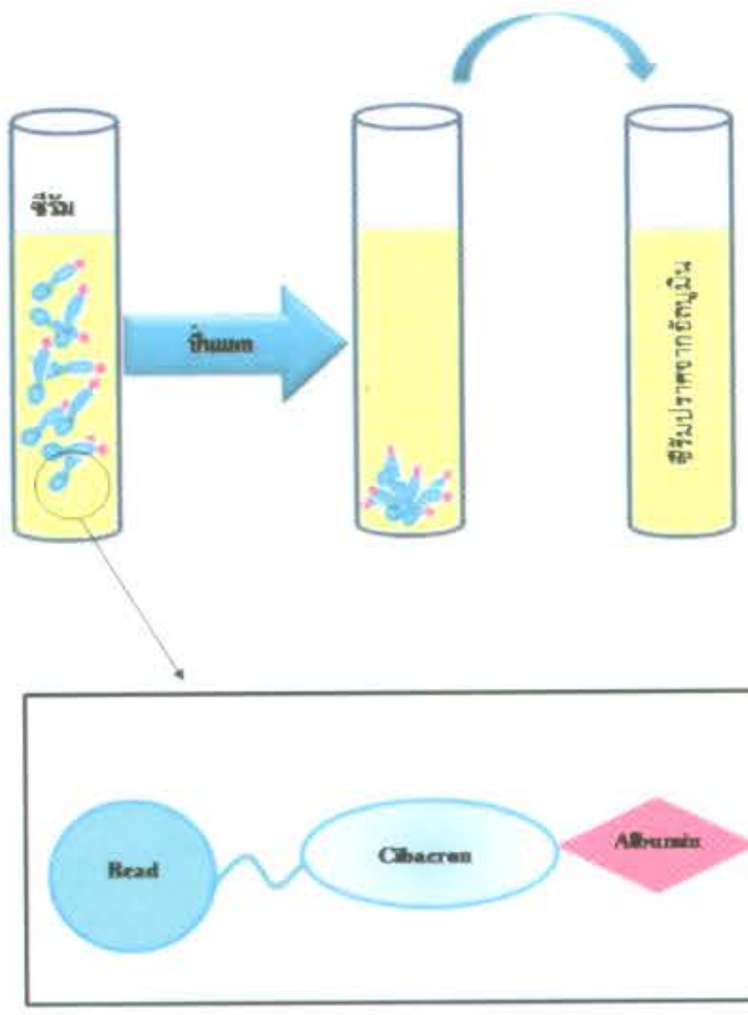
1. การใช้ cibacron blue gels

อัลบูมินจับกับ cibacron blue gels ได้โดยอาศัยโครงสร้างที่มีลักษณะการต่อกันเป็นวงแหวนที่ถูกยึดติดอยู่บนผิวของเม็ดพลาสติก (bead) ด้วยพันธะโควาเลนต์ เรียกโครงสร้างนี้ว่า cibacron blue gels (รูปที่ 1) ในธรรมชาติอัลบูมินจะทำหน้าที่เป็นตัวพาโดยจะจับกับโปรตีนได้หลายชนิด ดังนั้น cibacron blue gels จึงได้มีการออกแบบตามโครงสร้างที่พบในธรรมชาติเพื่อใช้ในการจับกับอัลบูมิน ด้วยพันธะอย่างอ่อน



รูปที่ 1 โครงสร้าง cibacron blue 3G-A (สูตรโมเลกุล $C_{29}H_{20}ClN_7O_{11}S_3$, น้ำหนักโมเลกุล 774.16) Cibacron blue 3G-A.
(ที่มา: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB2498003.htm)

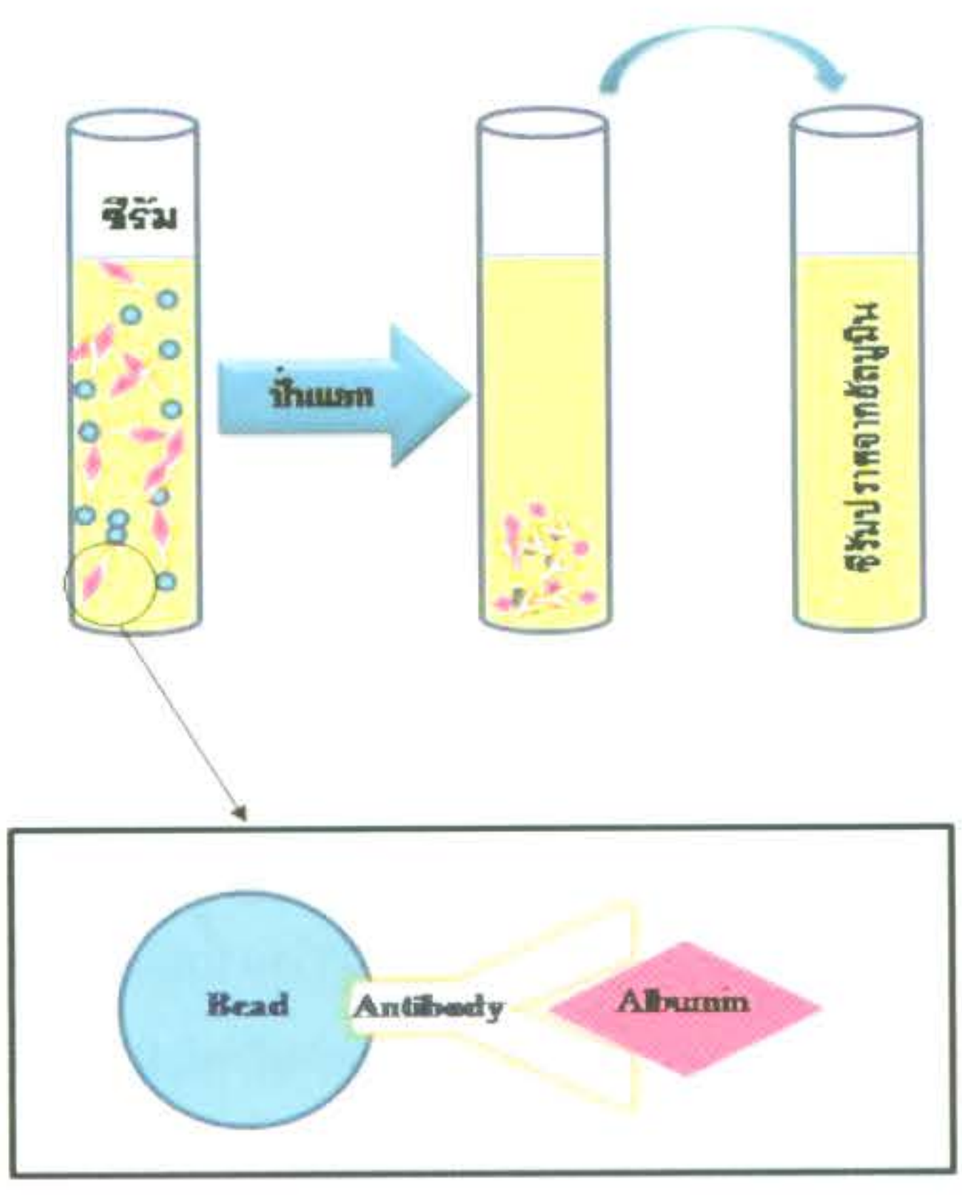
จากการศึกษาของ ศิริพร ภัทรกิจกำจรและคณะ (2009) พบว่าการนำ cibacron blue gels มาใช้ในการจับอัลบูมินในซีรัม สามารถทำได้ง่าย โดยผสมซีรัมกับ cibacron blue gels ในอัตราส่วนที่กำหนดและในสภาวะที่มีความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม cibacron blue gels ก็จะสามารถจับกับอัลบูมินในซีรัม ในเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากปั่นแยก (spin down) อัลบูมินจะถูกแยกออกและสามารถนำส่วนใสที่ปราศจากอัลบูมินไปศึกษาต่อไป (รูปที่ 2) วิธีการนี้สามารถกำจัดอัลบูมินได้มากกว่าร้อยละ 60 อย่างไรก็ตามการจับกันระหว่าง cibacron blue gels และอัลบูมินนั้นมีความจำเพาะต่ำจึงสามารถจับกับโปรตีนชนิดอื่นได้อีก (Subramanian, 1984; Colantonio et al., 2005) โดยพบว่ามีโปรตีนหลายชนิดที่ถูกกำจัดออกไปในระหว่างกระบวนการนี้ เช่น ซีโรทรานสเฟอริน (serotransferrin), อัลฟา1-แอนติทริปซิน (α1-antitrypsin), อะโพไลโพโปรตีน (apolipoprotein) อีกทั้งยังพบว่ามีการสูญเสียโปรตีนชนิดอื่นๆ ที่จับอยู่กับอัลบูมินอีกด้วย (Granger et al., 2005) อย่างไรก็ดี Ahmed Kassab et al. (2000) ทดสอบว่า cibacron blue gels ยังสามารถนำกลับมาใช้ได้อีก



รูปที่ 2 เทคนิคการใช้ cibacron blue gels ที่แยกอัลบูมินในซีรัม

2. Immunoaffinity depletion method

หลักการ antigen-antibody complex คือ การนำแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนเป้าหมายมาตรึงอยู่บนผิวของเม็ดพลาสติกด้วยพันธะโควาเลนต์ จากนั้นเมื่อนำซีรัมมาผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะ เช่น anti-albumin antibody ก็จะสามารถจับและแยกอัลบูมินออกจากซีรัมได้อย่างจำเพาะ จากการศึกษาของ Nitin Seam et al. (2007) พบว่าสามารถกำจัดอัลบูมินได้มากกว่าร้อยละ 95 (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 เทคนิค immunoaffinity depletion method ที่แยกอัลบูมินในซีรัม

เทคนิคนี้สามารถนำมาใช้กำจัดโปรตีนที่มีปริมาณมากได้อย่างจำเพาะและสามารถนำแอนติบอดีหลากหลายชนิดที่จำเพาะมาจับกับโปรตีนเป้าหมายได้อีกด้วย (Linke et al., 2007; Cellar et al., 2009) แอนติบอดีที่มักนำมาตรึงอยู่บนผิวของเม็ดพลาสติกส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มโปรตีนที่มีปริมาณมาก ได้แก่ albumin, IgG, transferrin, IgM, haptoglobin, fibrinogen และ (1-anti-trypsin เป็นต้น สำหรับข้อจำกัดของการใช้เทคนิคนี้ คือ การมีโปรตีนชนิดอื่นๆ ซึ่งจับอยู่กับโปรตีนที่มีปริมาณมาก จึงทำให้โปรตีนอื่นๆถูกกำจัดออกไปด้วย (Brand et al., 2006; Sahab et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีราคาสูงเมื่อเทียบกับวิธี cibacron blue gels (ตารางที่ 1) และไม่เหมาะที่จะนำกลับมาใช้อีก

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบเทคนิคการกำจัดโปรตีนที่มีปริมาณมาก

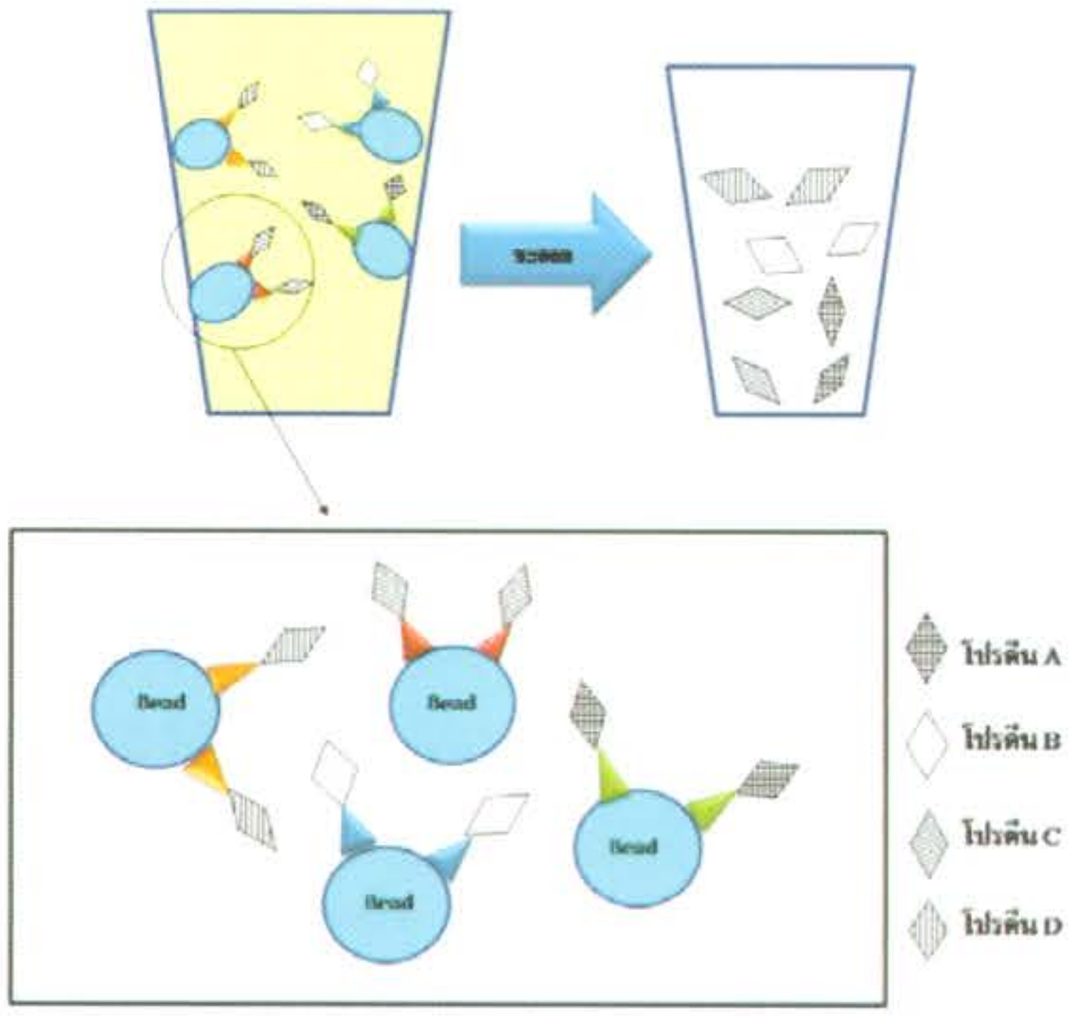
เทคนิค / ข้อเปรียบเทียบ	**Cibacron blue gels**	**Immunoaffinity depletion method**	**Equalizer bead technology**
หลักการ	affinity	antibody affinity	affinity
ความจำเพาะ	ต่ำ	สูง	ปานกลาง
ระยะเวลา	1-2 ชั่วโมง	มากกว่า 5 ชั่วโมง	1-2 ชั่วโมง
ปริมาณตัวอย่าง	น้อย	น้อย	น้อย
ชนิดตัวอย่าง	ซีรัม	ซีรัม	ซีรัม ชิ้นเนื้อ สารเหลวในร่างกายอื่นๆ
ราคา	ถูก	แพง	ปานกลาง

การแย่งจับของโปรตีนที่ต้องการ (enrichment techniques)

The equalizer bead technology

การสังเคราะห์สายโพลีเปปไทด์ที่สามารถจับกับโปรตีนได้อย่างหลากหลาย ซึ่งเกิดจากการออกแบบสายโพลีเปปไทด์ชนิด “เฮกซะเปปไทด์” ที่จะสามารถสร้างต้นแบบของโปรตีนได้มากถึง 64,000,000 ชนิด (Boschetti et al., 2008) สำหรับสายโพลีเปปไทด์ดังกล่าวจะถูกนำมาตรึงไว้บนเม็ดพลาสติก (sepharose) ด้วยพันธะโควาเลนต์ เรียก equalizer beads ในอัตราส่วนที่เท่ากันจะสามารถจับกับโปรตีนทุกชนิดได้ในปริมาณเท่ากัน (Boschetti et al., 2008) เรียก equivalent binding capacity ซึ่งเมื่อนำโปรตีนที่จับอยู่บนเม็ดพลาสติกออกมาทำการวิเคราะห์ก็จะพบว่าสามารถลดการบดบังของโปรตีนที่มีปริมาณมากและยังทำให้โปรตีนที่มีปริมาณน้อยถูกตรวจพบด้วยกลไกดังกล่าวจะทำให้สารบ่งชี้ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ ถูกค้นพบได้ง่ายมากขึ้น (รูปที่ 4) จากการศึกษาในเบื้องต้น ศิริพร ภัทรกิจกำจร และคณะ (unpublished data) พบว่าแบบแผน 2DE ของโปรตีนในซีรัมที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธีนี้ มีความแตกต่างจากอีก 2 วิธีข้างต้น

สำหรับเทคนิคนี้ สามารถประยุกต์ใช้กับตัวอย่างชนิดอื่นๆ ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ เช่น สารเหลวในร่างกาย, ชิ้นเนื้อ และเซลล์เพาะเลี้ยง เป็นต้น รวมทั้งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการแยกโปรตีนชนิด recombinant DNA product อีกด้วย (Boschetti et al., 2008) ทั้งนี้ไม่แนะนำการใช้พลาสมาในการศึกษาเนื่องจากอาจเกิดการเกาะกลุ่มของโปรตีน นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดคือ การจับกันของโปรตีนและ equalizer beads จะจับด้วยพันธะอ่อนๆ อาจทำให้หลุดออกจากกันได้ง่าย (Thulasiraman et al., 2005; Boschetti et al., 2008)



รูปที่ 4 เทคนิค equalizer bead technology ที่จับกับโปรตีนต่างๆ ในตัวอย่าง

สรุป

การทราบหลักการ ข้อดีและข้อจำกัดของเทคนิคในการเตรียมตัวอย่างให้มีความเหมาะสมก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีโปรติโอมิคส์มีความสำคัญในการเพิ่มความไวในการตรวจพบโปรตีนที่เป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพที่มักมีปริมาณน้อย ทั้งนี้ในแต่ละวิธีมีหลักการที่แตกต่างกันออกไป สามารถเตรียมเองหรือใช้ชุดสำเร็จรูปที่มีผู้จำหน่ายจำนวนมาก ทำให้ผู้วิจัยต้องพิจารณาเลือกใช้เทคนิคเพื่อให้มีความเหมาะสมกับงานที่ศึกษา ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาในการศึกษาและเพิ่มโอกาสในการค้นพบสารบ่งชี้ทางชีวภาพในขั้นสูงต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ศิริพร ภัทรกิจกำจร, ศุภรินทร์ อ้อมนอก, สิริลักษณ์ วิโรจน์สัตตบุษย์, ลิ่มทอง พรหมดี และดวงฤดี จังตระกูล (2009). การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดอัลบูลมินออกจากซีรัมด้วยวิธี bromcresol green method. Journal of medical technology and physical therapy. 21(1): (supplement): 78.

Aebersold, R. and Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. Nature. 422(6928): 198-207.

Ahmed, N., Barker, G., Oliva, K., Garfin, D., Talmadge, K., Georgiou, H., Quinn, M. and Rice, G. (2003). An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum. Proteomics. 3(10): 1980-7.

Anderson, L. (2005). Candidate-based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease. J Physiol. 563(Pt 1): 23-60.

Bjorhall, K., Miliotis, T. and Davidsson, P. (2005). Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. Proteomics. 5(1): 307-17.

Block, T. M., Comunale, M. A., Lowman, M., Steel, L.F., Romano, P. R., Fimmel, C., Tennant, B. C., London, W. T., Evans, A. A., Blumberg, B. S., Dwek, R. A., Mattu, T. S. and Mehta, A. S. (2005). Use of targeted

glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans. Proc Natl Acad Sci U S A. 102(3): 779-84.

Bodzon-Kulakowska, A., Bierczynska-Krzysik, A., Dylag, T., Drabik, A., Suder, P., Noga, M., Jarzebinska, J. and Silberring, J. (2007). Methods for samples preparation in proteomic research. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 849(1-2): 1-31.

Boschetti, E. and Giorgio Righetti, P. (2008). Hexapeptide combinatorial ligand libraries: the march for the detection of the low-abundance proteome continues. Biotechniques. 44(5): 663-5.

Brand, J., Haslberger, T., Zolg, W., Pestlin, G. and Palme, S. (2006). Depletion efficiency and recovery of trace markers from a multiparameter immunodepletion column. Proteomics. 6(11): 3236-42.

Cellar, N. A., Karnoup, A. S., Albers, D. R., Langhorst, M. L. and Young, S. A. (2009). Immunodepletion of high abundance proteins coupled on-line with reversed-phase liquid chromatography: a two-dimensional LC sample enrichment and fractionation technique for mammalian proteomics. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 877(1-2): 79-85.

Colantonio, D. A., Dunkinson, C., Bovenkamp, D. E. and Van Eyk, J. E. (2005). Effective removal of albumin from serum. Proteomics. 5(15): 3831-5.

Garbis, S., Lubec, G. and Fountoulakis, M. (2005). Limitations of current proteomics technologies. J Chromatogr A. 1077(1): 1-18.

Gatlin, C. L., Kleemann, G. R., Hays, L. G., Link, A. J. and Yates, J. R., 3rd. (1998). Protein identification at the low femtomole level from silver-stained gels using a new fritless electrospray interface for liquid chromatography-microspray and nanospray mass spectrometry. Anal Biochem. 263(1): 93-101.

Granger, J., Siddiqui, J., Copeland, S. and Remick, D. (2005). Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines. Proteomics. 5(18): 4713-8.

Kassab, A., Yavuz, H., Odabasi, M. and Denizli, A. (2000). Human serum albumin chromatography by Cibacron Blue F3GA-derived microporous polyamide hollow-fiber affinity membranes. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 746(2): 123-32.

Keidel, E. M., Ribitsch, D. and Lottspeich, F. (2010). Equalizer technology--Equal rights for disparate beads. Proteomics. 10(11): 2089-98.

Kenny, P. T. and Orlando, R. (1992). Tandem mass spectrometric analysis of peptides at the femtomole level. Anal Chem. 64(8): 957-60.

Khan, S. A., Thomas, H. C., Davidson, B. R. and Taylor-Robinson, S. D. (2005). Cholangiocarcinoma. Lancet. 366(9493): 1303-14.

Linke, T., Doraiswamy, S. and Harrison, E. H. (2007). Rat plasma proteomics: effects of abundant protein depletion on proteomic analysis. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 849(1-2): 273-81.

Luque-Garcia, J. L. and Neubert, T. A. (2007). Sample preparation for serum/plasma profiling and biomarker identification by mass spectrometry. J Chromatogr A. 1153(1-2): 259-76.

Sahab, Z. J., Iczkowski, K. A. and Sang, Q. X. (2007). Anion exchange fractionation of serum proteins versus albumin elimination. Anal Biochem. 368(1): 24-32.

Sardana, G., Jung, K., Stephan, C. and Diamandis, E. P. (2008). Proteomic analysis of conditioned media from the PC3, LNCaP, and 22Rv1 prostate cancer cell lines: discovery and validation of candidate prostate cancer biomarkers. J Proteome Res. 7(8): 3329-38.

Sardana, G., Marshall, J. and Diamandis, E.P. (2007). Discovery of candidate tumor markers for prostate cancer via proteomic analysis of cell culture-conditioned medium. Clin Chem. 53(3): 429-37.

Seam, N., Gonzales, D. A., Kern, S. J., Hortin, G. L., Hoehn, G. T. and Suffredini, A. F. (2007). Quality control of serum albumin depletion for proteomic analysis. Clin Chem. 53(11): 1915-20.

Subramanian, S. (1984). Dye-ligand affinity chromatography: the interaction of Cibacron Blue F3GA with proteins and enzymes. CRC Crit Rev Biochem. 16(2): 169-205.

Thulasiraman, V., Lin, S., Gheorghiu, L., Lathrop, J., Lomas, L., Hammond, D. and Boschetti, E. (2005). Reduction of the concentration difference of proteins in biological liquids using a library of combinatorial ligands. Electrophoresis. 26(18): 3561-71.

Xue, H., Lu, B., Zhang, J., Wu, M., Huang, Q., Wu, Q., Sheng, H., Wu, D., Hu, J. and Lai, M. (2010). Identification of serum biomarkers for colorectal cancer metastasis using a differential secretome approach. J Proteome Res. 9(1): 545-55.

Zhang, H. and Chan, D. W. (2007). Cancer biomarker discovery in plasma using a tissue-targeted proteomic approach. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 16(10): 1915-7.

Zolotarjova, N., Martosella, J., Nicol, G., Bailey, J., Boyes, B.E. and Barrett, W.C. (2005). Differences among techniques for high-abundant protein depletion. Proteomics. 5(13): 3304-13.

Cibacron blue 3G-A. 22 ธันวาคม 2552. Available from URL:
http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB2498003.htm

ว.วิทย. มข. 39(1) 36-51 (2554) KKU Sci. J.39(1) 36-51 (2011)

แนวโน้มการใช้ประโยชน์จากอาร์เคียชอบเค็ม

Trend of Usage from Halophilic Archaea

ศิริลักษณ์ นามวงษ์ [1]

บทนำ

สภาวะแวดล้อมที่มีเกลือเป็นองค์ประกอบตั้งแต่ร้อยละ 15 ถึงความเข้มข้นของเกลืออิ่มตัว เหมาะกับการเจริญของอาร์เคียชอบเค็ม (Halophilic archaea) ในปัจจุบันค้นพบอาร์เคียชอบเค็มทั้งหมด 28 สกุล (Grant et al., 1990; Oren, 2006) โดยพบว่าสกุล *Halobacterium*, *Hbt. salinarum* สามารถผลิตแบคทีริโอโรดอปซิน (Bacteriorhodopsin) และทรานส์-แอสตาแซนธิน (trans-astaxanthin) สำหรับแบคทีริโอโรดอปซินมีคุณสมบัติทางด้านแสงและเคมีที่เหมาะสมสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวางในด้านอุปกรณ์อิเล็กโทรนิคระดับโมเลกุลและระบบแสงในคอมพิวเตอร์ เช่น เมมเบรนสังเคราะห์ (artificial membrane), โฮโลกราฟิกฟิล์ม (holographic films) ไบโอชิพ (biochip) และหน่วยความจำในคอมพิวเตอร์ (memory) รวมทั้งใช้เป็นแผ่นกรองรังสีเพื่อป้องกันรังสีเข้าสู่สายตา สำหรับทรานส์-แอสตาแซนธินอยู่ในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ (carotenoid) มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเช่นเดียวกับวิตามินอี (Han et al., 2008; Rodriguez-Valera, 1992; Grout, 2000; Bramley, 2000) สกุล *Haloferax*, *Hfx. mediterranei* และสกุล *Halopiger*, *Hpg. aswanensis* สามารถผลิตโพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอต [polyhydroxy alkanoate (PHA)] ซึ่งย่อยสลายได้ในธรรมชาติ สามารถนำกลับมาหลอมใช้ใหม่และไม่ทำให้ร่างกายเกิดอาการแพ้ รวมทั้งไม่เป็นพิษกับเซลล์ (Rodriguez-Valera et al., 1992; Hezayen et al., 2002) นอกจากนี้พบว่าอาร์เคียชอบเค็มสามารถปรับตัวให้เจริญในสภาวะที่มีเกลือโดยการผลิตสารละลายที่ทำหน้าที่รักษาสมดุลแรงดันออสโมติกระหว่างภายในกับภายนอกเซลล์ (compatible solutes) และเอนไซม์ชอบเค็ม (halophilic enzymes) สารอินทรีย์ที่ละลายน้ำเป็นสารที่มีขนาดเล็กและไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ เช่น เบทาอีน (betaine) อิคโทอีน (ectoine) ทรีฮาโลส (trehalose) และ ซัลโฟทรีฮาโลส (sulfotrehalose) สารดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง (Muller et al., 2005; Martin et al., 1999) สำหรับเอนไซม์ชอบเค็มมีคุณสมบัติพิเศษ คือ สามารถแสดงกิจกรรมได้ในสภาวะที่มีเกลือ เช่น เอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์โปรติเอส และ เอนไซม์ไลเปส (Hutcheon et al., 2005; Capiralla et al., 2002; Boutaiba et al., 2006) ในด้านสิ่งแวดล้อมอาร์เคียชอบเค็มสามารถสลายสารพิษในของเสียที่มีเกลือสูงจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น

[1] สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา เขตดุสิต กรุงเทพฯ 10300
E-mail: sirilak.na@ssru.ac.th

แอลเคน (alkane; tetradecane, hexa decane, eicosane, heneicosane และ pristane) และ อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (aromatic hydrocarbons; acenaphtene, phenaphtrene, anthracene และ 9-methyl-anthracene) (Bertrand et al., 1990)

เนื่องจากอาร์เคียชอบเค็มสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลายด้าน เช่น ด้านคอมพิวเตอร์ (แบคทีริโอโรดอปซิน) อาหารและยา (แคโรทีนอยด์ โพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอต และเอนไซม์ชอบเค็ม) และสิ่งแวดล้อม (โพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอตและเอนไซม์ชอบเค็ม) อย่างไรก็ตาม อาร์เคียชอบเค็มจัดเป็นจุลินทรีย์อีกกลุ่มที่เป็นทางเลือกสำหรับใช้ประโยชน์ในอนาคต ในปัจจุบันยังไม่ค่อยมีการใช้ประโยชน์จากอาร์เคียชอบเค็มมากนัก ดังนั้นการศึกษาอนุกรมวิธานของอาร์เคียชอบเค็ม การปรับตัวให้กับสภาวะแวดล้อมที่มีเกลือ คุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติทางอนุกรมวิธานเคมี จักเป็นการเพิ่มศักยภาพสูงสุดในการผลิตผลิตภัณฑ์ของอาร์เคียชอบเค็มและลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการผลิต รวมทั้งการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ในอนาคต

อนุกรมวิธานของอาร์เคียชอบเค็ม (Taxonomy of Halophilic Archaea)

อาร์เคียชอบเค็มสามารถเจริญได้ดีในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือความเข้มข้นตั้งแต่ 15 เปอร์เซ็นต์ จนถึงความเข้มข้นของเกลืออิ่มตัว (saturated NaCl) เช่น ทะเลสาบน้ำเค็ม (salt lake) ทะเลสาบน้ำเค็มที่มี pH เป็นด่าง (soda lake) ดินเค็มที่เกิดจากการระเหยของน้ำให้มีเกลือความเข้มข้นสูง (salterns) และอาหารหมักที่ใช้เกลือถนอมอาหารปริมาณสูง (fermented food) โดยความเข้มข้นของเกลือที่ทำให้อาร์เคียชอบเค็มเจริญเติบโตได้ดีที่สุด คือ ร้อยละ 20 ในบัจจุบันอาร์เคียชอบเค็มมีทั้งหมด 28 สกุล ซึ่งแสดงลำดับขั้นของอนุกรมวิธานของอาร์เคียชอบเค็มอ้างอิงตามรูปแบบของ Grant and Larsen (1990); Oren (2006) (รูปที่ 1)

การศึกษาด้านอนุกรมวิธานของอาร์เคียชอบเค็มใช้วิธี Polyphasic taxonomy ประกอบไปด้วย การศึกษาคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ (phenotypic characteristics) คุณสมบัติทางจีโนไทป์ (genotypic characteristics) และอนุกรมวิธานเคมี (chemotaxonomic characteristics) (Oren et al., 1997) สำหรับประเทศไทยมีรายงานการค้นพบอาร์เคียชอบเค็มจำนวน 4 สกุล คือ *Halobacterium* (*Hbt. salinarum* และ *Hbt. piscisalsi*), *Haloarcula* (*Har. salaria* และ *Har. tradensis*), *Natrinema* (*Nmn. gari*) และ *Halococcus* (*Hcc. Thailandensis*, *Hcc. saccharolysitcus* และ *Hcc. morrhuae*) โดยเป็นอาร์เคียชอบเค็มสายพันธุ์ใหม่ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ คือ *Hbt. piscisalsi*, *Har. salaria*, *Har. tradensis*, *Nmn. gari* และ *Hcc. thailandensis* แสดงดังแผนภูมิต้นไม้ (รูปที่ 2) (Namwong et al., 2007; Namwong et al., inpress; Tanasupawat et al., 2008-2009; Yachai et al., 2008; Tapingkae et al., 2008)

การค้นพบอาร์เคียชอบเค็มสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะแวดล้อมแตกต่างกันไป ถือเป็นแนวโน้มที่จะเพิ่มโอกาสพบอาร์เคียชอบเค็มที่จะมีคุณสมบัติเด่นบางประการที่ดีกว่าอาร์เคียชอบเค็มที่เคยมีรายงานมาแล้ว ซึ่งเป็นอีกทางเลือกเพื่อนำไปใช้สำหรับเป็นผู้ผลิตผลิตภัณฑ์ทางการค้า ดังนั้นการศึกษาคุณสมบัติของอาร์เคียชอบเค็มในด้านต่างๆ เช่น การปรับตัวในสภาวะที่มีเกลือ (osmoadaptation) คุณสมบัติทางฟีโนไทป์ (phenotypic characteristics) และคุณสมบัติทางอนุกรมวิธานเคมี (chemotaxonomic characteristics) จะทำให้สามารถตัดสินใจเลือกใช้อาร์เคียชอบเค็มที่มีคุณสมบัติที่ผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้มากที่สุด และใช้ต้นทุนการผลิตต่ำ

Domain *Archaea*

Kingdom *Euryarchaeota*

Phylum *Euryarchaeota*

Class *Halobacteria*

Order *Halobacteriales*

Family *Halobacteriaceae*

Genus *Haladaptatus* (*Hap.*)

Genus *Haloalcalophilium* (*Hac.*)

Genus *Halobacterium* (*Hbt.*)

Genus *Halobiforma* (*Hbf.*)

Genus *Haloferax* (*Hfx.*)

Genus *Halogeometricum* (*Hgm.*)

Genus *Halopiger* (*Hpg.*)

Genus *Haloquadratum* (*Hqr.*)

Genus *Halosimplex* (*Hsx.*)

Genus *Halostagnicola* (*Hst.*)

Genus *Halovivax* (*Hvx.*)

Genus *Natrinema* (*Nnm.*)

Genus *Natronococcus* (*Ncc.*),

Genus *Natronomonas* (*Nmn.*)

Genus *Halalkalicoccus* (*Hac.*)

Genus *Haloarcula* (*Har.*)

Genus *Halobaculum* (*Hbl.*)

Genus *Halococcus* (*Hcc.*)

Genus *Halorhabdus* (*Hrd.*)

Genus *Halomicrobium* (*Hmc.*)

Genus *Haloplanus* (*Hpn.*)

Genus *Halorubrum* (*Hrr.*)

Genus *Halosarcina* (*Hsn.*)

Genus *Haloterrigena* (*Htg.*)

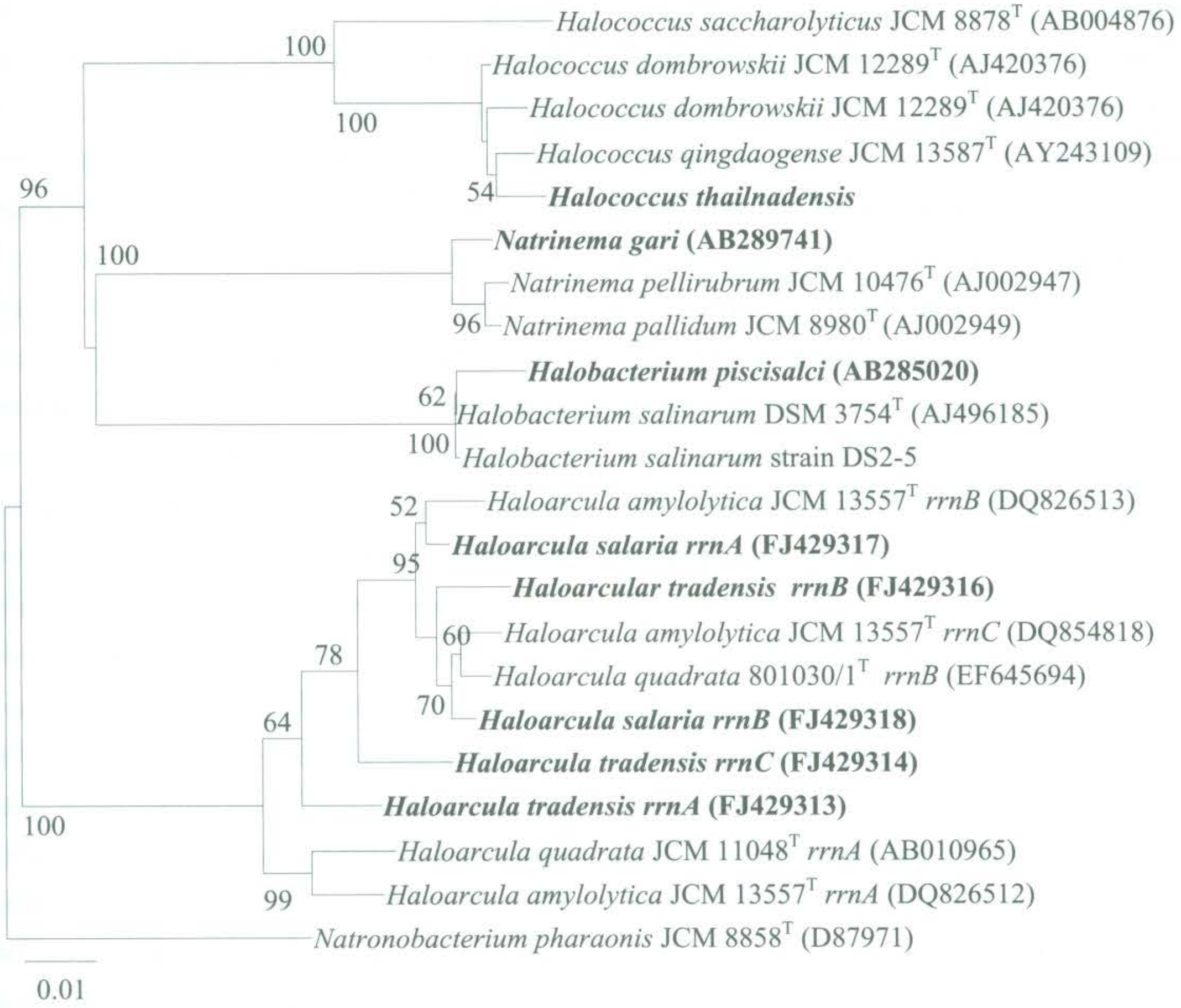
Genus *Natrialba* (*Nab.*)

Genus *Natronobacterium* (*Nbt.*),

Genus *Natronolimnobius* (*Nln.*)

Genus *Natronorubrum* (*Nrr.*)

รูปที่ 1 ลำดับขั้นอนุกรมวิธานของอาร์เคียชอบเค็ม (ที่มา: Oren, 2006)



รูปที่ 2 แสดงแผนภูมิต้นไม้ของอาร์เคียชอบเค็มสายพันธุ์ใหม่ที่คัดแยกจากประเทศไทย (ที่มา: Namwong et al., 2007; Namwong et al., inpress; Yachai et al., 2008; Tapingkae et al., 2008)

การปรับตัวของอาร์เคียชอบเค็มในสภาวะที่มีเกลือ (Osmotic adaptation of halophilic archaea)

ในสภาวะสมดุล (osmotic balance) ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายภายใน (intracellular solutes, S) กับภายนอกเซลล์ทำให้เซลล์จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้และคงรูปร่างเดิม (รูปที่ 3.1) ในสภาวะที่มีเกลือสูง (hypertonic condition) ความเข้มข้นของสารละลายภายนอกเซลล์มีมากกว่าภายในเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้น้ำภายในเซลล์ไหลออกนอกเซลล์เพื่อปรับสมดุลระหว่างเซลล์กับสิ่งแวดล้อม ส่งผลให้เซลล์สูญเสียน้ำ (dehydration) จนในที่สุดเซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโต (รูปที่ 3.2) สำหรับอาร์เคียชอบเค็มสามารถเจริญได้ดีในสภาวะดังกล่าวเนื่องจากมีกระบวนการปรับตัวในสภาวะแวดล้อมที่มีเกลือ ดังต่อไปนี้

1. เพิ่มปริมาณไอออนสารอนินทรีย์ (Accmulation of inorganic ions)

เช่น *Halobacterium salinarum* ตรวจพบโซเดียมไอออน (Na^+) ภายนอกเซลล์ประมาณ 4.0 โมลาร์ แต่มีปริมาณโพแทสเซียมไอออนภายในเซลล์มากถึง 4.57 โมลาร์ (Martin et al., 1999; Christian

and Waltho, 1962) การเพิ่มปริมาณโพแทสเซียมไอออน (K+) ภายในเซลล์ของอาร์เคียชอบเค็มอาศัยการทำงานรวมกันระหว่างแบคทีริโอโรดอปซินและ ATPase แบคทีริโอโรดอปซินทำหน้าที่ขนส่งโพรทอนออกจากเซลล์ในสภาวะที่มีแสง ทำให้เกิดความแตกต่างของโพรทอนภายในกับภายนอกเซลล์ (proton gradient) และเกิดการไหลกลับของโพรทอนบริเวณ ATPase หรือ Na^+/H^+ antiporter ขณะการนำโพรทอนเข้าเซลล์ที่บริเวณ Na^+/H^+ antiporter จะเกิดการขนส่งโซเดียมไอออนออกจากเซลล์ผ่านทาง Na^+/H^+ antiporter เช่นกัน และมีการนำโพแทสเซียมไอออนเข้าเซลล์แบบการแพร่ (passive transport) ผ่าน uniport ที่บริเวณเซลล์เมมเบรน เพื่อให้เกิดสมดุลทางประจุภายในเซลล์ (electroneutrality) (Lanyi and Hilliker, 1976) สำหรับอาร์เคียชอบเค็มที่ไม่มีแบคทีริโอโรดอปซิน เช่น *Haloferax valcanii* จะนำโพแทสเซียมไอออนเข้าเซลล์โดยวิธี Active transport โดยใช้ ATP-driven transport system (Meury and Kohiyama, 1989) ในปี 2000 Ng และคณะ ศึกษาจีโนมของ *Halobacterium* strain NRC-1 พบว่านอกจาก Na^+/H^+ antiporter ที่ทำหน้าที่ขนส่งโซเดียมไอออนออกจากเซลล์ ยังพบบริเวณอื่นที่ทำหน้าที่ขนส่งโซเดียมไอออน คือ NhaC proteins และค้นคบระบบการนำเข้าโพแทสเซียมไอออน 2 แบบ คือ Passive transport และ Active transport (ATP-driven transport system, KdpABC และ TrkAH)

2. เพิ่มการนำเข้าหรือสังเคราะห์สารละลายที่ทำหน้าที่รักษาสมดุลแรงดันออสโมติกระหว่างภายในกับภายนอกเซลล์ (Accumulation of Compatible solutes by transport or synthesis)

สารที่ทำหน้าที่รักษาสมดุลแรงดันออสโมติกระหว่างภายในกับภายนอกเซลล์อาร์เคียจัดเป็นสารที่มีขนาดเล็กและไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ จึงทำให้ตรวจพบความเข้มข้นของสารดังกล่าวภายในเซลล์อาร์เคียปริมาณสูง โดยเฉพาะสารที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นลบจะสามารถเข้าไปเกิดพันธะไอออนิกกับโพแทสเซียมไอออน เรียกว่า Counter ions กับ K^+ ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของสารที่ทำหน้าที่รักษาสมดุลแรงดันออสโมติกระหว่างภายในกับภายนอกอาร์เคียจะเป็นอัตราส่วนกับปริมาณโพแทสเซียมไอออน เพื่อให้เกิดสมดุลของความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์กับภายนอกเซลล์ โดยพบว่าในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงหรือเพิ่มขึ้นจากปกติ อาร์เคียชอบเค็มนิยมเพิ่มปริมาณของสารที่ทำหน้าที่รักษาสมดุลแรงดันออสโมติกระหว่างภายในกับภายนอกเซลล์ โดยนำเข้ามาจากอาหารที่อยู่ด้านนอกเซลล์มากกว่าสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ (รูปที่ 3.3) สารที่ทำหน้าที่รักษาสมดุลแรงดันออสโมติกระหว่างภายในกับภายนอกเซลล์ของเอาร์เคียแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1) สารอินทรีย์ที่มีประจุลบและบวก (zwitterionic Solutes) เช่น เบทาอีน อิคโทอีน และไฮดรอกซีอิคโทอีน (hydroxyectoine) 2) สารอินทรีย์ที่ไม่มีประจุ (noncharged solutes) เช่น ทีฮาโลส และ เอน-อะซิทิลกลูตามินิลกลูตาเมต เอไมด์ (acetylglutaminylglutamine amide) 3) สารอินทรีย์ที่มีประจุสุทธิเป็นลบ (anionic solutes) ที่มีหมู่ carboxylic phosphate หรือ sulfate เช่น แอล-แอลฟา-กลูตาเมต (L-α-glutamate) และ ซัลโฟทีฮาโลส ตัวอย่างการเพิ่มปริมาณของสารที่ทำหน้าที่รักษาสมดุลแรงดันออสโมติกระหว่างภายในกับภายนอกเซลล์เมื่ออาร์เคียชอบเค็มเจริญในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือ โดยเริ่มต้นจากอาร์เคียชอบเค็มจะเพิ่มปริมาณโพแทสเซียมไอออนและตามด้วยการเพิ่มปริมาณของ L-(-glutamate (G-) ภายในเซลล์จนสมดุลกับปริมาณของโพแทสเซียมไอออน (รูปที่ 3.4) โดยพบว่าในช่วงที่มีการปรับสมดุลจะไม่มีการเจริญเติบโตของอาร์เคียชอบเค็ม จนกระทั่งเข้าสู่สภาวะสมดุลอาร์เคียชอบเค็มจะเจริญเติบโตอย่างปกติในสภาวะแวดล้อมที่มีเกลือและอาจมีการสังเคราะห์สารที่ทำหน้าที่รักษาสมดุลแรงดันออสโมติกระหว่างภายในกับภายนอกเซลล์ของอาร์เคียชนิดอื่นๆ (N) (รูปที่ 3.5) สารที่ทำหน้าที่รักษาสมดุลแรงดันออสโมติกระหว่างภายในกับภายนอกเซลล์ของอาร์เคียสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในการผลิตยา

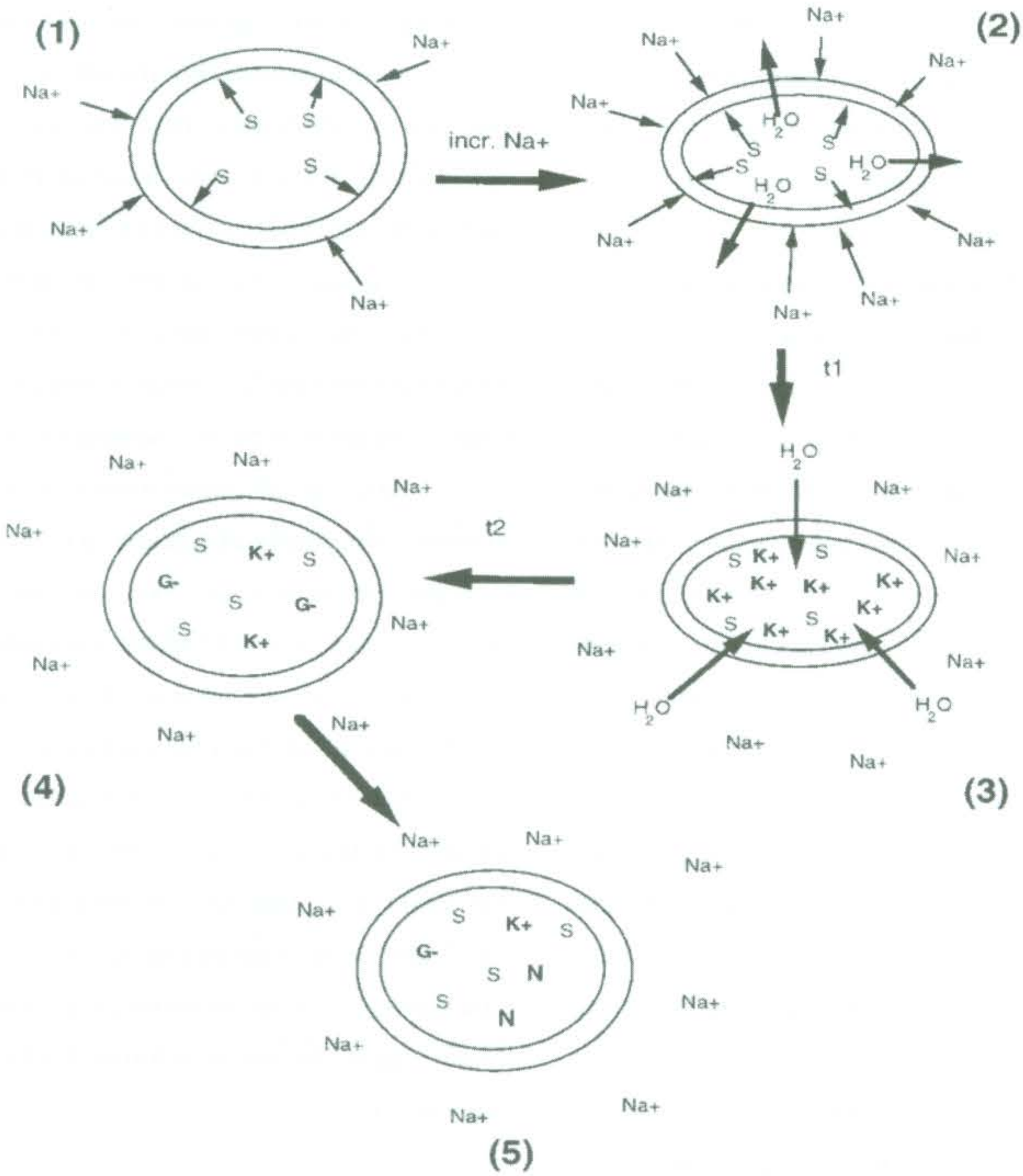
(pharmaceutical formulations) การเพิ่มความเสถียรของวัคซีน (vaccine stabilizers) เครื่องสำอาง (cosmetics) ผลิตภัณฑ์ถนอมผิว และป้องกันผิว (Skin treatment and protection) (Muller et al., 2005; Martin et al., 1999)

3. สร้างเอนไซม์ที่แสดงกิจกรรมได้ในสภาวะที่มีเกลือ (Halophilic enzymes)

ภายใต้สิ่งแวดล้อมที่มีเกลืออาร์เคียชอบเค็มสร้างโปรตีนที่สามารถแสดงกิจกรรมได้ในสภาวะที่มีเกลือ สาเหตุมากจากเอนไซม์ชอบเค็มมีปริมาณกรดอะมิโนที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นลบ (acidic amino acids) เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 25 ของกรดอะมิโนทั้งหมด (อัตราส่วน 1: 4) โดยปกติจะพบประมาณร้อยละ 16 (อัตราส่วน 1:6) และลดปริมาณกรดอะมิโนที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นบวก (basic amino acids) และหมู่ฟังก์ชันเป็นอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน เพื่อป้องกันการตกตะกอน เมื่อมีปริมาณโพแทสเซียมไอออนภายในเซลล์สูง เรียกว่า Salting-out effect โดยประจุลบของกรดอะมิโนจะเกิดพันธะไอออนิกกับโพแทสเซียมไอออน เพื่อลดแรงผลักระหว่างประจุลบ (repulsive interaction) ทำให้เอนไซม์ชอบเค็มมีโครงรูปที่เหมาะ (folding) และมีความเสถียร (Stability) (Madern et al., 2000: Izotova et al., 1983) ตัวอย่างเอนไซม์ชอบเค็ม เช่น เอนไซม์เอนโดเปปติเดส S9 (endopeptidase S9) ที่ผลิตจากอาร์เคียชอบเค็ม *Halobacterium halobium* S9 สามารถแสดงกิจกรรมย่อยสลายเคซีนได้ทั้งสภาวะที่มีเกลือและไม่มีเกลือ และมีประสิทธิภาพในการตัดเปปไทด์ที่ลักษณะเป็น X_1-Pro-X_3-X_4 หมายถึง Proline อยู่ตำแหน่งที่ 2 จากปลายสุด และกรดอะมิโนตำแหน่ง X_1 คือ ฟีนิลอะลานีน (penylalanine, Phe), ลิวซีน (leucine, Leu) และ อะลานีน (alanine, Ala) จากข้อมูลข้างต้น เอนไซม์เอนโดเปปติเดส S9 น่าจะสามารถช่วยแก้ปัญหาของการเกิดรสขมของโปรย่อยสลายโดยโปรตีนย่อยสลายผลิตโดยย่อยสลาย β-casein ด้วยเอนไซม์ทริปซิน ทำให้ได้ไฮโดรโฟบิก เปปไทด์ (hydrophobic peptide) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีรสขม เนื่องจากมี โพรลีน (proline, Pro) อยู่ในเปปไทด์ หลังจากเติมเอนไซม์เอนโดเปปติเดส S9 ลงไปในผลิตภัณฑ์ที่มีรสขมข้างต้น พบว่าเอนไซม์สามารถตัดพันธะเอไมด์ระหว่าง X_1-Pro ได้ทั้งหมด ทำให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์เปปไทด์สายสั้นลงที่ไม่มีโพรลีนเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นเอนไซม์เอนโดเปปติเดส S9 มีประสิทธิภาพในการลดความขมของโปรตีนย่อยสลาย ซึ่งโปรตีนย่อยสลายที่ไม่มีรสขมเป็นที่ต้องการสำหรับผลิตผลิตภัณฑ์อาหารเสริมและผลิตภัณฑ์ยา (Capiralla et al., 2002) ตัวอย่างเอนไซม์ชอบเค็มอื่นๆ ที่มีการศึกษา คือ เอนไซม์อะไมเลส จาก *Haloarcula hispanica* (Hutcheon et al., 2005) เอนโด-ไซลาแนส (endo-xylanase) และ ไซโลสิเดส (xylosidase) จาก *Halorhabdus utahensis* (WainØ et al., 2003) และเอนไซม์ไลเปส จาก *Natronococcus* (Boutaiba et al., 2006) กล่าวได้ว่าเอนไซม์ชอบเค็มสามารถนำไปประยุกต์ใช้กระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพที่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ในสภาวะที่มีเกลือและไม่มีเกลือ เช่น กำจัดความขมของโปรตีนย่อยสลาย เพื่อนำโปรตีนย่อยสลายที่ไม่มีรสขมไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริม รวมทั้งผลิตภัณฑ์ยา

คุณสมบัติทางฟีโนไทป์ (Phentypic characteristics)

การศึกษาคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ของอาร์เคียชอบเค็มใช้อาหารที่มีเกลือร้อยละ 20-25 เช่น JCM. no. 168 (20% NaCl) และ JCM. no. 169 (25% NaCl) ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้ คือ 100-250 กรัมของ NaCl, 5 กรัมของ casamino acid, 5 กรัมของ yeast extract, 1 กรัมของ glutamic acid; 2 กรัมของ KCl, 3 กรัมของ trisodium citrate, 20 กรัมของ $MgSO_4.7H_20$, 36 มิลลิกรัมของ $FeCl_2.4H_20$ หรือ $FeSO_4.4H_20$, 0.0036 มิลลิกรัมของ $MnCl_2.4H_20$ หรือ $MnSO_4$, 20 กรัมของ agar (Namwong et al., 2007; Namwong et al., inpress) คุณสมบัติชีวเคมีแรกที่จำเป็นต้องศึกษาสำหรับ



รูปที่ 3 แสดงการปรับตัวของอาร์เคียชอบเค็มในสภาวะที่มีเกลือ (ที่มา: Martin et al., 1999)

อาร์เคียชอบเค็ม คือ ช่วงของเกลือที่สามารถเติบโต (ร้อยละ 15-30) คุณสมบัติชีวเคมีที่สอง คือ ความเข้มข้นของเกลือที่ทำให้อาร์เคียชอบเค็มเจริญได้ดีที่สุด (ร้อยละ 20-25) สำหรับคุณสมบัติชีวเคมีอื่นๆ คือ รูปร่าง อาร์เคียชอบเค็มมีรูปร่างหลากหลายชนิด เช่น กลม (coccus) แท่ง (rods) (รูปที่ 4.a) สามเหลี่ยม (triangles) สี่เหลี่ยม (squars) และรูปร่างไม่แน่นอน (pleomorphic forms) สีโคโลนีของอาร์เคียชอบเค็มมีหลายเฉดสีตั้งแต่ส้มจนถึงสีแดง เนื่องจากปริมาณของแคโรทีนอยด์ที่เซลล์เมมเบรน โดยปริมาณแคโรทีนอยด์สูงจะทำให้โคโลนีมีสีแดงส้ม ถ้ามีปริมาณแคโรทีนอยด์น้อยสีโคโลนีจะเป็นสีส้ม โดยทั่วไป อาร์เคียชอบเค็มจะเจริญได้ดีที่สุดที่พีเอช 6.0-8.0 (ช่วงพีเอชที่เจริญได้ คือ พีเอช 5.0-10.0) แต่มีอาร์เคียชอบเค็มอีก 4 สกุล ที่เจริญได้ดีที่สุดที่พีเอชเป็นด่าง คือ สกุลที่มีชื่อขึ้นต้นด้วย Natro ซึ่งมาจากภาษาละตินว่า Natrun แปลว่า Soda (sodium carbonate); *Natronococcus*, *Natronomonas*, *Natrobacterium* และ *Natronorubrum* อาร์เคียชอบเค็มจัดเป็น Chemoorganotrophic เนื่องจากอาร์เคียชอบเค็มสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตและกรดอะมิโนเป็นแหล่ง

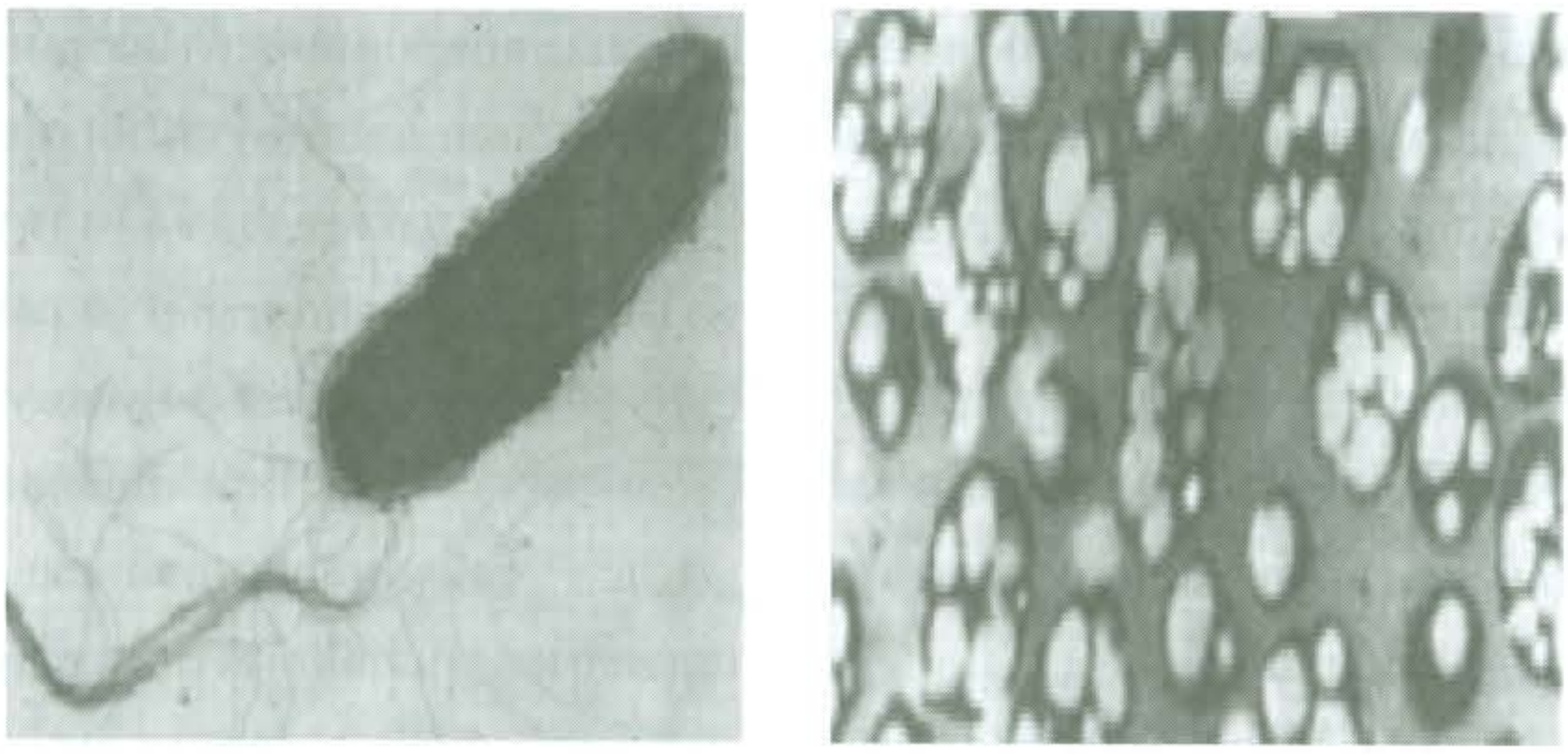
พลังงานและสามารถหมักน้ำตาลบางชนิดจนทำให้ได้กรด และส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนสำหรับการเจริญเติบโต (aerobe) บางกลุ่มสามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่ใช้ไนเตรต หรือ อาร์จินีนเป็นตัวรับอิเลคตรอน เช่น สกุล *Halobacterium* เป็นต้น (Grant et al., 1990; Oren, 2006)

ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินความต้องการ แต่สารอาหารอื่นมีปริมาณจำกัด อาร์เคียชอบเค็มจะเปลี่ยนสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนไปเป็นโพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (PHA) เช่น โพลีไฮดรอกซีบิวทิเรต [Polyhydroxybutyrate (PHB)] ซึ่งถูกสร้างในโปรคาริโอตเช่นกัน (รูปที่ 4a) PHA เป็นแหล่งสะสมพลังงาน และถูกนำมาใช้ในสภาวะที่ขาดแคลนอาหาร โดยอาร์เคียชอบเค็มจะสร้างเอนไซม์พิเอชเอ ดีโพลีเมอเรส (PHA depolymerase) เพื่อย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ภายในโครงสร้างของ PHA จนได้เป็นหน่อยย่อยของโพลีเมอร์ จากคุณสมบัติที่ถูกย่อยสลายได้ในธรรมชาติ จึงมีการนำ PHA เช่น PHB ไปผลิตเป็นพลาสติกย่อยสลายได้ และอุปกรณ์ทางการแพทย์ แต่พบว่า PHB มีลักษณะเปราะ แตกง่าย และไม่มีความยืดหยุ่น จึงทำให้มีการศึกษาเพื่อค้นหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA ที่มีคุณสมบัติที่ดีเดิม ในปี 1992 Rodriguez-Valera and Lillo ศึกษาการผลิต *PHA* จาก Haloferax. mediterranei พบว่าสามารถผลิต PHA ประมาณร้อยละ 60 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือน้อยกว่า 6 กรัม/ลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (batch culture) ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส หรือ แป้ง รวมทั้งมีปริมาณฟอสเฟตต่ำ โครงสร้างของ PHA ที่ได้ มีลักษณะเป็น co-polymer เรียกว่า poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (3HB-co-3HV) พบว่า 3HB-co-3HV มีความแข็ง เหนียว มีความยืดหยุ่น และ มีจุดหลอมเหลวต่ำ ซึ่งเป็นที่ต้องการของท้องตลาดมากกว่า PHB (Don et al., 2006; Chen et al., 2006) ถึงแม้ว่า PHA สามารถนำไปผลิตเป็นพลาสติกใช้ทดแทนพลาสติกที่ผลิตจากปิโตรเลียม แต่การใช้พลาสติกดังกล่าวยังไม่แพร่หลายเนื่องจากราคาต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูง โดยพบว่าครึ่งหนึ่งของต้นทุนมาจากค่าใช้จ่ายในการจัดซื้อแหล่งคาร์บอน (Choi and Lee, 1997) ดังนั้นจึงทำให้มีการศึกษาการลดต้นทุนการผลิต PHA จาก *Hfx. mediterranei* โดยเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก เช่น แป้งข้าวโพด รำข้าว และน้ำตาลจากหางนม (whey sugar เป็นน้ำตาลผสมระหว่างกาแลคโตสและกลูโคส โดยนำหางนมซึ่งเป็นส่วนที่เหลือจากกระบวนการผลิตชีสต์ไปย่อยสลายด้วยเอนไซม์ β-galactosidase) เป็นแหล่งคาร์บอน หลังสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ทำการแยก PHA ออกจากสารอื่นๆ โดยใช้การหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่ำเพื่อทำให้เซลล์ที่มีการสะสมของ PHA (รูป 4a) ตกตะกอนและล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นเพื่อทำให้เซลล์แตก และล้างด้วยน้ำอีกเพื่อกำจัดเศษเซลล์

โดยพบว่าการใช้น้ำตาลจากหางนมจะทำให้ *Hfx. Mediterranei* สามารถผลิต Poly (3-Hydroxybutyrate-co-6%-3-Hydroxyvalerate) (3HB-co-6%-3HV) ได้มากที่สุด คือร้อยละ 72.8 (0.09 $g^{-1}L^{-1}h^{-1}$) ซึ่งมีจุดหลอมเหลวที่ 150 และ 160 องศาเซลเซียส และพบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง (fed-batch culture) โดยการเติมน้ำตาลจากหางนม ไฮดรอกซีวาเลอเรต (hydroxyvalerate) และ ไฮดรอกซี บิวทิเรต (hydroxybutyrate) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Poly (3-Hydroxybutyrate-co-21.8%-3-Hydroxyvalerate-co-5.1%-3-Hydroxybutyrate) (3-HB-co-21.8%-3-HV-co-5.1%-3-HB) มากถึงร้อยละ 85 (0.14 $g^{-1}L^{-1}h^{-1}$) และ 3-HB-co-21.8%-3-HV-co-5.1%-3-HB มีจุดหลอมเหลว (140 และ 150 องศาเซลเซียส) ซึ่งต่ำกว่า 3HB-co-6%-3HV ถึง 10 องศาเซลเซียส (Koller et al., 2007) จัดเป็นแนวโน้มที่ดีสำหรับการนำโพลีเมอร์ข้างต้นไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ เนื่องจากมีจุดหลอมเหลวต่ำทำให้สามารถลดการใช้พลังงานในการหลอม PHA ก่อนการนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ

จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีทำให้ทราบว่าอาร์เคียชอบเค็มสามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถ

แสดงกิจกรรมได้ในสภาวะที่มีเกลือ เช่น เอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์โปรติเอส และ เอนไซม์ไลเปส รวมทั้งมีการสร้างโพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอต ดังนั้นแบคทีเรียชอบเค็มสูงจัดเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่น่าสนใจสำหรับใช้เป็นผู้ผลิตเอนไซม์ และโพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอตเนื่องจากสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์หลายชนิดรวมทั้งเจริญเติบโตในสภาวะที่มีเกลืออย่างน้อยร้อยละ 15 แสดงให้ทราบว่าการเพาะเลี้ยงอาร์เคียชอบเค็มจะไม่เกิดปัญหาการปนเปื้อนการเจริญของเชื้ออื่นๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และเมื่อต้องการขยายการเพาะเลี้ยงก็สามารถทำได้โดยง่ายและใช้ต้นทุนที่ต่ำเนื่องจากไม่ต้องใช้ระบบปลอดเชื้ออย่างไรก็ตามการนำอาร์เคียชอบเค็มไปใช้ประโยชน์ยังต้องคำนึงถึงการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นส่วนที่ใช้ค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากมีขั้นตอนที่สลับซับซ้อน จึงมีการศึกษาองค์ประกอบของเซลล์ของอาร์เคียชอบเค็ม เรียกว่า คุณสมบัติทางอนุกรมวิธานเคมี (Chemotaxonomic characteristics) ซึ่งการทราบองค์ประกอบของเซลล์อาร์เคียชอบเค็มทำให้สามารถเลือกใช้วิธีที่เหมาะสมในการนำผลิตภัณฑ์ออกจากเซลล์โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงและและมีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยาก



(a) (b)

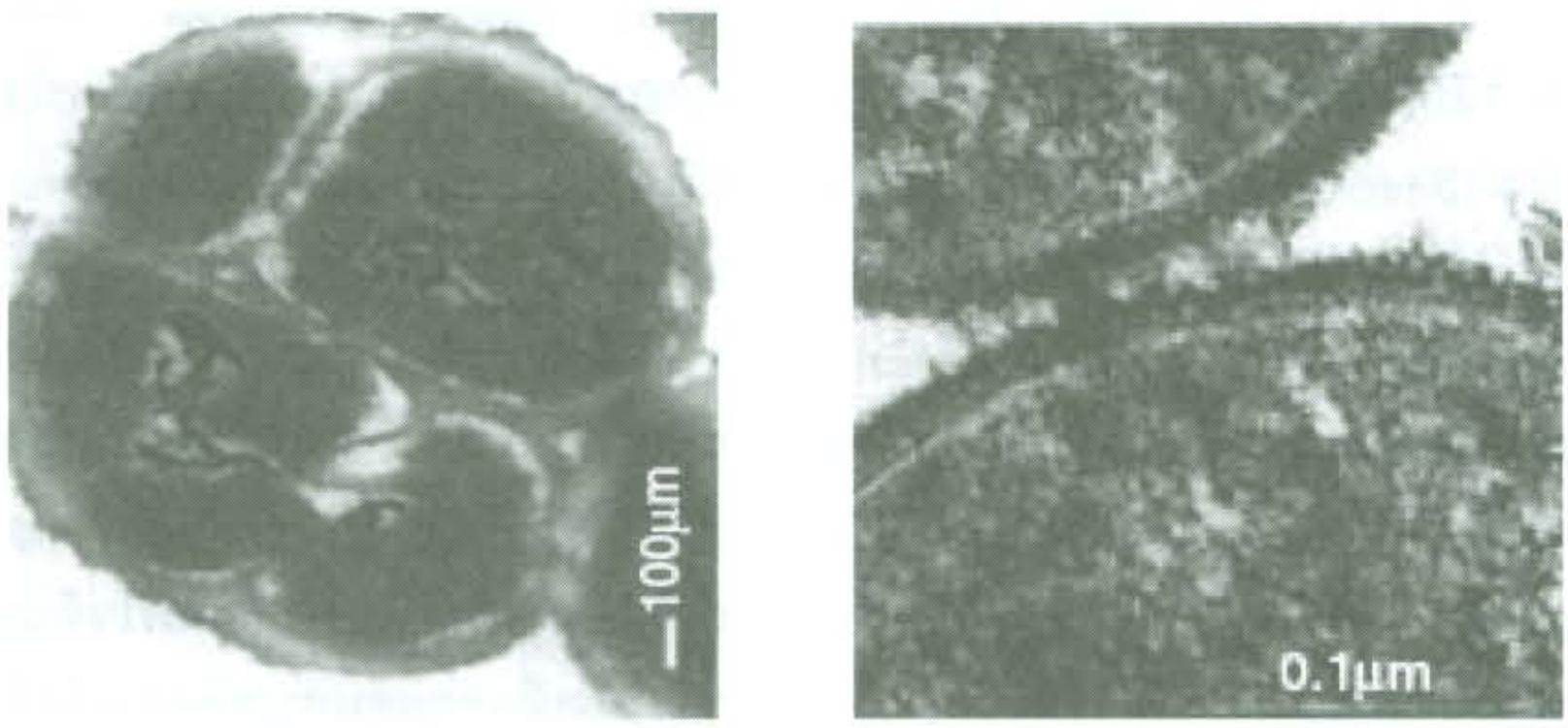
รูปที่ 4 รูปร่างของอาร์เคียชอบเค็ม (a) *Halobacterium salinarum* โดยกล้อง Scaning Electron Microscope และ (b) *Haloferax mediterranei* โดยกล้อง Transmission Electron microscopy นี้ แสดง polyhydroxyalkanoate granule ของ (ที่มา: Oren, 2006)

คุณสมบัติทางอนุกรมวิธานเคมี (Chemtotaxonomic characteristics)

องค์ประกอบของผนังเซลล์

อาร์เคียชอบเค็มรูปร่างแท่ง สามเหลี่ยม สี่เหลี่ยม และ รูปร่างไม่แน่นอน มีผนังเซลล์ที่บางมากเรียกว่า Surface-layer cell wall (S-layer) (รูป 5.a) โดย S-layer ประกอบด้วยไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ประมาณร้อยละ 40-50 และโปรตีนประมาณร้อยละ 15-20 ตัวอย่างเช่น S-layer ของ *Halobacterium salinarum* ประกอบด้วยไกลโคโปรตีนขนาด 120 กิโลดาลตัน ซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีน (87 กิโลดัลตัน) ซึ่งมีกรดอะมิโนที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นลบเป็นส่วนใหญ่ และโพลีเมอร์ของน้ำตาลซึ่งมี side chain เป็นประจุลบ (acidic saccharaide chains) เช่น acidic glycosaminoglycan โดยทุกๆ 10-15 โมเลกุลน้ำตาลจะมี 2 หมู่ซัลเฟต (SO_4^{2-}) เกาะอยู่ รวมทั้งพบ O-linked glucosyl-(α-1→(2)-galactoside disaccharide units ซึ่งเป็นน้ำตาลซึ่งมี side chain เป็นประจุลบ (neutral saccharaide chains) (Lechner and Wieland, 1989)

จากข้อมูลองค์ประกอบของ S-layer cell wall แสดงให้ทราบว่า S-layer ของอาร์เคียชอบเค็มมีปริมาณกรดอะมิโนที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นลบปริมาณมาก ดังนั้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีเกลือสูงโครงสร้างของโปรตีนจะอยู่ในโครงรูปที่เหมาะสม ไม่เกิดการผลักกันระหว่างประจุลบที่มีมาก (repulsive interaction) เนื่องจากมีประจุบวกหนึ่งของโซเดียมไอออน (Na^+) และประจุสองบวกของแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) เข้าไปเกิดพันธะไอออนนิก เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Shielding of negative charge by cation แต่เมื่ออยู่สภาวะที่มีเกลือต่ำ จะเกิดการผลักการระหว่างประจุลบเนื่องจากไม่มีประจุบวกของโซเดียมไอออนไปเกิดพันธะไอออนิกกับหมู่ฟังก์ชันเป็นลบของกรดอะมิโนที่ผนังเซลล์ ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้โครงสร้างของโปรตีนไม่อยู่ในโครงรูปที่เหมาะสม (unfolding) และไม่มีความเสถียร (destabilization) ทำให้โครงสร้างของผนังเซลล์ไม่แข็งแรง จึงทำให้ไม่สารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงความดันออสโมติกภายเซลล์ ที่เกิดจากการปรับสมดุล (osmotic balance) ระหว่างภายในกับภายนอก ทำให้เกิดการไหลของน้ำเข้าสู่เซลล์ภายนอกเซลล์ตลอดเวลา ส่งผลให้ให้เซลล์ค่อยๆ เปลี่ยนรูปร่างจากแท่งไปเป็นกลม และแตกออกในที่สุด



(a) (b)

รูปที่ 5 แสดง Transmission Electron micrographs of *Halococcus salifodinae* (a) and *Halobacterium salinarum* (b) (ที่มา: Oren, 2006)

จากรูปที่ 5a แสดงให้เห็นว่าผนังเซลล์ของอาร์เคียชอบเค็มที่มีรูปร่างกลม ไม่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบและมีความหนามากกว่าอาร์เคียชอบเค็มรูปร่างไม่กลม เช่น ผนังเซลล์ของ *Halococcus* เรียกว่า Thick sulfated heteropolysaccharide cell wall ซึ่งองค์ประกอบผนังเซลล์จะคล้ายกับ Murein ของแบคทีเรีย เรียกว่า Pseudomurein ส่วนที่แตกต่างคือ จะพบ Gal =galactose; GalNAc = N-cetylgalactosamine; Glc = glucose, Gly = glycine; GulNUA = N acetylgulosaminuronic acid; Man = mannose; UA = uronic สำหรับสกุล Natronococcus จะมีผนังเซลล์ที่หนาเช่นกันแต่มีองค์ประกอบแตกต่างจากสกุล *Halococcus* โดยมีโมโนเมอร์เป็น poly (L-glutamine) glycoconjugate ดังนั้นผนังเซลล์ดังกล่าวไม่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ และมีความหนา จึงทำหน้าที่รักษารูปร่างที่แท้จริงของอาร์เคียชอบเค็มรูปร่างกลม ไม่ว่าจะอยู่ในสภาวะที่เป็น Hypotonic หรือ Hypertonic (Schleifer et al., 1982) เนื่องจากอาร์เคียชอบเค็มที่สามารถผลิตภัณฑ์ทางอุตสาหกรรมมีรูปร่างแท่ง (*Halobacterium*) และรูปร่างไม่แน่นอน

(*Haloferax*) ซึ่งมี S-layer เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ทำให้สามารถสกัดผลิตภัณฑ์ออกจากเซลล์ได้ภายใน 1 ขั้นตอน โดยการนำเซลล์ละลายในน้ำ หรือบัฟเฟอร์ เซลล์จะแตก ทำให้ได้สารละลายผลิตภัณฑ์ที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป เช่น การเก็บเกี่ยว PHA จากอาร์เคียชอบเค็ม *Haloferax. mediterranei* ใช้การหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก นำเซลล์ละลายในน้ำเพื่อให้เซลล์แตก และล้างตะกอนด้วยน้ำเพื่อกำจัดเศษเซลล์

องค์ประกอบของเซลล์เมมเบรน

เซลล์เมมเบรนประกอบไปด้วยสองส่วนที่สำคัญ คือ ไขมัน และโปรตีน โดยไขมันแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ โพลาร์ลิปิด [Polar lipids, (ร้อยละ 90)] และ นิวทรัล ลิปิด [Neutral lipids, (ร้อยละ 10)] ซึ่งโพลาร์ลิปิด หรือ เรียกว่า glycerol diether lipids ของอาร์เคียชอบเค็มประกอบไปด้วยกลีเซอรอล (glycerol) และสายไฮโดรคาร์บอน [Hydrocarbon chain คือ 2,3-di-*O*-phytanyl-sn-glycerol (C_{20},C_{20}) และ 2-O-sesterterpanyl-3-O-phytanyl-sn-glycerol (C_{25},C_{20})] ทั้งสองโมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะอีเธอร์ (Ether bond) โดยโพลาร์ ลิปิด แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ ฟอสโพลิปิด [Phospholipids] พบในอาร์เคียชอบเค็มทุกชนิด คือ phosphatidyl glycerol (PG) และ phosphatidyl glycerol phosphate methyl ester (PGP-Me)], ไกลโคลิปิด (glycolipids) และ ซัลโฟลิปิด (Sulfolipid) มีการรายงานการนำ glycerol diether lipids ไปใช้สำหรับสารที่เติมในอาหารเพื่อลดปริมาณแคลอรี่ในอาหาร (non-caloric fat substitute) (Kamekura and Kates,1988)

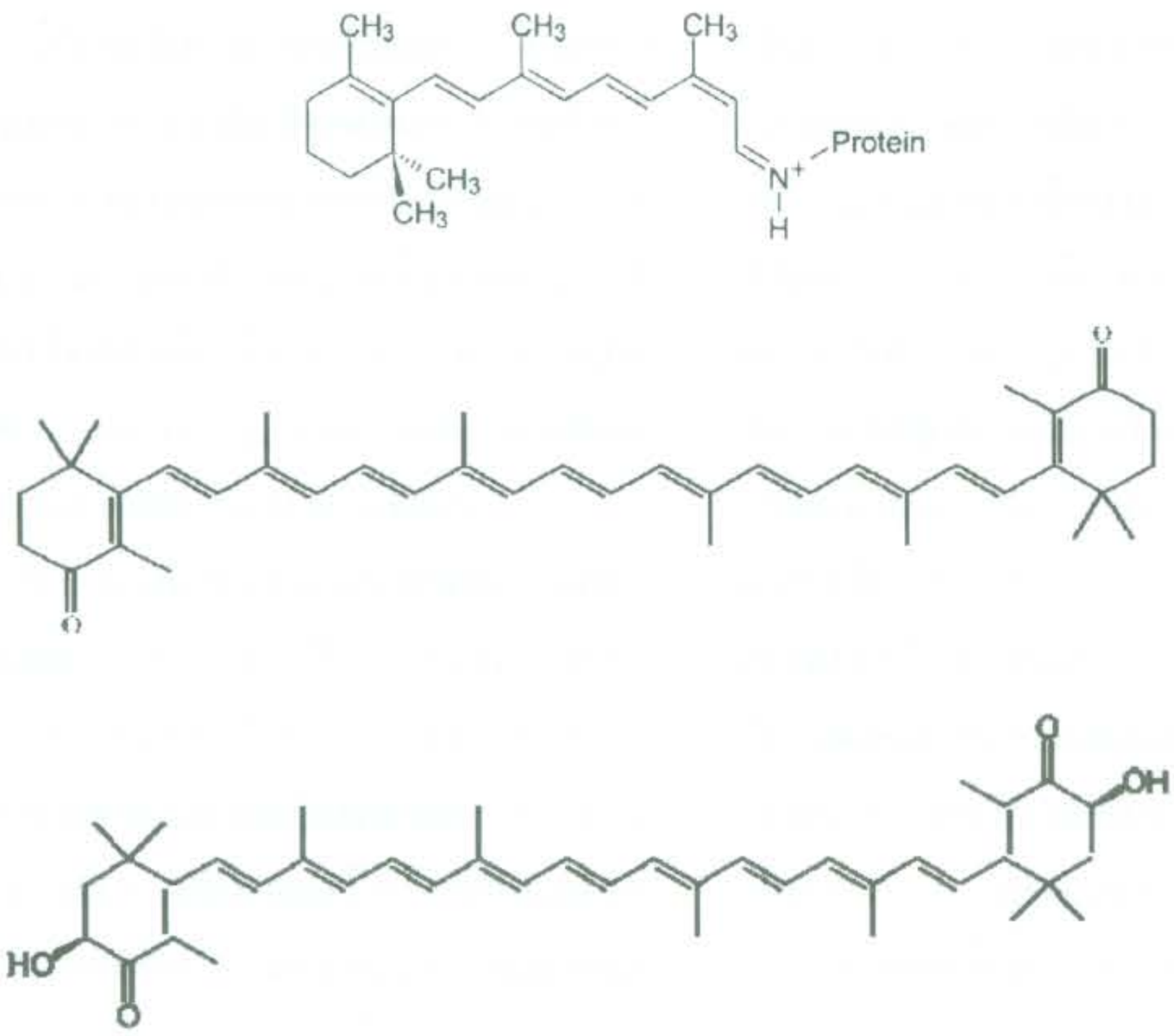
สำหรับนิวทรัล ลิปิด ประกอบด้วยไฮโดรคาร์บอนเท่านั้น เช่น C_{20} isoprenoid lipids, Neutral phytanyl ethers of glycerol, C_{30} isoprenoid lipids (กลุ่มของ squalene และ อนุพันธ์) แคโรทีนอยด์ ควิโนน (quinones) และ Retinal pigments สำหรับแคโรทีนอยด์ มีผลต่อสีของโคโลนีอาร์เคียชอบเค็ม เมื่อมีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงจะทำให้โคโลนีมีสีแดงส้ม และแคโรทีนอยด์มีหน้าที่ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์จากรังสียูวี โดยแคโรทีนอยด์ที่พบมากที่สุด คือ แบคทีริโอรูเบอริน (bacterioruberin) ปริมาณร้อยละ 60 ของปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบแคโรทีนอยด์ที่มีคาร์บอน 40 อะตอม เช่น hydroxyechinenone ทรานส์-แอสตาแซนธิน (รูปที่ 6.a) และ แคนธาแซนธิน (canthaxanthin) (รูปที่ 6.b) สำหรับ ทรานส์-แอสตาแซนธิน สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านการแพทย์และอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเช่นเดียวกับวิตามินอี พบว่าแอสตาแซนทินมีฤทธิ์ใกล้เคียงหรือมากกว่าวิตามินอี เรียกว่า ซูเปอร์วิตามินอี (super vitamin E) (Bramley, 2000) และในอุตสาหกรรมอาหารใช้แคนธาแซนธินเป็นสีผสมอาหาร (food colorant) สืบเนื่องมาจากแคนธาแซนธินมีคุณสมบัติไม่ทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการแพ้เหมือนกับสีสังผสมอาหารสังเคราะห์ รวมทั้งใช้เป็นสารให้สีสำหรับการเพาะเลี้ยงปลาแซลมอน และปูทำให้สัตว์มีสีสันสวยงาม (Asker and Ohta, 1999) จึงทำให้มีการศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์จากอาร์เคียชอบเค็มเพื่อทดแทนการผลิตจากยีสต์ ที่ใช้ขั้นตอนที่ยุ่งยากในการทำให้เซลล์แตกและการสกัดสารสีออกจากเซลล์ ซึ่งส่งผลต่อต้นทุนการผลิตและราคาของผลิตภัณฑ์ (Calo et al., 1995)

Calo และคณะ (1995) ศึกษาหาปริมาณของแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ของ *Halobacterium salinarum* พบแคโรทีนอยด์ทั้งหมด 2400 ไมโครกรัม/กรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยแคโรทีนอยด์ที่พบปริมาณสูง คือ hydroxyechinenone ปริมาณ 588 ไมโครกรัม (ร้อยละ 24) และ ทรานส์-แอสตาแซนธินปริมาณ 588 ไมโครกรัม (ร้อยละ 11) เมื่อเพาะเลี้ยงในที่มีองค์ประกอบ yeast extract (10 กรัม/ลิตร), casamino acids (7.5 กรัม/ลิตร); NaCI (250 กรัม/ลิตร); $MgSO_4$. 7H,O (40 กรัม/ลิตร), KCl (2 กรัม/ลิตร); trisodium citrate (3 กรัม/ลิตร) และ trace element solution ปริมาณ 10 มิลลิลิตร สำหรับ *Haloferax alexandrinus*

เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารข้างต้น สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ปริมาณใกล้เคียงกับ *Hbt. salinarum* (2060 ไมโครกรัม/กรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง) โดยแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้สูงที่สุด คือ แคนธาแซนธิน ปริมาณ 700 ไมโครกรัม (ร้อยละ 34 ของปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด) แต่ไม่พบการผลิตทรานส์-แอสตาแซนธิน (Asker et al., 2002) การเก็บเกี่ยวแคโรทีนอยด์สามารถทำได้โดยใช้น้ำมันพืชสกัดแคโรทีนอยด์ เช่น น้ำมันดอกทานตะวัน โดยไม่ต้องใช้สารละลายอินทรีย์ เช่น hexane หรือ acetone ซึ่งเป็นสารเคมีที่อันตรายต่อสุขภาพของทั้งคนและสัตว์

ในกลุ่มของ Retinal pigments แบ่ง 3 ชนิด คือ แบคทีริโอโรดอปซิน พบในอาร์เคียชอบเค็มบางชนิด (*Halobacterium salinarum*, *Hbt. halobium*, *Haloarcular japonica* and *Halorubrum* spp.) (รูปที่ 6.c) ฮาโรดอปซิน (halorhodopsin) และ โรดอปซิน (Rhodopsins) พบในอาร์เคียชอบเค็มทุกชนิด โดยที่แบคทีริโอโรดอปซินจัดเป็นโปรตีนที่ทะลุผ่านเซลล์เมมเบรน (integral membrance protein) สามารถดูดกลืนพลังงานจากแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรได้ดีที่สุดและใช้พลังงานดังกล่าวสำหรับผลักโพรทอนออกนอกเซลล์ (proton pump) จนเกิดความแตกต่างของประมาณโพรทอนภายในกับภายนอกเซลล์ (proton gradient) ทำให้มีการไหลกลับของโพรทอนบริเวณ Na^+/H^+ antiporter และ ATPase เมื่อโพรทอนไหลกลับบริเวณ ATPase ส่งผลให้เกิดการสร้าง ATP สำหรับใช้ในกิจกรรมของเซลล์รวมทั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Lanyi, 1997) สำหรับโรดอปซิน มี 2 ชนิด คือ โรดอปซิน I (ไวต่อแสงสีเขียว) และ โรดอปซิน II (ไวต่อแสงสีน้ำเงิน) ทำหน้าที่เป็น photoreceptor cell สำหรับการเคลื่อนไหวของอาร์เคียชอบเค็มภายใต้อิทธิพลของแสง (phototaxis) ดังนั้นจึงทำให้อาร์เคียชอบเค็มยังสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอาหารต่ำ เนื่องจากสามารถสร้าง ATP จากพลังงานของแสง สำหรับฮาโรโรดอปซินจัดเป็นโปรตีนที่ทะลุผ่านเซลล์เมมเบรน (integral membrance protein) เช่นเดียวกับแบคทีริโอโรดอปซิน ทำหน้าที่เป็น chloride pump โดยใช้พลังงานจากแสงดึง Cl^- เข้าเซลล์ จากกลไกลการปรับสมดุลของไอออนชนิดต่างๆ ทำให้อาร์เคียชอบเค็มสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือสูง เนื่องจากเกิดสมดุลระหว่างความเข้มข้นของไอออนภายในกับภายนอก (ionic balance) (Lanyi, 1990)

แบคทีริโอโรดอปซินซึ่งมีคุณสมบัติทางด้านแสงและเคมีที่เหมาะสมสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวางในด้านของอุปกรณ์อิเล็กโทรนิคระดับโมเลกุลและระบบแสงในคอมพิวเตอร์ อย่างไรก็ตามมีเพียงอาร์เคียชอบเค็มบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถผลิตแบคทีริโอโรดอปซิน เช่น *Halobacterium salinarum* ซึ่งปริมาณการผลิตค่อนข้างต่ำ ส่งผลให้ราคาแบคทีริโอโรดอปซินค่อนข้างสูง (1 mg ของแบคทีริโอโรดอปซิน ผลิตจาก *Hbt. salinarum* ราคา 25000 บาท, Sigma) จึงทำให้การวิจัยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแบคทีริโอโรดอปซิน ในปี 2008 Ghasemi และคณะ ประสบความสำเร็จในการเพิ่มการผลิตแบคทีริโอโรดอปซิน ได้เป็น 234.6 มิลลิกรัม/ลิตร (ซึ่งเพิ่มขึ้น 3.49 เท่าจากสูตรอาหารมาตรฐาน) โดยใช้อาหารที่มีองค์ประกอบดังนี้ NaCl (250 g/L), meat extract (10 g/L), casamino acids (3.75 g/L), glycerol (10 g/L), corn steep powder (50 g/L), Na_3-citrate (1 g/L), KCl (6 g/L), FeSO47H2O (0.2 g/L), $MnSO_4 7H_2O$ (0.2 g/L) และ $MgSO_4 7H_2O$ (10 g/L) สำหรับการเพาะเลี้ยง *Hbt. salinarum* การที่สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตแบคทีริโอดอปซินถือเป็นแนวโน้มที่ดีที่จะทำให้เกิดการขยายตัวของอุตสาหกรรมการผลิตแบคทีริโอดอปซิน จากอาร์เคียชอบเค็ม ถึงแม้ว่าสูตรอาหารที่ใช้ข้างต้นมีการปรับปรุงใช้สารอาหารที่ราคาถูก corn steep powder แต่ยังคงใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาแพงหลายชนิดเช่นเดียวกับการผลิต แคโรทีนอยด์ คือ Yeast extract, Meat extract และ Casamino acids



(a)

(b)

(c)

รูปที่ 6 แสดงโครงสร้างของ (a) แบคทีริโอโรดอปซิน, (b) แคนธาแซนธิน และ (c) แอสตาแซนธิน (ที่มา: Oren, 2006)

สรุป

จากการศึกษาอนุกรมวิธานของอาร์เคียชอบเค็ม การปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมที่มีเกลือ คุณสมบัติทางฟีโนไทป์และคุณสมสมบัติอนุกรมวิธานเคมี ทำให้ทราบว่าอาร์เคียชอบเค็มสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าทางอุตสาหกรรมจำนวน 4 ชนิด คือ 1) แคโรทีนอยด์สำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ทรานส์-แอสตาแซนธิน และ แคนธาแซนธิน 2) แบคทีริโอโรดอปซิน สำหรับนำไปใช้ในด้านผลิตเครื่องมืออิเลคทรอนิกส์ 3) โพลีไฮดรอกซีแอล-คาโนเอต สำหรับใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติและผลิตอุปกรณ์ทางการแพทย์ 4) เอนไซม์ชอบเค็ม สำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา เช่น เอนโดเปปติเดส S9 สามารถกำจัดความขมจากโปรตีนย่อยสลาย นอกจากนี้อาร์เคียชอบเค็มมีข้อดีที่เหมาะจะนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม คือ 1) ไม่จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อ 2) ขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกไม่ยุ่งยาก 3) การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์สามารถทำได้โดยง่าย

ถึงแม้ว่าอาร์เคียชอบเค็มจะสามารถผลิตภัณฑ์ได้หลายชนิด และขั้นตอนการเก็บเกี่ยวไม่ยุ่งยาก แต่การผลิตผลิตภัณฑ์จากอาร์เคียชอบเค็มยังคงประสบปัญหาต้นทุนสูง เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวต้องการแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตในปริมาณมาก จากข้อมูลการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของแสดงว่าอาร์เคียชอบเค็มจัดเป็น Chemoorganotroph ซึ่งสามารถให้แหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนได้หลายชนิด ดังนั้นส่วนที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลซึ่งมีมากในประเทศไทย และมีสารอาหารประเภทไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ น่าจะเป็นอีกทางเลือกสำหรับเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อทดแทน Yeast extract, Meat Extract และ Casamino acids รวมทั้งศึกษาสภาวะที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยง เช่น การกวน (agitation) และการให้อากาศ (aeration) เป็นต้น น่าจะทำให้เพิ่มโอกาสในการนำอาร์เคียชอบเค็มไปใช้ประโยชน์ในประเทศไทยในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Aaker, D. and Ohta, Y. (1999). Production of Canthaxanthin by Extremely Halophilic Bacteria. J. Bioscience Bioeng. 88(6): 617-621.

Aaker, D., Awad, T. and Ohta, Y. (2002). Lipids of *Haloferax alexandrinus* Strain TMT: an Extremely Halophilic Canthaxanthin-Producing Archaeon. J. Bioscience Bioeng. 93(1): 37-43.

Bertrand, J. C., Almallah, M., Acquaviva, M., and Mille, G. (1990). Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaebacterium. Lett. Appl. Microbiol. 11: 260-263.

Boutaiba, S., Bhatnagar, T., Hacene, H., Mitchell, D. A. and Baratti, J. C. (2006). Preliminary characterisation of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp. J. Mol. Catalysis B: Enzymatic. 41 (1-2): 21-26.

Bramley, P. M. (2000). Is lycopene beneficient to human health. Phytochem. 54: 233-236.

Calo, P., de Miguel, T., Sieiro, C., Velazquez, J. B. and Villa, T. G. (1995). Ketocarotenoids in halobacteria: 3-hydroxyechinenone and trans-astaxanthin. J. Appl. Bacteriol. 79: 282-285.

Capiralla, H., Hiroi, T., Hirokawa, T., and Maeda, S. (2002). Purification and characterizat ion of a hydrophobic amino acid-specific endopeptidase from *Halobacterium halobium* S9 with potential application in debittering of protein hydrolysates. Process Biochem. 38: 571-579.

Chen, C. W., Don, T. M. and Yen, H. F. (2006). Enzymatic extruded starch as a carbon source for the production of poly (3-hydroxybutyrate-co- 3-hydroxyvalerate) by Haloferax mediterranei. Process Biochem. 41: 2289-2296.

Christian, J. H. B. and Waltho, J. A. (1962). Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria. Biochim. Biophys. Acta. 65: 506-508.

Choi, J. I. and Lee, S. Y. (1997). Process analysis and economic evaluation for poly (3- hydroxybutyrate) production by fermentation. Bioprocess Eng. 17: 335-342.

Don, T. M., Chen. C. W. and Chan, T. H. (2006). Preparation and characterization of 6 poly(hydroxyalkanoate) from the fermentation of *Haloferax mediterranei*. J Biomater Sci Polymer Edn. 17: 1425-1438.

Ghasemi, M. F., Shodjai-Arani, A. and Moazam, N. (2008). Optimization of bacteriorhodopsin production by *Halobacterium salinarium* PTCC 1685. Process Biochem. 43: 1077-1082.

Grant, W. D., and Larsen, H. (1990). Extremely halophilic archaeobacteria, order *Halobacteriales* ord. nov., In: Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfennig, N., and Holt, J. G. (Eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 3. Baltimore: Williams & Wilkins. pp. 2216-2233.

Grout, M. J. (2000). Application of bacteriorhodopsin for optical limiting eye protection flters. Optical Materials. 14: 155-160.

Hezayen, F. F., Alexander Steinbüchel, A. and Rehm, B. H. A. (2002). Biochemical and

enzymological properties of the polyhydroxybutyrate synthase from the extremely halophilic archaeon strain 56. Archives of Biochem Biophy. 403: 284-291.

Han, J., Yao, B., Gao, P., Chen, L., Wang, Y. and Lei, M. (2008). Application of bacteriorhodopsin film for polarization phase-shifting interferometry. J. Modern Optics. 55(14): 2215 - 2222.

Hutcheon, G. W., Vasisht, N. and Bolhuis, A. (2005). Characterisation of a highly stable α-amylase from the halophilic archeon *Haloarcula hispanica*. Extremophiles. 9: 487-495.

Izotova, L. S., Strongin, A. Y., Chekulaeva, L. N., Sterkin, V. E., Ostoslavskaya, V. I., Lyublinskaya, L. A., Timokhina, E. A. and Stepanov, V. M. (1983). Purification and properties of serine protease from *Halobacterium halobium*. J. Bacteriol. 155: 826-830.

Kamekura, M., Kates, M. (1988). Lipids of halophilic archaebacteria. *In:* F. Rodriguez-Valera (Ed.) Halophilic bacteria. Vol. II. CRC Press. Boca Raton, FL. 25-54.

Koller, M., Hesse, P., Bona, R., Kutschera, C., Atlic, A. and Braunegg, G. (2007). Biosynthesis of high quality polyhydroxyalkanoate coand terpolyesters for potential medical application by the archaeon *Haloferax mediterranei*. Macromol Symp. 253: 33-39

Lanyi, J. K. and Hilliker, K. (1976). Passive potassium ion permeability of *Halobacterium halobium* cell envelope membranes. Biochim. Biophys. Acta. 448: 181-184.

Lechner, J. and F. Wieland. (1989). Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins. Ann. Rev. Biochem. 58:173-194.

Madern, D., Ebel C. and Zaccai G. (2000). Halophilic adaptation of enzymes. Extremophiles. 4: 91-98.

Martin, D. D., Ciulla, R. A. and Rorberts, M. F. (1999). Osmoadaptation in Archaea. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1815-1825.

Meury, J. and Kohiyama, M. (1989). ATP is required for active transport in the archaebacterium *Haloferaxvolcanii*. Arch. Microbiol. 151: 530-536.

Muller, M., Spanheimer, R. and Santos, H. (2005). Stress response by solute accumulation in archaea. Curr. Opinion Microbiol. 8: 729-736

Namwong, S., Tanasupawat, S., Kudo, T. and Itoh, T. (2007). *Halococcus thailandensis* sp. nov., from fish sauce in Thailand. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 2199-2203.

Namwong, S., Tanasupawat, S., Kudo, T. and Itoh, T. *Haloarcula salarius* sp. nov. and *Haloarcula tradensis* sp. nov. from salt in fish sauce fermentation in Thailand. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. inpress.

Ng, W. V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H. D., Lasky, S. R., Baliga, N. S., Thorsson, V., Sbrogna, J., Swartzell, S., Weir, D., Hall, J., Dahl, T. A., Welti, R., Goo, Y. A., Leithauser, B., Keller, K., Cruz, R., Danson, M. J., Hough, D. W., Maddocks, D. G., Jablonski, P. E., Krebs, M. P., Angevine, C. M., Dale, H., Isenbarger, T. A., Peck, R. F., Pohlschroder, M., Spudich, J. L., Jung, K.-H., Alam, M., Freitas, T., Hou, S., Daniels, C. J., Dennis,

P. P., Omer, A. D., Ebhardt, H., Lowe, T. M., Liang, P., Riley, M., Hood, L., DasSarma, S. (2000). Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 12176-12181.

Oren, A., Ventosa, A. and Grant, W. D. (1997). Proposed minimal standards for description of new taxa in the order *Halobacteriales*. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 233-238.

Oren. A. (2006). The Order Halobacteriales. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Erko Stackebrandt, E., (Eds). Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria, Vol 3. New York, USA. pp.113-164.

Rodriguez-Valera, F., Lillo, J. G. (1992). Biotechnological potential of halobacteria. In *The Archaebacteria : Biochemistry and Biotechnology*, eds. London: Portland Press. pp. 135-147

Schleifer, K. H., J. Steber, and H. Mayer. (1982). Chemical composition and structure of the cell wall of *Halococcus morrhuae*. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. C. 3: 171-178.

Tapingkae, W., Tanasupawat, S., Itoh, T., Parkin, K. L., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Valyasevi, R. (2008). *Natrinema gari* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from fish sauce in Thailand. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 2378 - 2383.

Tanasupawat, S., Namwong, S., Kudo, T. and Itoh, T. (2008-2009). Identification of halophilic bacteria from fish sauce (*nam-pla*) in Thailand. J. Culture Collections. 6: 69-75.

Yachai, M., Tanasupawat, s., Itoh, T., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Valyasevi, R. (2008). *Halobacterium piscisalsi* sp. nov., from fermented fish (*pla-ra*) in Thailand. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 2136 - 2140.

Wainø , M. and Ingvorsen, K. (2003). Production of β-xylanase and β-xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*. Extremophiles. 7: 87-93.

❑❑❑❑❑

ว.วิทย. มข. 39(1) 52-70 (2554) KKU Sci. J.39(1) 52-70 (2011)

KKU SCIENCE JOURNAL

พลาสติกชีวภาพสังเคราะห์: ชนิด การสังเคราะห์ และสมบัติของพอลิแลคติกแอซิด

Synthetic Bioplastics: Types, Synthesis and Properties of Poly(lactic acid)s

มังกร ศรีสะอาด [1*] *ยอดธง ใบมาก* [1]

บทคัดย่อ

พอลิแลคติกแอซิด (PLAs) เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่สามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพสำหรับประยุกต์ใช้เป็นพลาสติกชีวภาพ ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 3 ชนิดตามโครงแบบของกรดแลคติก (ชนิดแอล ชนิดดี และชนิดดีแอล) ได้แก่ พอลิแอล-แลคติกแอซิด (PLLA) พอลิดี-แลคติกแอซิด (PDLA) และพอลิดีแอล-แลคติกแอซิด (PDLLA) โดย PLAs สามารถสังเคราะห์ได้ 2 วิธี คือ พอลิเมอไรเซชันแบบควบแน่นโดยตรงและแบบเปิดวงแหวน ซึ่งมีการใช้กรดแลคติก และแลคไทด์เป็นมอนอเมอร์สำหรับเทคนิคพอลิเมอไรเซชันแบบควบแน่นโดยตรงและแบบเปิดวงแหวน ตามลำดับ PLAs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงสังเคราะห์ได้โดยใช้เทคนิคพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงแหวน PLLA และ PDLA เป็นพอลิเมอร์กึ่งผลึก ขณะที่ PDLLA เป็นพอลิเมอร์อสัณฐาน สมบัติเชิงกล การละลายในตัวทำละลายอินทรีย์และอัตราการสลายตัวทางชีวภาพของ PLAs ขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลและระดับความเป็นผลึกของพอลิแลคติกแอซิด โดยการสลายตัวทางชีวภาพของพอลิแลคติกแอซิดสามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบ ได้แก่ การสลายตัวโดยไม่ใช้เอนไซม์ และการสลายตัวด้วยเอนไซม์

Abstract

Poly(lactic acid)s (PLAs) are synthetic biodegradable polymers for use as bioplastic applications. They were divided into 3 types corresponded to lactic acid configurations (L-, D- and D,L-forms). They are poly(L-lactic acid) (PLLA), poly(D-lactic acid) (PDLA) and poly(D,L-lactic acid) (PDLLA). PLAs can be synthesized by 2 methods, direct polycondensation and ring-opening polymerization. Lactic acid and lactide are used as monomers for direct polycondensation and ring-opening polymerization, respectively. High molecular weight PLAs can be obtained from the later method. PLLA and PDLA are semi-crystalline

1 หน่วยวิจัยพอลิเมอร์ที่สามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 44150

* Corresponding Author, E-mail: msrisaard@gmail.com

polymers, whereas PDLLA is an amorphous polymer. Solubility in organic solvents and biodegradation rate of PLAs strongly depended upon their molecular weight and degree of crystallinity. Biodegradation of PLA can be divided into 2 types including non-enzyme degradation and enzyme degradation.

คำสำคัญ : พลาสติกชีวภาพ พอลิแลคติกแอซิด พอลิแลคไทด์ การสลายตัวทางชีวภาพ การสังเคราะห์

Keywords : Bioplastics, Poly(lactic acid), Poly(lactide), Biodegradation, Synthesis

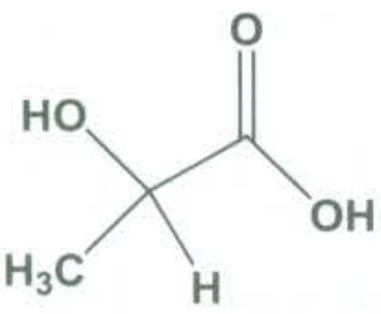
บทนำ

เนื่องจากปัญหามลภาวะที่เกิดขึ้นจากขยะพลาสติกและการลดปริมาณลงของน้ำมันและก๊าซธรรมชาติในธรรมชาติ ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักสำคัญที่ใช้ในการผลิตพลาสติกทั่วไปที่ใช้ในชีวิตประจำวันต่างๆ จึงทำให้มีความสนใจในการศึกษาวิจัยและพัฒนาพลาสติกทางชีวภาพ (bioplastics) ที่ผลิตได้จากวัตถุดิบธรรมชาติอื่นจากแหล่งที่ยั่งยืน (sustainable resources) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพ (biodegradable polymers) หมายถึง พอลิเมอร์ที่สามารถสลายตัวได้ด้วยกระบวนการไฮโดรไลซีส หรือการกระทำของเอนไซม์ และจุลินทรีย์ต่างๆ ในร่างกายสิ่งมีชีวิต หรือในสิ่งแวดล้อม (Barrows, 1991) พอลิเมอร์ที่สามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพสามารถแบ่งตามแหล่งกำเนิดได้เป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่สามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพ (natural biodegradable polymers) ได้แก่ แป้ง (starch) และไฟโบรอินจากไหม (silk fibroin) เป็นต้น และพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่สามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพ (synthetic biodegradable polymers) ได้แก่ พอลิไกลโคลิคแอซิด [poly(glycolic acid)] พอลิแลคติกแอซิด [poly(lactic acid)] และพอลิเอปไซลอน-แคโพรแลคโทน [poly(ε-caprolactone)] เป็นต้น แม้ว่าพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่สามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพจะมีราคาแพงกว่า แต่การปนเปื้อน และความสม่ำเสมอของสมบัติสามารถควบคุมได้ดีกว่าพอลิเมอร์ธรรมชาติที่สามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพ

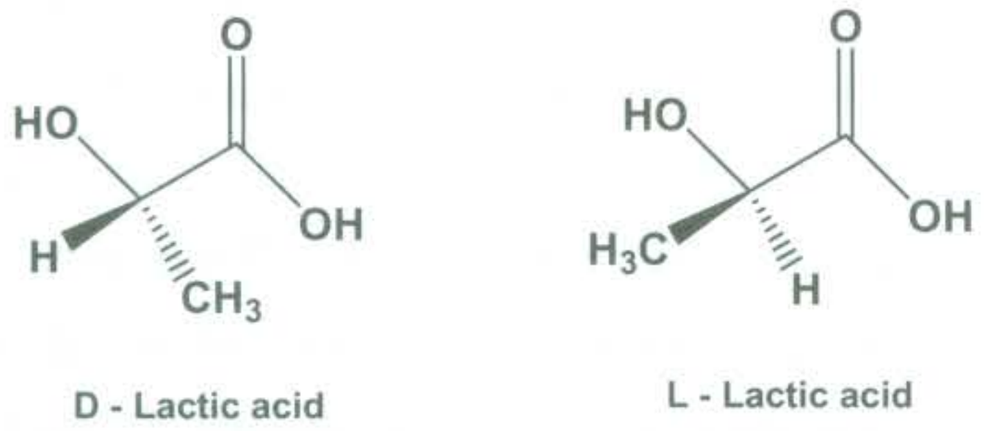
ในช่วง 30 ปีที่ผ่านมา เนื่องจากพอลิแลคติกแอซิด ยังมีราคาค่อนข้างสูง ส่วนใหญ่จึงได้มีการวิจัยพัฒนาในการประยุกต์ใช้งานพอลิแลคติกแอซิด เป็นอุปกรณ์โครงยึดชั่วคราว (temporary scaffolds) ทางการแพทย์ ได้แก่ ไหมเย็บแผลชนิดละลายได้ หรือไหมละลาย (bioabsorbable sutures) และ อุปกรณ์ยึดกระดูก (bone fixation devices) เป็นต้น (Nair and Laurencin, 2007) และทางเภสัชกรรม ได้แก่ ระบบนำส่งยาแบบควบคุมการปลดปล่อย (controlled-release drug delivery systems) และ ระบบนำส่งยาสู่เป้าหมาย (drug targeted delivery systems) เป็นต้น (Freiberg and Zhu, 2004) จุดประสงค์ในพัฒนาการใช้งานพอลิเมอร์ที่สามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพเป็นพลาสติกใช้งานทั่วไป เช่น ฟิมล์ และขวด เพื่อลดมลภาวะจากขยะพลาสติกที่ไม่สลายตัวทางชีวภาพที่ต้องมีการกำจัดด้วยการเผา หรือฝังกลบ ทำให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมได้ พอลิแลคติกแอซิด ได้รับความสนใจในการวิจัยพัฒนาเป็นพลาสติกชีวภาพเนื่องจากมีสมบัติทางความร้อนที่สำคัญ ได้แก่ อุณหภูมิการหลอมที่ใกล้เคียงกับพอลิเอทิลีน และพอลิพรอพิลีน ซึ่งเป็นพลาสติกที่ใช้งานทั่วไป จึงมีความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคกระบวนการหลอมขึ้นรูปแบบต่างๆ ที่ใช้ขึ้นรูปผลิตภัณฑ์พลาสติกของพอลิเอทิลีน และพอลิพรอพิลีน ได้แก่ กระบวนการอัดรีด (extrusion process) กระบวนการฉีด (injection process) และกระบวนการเป่า (blow molding process) เป็นต้น โดยในบทความนี้จะได้กล่าวถึงรายละเอียดต่างๆ ของพอลิแลคติกแอซิด ได้แก่ ชนิด การสังเคราะห์ และสมบัติต่างๆ ได้แก่ สมบัติทางความร้อน สมบัติเชิงกล ความสามารถในการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ และการย่อยสลายทางชีวภาพ

ชนิดของพอลิแลคติกแอซิด

กรดแลคติก หรือ แลคติกแอซิด (lactic acid) หรือ 2-ไฮดรอกซิล กรดโพรพาโนอิค (2-hydroxy propanoic acid) เป็นกรดไฮดรอกซีที่มีโครงสร้างโมเลกุลดังรูปที่ 1 ซึ่งประกอบด้วยอะตอมคาร์บอนที่ไม่สมมาตร ทำให้กรดแลคติกมีไอโซเมอร์แบบออปติคอล ที่ต่างกันจำนวน 2 ไอโซเมอร์ ได้แก่ กรดแลคติกชนิดแอล (L-lactic acid) และ กรดแลคติกชนิดดี (D-lactic acid) (Barrows, 1991) ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลกรดแลคติก (ที่มา: Lunt, 1998)

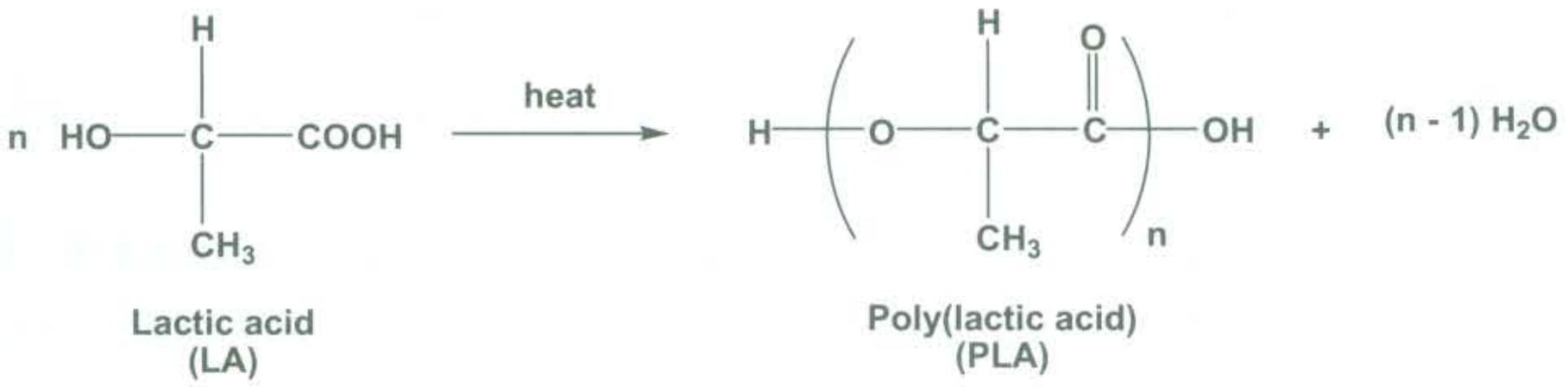


รูปที่ 2 ไอโซเมอร์ของกรดแลคติกชนิดดี และชนิดแอล (ที่มา: Lunt, 1998)

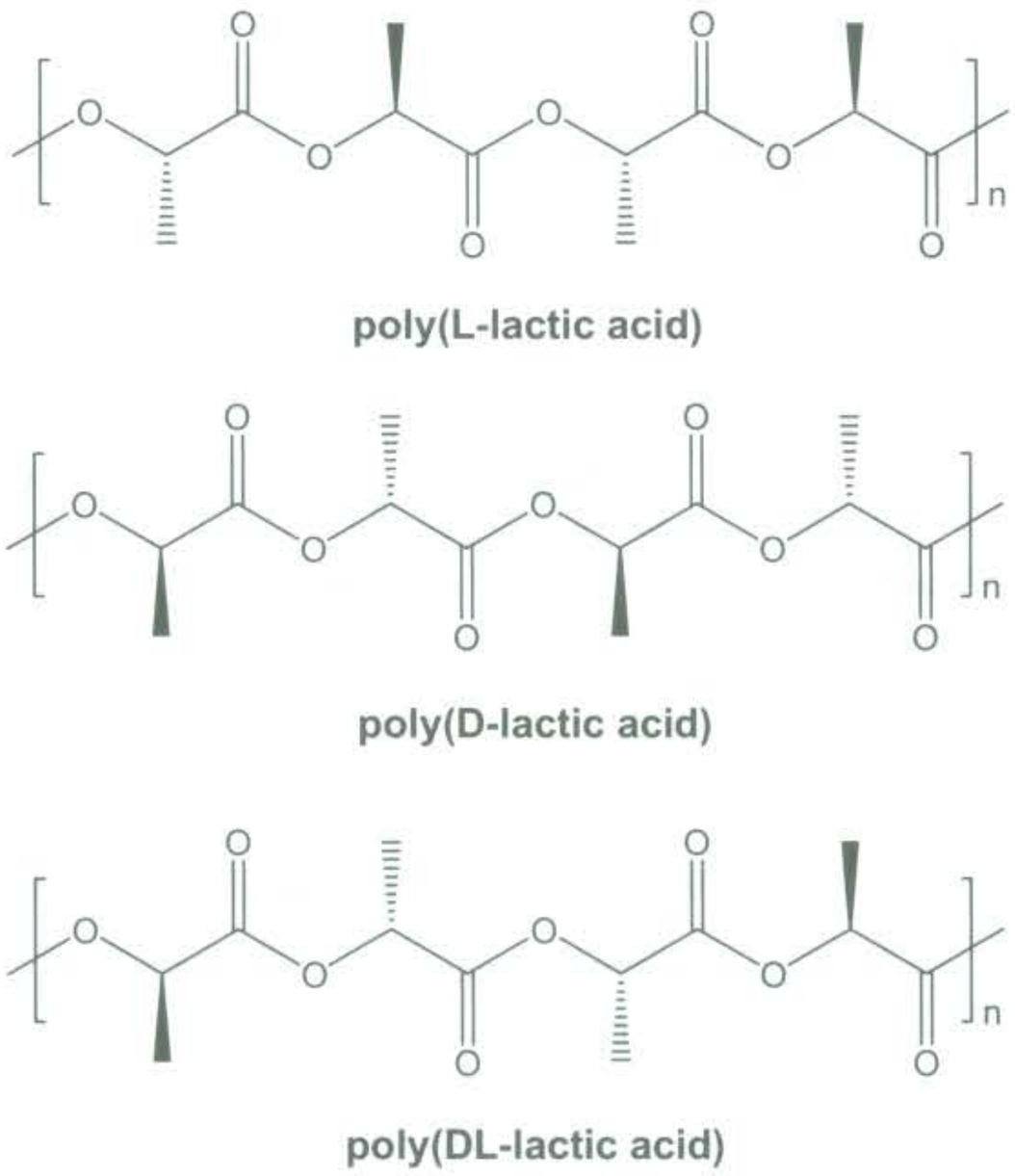
การเรียกชื่อพอลิเมอร์นิยมใช้ชื่อมอนอเมอร์ในวงเล็บต่อท้ายคำว่าพอลิ เช่น poly(lactic acid) แต่ในการเขียนภาษาไทยจะไม่นิยมใส่วงเล็บและจะเขียนชื่อติดกัน เช่น พอลิแลคติกแอซิด เป็นการเรียกทับศัพท์ โดยกรดแลคติกชนิดแอล และชนิดดี เมื่อเกิดปฏิกิริยาการพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) หรือปฏิกิริยาการสังเคราะห์พอลิเมอร์แล้วจะได้เป็นพอลิแอล-แลคติกแอซิด [poly(L-lactic acid), PLLA] และ พอลิดี-แลคติกแอซิด [poly(D-lactic acid), PDLA] ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีกรดแลคติกที่มีการผสมกันของกรดแลคติกชนิดแอล และกรดแลคติกชนิดดีในอัตราส่วนโดยโมลที่ใกล้เคียงกัน เรียกว่า racemic-lactic acid หรือกรดแลคติกชนิดดีแอล (D,L-lactic acid) ซึ่งเมื่อเกิดการพอลิเมอไรเซชันแล้วจะได้เป็นพอลิดีแอล-แลคติกแอซิด [poly(D,L-lactic acid), PDLLA] ซึ่งกรดแลคติกชนิดแอล และชนิดดีผลิตได้จากกระบวนการหมัก (fermentation) ของสารคาร์โบไฮเดรตด้วยเอนไซม์ (Narayanan et al., 2004) ขณะที่กรดแลคติกชนิดดีแอลผลิตได้จากกระบวนการทางปิโตรเคมี (Lunt, 1998)

จากข้อมูลข้างต้นกล่าวได้ว่าพอลิแลคติกแอซิด [poly(lactic acid), PLA] สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ตามโครงแบบ (configurations) ของมอนอเมอร์ คือ กรดแลคติกที่ใช้ในการสังเคราะห์พอลิแลคติกแอซิด ได้แก่ พอลิแอล-แลคติกแอซิด (PLLA) พอลิดี-แลคติกแอซิด (PDLA) และพอลิดีแอล-แลคติกแอซิด (PDLLA) โดยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบควบแน่นโดยตรง (direct polycondensation) ของกรดแลคติก

แสดงดังรูปที่ 3 ซึ่งจะทำให้ได้พอลิแลคติกแอซิดที่มีโครงแบบต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 4 ตามโครงแบบของกรดแลคติกที่ใช้ในการสังเคราะห์ อย่างไรก็ตาม ในกรณีที่ไม่ได้ระบุถึงชนิดโครงแบบของพอลิแลคติกแอซิด หรือ ที่เรียกว่า PLA โดยทั่วไปมักหมายถึงพอลิแอล-แลคติกแอซิด ซึ่งเป็นพอลิแลคติกแอซิดที่มีการวิจัยเพื่อประยุกต์ใช้งานเป็นพลาสติกชีวภาพในปัจจุบันอย่างกว้างขวางมากที่สุด

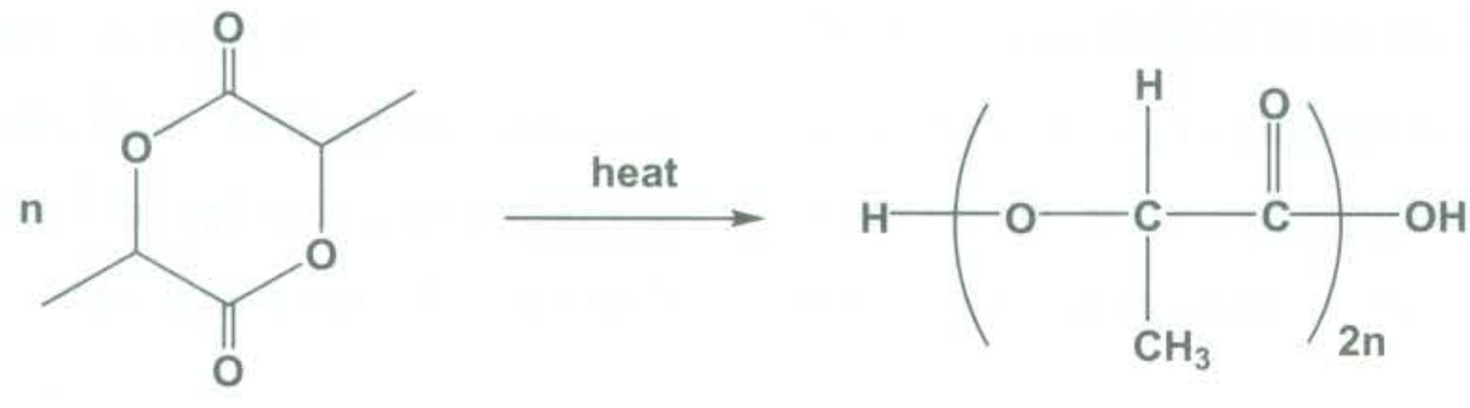


รูปที่ 3 ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบควบแน่นโดยตรงของกรดแลคติก (ที่มา: Vink et al., 2003)



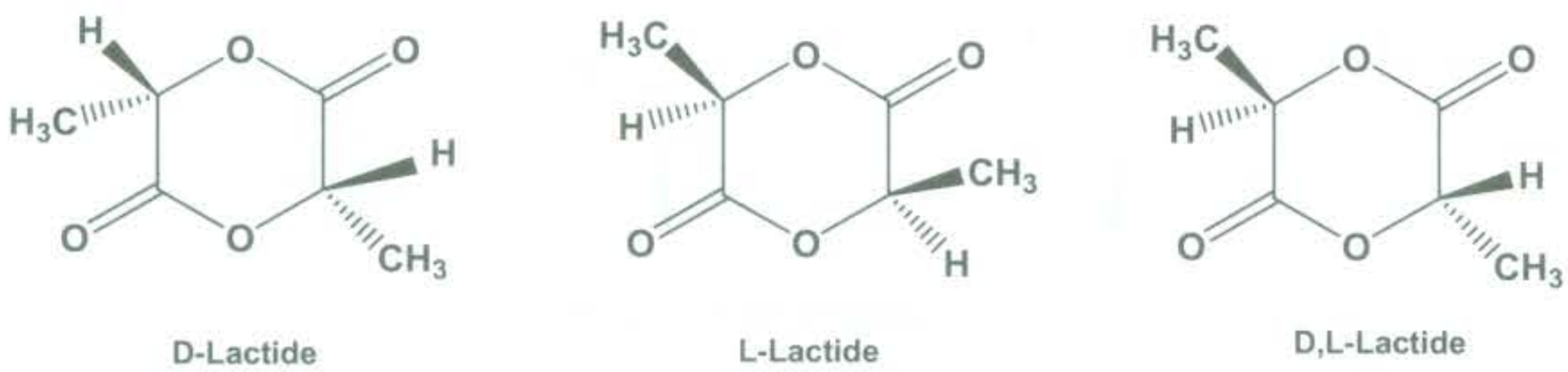
รูปที่ 4 พอลิแลคติกแอซิดที่มีโครงแบบต่างๆ (ที่มา: Dechy-Cabaret et al., 2004)

พอลิแลคติกแอซิดยังสามารถสังเคราะห์ได้อีกกระบวนการหนึ่งที่เรียกว่าปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงแหวน (ring-opening polymerization) โดยใช้มอนอเมอร์แบบวงของเอสเทอร์ (ester cyclic monomers) ได้แก่ ไดแลคติกแอซิด หรือ แลคไทด์ (lactide) หรือ 3,6-dimethyl 1,4-dioxane 2,5-dione ดังแสดงในรูปที่ 5 ดังนั้นพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกระบวนการพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงแหวนของแลคไทด์นี้ จึงมีชื่อเรียกที่ถูกต้องตามมอนอเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ว่า พอลิแลคไทด์ [poly(lactide), PL] (Gupta and Kumar, 2007)



รูปที่ 5 ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงแหวนของแลคไทด์ (ที่มา: Vink et al., 2003)

สำหรับแลคไทด์ที่ใช้เป็นมอนอเมอร์ในปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงแหวน สามารถเตรียมได้จากกรดแลคติก ซึ่งจะกล่าวถึงรายละเอียดในการเตรียมนี้หัวข้อถัดไป ดังนั้นแลคไทด์จึงมีไอโซเมอร์ 3 แบบ ได้แก่ แอลแอล-แลคไทด์ (L,L-lactide) นิยมเรียกว่า แอล-แลคไทด์ (L-lactide, LL) ดีดี-แลคไทด์ (D,D-lactide) นิยมเรียกว่า ดี-แลคไทด์ (D-lactide, DL) และดีแอล-แลคไทด์ (D,L-lactide, DLL) ดังรูปที่ 6 ซึ่งแลคไทด์เหล่านี้ เมื่อเกิดการสังเคราะห์เป็นพอลิแลคไทด์ด้วยกระบวนการพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงแหวนจะทำให้ได้พอลิแลคไทด์ แบบต่างๆ ได้แก่ พอลิแอล-แลคไทด์ [poly(L-lactide), PLL] พอลิดี-แลคไทด์ [poly(D-lactide), PDL] และ พอลิดีแอล-แลคไทด์ [poly(D, L-lactide), PDLL] ตามลำดับ



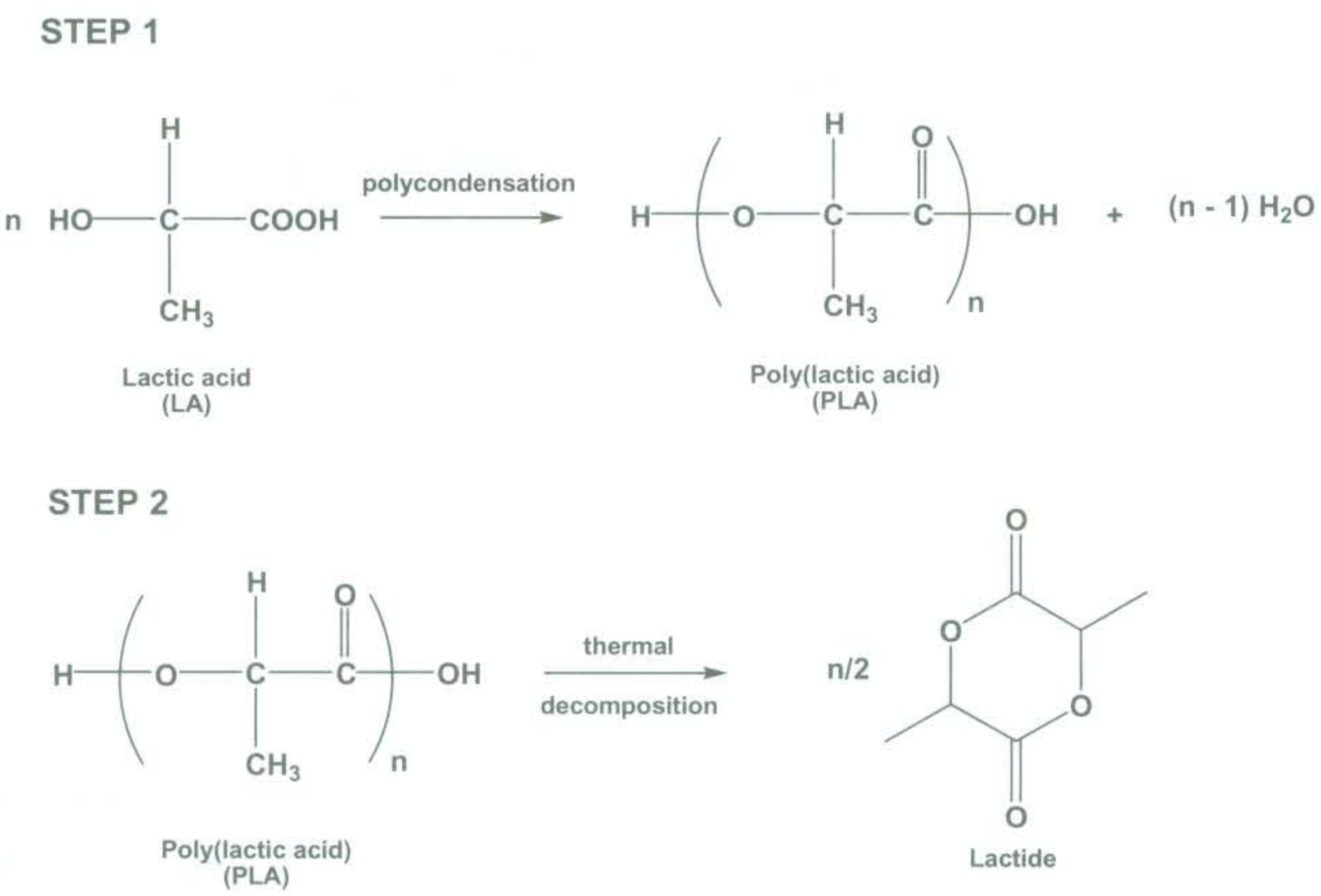
รูปที่ 6 ไอโซเมอร์ของแลคไทด์ (ที่มา: Gupta and Kumar, 2007)

พอลิแอล-แลคติกแอซิด มีโครงสร้างโมเลกุลทางเคมีเหมือนกับพอลิแอล-แลคไทด์ ขณะที่พอลิดี-แลคติกแอซิด และพอลิดีแอล-แลคติกแอซิด มีโครงสร้างโมเลกุลทางเคมีเหมือนกับพอลิดี-แลคไทด์ และพอลิดีแอล-แลคไทด์ ตามลำดับ เพียงแต่การเรียกชื่อที่แตกต่างกันตามมอนอเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์เท่านั้น นอกจากนี้จากการเรียกชื่อที่ต่างกันนี้ ทำให้ทราบได้ว่าพอลิเมอร์นี้สังเคราะห์ได้จากกระบวนพอลิเมอไรเซชันแบบควบแน่น หรือแบบเปิดวงแหวน เนื่องจากพอลิแลคติกแอซิด และพอลิแลคไทด์ สามารถสังเคราะห์ได้จากกระบวนการพอลิเมอไรเซชันแบบควบแน่นของกรดแลคติก และแบบเปิดวงแหวนของแลคไทด์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามยังมีรายงานการวิจัยจำนวนมากที่เรียกพอลิเมอร์เหล่านี้ว่าพอลิแลคติกแอซิด หรือ PLA ทั้งที่ทำการสังเคราะห์โดยใช้แลคไทด์เป็นมอนอเมอร์ผ่านปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงแหวน ซึ่งอาจทำให้เกิดความเข้าใจที่คลาดเคลื่อนสำหรับมอนอเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ ดังนั้นผู้อ่านต้องพิจารณาถึงรายละเอียดในการสังเคราะห์ของรายงานการวิจัยนั้นอย่างรอบคอบ แม้จะมีโครงสร้างโมเลกุลที่เหมือนกัน แต่โดยทั่วไปพบว่าพอลิแลคไทด์ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงแหวนมีค่าน้ำหนักโมเลกุลที่มากกว่าพอลิแลคติกแอซิดที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน

แบบควบแน่น ซึ่งส่งผลต่อสมบัติต่างๆ และการประยุกต์ใช้งาน

การสังเคราะห์แลคไทด์จากกรดแลคติก

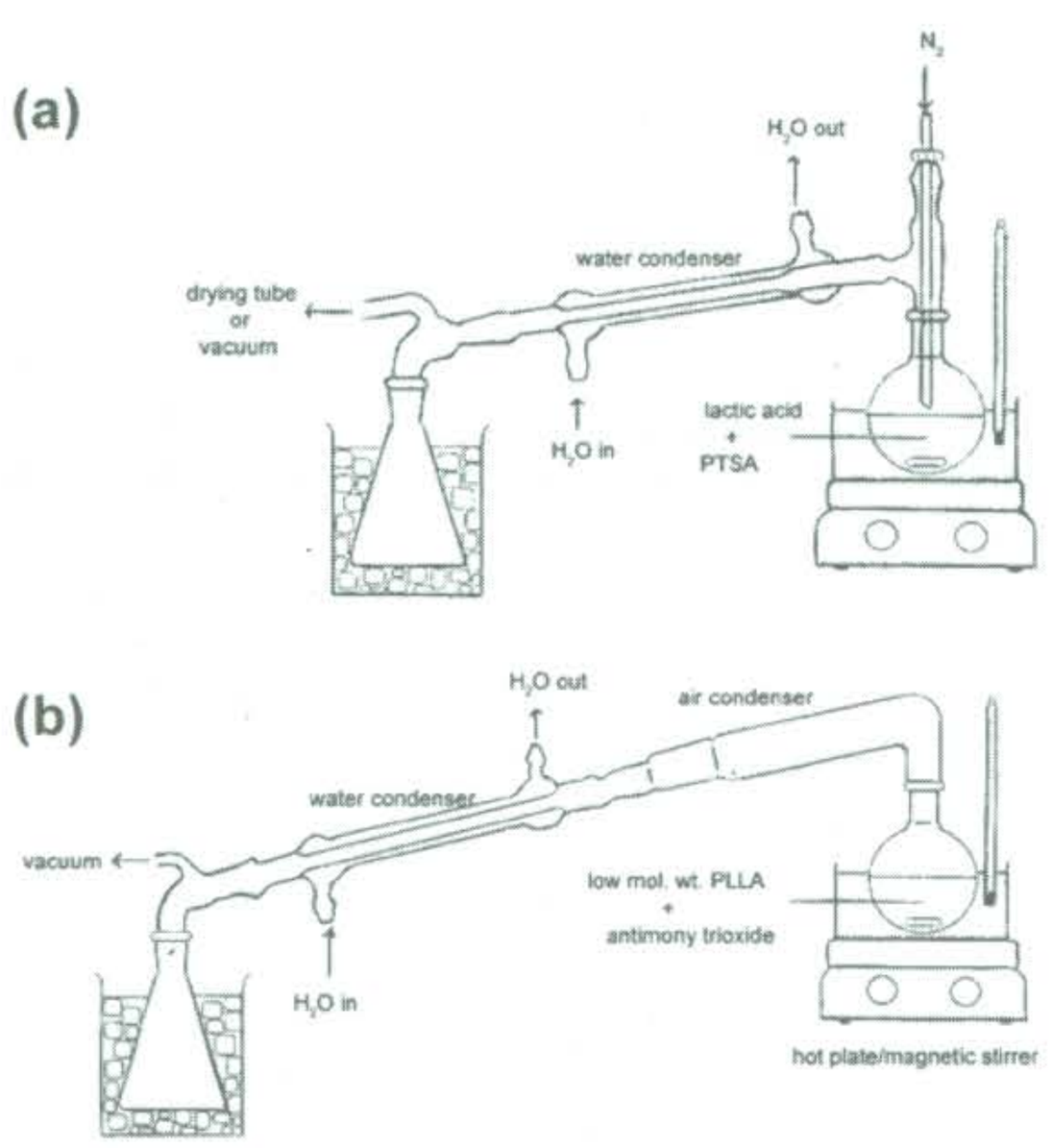
สำหรับแลคไทด์ที่ใช้เป็นมอนอเมอร์ในกระบวนการพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงแหวนนั้น โดยทั่วไปสามารถเตรียมได้จากเทคนิคที่ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังรูปที่ 7 โดยในขั้นตอนที่ 1 (step 1) เป็นการสังเคราะห์พอลิแลคติกแอซิดจากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบควบแน่น (polycondensation) ก่อนที่จะได้แลคไทด์จากการสลายตัวด้วยความร้อน (thermal decomposition) ของพอลิแลคติกแอซิด ในขั้นตอนที่ 2 (step 2)



รูปที่ 7 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์แลคไทด์จากกรดแลคติกผ่านปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบควบแน่น (polycondensation) ในขั้นตอนที่ 1 และการสลายตัวด้วยความร้อน (thermal decomposition) ในขั้นตอนที่ 2 (ที่มา: Lunt, 1998)

การสังเคราะห์แลคไทด์ในขั้นตอนแรกมีการประกอบอุปกรณ์การสังเคราะห์พอลิแลคติกแอซิด ดังรูปที่ 8(a) ที่มีการใช้กรดพารา-โทลูอีนซัลโฟนิก (p-toluene sulfonic acid, PTSA) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในปริมาณ 0.5-1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยทำการสังเคราะห์ในขั้นที่หนึ่งนี้มีการใช้อุณหภูมิประมาณ 150-170 องศาเซลเซียล เป็นระยะเวลาประมาณ 4 - 5 ชั่วโมง ก่อนทำการลดความดันประมาณ 100 มิลลิเมตรของปรอท เป็นระยะเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง (Gilding and Reed, 1979) เพื่อกำจัดน้ำที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา และทำให้พอลิแลคติกแอซิด ที่ได้มีความหนืดขณะหลอมมากขึ้น การสังเคราะห์แลคไทด์ในขั้นตอนที่สองมีการประกอบชุดอุปกรณ์การสังเคราะห์ ดังรูปที่ 8(b) ที่มีการใช้แอนติโมนีไตรออกไซด์ (antimony trioxide) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในปริมาณ 0.1-1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในขั้นที่สองนี้มีการใช้อุณหภูมิประมาณ 180 - 220 องศาเซลเซียล ที่ความดันประมาณ 2 มิลลิเมตรของปรอท (Hyon et al., 1997) หรืออุณหภูมิประมาณ 230 - 250

องศาเซลเซียล ที่ความดันประมาณ 5 - 10 มิลลิเมตรของปรอท (Srisa-ard, 2001) แลคไทด์ที่เกิดจากการสลายตัวด้วยความร้อนจะระเหยขึ้นมา และเกิดการควบแน่นก่อนเกิดการแข็งตัวและสะสมในท่อที่ควบแน่นด้วยอากาศ (air condenser) แลคไทด์ที่ได้ต้องมีการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการละลายและตกตะกอนซ้ำ (re-crystallization) ในเอทธิล อะซิเทต และทำการอบให้แห้งโดยการลดความดันก่อนนำไปใช้ในการสังเคราะห์พอลิแลคไทด์ ต่อไป



รูปที่ 8 อุปกรณ์การสังเคราะห์แลคไทด์จากกรดแลคติก สำหรับ (a) ขั้นตอนที่ 1 ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบควบแน่น (polycondensation polymerization) และ (b) ขั้นตอนที่ 2 การสลายตัวด้วยความร้อน (thermal decomposition) (ที่มา: Srisa-ard, 2001)

การสังเคราะห์พอลิแลคติกแอซิด

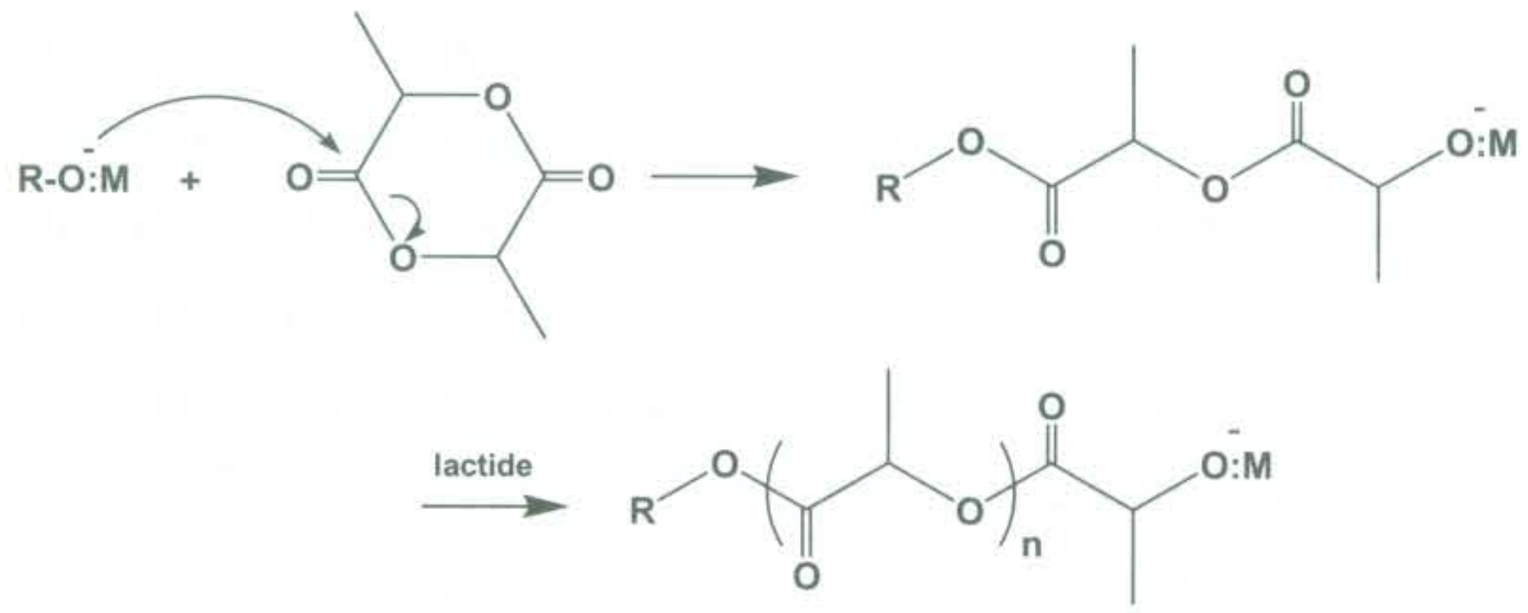
การสังเคราะห์สามารถทำได้ด้วยกระบวนการพอลิเมอไรเซชันที่สำคัญ 2 วิธี ได้แก่ วิธีพอลิเมอไร-เซชัน แบบควบแน่นโดยตรง (direct polycondensation polymerization) ที่มีการใช้กรดแลคติกเป็นมอนอเมอร์ และวิธีพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงแหวน (ring-opening polymerization, ROP) ที่มีการใช้แลคไทด์เป็นมอนอเมอร์ การศึกษาปฏิกิริยาการสังเคราะห์ส่วนใหญ่เป็นการสังเคราะห์ของกรดแลคติกชนิดแอล และแลคไทด์ชนิดแอล

สำหรับปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบควบแน่นโดยตรงของกรดแลคติกจะมีผลิตภัณฑ์ที่เป็นโมเลกุลของน้ำเกิดขึ้นด้วย จึงมีการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสที่ทำให้พอลิแลคติกแอซิดเกิดการสลายตัวควบคู่ไปด้วย ทำให้พอลิแลคติกแอซิดมีค่าน้ำหนักโมเลกุลลดลง นับเป็นข้อจำกัดสำคัญในการสังเคราะห์พอลิแลคติกแอซิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง แม้จะมีการพยายามปรับปรุงเทคนิคโดยการลดความดันของระบบระหว่างปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันเพื่อกำจัดน้ำที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา แต่เป็นการยากที่จะกำจัดน้ำที่ผสมอยู่ในพอลิเมอร์หลอมที่มีความหนืดมากอย่างสมบูรณ์ ดังนั้นวิธีนี้จึงสามารถสังเคราะห์พอลิแอล-แลคติกแอซิด ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (number-average molecular weight, M_n) มีค่าไม่เกิน

20,000 - 30,000 กรัมต่อโมล เท่านั้น ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบควบแน่นโดยตรงของกรดแลคติกทั้งชนิดแอล และดีแอลที่ปราศจากตัวเร่งปฏิกิริยาใดๆ ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียล และความดัน 25 มิลลิเมตรของปรอท เป็นเวลา 25 ชั่วโมง โดยทำการกำจัดน้ำที่ผสมอยู่ก่อนด้วยการกลั่นที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส พบว่าได้พอลิแอล-แลคติกแอซิดที่มีค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนไม่เกิน 20,000 กรัมต่อโมล (Hyon et al., 1997) Achmad et al. (2009) ได้ทำการสังเคราะห์พอลิแอล-แลคติกแอซิดภายใต้สภาวะสูญญากาศที่ปราศจากตัวเร่งปฏิกิริยาและตัวทำละลาย โดยทำการกำจัดน้ำที่ผสมอยู่ก่อนด้วยการกลั่นที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 150 นาที ก่อนทำการลดความดันที่ 10 มิลลิเมตรของปรอท เป็นเวลาอีก 150 นาที ก่อนทำการพอลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิในช่วง 150 - 250 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 10 มิลลิเมตรของปรอท เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิในการสังเคราะห์เท่ากับ 200 องศาเซลเซียส จะได้พอลิแอล-แลคติกแอซิดที่มีค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนสูงที่สุด คือ ประมาณ 25,000 กรัมต่อโมล ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 200 องศาเซลเซียส จะเกิดการสลายตัวด้วยความร้อน ทำให้พอลิแอล-แลคติกแอซิดที่มีค่าน้ำหนักโมเลกุลลดต่ำลง สำหรับตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการพอลิเมอไรเซชันของกรดแลคติกชนิดแอลที่ได้มีการศึกษาวิจัย ได้แก่ กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) ซิงค์คลอไรด์ (zinc chloride) กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid) แอนติโมนีไตรออกไซด์ (antimony (III) oxide) ไททาเนียมไอโซพรอพิเลท (titanium (IV) isopropylate) อลูมิเนียมอะซิทิลอะซิโทเนท (aluminum acetylacetonate) และ สแตนนัสออกโทเอท (stannous octoate) โดยทำการกำจัดน้ำที่ผสมอยู่ก่อนด้วยการกลั่นที่อุณหภูมิ100 องศาเซลเซียส ภายใต้การลดความดัน ก่อนทำพอลิเมอไรเซชันภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิช่วง 180 - 220 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.1 % โดยน้ำหนัก ทำให้ได้พอลิแอล-แลคติกแอซิดที่มีค่าน้ำหนัก โมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนมากที่สุด คือ ประมาณ 18,200 17,000 และ 18,100 กรัมต่อโมล ที่อุณหภูมิการสังเคราะห์ 180 200 และ 220 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Hiltunen et al., 1997)

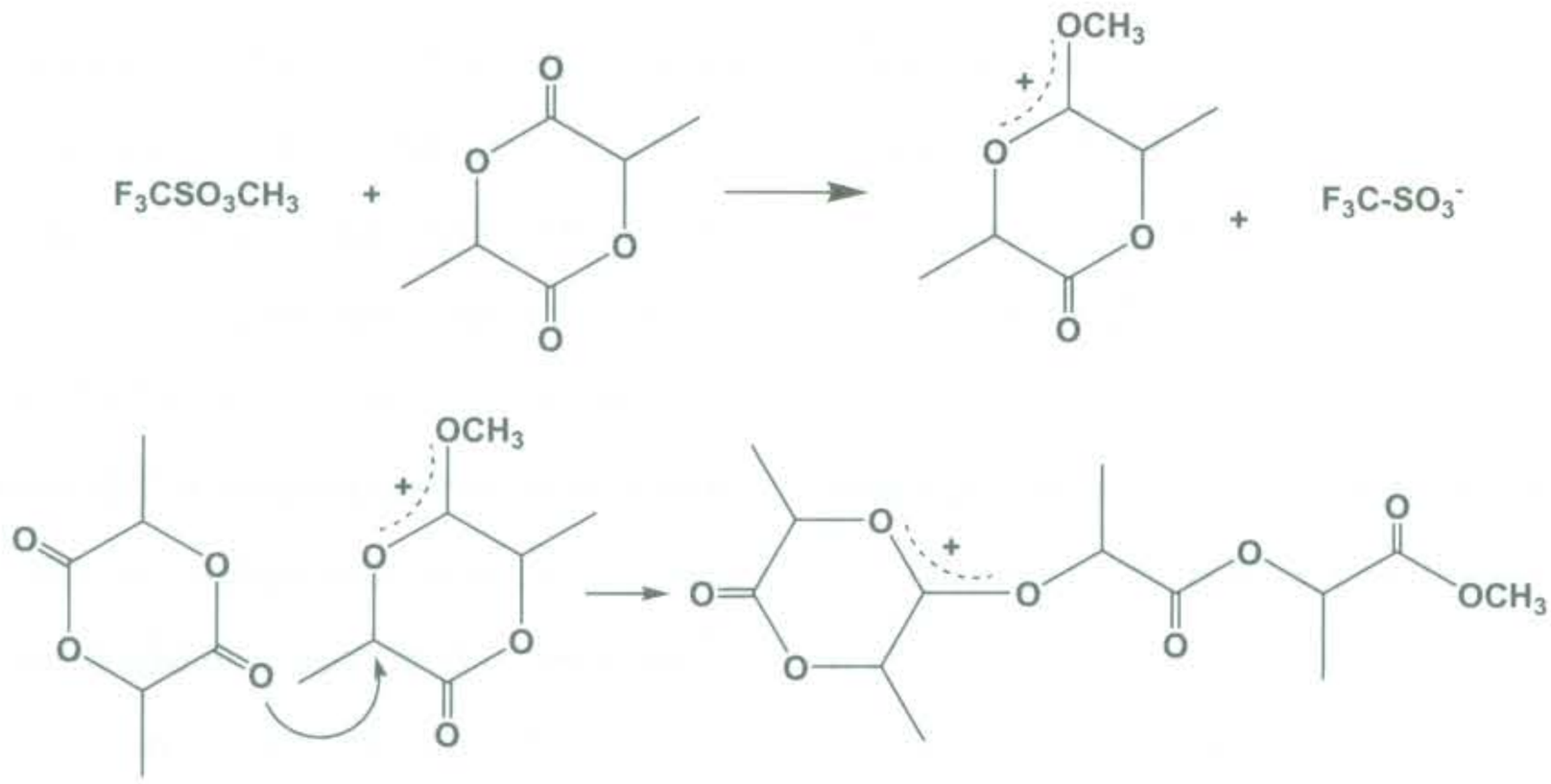
นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการใช้ระบบเร่งปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยสารประกอบโลหะ (metal compounds) และ กรด (proton acids) สามารถเตรียมพอลิแอล-แลคติกแอซิด ที่สังเคราะห์ด้วยกระบวนการพอลิเมอไรเซชันแบบควบแน่นในสถานะหลอม-ของแข็ง (melt-solid polycondensation) ให้มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนประมาณ 94,100 กรัมต่อโมลได้ (Moon et al., 2000; Moon et al., 2001) โดยหลังจากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบควบแน่นที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันที่ 10 ทอร์ (torr) ที่มีการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาร่วมระหว่างสแตนนัสคลอไรด์ (stannous (II) chloride) และกรดพารา-โทลูอีนซัลโฟนิก (*p*-toluenesulfonic acid) ที่มีความเข้มข้น 0.4 % โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 5 ชั่วโมงแล้วจะนำพอลิแอล-แลคติกแอซิดที่ได้ไปบดละเอียด ก่อนทำการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอีก 10 ชั่วโมง ภายใต้ความดันที่ 0.5 ทอร์

สำหรับกระบวนการพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงแหวนที่สำคัญของแลคไทด์สามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ แบบไอออนลบ (anionic) แบบไอออนบวก (cationic) และแบบโคออร์ดิเนชัน-การแทรก (coordination-insertion) ตัวอย่างของตัวเริ่มปฏิกิริยา (initiator) ของกระบวนการพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงแหวนแบบไอออนลบ ได้แก่ alkaline metal alkoxides (Kricheldorf, 2001) ดังแสดงในรูปที่ 9 อย่างไรก็ตามพอลิแลคไทด์ที่สังเคราะห์ได้มีน้ำหนักโมเลกุลไม่สูงเนื่องจากมีการเกิดปฏิกิริยา back biting ซึ่งทำให้โมเลกุลเกิดการขาดหรือเกิดแลคไทด์ขึ้นควบคู่ด้วย



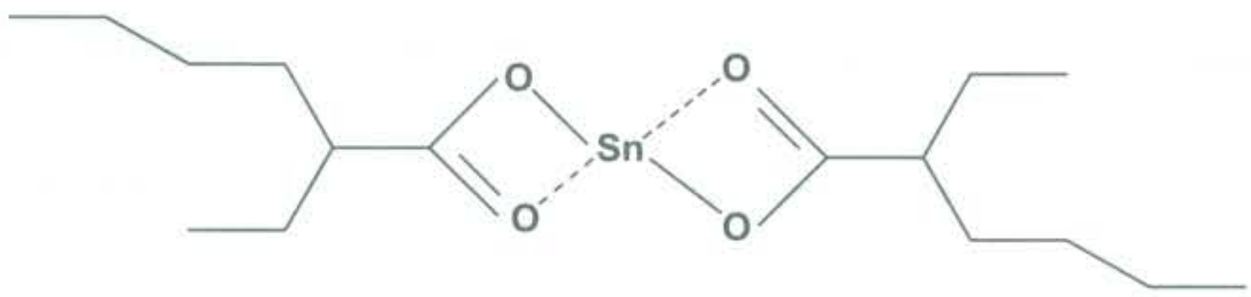
รูปที่ 9 ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงแหวนแบบไอออนลบ (anionic ring-opening polymerization) ของแลคไทด์ (ที่มา: Gupta and Kumar, 2007)

ตัวอย่างของตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ของกระบวนการพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงแหวนแบบไอออนบวก ได้แก่ borontrifluoride และ trifluoroacetic acid (Tang et al., 2003) ดังแสดงในรูปที่ 10 ข้อเสียที่สำคัญของกระบวนการนี้ คือ ทำให้โครงแบบของแลคไทด์เปลี่ยนแปลงได้ง่ายที่อุณหภูมิสูง แต่เมื่อลดอุณหภูมิการสังเคราะห์ลงจะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาช้าลง (Wang et al., 2004)



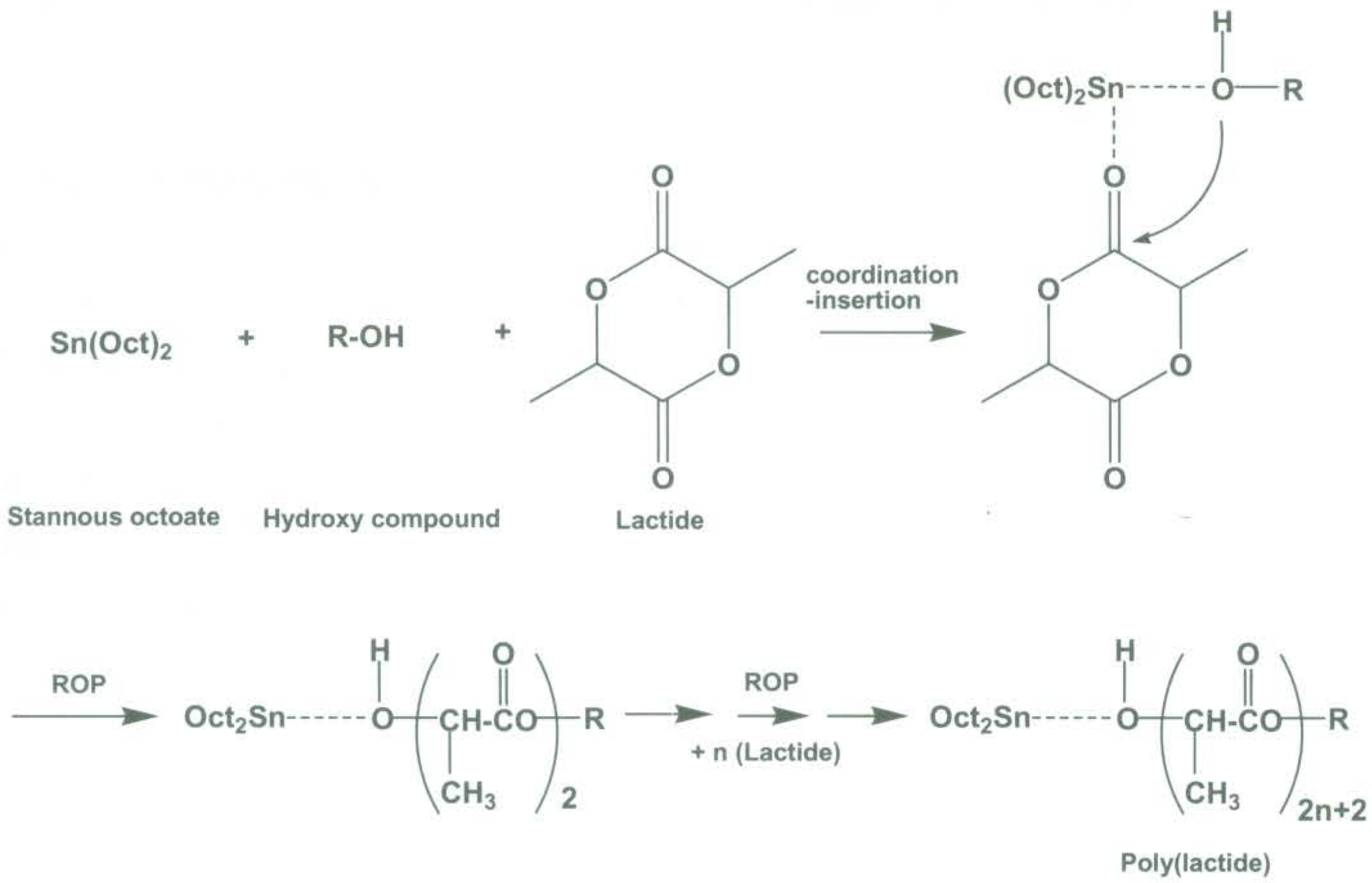
รูปที่ 10 ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงแหวนแบบไอออนบวก (cationic ring-opening polymerization) ของแลคไทด์ (ที่มา: Gupta and Kumar, 2007)

สำหรับกระบวนการพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงแหวนแบบโคออร์ดิเนชัน-การแทรก เป็นกระบวนการที่ใช้ในการสังเคราะห์พอลิแลคไทด์ในปัจจุบันมากที่สุด โดยทั่วไปใช้ระบบเริ่มปฏิกิริยา (initiating systems) ที่ประกอบด้วย สารประกอบไฮดรอกซีล (hydroxyl compounds) และสารประกอบโลหะอินทรีย์ (organometallic compounds) โดยสารประกอบโลหะอินทรีย์ที่มีการใช้มากที่สุด คือ สแตนนัสออกโทเอท (stannous octoate, $Sn(Oct)_2$) ที่มีชื่อในระบบ IUPAC ว่า tin (II)-bis-2-ethylhexanoate ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในรูปที่ 11 เนื่องจากเป็นสารประกอบโลหะอินทรีย์ที่ได้รับการอนุญาตจากองค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration, FDA) สำหรับใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารและยาได้ (Stridsberg et al., 2002)

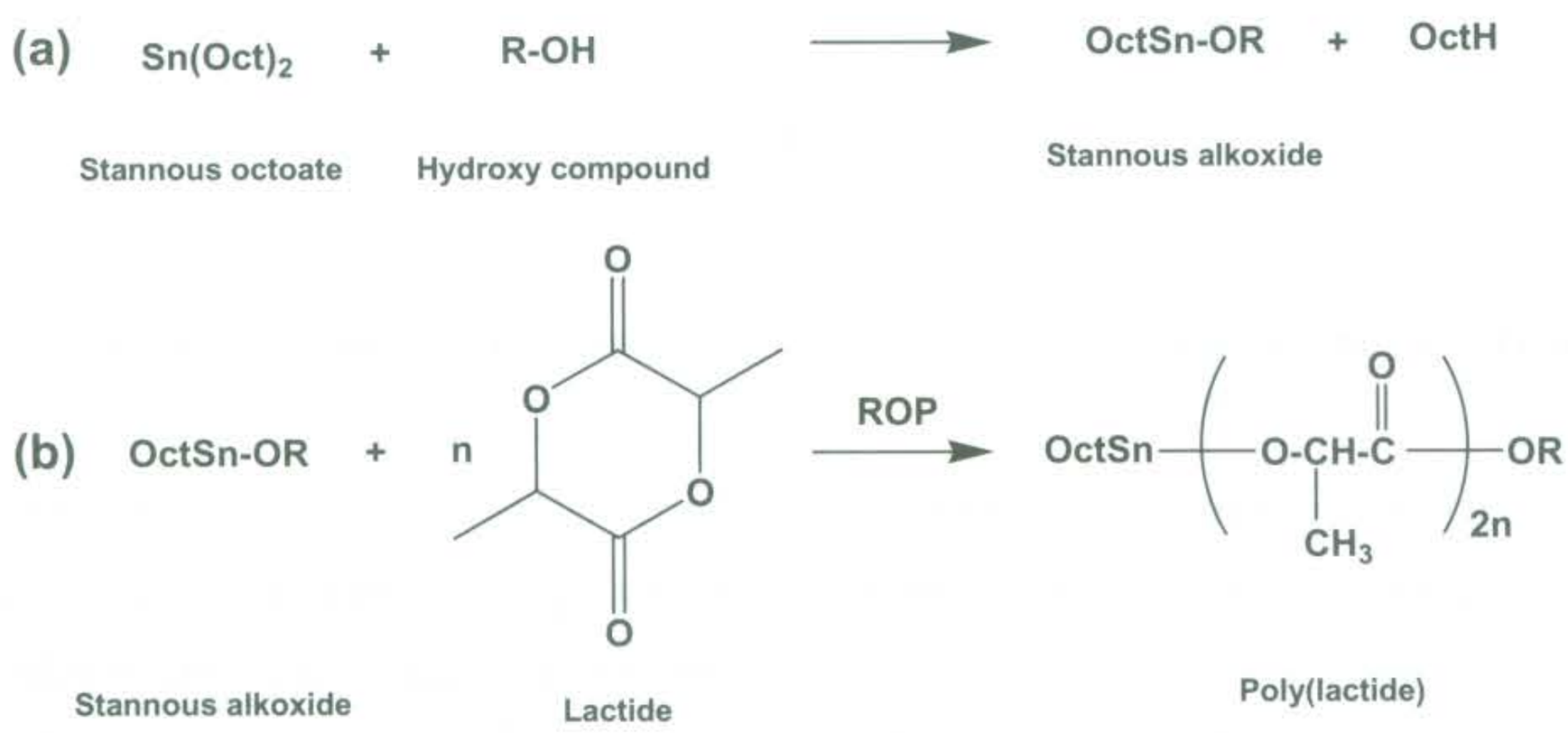


รูปที่ 11 โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลสแตนนัสออกโทเอท (ที่มา: Gupta and Kumar, 2007)

โดยการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงแหวนแบบโคออร์ดิเนชัน-การแทรกแสดงในรูปที่ 12 โดยมีการเกิด coordination ของสแตนนัสออกโทเอท สารประกอบไฮดรอกซิล และแลคไทด์ก่อนการเปิดวงแหวนของแลคไทด์ (Kricheldorf et al., 2000) นอกจากนี้ยังมีการเสนอกลไกของปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงแหวน ที่มีสแตนนัสออกโทเอท และสารประกอบไฮดรอกซีลเป็นระบบเริ่มปฏิกิริยา โดยมีการเกิดสแตนนัส อัลคอกไซด์ ที่มีตัวเริ่มปฏิกิริยาที่แท้จริงในการเปิดวงแหวนของแลคไทด์ (Kowalski et al., 2000) ดังแสดงในรูปที่ 13 พอลิแลคไทด์ ที่สังเคราะห์สามารถทำให้บริสุทธิ์จากมอนอเมอร์ที่ยังไม่เกิดปฏิกิริยา และโอลิโกเมอร์ด้วยเทคนิคการละลายและตกตะกอน โดยใช้คลอโรฟอร์มและนอร์มอล-เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย และตัวตกตะกอน เป็นต้น



รูปที่ 12 ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงของแลคไทด์โดยใช้สแตนนัสออกโทเอทและสารประกอบไฮดรอกซิลเป็นระบบเริ่มปฏิกิริยา โดยการเกิดผ่านสารประกอบเชิงซ้อน (ที่มา: Stridsberg et al., 2002)



รูปที่ 13 ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงของแลคไทด์โดยใช้สแตนนัสออกโทเอทและสารประกอบไฮดรอกซิลเป็นระบบเริ่มปฏิกิริยา โดยการเกิดสแตนนัสอัลคอกไซด์ (a) ขั้นตอนการเกิดสแตนนัสอัลคอกไซด์ และ (b) ขั้นตอนการเปิดวงแหวนของแลคไทด์ (ที่มา: Dechy-Cabaret et al., 2004)

สมบัติทางความร้อนของพอลิแลคติกแอซิด

สำหรับ PLLA และ PDLA เป็นพอลิเมอร์กึ่งผลึก (semi-crystalline polymers) ที่มีค่าอุณหภูมิการหลอม (melting temperatures, T_m) อยู่ในช่วงประมาณ 170-180 องศาเซลเซียส และมีค่าอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (glass-transition temperature, T_g) อยู่ในช่วงประมาณ 60 - 65 องศาเซลเซียส ขณะที่ PDLLA เป็นพอลิเมอร์อสัณฐาน (amorphous polymer) ไม่มีความเป็นผลึก จึงไม่ปรากฏค่า T_m โดยมีค่า T_g อยู่ในช่วงประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส (Maharana et al., 2009) โดยค่า T_g และ T_m ของพอลิแลคติกแอซิดจะมีค่ามากขึ้น เมื่อความยาวของโมเลกุล หรือน้ำหนักโมเลกุลของพอลิแลคติกแอซิดเพิ่มขึ้น

สมบัติการละลายของพอลิแลคติกแอซิด

ความสามารถในการละลาย (solubility) ในตัวทำละลายอินทรีย์ของ PLLA และ PDLLA แสดงในตารางที่ 1 โดย PDLA จะมีความสามารถในการละลายเช่นเดียวกันกับ PLLA จากตารางที่ 1 พบว่า PDLLA สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้หลายชนิดมากกว่า PLLA เนื่องจากความเป็นผลึกของ PLLA ทำให้สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆได้น้อยกว่า PDLLA

ตารางที่ 1 ความสามารถในการละลายของพอลิแลคติกแอซิดในตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ (Södergård and Stolt, 2002)

Organic solvents	PLLA	PDLLA
Isopropyl ether	×	×
Cyclohexane	×	×
Xylene	□	√
Ethyl acetate	□	√
Tetrahydrofuran	□	√
Chloroform	√	√
Methyl ether ketone	□	√
Furan	√	√
Acetone	□	√
1,4-Dioxane	√	√
Ethyl lactate	×	√
1,3-Dioxolane	√	√
Pyridine	√	√
Dimethylsulfoxide	□	√
N,N-Dimethylformamide	×	√
Ethanol	×	×

× = non-soluble, □ = swelling, √ = soluble

ค่าน้ำหนักโมเลกุลโดยความหนืด (viscosity molecular weight, M_v) ของพอลิแลคไทด์สามารถคำนวณได้จากค่าความหนืดอินทรินสิค (intrinsic viscosity, [()] ด้วยสมการของ Mark-Houwink ที่มีการใช้ตัวทำละลายต่างๆ ได้หลายสมการ ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายและอุณหภูมิที่ใช้วิเคราะห์ ดังนี้

เมื่อใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายที่ 25 องศาเซลเซียส (Hyon et al., 1997)

$[\eta] = 5.45 \times 10^{-4} M_v^{0.73}$ สำหรับ poly(L-lactide)

$[\eta] = 2.21 \times 10^{-4} M_v^{0.77}$ สำหรับ poly(D,L-lactide)

เมื่อใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายที่ 20 องศาเซลเซียส (Kricheldorf and Lee, 1995)

$[\eta] = 7.4 \times 10^{-5} M_v^{0.87}$ สำหรับ poly(L-lactide)

$[\eta] = 1.32 \times 10^{-3} M_v^{0.58}$ สำหรับ poly(D,L-lactide)

เมื่อใช้เตตราไฮโดรฟูรานเป็นตัวทำละลายที่ 37 องศาเซลเซียส (Yuan et al., 1999)

$[\eta] = 1.04 \times 10^{-4} M_v^{0.75}$ สำหรับ poly(D,L-lactide)

สมบัติเชิงกลของพอลิแลคติกแอซิด

สมบัติเชิงกลของพอลิแลคติกแอซิดขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลและระดับความเป็นผลึก (Maharana et al., 2009) พอลิแลคติกแอซิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลและระดับความเป็นผลึกที่มากกว่า จะมีสมบัติเชิงกลที่ดีกว่า โดยพอลิแลคติกแอซิดประเภทกึ่งผลึก ได้แก่ พอลิแอล-แลคติกแอซิด และพอลิดี-แลคติกแอซิด จะมีสมบัติเชิงกลที่สูงกว่าพอลิแลคติกแอซิดประเภทอสัณฐาน ได้แก่ พอลิดีแอล-แลคติกแอซิด ในการเลือกใช้งานต่างๆ จึงขึ้นอยู่กับความต้องการสมบัติเชิงกลอย่างไร เช่น ในการประยุกต์ใช้งานเป็นอนุภาคนำส่งยา สามารถเลือกใช้พอลิแลคติกแอซิดที่มีสมบัติเชิงกลไม่สูงมากนักได้ ขณะที่การประยุกต์ใช้งานเป็นเส้นไหมเย็บแผล ต้องใช้พอลิแลคติกแอซิดที่มีสมบัติเชิงกลสูงมาก เป็นต้น อิทธิพลของน้ำหนักโมเลกุลที่มีต่อสมบัติเชิงกลของพอลิแอล-แลคติกแอซิด ได้แก่ สมบัติการทนต่อแรงดึง (tensile properties) ที่ทดสอบตามมาตรฐาน ASTM D-638 และการทนต่อแรงตกกระทบ (impact strength) ที่ทดสอบตามมาตรฐาน ASTM D-256 แสดงในตารางที่ 2 ซึ่งพบว่าค่าความต้านทานต่อแรงดึง ณ จุดขาด (tensile strength) ค่าการยืดตัว ณ จุดขาด (elongation at break) และค่าความต้านทานต่อแรงตกกระทบ (impact strength) ของพอลิแลคติกแอซิดมีแนวโน้มมากขึ้น เมื่อน้ำหนักโมเลกุลมีค่ามากขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าค่าความต้านทานต่อแรงดึง ณ จุดขาดมีค่าเพิ่มขึ้น 2 เท่า เมื่อน้ำหนักโมเลกุลของพอลิแอล-แลคติกแอซิดมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 50,000 ดาลตัน เป็น 100,000 ดาลตัน แต่ค่าความต้านทานต่อแรงดึง ณ จุดขาดไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อน้ำหนักโมเลกุลของพอลิแอล-แลคติกแอซิดมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 100,000 ดาลตัน เป็น 300,000 ดาลตัน (Engelberg and Kohn, 1991)

ตารางที่ 2 สมบัติเชิงกลของพอลิแอล-แลคติกแอซิด

M_v ของ PLLA	Tensile strength at break[a] (MPa)	Elongation at breakb (%)	Impact strengthc (J/m)
20,000	47	1.3	32
33,500	54	3.3	55
47,000	59	3.5	70
71,000	66	4.0	66

[a] ความต้านทานต่อแรงดึง ณ จุดขาด จากการทดสอบสมบัติการทนต่อแรงดึง

[b] การยืดตัว ณ จุดขาด จากการทดสอบสมบัติการทนต่อแรงดึง

[c] ความต้านทานต่อแรงตกกระทบแบบมีรอยบาก (notch) จากการทดสอบการทนต่อแรงตกกระทบ

สมบัติเชิงกลของพอลิแอล-แลคติกแอซิดสามารถปรับปรุงได้โดยการเติมพลาสติไซเซอร์ (plasticizer) ดังตัวอย่างการเติม ไตรเอทิล ซิเทรต (triethyl citrate) ทำให้พอลิแอล-แลคติกแอซิดมีค่าอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วลดลง มีค่าความต้านทานต่อแรงดึงลดลง และมีค่าการยืดตัว ณ จุดขาดเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยค่าต่างๆ ดังกล่าวขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของพลาสติไซเซอร์ด้วย

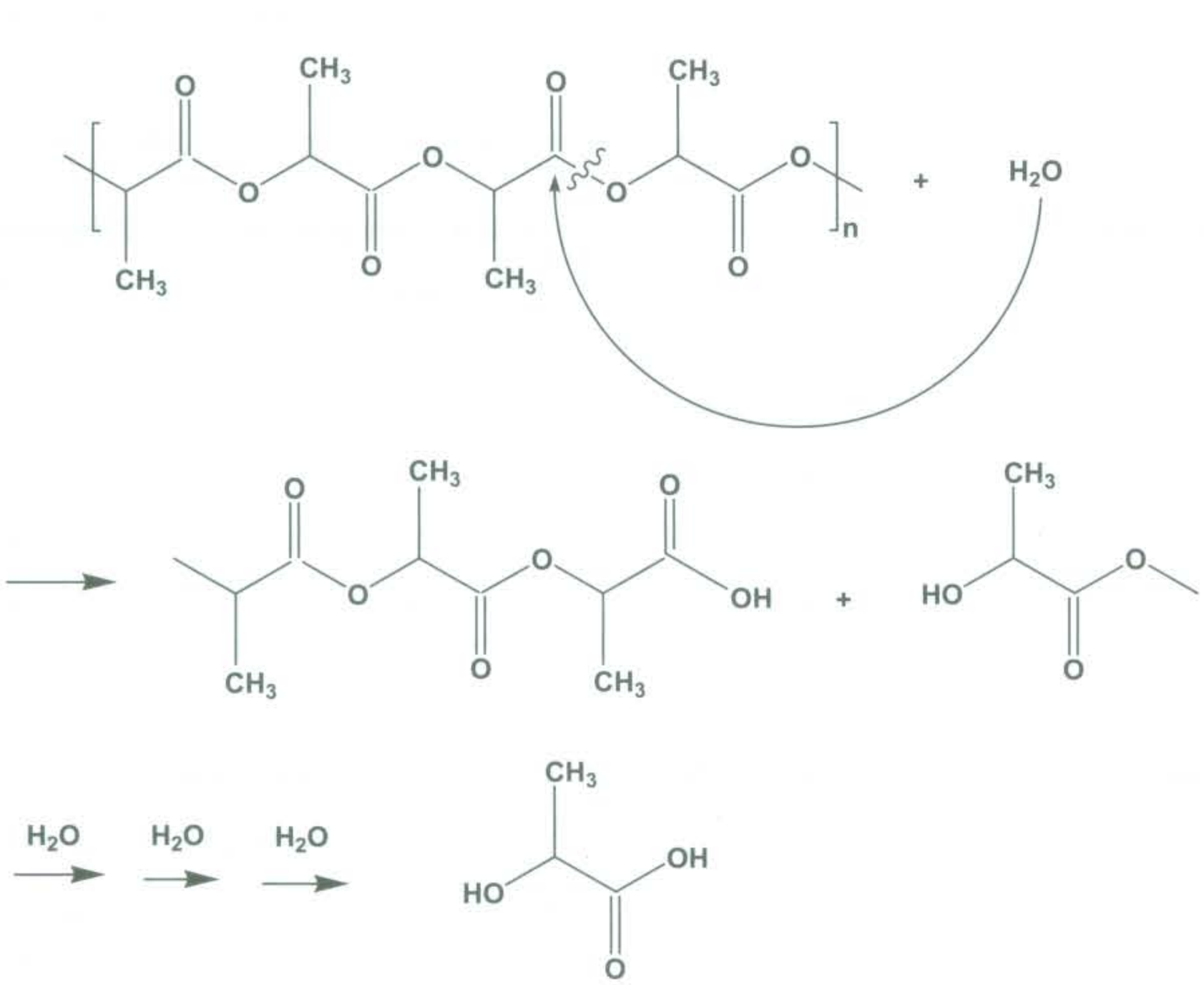
ตารางที่ 3 ค่า T_g และสมบัติเชิงกลของพอลิแอล-แลคติกแอซิด (Labrecque et al., 1997)

Triethyl citrate (% w/w)	T_g ($^{\circ}C$)	Tensile strength at break (MPa)	Elongation at break (%)
0	59	52	7
10	42	28	21
20	33	13	382
40	22	7	610

สมบัติการสลายตัวทางชีวภาพของพอลิแลคติกแอซิด

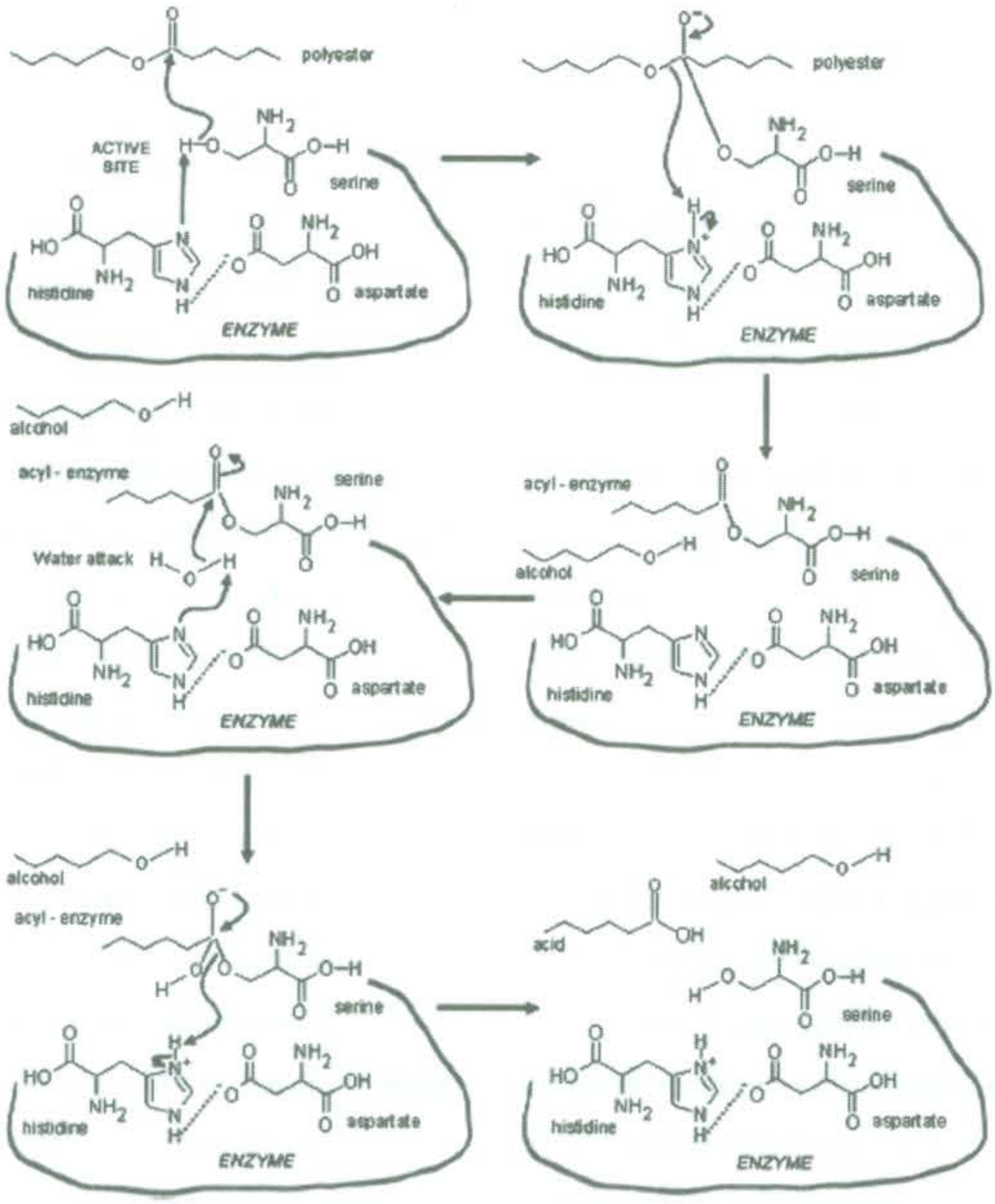
การสลายตัวทางชีวภาพของพอลิแลคติกแอซิดมี 2 แบบที่สำคัญ คือ การสลายตัวโดยไม่ใช้เอนไซม์ (non-enzyme degradation) และการสลายตัวด้วยเอนไซม์ (enzyme degradation) (Maharana et al., 2009) สำหรับการสลายตัวโดยไม่ใช้เอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ การสลายตัวด้วยกระบวนไฮโดรไลซีสแบบสุ่มที่พันธะเอสเทอร์ (รูปที่ 14) ซึ่งเป็นรูปแบบการสลายตัวที่สำคัญที่สุดของพอลิแลคติกแอซิด โดยโมเลกุลของน้ำจะเกิดการแพร่ผ่านผิววัสดุเข้าไปภายในเนื้อของวัสดุที่ทำด้วยพอลิแลคติกแอซิดก่อนเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส ซึ่งทำให้วัสดุที่ทำด้วยพอลิแลคติกแอซิดเกิดการสลายตัวทั้งจากภายในวัสดุ (bulk erosion) และการสลายตัวที่ผิววัสดุ (surface erosion) (Siepmann and Gopferich, 2001) สำหรับผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของพอลิแอล-แลคติกแอซิด คือ กรดแลคติกชนิดแอล ซึ่งถูกเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิค (pyruvic acid) ได้ภายใน

ร่างกายมนุษย์ก่อนถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำโดยการผ่านวัฏจักรกรดซิทริก (citric acid cycle) ขณะกรดแลคติกชนิดดีซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของพอลิดีแอล-แลคติกแอซิด และพอลิดี-แลคติกแอซิด จะถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยตรงทางปัสสาวะ (Yuehuei, 2000) การสลายตัวจะเกิดขึ้นในส่วนที่เป็นอสัณฐานก่อนส่วนที่เป็นผลึกของพอลิแลคติกแอซิด (Cai et al., 1996) ซึ่งยืนยันได้จากการที่พอลิแอล-แลคติกแอซิดมีระดับความเป็นผลึกเพิ่มมากขึ้น เมื่อระยะเวลาในการสลายตัวมากขึ้น (Cam et al., 1995) โดยอัตราการสลายตัวของพอลิแลคติกแอซิดจะแปรผกผันกับน้ำหนักโมเลกุลและระดับความเป็นผลึกของพอลิแลคติกแอซิด (Li et al., 1990) ดังนั้นพอลิดีแอล-แลคติกแอซิดจะสลายตัวได้เร็วกว่าพอลิแอล-แลคติกแอซิดและพอลิดี-แลคติกแอซิด โดยพฤติกรรมการสลายตัวของพอลิ แลคติกแอซิดสามารถวิเคราะห์ได้จากสมบัติต่างๆ ที่เปลี่ยนแปลงไป ได้แก่ น้ำหนักที่หายไป (weight loss) น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) การกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight distribution) สัณฐานวิทยาของพื้นผิว (surface morphology) สมบัติทางความร้อน (thermal properties) ระดับความเป็นผลึก (degree of crystallinity) และการปลดปล่อยโอลิโกเมอร์ที่เกิดจากการสลายตัวออกสู่สิ่งแวดล้อม เป็นต้น (Huang et al., 2004)



รูปที่ 14 การสลายตัวทางชีวภาพโดยกระบวนการไฮโดรไลซีสแบบสุ่มของพอลิแลคไทด์ (Maharana et al., 2009)

การสลายตัวด้วยเอนไซม์ของพอลิแลคติกแอซิดสามารถเกิดได้ทั้งในดิน และในน้ำที่มีจุลินทรีย์ (microorganisms) ต่างๆ ได้แก่ แบคทีเรีย และเชื้อราที่มีการผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆ ออกมาเพื่อใช้ในการสลายพอลิแลคติกแอซิด พอลิแลคติกแอซิดสามารถสลายตัวทางชีวภาพด้วยเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ esterases, proteases และ lipase เป็นต้น (Williams, 1981; Tokiwa and Jarerat, 2004) ซึ่งการสลายตัวด้วยเอนไซม์จะเกิดควบคู่ไปกับการสลายตัวด้วยกระบวนไฮโดรไลซีสเสมอ ความชื้นในอากาศและในดินสามารถทำให้พอลิแลคติกแอซิดสลายตัวได้ด้วยกระบวนไฮโดรไลซีส อย่างไรก็ตามการศึกษาการสลายตัวของพอลิแลคติกแอซิดด้วยเอนไซม์ส่วนใหญ่ทำการศึกษาโดยใช้เอนไซม์โดยตรงมากกว่าการศึกษาโดยใช้จุลินทรีย์ เนื่องจากสามารถควบคุมและศึกษาปัจจัยของปริมาณของเอนไซม์ที่มีผลต่ออัตราการสลายตัวได้อย่างถูกต้องมากกว่า การสลายตัวด้วยเอนไซม์จะเกิดขึ้นบริเวณผิวนอกของวัสดุ (surface erosion) ที่ทำด้วยพอลิแลคติกแอซิดเท่านั้น เนื่องจากเอนไซม์ไม่สามารถผ่านเข้าไปภายในเนื้อวัสดุได้ (Maharana et al., 2009) ทำให้น้ำหนักโมเลกุล และค่าการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลไม่เปลี่ยนแปลง ตัวอย่างกลไกการสลายตัวด้วยเอนไซม์แสดงในรูปที่ 15 ซึ่งเป็นการสลายพันธะเอสเทอร์ของเอนไซม์กลุ่ม hydrolases ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิด ได้แก่ aspartate, histidine และ serine ทำให้โมเลกุลของพอลิแลคติกแอซิดแตกออกเป็น 2 โมเลกุลที่สั้นลง โดยเกิดหมู่คาร์บอกซิลิก และหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่ปลายของแต่ละโมเลกุล



รูปที่ 15 กลไกการสลายตัวของพอลิแลคติกแอซิดด้วยเอนไซม์ hydrolases (Lucas et al., 2008)

บทสรุป

พอลิแลคติกแอซิด เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่สามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพ ที่มี 3 ไอโซเมอร์ ได้แก่ พอลิแอล-แลคติกแอซิด พอลิดี-แลคติกแอซิด และพอลิดีแอล-แลคติกแอซิด ซึ่งสังเคราะห์ได้จากการใช้กรดแลคติกที่มีโครงแบบที่ต่างกัน พอลิแลคติกแอซิด และ พอลิแลคไทด์ เป็นพอลิเมอร์ชนิดเดียวกันที่ใช้มอนอเมอร์และกระบวนการในการสังเคราะห์ต่างกัน พอลิแลคติกแอซิด สังเคราะห์โดยใช้กรดแลคติกเป็นมอนอเมอร์ด้วยกระบวนการพอลิเมอไรเซชันแบบควบแน่น ขณะที่พอลิแลคไทด์สังเคราะห์โดยใช้แลคไทด์เป็นมอนอเมอร์ด้วยกระบวนการพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงแหวน ซึ่งกระบวนการพอลิเมอไรเซชันแบบเปิดวงแหวนสามารถสังเคราะห์พอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า โครงแบบที่แตกต่างกันของพอลิแลคติกแอซิด ส่งผลต่อความเป็นผลึก สมบัติทางความร้อน สมบัติเชิงกล ความสามารถในการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ และอัตราการสลายตัวทางชีวภาพ กรดแลคติกชนิดแอลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวทางชีวภาพของพอลิแอล-แลคติกแอซิด และพอลิดีแอล-แลคติกแอซิดเท่านั้นที่สามารถเข้าสู่กระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกายสิ่งมีชีวิตได้ ขณะที่กรดแลคติกชนิดดีซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวทางชีวภาพของพอลิดี-แลคติกแอซิด และพอลิดีแอล-แลคติกแอซิด จะถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยตรงทางปัสสาวะ โดยพอลิดีแอล-แลคติกแอซิด ให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวมีทั้งกรดแลคติก ชนิดแอลและชนิดดี

แม้ว่าปัจจุบันข้อจำกัดที่สำคัญในการประยุกต์ใช้งานพอลิแลคติกแอซิด สำหรับเป็นพลาสติกชีวภาพ คือ มีราคาที่สูงกว่าพลาสติกที่ใช้งานทั่วไป ได้แก่ พอลิเอทิลีน และ พอลิพรอพิลีน อย่างไรก็ตามคาดว่าในอนาคตอันใกล้นี้ผลิตภัณฑ์จากพอลิแลคติกแอซิดจะสามารถแข่งขันในด้านราคากับพลาสติกทั่วไปในปัจจุบันได้ เนื่องจากหลายประเทศมีการสร้างนโยบายร่วมกันในการสนับสนุนการใช้งานพลาสติกชีวภาพต่างๆ โดยการใช้ระบบภาษีสำหรับการผลิต การจำหน่าย และการกำจัดขยะพลาสติกที่แตกต่างกันอย่างมาก ระหว่างพลาสติกที่ไม่สามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพ (non-biodegradable plastics) ที่มีการใช้งานกันในปัจจุบันกับพลาสติกที่สามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastics หรือ bioplastics) ทำให้ผลิตภัณฑ์พลาสติกทั้งสองชนิดมีราคาใกล้เคียงกันมากขึ้น นอกจากนี้การผลิตผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพในปริมาณที่มากขึ้น ทำให้คาดว่าต้นทุนการผลิตในอนาคตจะมีมูลค่าลดลงอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

Achmad, F., Yamane, K., Quan, S. and Kokugan, T. (2009). Synthesis of polylactic acid by direct polycondensation under vacuum without catalysts, solvents and initiators. Chem. Eng. J. 151: 342-350.

Barrows, T.H. (1991). Synthetic bioabsorbable polymers in high performance biomaterials. In Szycher M, editor. A Comprehensive Guide to Medical and Pharmaceutical Applications; Pennsylvania: The Technomic Publishing Company. p. 1-30.

Cai, H., Dave, V., Gross, R. A. and McCarthy, S. P. (1996). Effects of physical aging, crystallinity, and orientation on the enzymatic degradation of poly(lactic acid). J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys. 34: 2701-2708.

Cam, D., Hyon, S. H. and Ikada, Y. (1995). Degradation of high molecular weight poly(L-lactide) in alkaline medium. Biomaterials. 16: 833-843.

Dechy-Cabaret, O., Martin-Vaca, B. and Bourissou, D. (2004). Controlled ring-opening polymerization of lactide and glycolide. Chem. Rev. 104: 6147-6176.

Engelberg, I. and Kohn J. (1991). Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical application: a comparative study. Biomaterials. 12: 292-304.

Freiberg, S. and Zhu, X. X. (2004). Polymer microspheres for controlled drug release. Int. J. Pharm. 282: 1-18.

Gilding, D. K. and Reed, A. M. (1979). Biodegradable polymers for use in surgery-polyglycolic/ poly(lactic acid) homo- and copolymers. Polymer. 20: 1459-1464.

Gupta, A. P. and Kumar, V. (2007). New emerging trends in synthetic biodegradable polymers - Polylactide : A critique. Euro. Polym. J. 43: 4053-4074.

Hiltunen, K., Seppala, J. V. and Harkonen, M. (1997). Effect of catalyst and polymerization conditions on the preparation of low molecular weight lactic acid polymers. Macromolecules. 30: 373-379.

Huang, M. H., Li, S. And Vert, E. M. (2004). Synthesis and degradation of PLA-PCL-PLA triblock copolymer prepared by successive polymerization of 3-caprolactone and DL-lactide. Polymer. 45: 8675-8681.

Hyon, S. H., Jamshidi, K. and Ikada, Y. (1997). Synthesis of polylactides with different molecular weights. Biomaterials. 16: 1503-1508.

Kowalski, A., Duda, A. and Penczek, S. (2000). Kinetics and Mechanism of Cyclic Esters Polymerization Initiated with Tin(II) Octoate. 3. Polymerization of L,L-Dilactide. Macromolecules. 33: 7359-7370.

Kricheldorf, H. R. and Lee, S. R. (1995). Polylactones 32. High molecular weight polylactides by ring-opening polymerization with dibutylmagnesium or butylmagnesium chloride. Polymer. 36: 2995-3003.

Kricheldorf, H. R. (2001). Syntheses and application of polylactides. Chemosphere. 43: 49-54.

Kricheldorf, H. R., Kreiser-Saunders, I. and Stricker, A. (2000). Polylactones 48. $SnOct_2$-Initiated Polymerizations of Lactide: A Mechanistic Study. Macromolecules. 33: 702-709.

Labrecque, L. V., Kumar, R. A., Dave, V., Gross, R. A. and Mccarthy, S. P. (1997). Citrate esters as plasticizers for poly(lactic acid). J. Appl. Polym. Sci. 66: 1507-1513.

Li, S. M., Garreau, H. And Vert, M. (1990). Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly(α-hydroxy acids) in aqueous media. Part 1. Poly(D,L-lactic acid). J. Mater. Sci. Mater. Med. 1: 123-130.

Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F. and Nava-Saucedo, J. E. (2008). Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques. Chemosphere. 73: 429-442.

Lunt, J. (1998). Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. Polym. Degrad. Stabil. 59: 145-152.

Maharana, T., Mohanty, B. and Negi, Y. S. (2009). Melt-solid polycondensation of lactic acid and its biodegradability. Prog. Polym. Sci. 34: 99-124.

Moon, S. I., Lee, C. W., Miyamoto, M. and Kimura, Y. (2000). Melt polycondensation of L-lactic acid with Sn(II) catalysts activated by various proton acids: A direct

manufacturing route to high molecular weight poly(L-lactic acid). J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. 38: 1673-1679.

Moon, S. I., Lee, C. W., Taniguchi, I., Miyamoto, M. and Kimura, Y. (2001). Melt/solid polycondensation of L-lactic acid: an alternative route to poly(L-lactic acid) with high molecular weight. Polymer. 42: 5059-5062.

Nair, L. S. and Laurencin, C. T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. Prog. Polym. Sci. 32: 762-798.

Narayanan, N., Roychoudhury, P. K. and Srivastava, A. (2004). L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. Electron. J. Biotechn. 7: 167-179.

Siepmann, J. and Gopferich, A. (2001). Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems. Adv. Drug Deliver. Rev. 48:229-247.

Srisa-ard, M. (2001). Development of new biodegradable polyesters based on L-lactide, glycolide and (-caprolactone for use as absorbable monofilament surgical sutures. Ph.D. Thesis, Chiang Mai University, Thailand.

Södergård, A. and Stolt, M. (2002). Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. Prog. Polym. Sci. 27: 1123-1163.

Stridsberg, K. M., Ryner, M. and Albertsson, A.-C. (2002). Controlled ring-opening polymerization: polymers with designed macromolecular architecture. In degradable aliphatic polyesters. Adv. Polym. Sci. 157: 41-65.

Tang, Z., Chen, X., Liang, Q., Bian, X., Yang, L. and Piao, L. (2003). Strontium for ring-opening polymerization of cyclic eaters. J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem. 41: 1934-1941.

Tokiwa, Y. and Jarerat, A. (2004). Biodegradation of poly(L-lactide). Biotechnol. Lett. 26: 771-777.

Vink, E. T. H., Rabago, K. R., Glassner, D. A. and Gruber, P. R. (2003). Applications of life cycle assessment to NatureWork™ polylactide (PLA) production. Polym. Degrad. Stabil. 80: 403-419.

Wang, C., Li, H. and Zhao, X. (2004). Ring opening polymerization of L-lactide initiated by creatinine. Biomaterials. 25: 5797-5801.

Williams, D. F. (1981). Enzymic hydrolysis of polylactic acid. Eng. Med. 10: 5-7.

Yuan, M., Li, X., Xiong, C. and Deng X. (1999). Polymerization of lactide and lactones 5. Ring opening polymerization of ε-caprolactone and DL-lactide by rare earth 2-methylephenylsamarium. Euro. Polym. J. 35: 2131-2138.

Yuehuei, H. A. (2000). Pre-clinic in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. Biomaterials. 21: 2635-2652.

❑❑❑❑❑

ว.วิทย. มข. 39(1) 71-79 (2554) KKU Sci. J.39(1) 71-79 (2011)

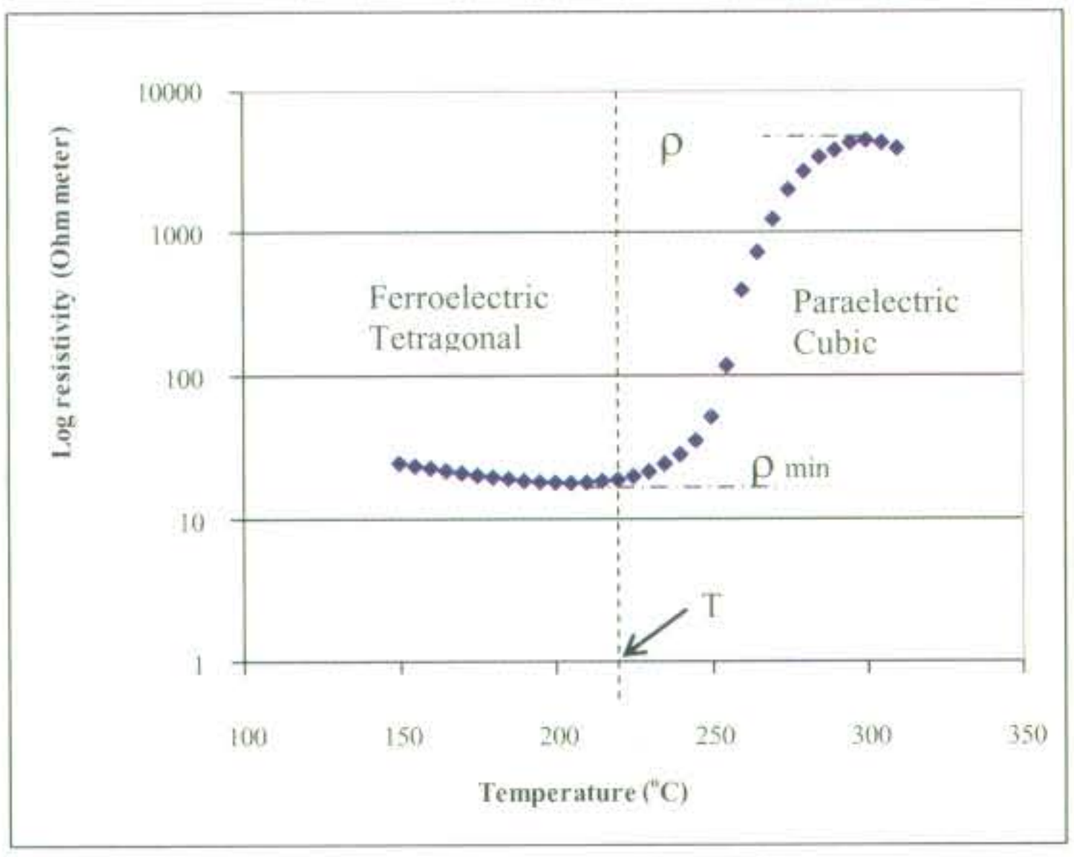
ตัวทำความร้อน PTCR-$BaTiO_3$

PTCR-$BaTiO_3$ Heating Element

สุธรรม ศรีหล่มสัก [1]

แบบจำลองการนำไฟฟ้าของ $BaTiO_3$ ที่เจือด้วยไอออนตัวให้

Barium titanate ($BaTiO_3$) เป็นวัสดุอิเล็กทรอนิกส์ที่ใช้กันมากที่สุดชนิดหนึ่ง มีการนำ $BaTiO_3$ ที่ถูกเจือ (doped $BaTiO_3$) ไปใช้ในงานต่างๆ มาก เช่น ทำตัวเป็นประจุที่มีหลายชั้น (multilayer capacitors; MLC), แทรนส์ดิวเซอร์ (transducer) หน่วยความจำเฟร์โรอิเล็กทริกแบบฟิล์มบาง (ferroelectric thin film memories) และตัวทำความร้อน (heating element) หรือตัวรับรู้ (sensor) ฯลฯ $BaTiO_3$ ที่ถูกเจือด้วยอะตอมหรือไอออนที่เป็นตัวให้ (donor) เป็นเซรามิกที่มีสมบัติ PTCR (positive temperature coefficient resistance) ซึ่งมีสภาพต้านทานไฟฟ้าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิแคบๆ ใกล้ๆ อุณหภูมิคูรี (Curie point; T_C) (Capurso, 1998) ดังแสดงในรูปที่ 1 ปรากฏการณ์ PTCR ถูกค้นพบและบันทึกไว้ครั้งแรกในปี 1955 (Haayman, 1955) ในเวลาต่อมานักวิทยาศาสตร์หลายท่านสร้างแบบจำลอง (model) หลายๆ แบบมาอธิบายปรากฏการณ์ PTCR ใน $BaTiO_3$ ที่เจือด้วยตัวไอออนให้ (donor doped $BaTiO_3$)



รูปที่ 1 สภาพต้านทานไฟฟ้า (electrical resistivity; ρ) ต่ออุณหภูมิ ของเซรามิกที่แสดงสมบัติ PTCR ขนาดความเป็น PTCR (PTCR magnitude หรือ PTCR jump) หาได้จากอัตราส่วนระหว่างสภาพต้านทานไฟฟ้าสูงสุด (maximum resistivity; ρ_{max}) ต่อสภาพต้านทานไฟฟ้าต่ำสุด (minimum resistivity; ρ_{min})

[1] สาขาวิชาวิศวกรรมเซรามิก สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา 30000

E-mail: sutamsri@sut.ac.th

Heywang (1961, 1964) เป็นผู้ที่เสนอแบบจำลองที่เป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางแบบแรก เขาอธิบายปรากฏการณ์ PTCR ว่าเกิดจากการมีกำแพงศักย์ (potential barrier) หรือชั้นปิด (blocking layer) ที่ขอบเกรน (grain boundary) ซึ่งอยู่ระหว่างเกรน (grains) ของ $BaTiO_3$ เขาเสนอว่าชั้นปิด (blocking layer) ดังกล่าวมีพฤติกรรมการรับอิเล็กตรอน (electron accepting state) ดังนั้นมันจึงทำหน้าที่เหมือนกับดักคอยจับอิเล็กตรอนจากอะตอมของสารเจือตัวให้ (donor dope atom) ทำให้เกิดชั้นของการพร่องอิเล็กตรอน (electron depletion layer) ทำให้แถบการนำ (conduction band) ที่ขอบเกรนโค้งขึ้นเกิดเป็นรอยต่อ back-to-back Schottky หรือกำแพงศักย์ (potential barrier) ดังแสดงในรูปที่ 2 ความกว้างของชั้นของการพร่องอิเล็กตรอน (electron depletion layer; d) หาได้จาก

$$d = \frac{N_s}{2N_d} \tag{1}$$

เมื่อ N_s เป็นความหนาแน่นของสถานะตัวรับ (acceptor state) ที่ขอบเกรน และ N_d คือ ความหนาแน่นของอะตอมของสารเจือตัวให้ยังผล (effective donor atom) ภายในเกรน

ความสูงของกำแพงศักย์ (ϕ) หาได้จาก (Cho, 2006)

$$\varphi = \frac{eN_s^2}{8\varepsilon_0\varepsilon_{gb}N_d} \tag{2}$$

เมื่อ ε_0, ε_{gb} คือ สภาพยอม (permittivity) ของสุญญากาศและขอบเกรน ตามลำดับ และ e คือประจุของอิเล็กตรอน

เนื่องจาก $BaTiO_3$ เป็นสารประกอบเฟร์โร-อิเล็กทริก ดังนั้นที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิคูรีจึงมีพฤติกรรมตามกฎของ Curie-Weiss กล่าวคือ

$$\varepsilon_{gb} = \frac{C}{T-\theta} \tag{3}$$

เมื่อ T คือ อุณหภูมิ C คือ ค่าคงที่ของ Curie-Weiss ซึ่งมีค่าประมาณ ~120,000 องศาเซลเซียส และ θ คือ อุณหภูมิ Curie-Weiss (Curie-Weiss temperature) จากสมการ (3) และสมการ (2) จะเห็นว่ากำแพงศักย์มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น เนื่องจากความน่าจะเป็นที่อิเล็กตรอนจะข้ามกำแพงศักย์ขึ้นกับความสูงของกำแพงศักย์ และอุณหภูมิ ดังนั้นสภาพความต้านทานไฟฟ้าที่ขอบเกรน (ρ_{gb}) ของ PTCR-$BaTiO_3$ จึงแปรตามความสูงของกำแพงศักย์และอุณหภูมิตามสมการ (Moulson, 2003)

$$\rho_{gb} = R \cdot \exp\left(\frac{e\varphi}{kT}\right) \tag{4}$$

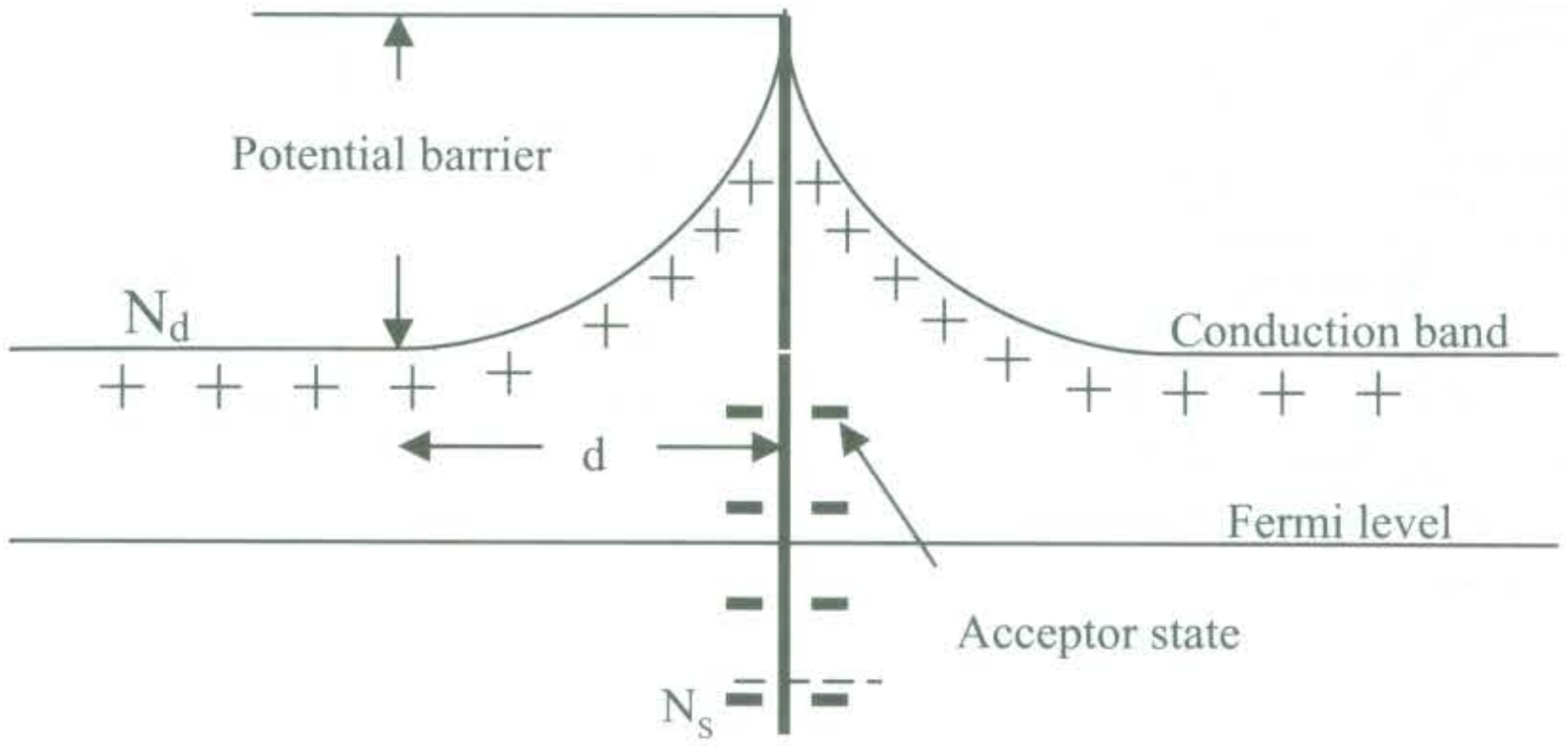
เมื่อ R คือ ค่าคงที่ และ k คือ ค่าคงที่โบลซิมัน (Boltzmann constant)

แทน (3) ไปใน (2) แล้วแทน (2) ไปใน (4) จะได้ว่า

$$\rho_{gb} = R \cdot \exp\left[\frac{e^2N_s^2}{8\varepsilon_0 N_d C}\left(1-\frac{\theta}{T}\right)\right] \tag{5}$$

จาก (5) จะเห็นว่าที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิคูรีสภาพความต้านทานไฟฟ้าที่ขอบเกรนเพิ่มขึ้นอย่างเลขชี้กำลัง (exponentially) โดยภาพรวมจะเห็นได้ว่าแบบจำลองของ Heywang อธิบายปรากฏการณ์ PTCR ว่า “ที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิคูรี (T_C) สภาพความต้านทานไฟฟ้าของขอบเกรนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ดังนั้นสภาพความต้านทานไฟฟ้าของวัสดุจึงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ”

แบบจำลองที่สองซึ่งอธิบายปรากฏการณ์ PTCR เป็นแบบจำลองของ Daniels (1978, 1979) แบบจำลองนี้อธิบายปรากฏการณ์ PTCR ว่าเกิดจากการกระจายตัวของตำหนิ (defect) ในชิ้นงาน PTCR เมื่อเจือ (dope) $BaTiO_3$ ด้วยไอออนจำพวกตัวให้ (donor) เช่น แทนที่ Ba^{2+} ไอออนด้วย La^{3+} ไอออน หรือ แทน Ti^{4+} ไอออนด้วย Nb^{5+} ไอออน อาจจะเกิดตำหนิต่างๆ ได้ดังต่อไปนี้



รูปที่ 2 ชั้นปิด (blocking layer) ที่ขอบเกรน (grain boundary) ตามแบบจำลองของ Heywang (1961, 1964)

1) ตำหนิอิเล็กทรอนิกส์ (electronic defect)

$$La_2O_3 + 2TiO_2 \rightarrow 2La^{\bullet}_{Ba} + 2Ti^{x}_{Ti} + 6O^{x}_{O} + \frac{1}{2}O_2 + 2e^{/}$$

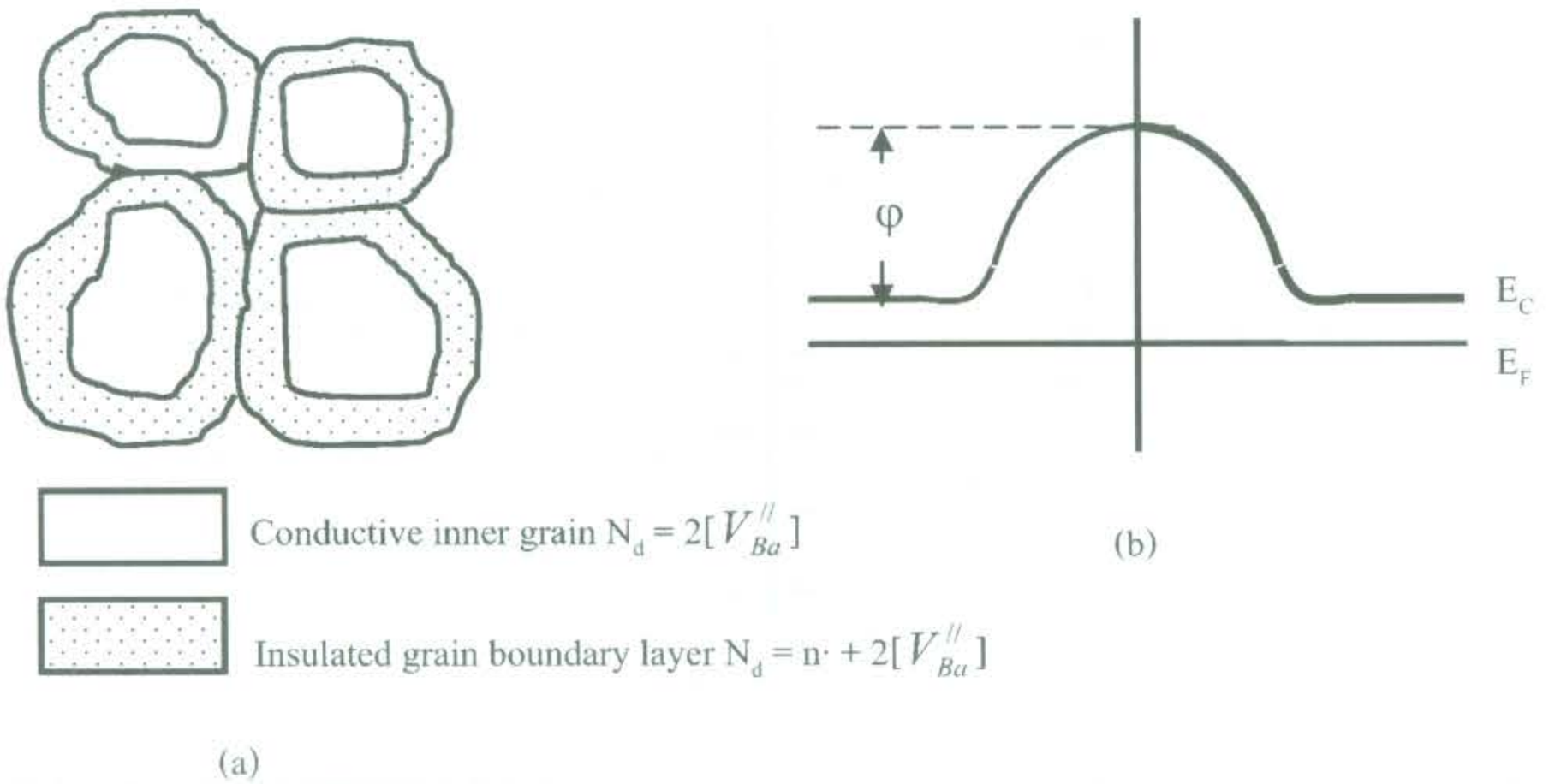
2) ตำหนิไทตาเนียมไอออน (Titanium ion defect)

$$La_2O_3 + 2TiO_2 \rightarrow 2La^{\bullet}_{Ba} + 2Ti^{/}_{Ti} + 6O^{x}_{O} + \frac{1}{2}O_2$$

3) ตำหนิช่องว่างแบเรียม (Barium vacancy defect)

$$La_2O_3 + 3TiO_2 \rightarrow 2La^{\bullet}_{Ba} + V^{//}_{Ba} + 3Ti^{x}_{Ti} + 9O^{x}_{O}$$

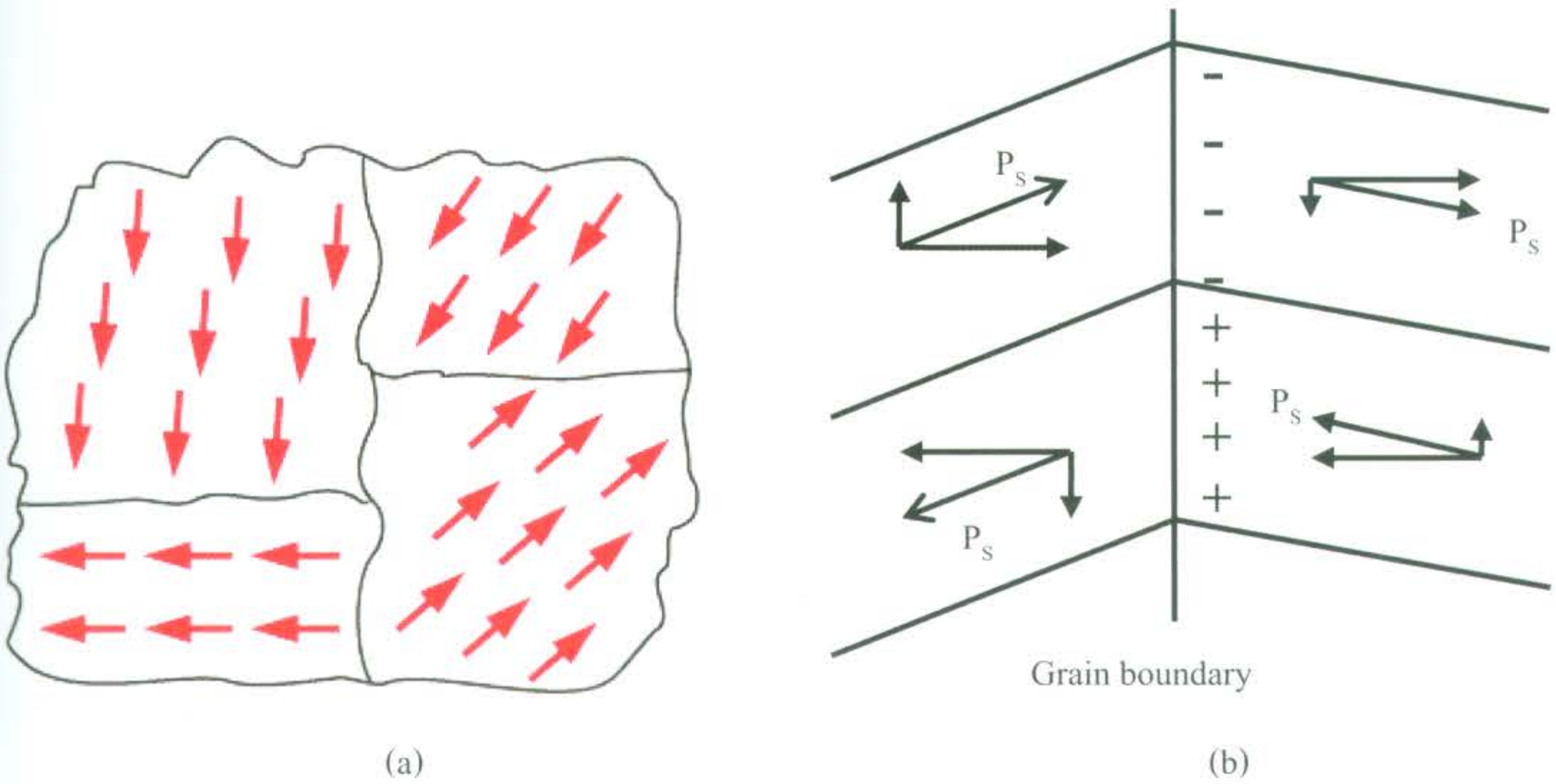
Daniels (1976, 1978/1979) บอกว่าขณะที่เผาผนึก (sinter) ในบรรยากาศแบบออกซิเดชัน $BaTiO_3$ ที่เจือด้วยไอออนตัวให้จะมีตำหนิหลักเป็นตำหนิอิเล็กทรอนิกส์ (electronic defect) ซึ่งทำให้เกิดอิเล็กตรอนจำนวนมากเป็นพาหะประจุ (Hill, 1991) ต่อมาเมื่อลดอุณหภูมิลงมาตำหนิหลักของ $BaTiO_3$ ที่เจือด้วยไอออนตัวให้จะเป็นช่องว่างแบเรียม (Barium vacancy defect; $V^{//}_{Ba}$) และตำหนิดังกล่าวจะมีจำนวนมากขึ้นเมื่อลดอุณหภูมิลงไปเรื่อยๆ ต่อมาช่องว่างแบเรียม (Barium vacancy defect) ซึ่งเกิดที่ขอบเกรนจะแพร่จากขอบเกรนเข้าไปในเกรน แต่เนื่องจากตำหนิชนิดนี้แพร่ (diffuse) ได้ช้ามากจึงมักจะไม่สามารถแพร่เข้าไปในเกรนได้หมด ส่วนใหญ่จึงยังคงเกาะกันอยู่ตามขอบเกรน อาจจะมองชั้นของตำหนิชนิดนี้ว่าเป็นชั้นของฉนวนหุ้มรอบๆ เกรน ดังรูปที่ 3a Daniels (1976, 1991) อธิบายต่อไปว่าชั้นของฉนวนนี้มีพฤติกรรมเป็นตัวรับ (acceptor) ทำหน้าที่จับอิเล็กตรอนจากเนื้อสาร (bulk) และทำให้เกิดกำแพงศักย์ขวางกั้นการเคลื่อนที่ของพาหะประจุดังรูปที่ 3b



รูปที่ 3 a) เกรน (grain) และขอบเกรน (grain boundary) ตามแบบจำลองของ Daniels (1976, 1978, 1979) b) กำแพงศักย์ (potential barrier) ที่ชั้นขอบเกรน (grain boundary layer) (ที่มา: ปรับปรุงจาก Hill, 1991)

จะเห็นว่า ทั้ง Daniels และ Heywang ต่างเห็นว่าขอบเกรนของ $BaTiO_3$ ที่เจือด้วยตัวให้ (donor doped $BaTiO_3$) ทำหน้าที่เป็นตัวรับ (acceptor) ขัดขวางการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอน ปรากฏการณ์ PTCR จึงขึ้นกับความหนาของขอบเกรน ปกติแล้วความหนาของขอบเกรนจะขึ้นกับปัจจัยหลายประการ (Alles, 1989; LaCourse, 1995; Kulwicki, 1981) เช่น ปริมาณไอออนของอะตอมตัวให้ที่เจือ อุณหภูมิที่เผาผนึก บรรยากาศที่ใช้การเผาผนึกและอัตราเร็วที่ลดอุณหภูมิชิ้นงานลงมา (cooling rate) โดยทั่วไปแล้วการลดอุณหภูมิลงมาเร็วๆ จะได้ขอบเกรนบางๆ ทำให้ชิ้นงานที่ได้แสดงสมบัติ PTCR ได้ดีกว่าการลดอุณหภูมิลงมาอย่างช้าๆ (Cho, 2006)

แบบจำลองแบบสุดท้ายเป็นแบบจำลองของ Jonker (1964, 1982) อธิบายว่า $BaTiO_3$ เป็นสารประกอบจำพวกเฟร์โรอิเล็กทริก ดังนั้นที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิคูรีของ $BaTiO_3$ จึงมีโพลาไรเซชันเกิดเอง (spontaneous polarization) ภายในผลึกของ $BaTiO_3$ และภายในผลึกหนึ่งๆ ของ $BaTiO_3$ ประกอบด้วยหลายๆ โดเมน (domain) ซึ่งภายในแต่ละโดเมนมีการจัดเรียงโพลาไรเซชันไปในทิศเดียวกันดังรูปที่ 4a ดังนั้นโพลาไรเซชันสุทธิระหว่างเกรนที่อยู่ติดกันจะทำให้เกิดประจุที่ผิว (surface charge) ของขอบเกรน ดังแสดงในรูปที่ 4b โพลาไรเซชันสุทธิจะทำให้เกรนที่มีทั้งหมดครึ่งหนึ่งมีประจุบวกที่ผิวและเกรนที่เหลืออีกครึ่งหนึ่งมีประจุลบที่ผิว Jonker อธิบายอีกว่าที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิคูรีประจุลบที่ผิวจะหักล้างหรือชดเชยกำแพงศักย์ที่ขอบเกรนซึ่งเกิดจากช่องว่างของแบเรียม (Barium vacancies) เป็นผลให้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิคูรี $BaTiO_3$ ที่เจือด้วยไอออนตัวให้มีความต้านทานไฟฟ้าต่ำ อนึ่งประจุบวกที่ผิวไม่มีผลต่อการนำไฟฟ้าเพราะอิเล็กตรอนจะวิ่งไปตามทางที่มีกำแพงศักย์ต่ำอยู่แล้ว ต่อมาเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นไปสูงกว่าอุณหภูมิคูรี $BaTiO_3$ จะเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบจำพวกพาราอิเล็กทริกซึ่งไม่มีโพลาไรเซชันเกิดเอง (spontaneous polarization) ดังนั้นกำแพงศักย์ที่ขอบเกรนจึงไม่ถูกหักล้าง ทำให้ $BaTiO_3$ ที่เจือด้วยไอออนตัวให้มีความต้านทานไฟฟ้าสูงๆ เหตุการณ์ดังกล่าวเกิดได้เร็วมากเมื่อให้ความร้อนแก่ $BaTiO_3$ ผ่านอุณหภูมิคูรี ดังนั้น $BaTiO_3$ ที่เจือด้วยไอออนตัวให้จึงแสดงสมบัติ PTCR ดังรูปที่ 1



(a) (b)

รูปที่ 4 a) โพลาไรเซชันเกิดเอง (spontaneous polarization) ในโดเมนของสารประกอบเฟร์โรอิเล็กทริก
b) ประจุที่ผิวของเกรน (surface charge) ซึ่งเกิดจากผลรวมของโพลาไรเซชันเกิดเองของเกรนที่อยู่ติดกัน
(ดัดแปลงจาก: Huybrechs, 1995)

นักวิทยาศาสตร์นำ PTCR- $BaTiO_3$ ไปใช้ทำตัวทำความร้อน (heating element) ที่ตัดไฟเองได้ โดยอัตโนมัติไม่ต้องใช้วงจรไฟฟ้า โดยอาศัยหลักการที่ว่าที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิคูรี ตัวทำความร้อนมีสภาพความต้านทานไฟฟ้าในตัวไม่มาก จึงยอมให้ไฟฟ้าวิ่งผ่านตัวมันแล้วให้ความร้อนออกมาเหมือนกับไส้หลอดไฟฟ้า ต่อมาเมื่อตัวของมันมีอุณหภูมิสูงขึ้นจนกระทั่งสูงกว่าอุณหภูมิคูรี PTCR- $BaTiO_3$ จะมีสภาพความต้านทานไฟฟ้าสูงขึ้นอย่างทันทีหลายพันเท่า ทำให้ไฟฟ้าวิ่งผ่านตัวมันไม่ได้ มันจึงหยุดให้ความร้อนอุณหภูมิจึงต่ำลง และจะให้ความร้อนออกมาอีกทีเมื่อตัวมันมีอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิคูรี

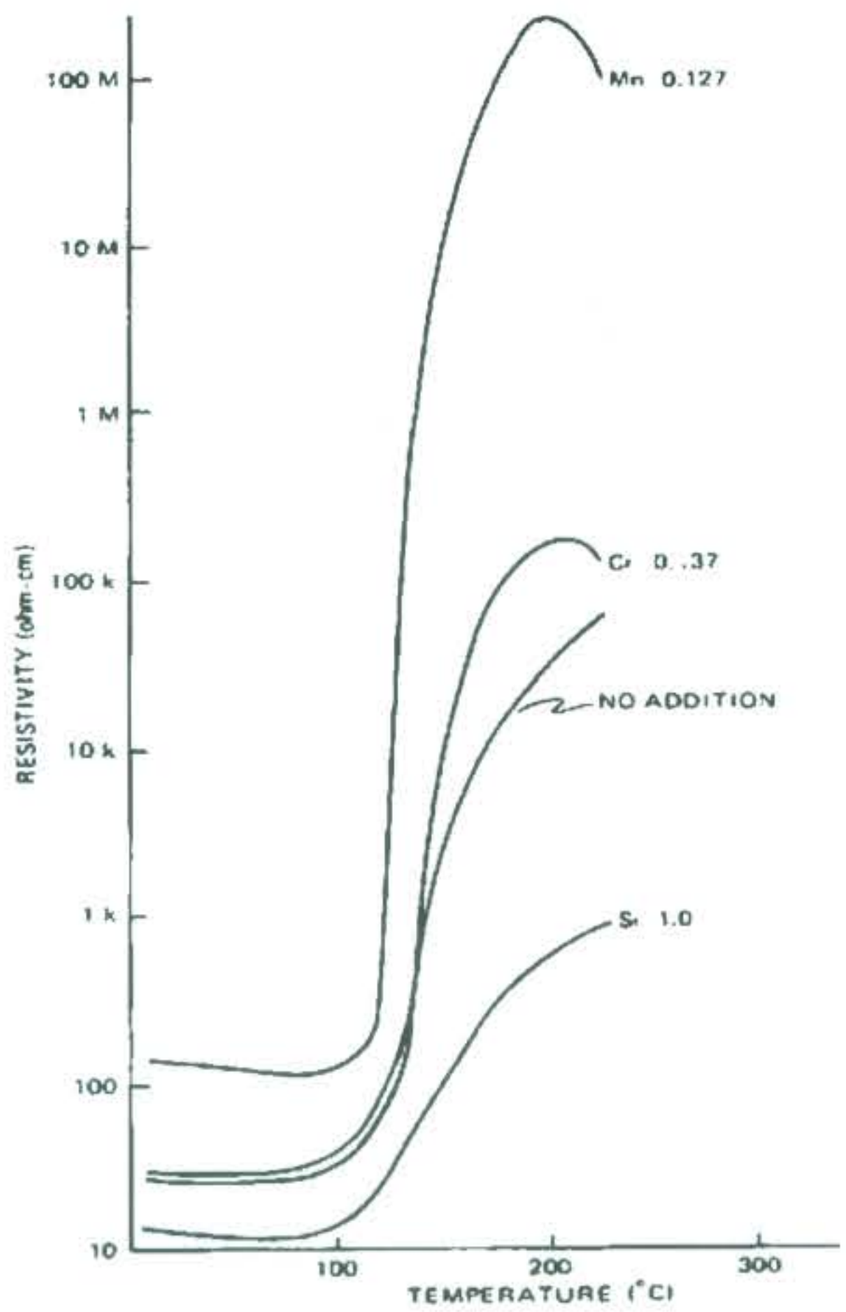
ผลของการเติมไอออนตัวรับใน PTCR-$BaTiO_3$

ผู้ผลิต PTCR จาก $BaTiO_3$ ที่เติมสารเจือตัวให้มักจะเติมไอออนหรืออะตอมของธาตุแทรนซิชันลงไปในส่วนผสมด้วย เพราะจากงานวิจัยพบว่าการเติมอะตอมของธาตุแทรนซิชันบางตัว เช่น Fe, Cr และ Mn เข้าไปใน $BaTiO_3$ ที่เจือด้วยไอออนตัวให้จะช่วยเพิ่มสมบัติ PTCR ได้ดังแสดงในรูปที่ 5 เนื่องจากไอออนของธาตุแทรนซิชันที่เติมลงไปนั้นมีเวเลนซีต่ำกว่าไอออนของ $BaTiO_3$ จึงถือว่าการเติมไอออนของธาตุทรานซิชันเป็นการเจือ $BaTiO_3$ ด้วยไอออนตัวรับ Ueoka (1974) อธิบายการเติม Mn^{2+} ลงไปใน $BaTiO_3$ ว่าที่อุณหภูมิสูงๆ การเติม Mn^{2+} จะทำให้ $BaTiO_3$ ปรับประจุให้สมดุลโดยการเกิดช่องว่างของออกซิเจน (oxygen vacancies; $V_O^{\bullet\bullet}$) อย่างไรก็ตาม จะมีจำนวนลดลงเมื่อลดอุณหภูมิลงมาที่อุณหภูมิห้องในบรรยากาศปกติ ทำให้ Mn^{2+} ซึ่งถูกเติมเข้าไปแทนที่ Ti^{4+} ใน $BaTiO_3$ เปลี่ยนเวเลนซีเป็น Mn^{3+} หรือ Mn^{4+} เพื่อรักษาสมดุลของประจุของระบบ Mn ไอออนที่มีเวเลนซีสูงๆ เหล่านี้จะทำหน้าที่คอยจับอิเล็กตรอนทำให้กำแพงศักย์ตามแบบจำลองของ Heywang สูงขึ้น ดังนั้นการเติม Mn^{2+} เข้าไปจึงทำให้ $BaTiO_3$ ที่เจือด้วยตัวให้แสดงสมบัติ PTCR มากยิ่งขึ้น อาจจะเขียนสมการเคมีของการเกิดตำหนิตามคำอธิบายของ Ueoka ได้ดังนี้

$$\textit{High Temparature} \quad BaO + MnO \rightarrow Ba_{Ba}^{x} + Mn_{Ti}^{//} + 2O_O + V_O^{\bullet\bullet}$$

$$\textit{Low Temperature} \quad 2Mn_{Ti}^{//} + V_O^{\bullet\bullet} \rightarrow 2Mn_{Ti}^{/}$$

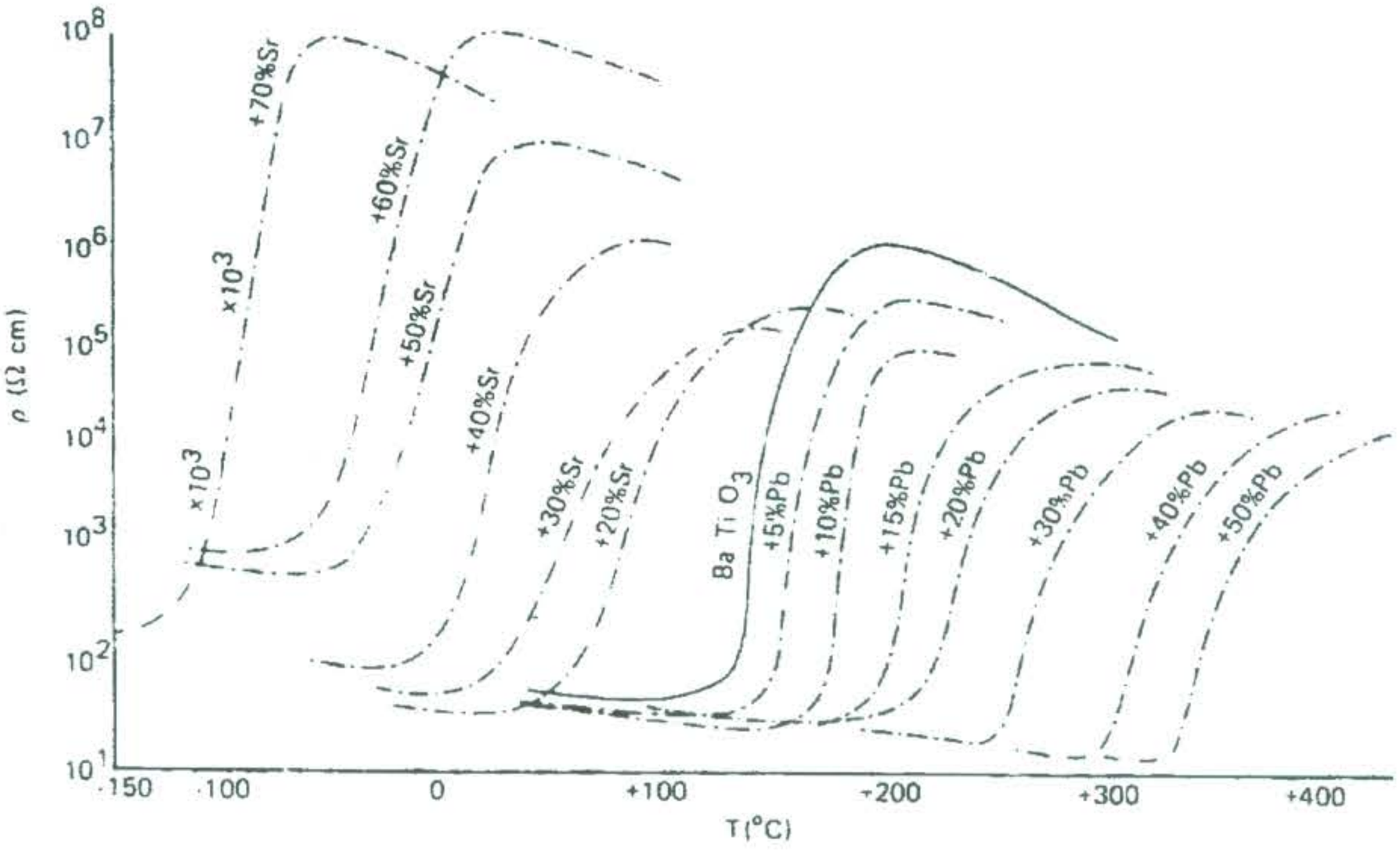
$$\textit{or} \quad Mn_{Ti}^{//} + V_O^{\bullet\bullet} \rightarrow Mn_{Ti}^{x}$$



รูปที่ 5 สภาพความต้านทานไฟฟ้าต่ออุณหภูมิของ $BaTiO_3$ ที่เจือไอออนตัวให้ที่เติม Mn, Cr หรือ Si จากภาพจะเห็นว่า Mn ที่เติมช่วยเพิ่ม PTCR ขึ้นไปเป็น 10^7 (ที่มา: Ueoka, 1974)

ผลของการเติมไอโซเวเลนซ์ไอออน (isovalence) ใน PTCR-$BaTiO_3$

การแทนที่ Ba^{2+} ใน $BaTiO_3$ ด้วยไอออนที่มีเวเลนซี 2+ เท่ากัน เช่น Sr^{2+}, Pb^{2+}, Ca^{2} จะทำให้การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึกจากผลึกแบบเททระโกนัล (tetragonal) ไปเป็นผลึกแบบลูกบาศก์ (cubic) เกิดที่อุณหภูมิเปลี่ยนไป ซึ่งเป็นผลให้อุณหภูมิที่เกิดปรากฏการณ์ PTCR เปลี่ยนไปด้วยดังแสดงในรูปที่ 6 จากรูปจะเห็นว่า การแทนที่ Ba^{2+} ด้วย Sr^{2+} จะทำให้ $BaTiO_3$ แสดงปรากฏการณ์ PTCR ที่อุณหภูมิต่ำลง ในทางตรงกันข้ามการแทนที่ Ba^{2+} ด้วย Pb^{2+} จะทำให้ $BaTiO_3$ แสดงปรากฏการณ์ PTCR ที่อุณหภูมิสูงขึ้น จึงอาจจะเลือกเติมไอโซเวเลนซ์ไอออนเพื่อควบคุมให้ PTCR- $BaTiO_3$ ที่ใช้ทำตัวทำความร้อน (heating element) ตัดไฟที่อุณหภูมิที่ต้องการได้



รูปที่ 6 สภาพความต้านทานไฟฟ้าต่ออุณหภูมิของ $BaTiO_3$ ที่เจือด้วย Sr และ Pb (ที่มา: Andrich, 1965-1966)

สารเติมแต่งช่วยในการเผาผนึก PTCR-$BaTiO_3$

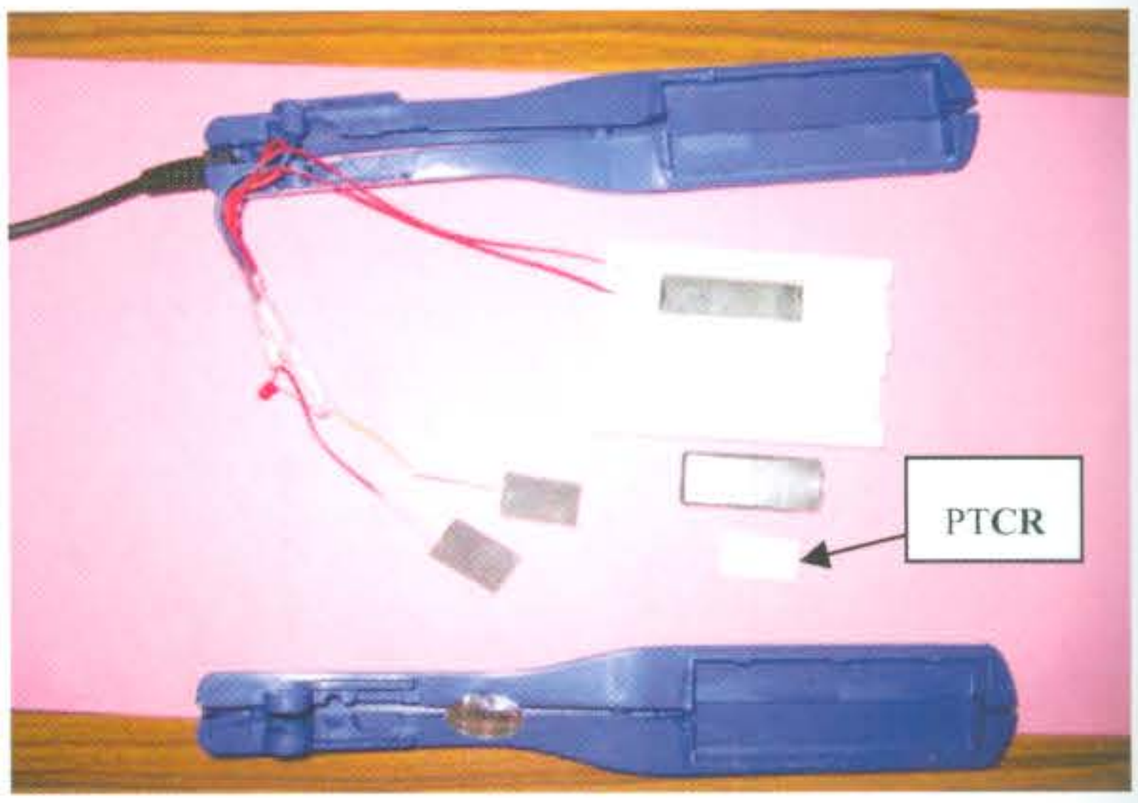
ในการทำ PTCR จาก $BaTiO_3$ อาจจะใส่สารเติมแต่ง (additive) บางชนิดลงไปช่วยลดอุณหภูมิเผาผนึกของ $BaTiO_3$ สารเหล่านี้ยังสามารถช่วยทำให้เกิดการเผาผนึกแบบเฟสของเหลว (liquid phase sintering) ได้ด้วย สารเติมแต่งที่โรงงานผลิต PTCR นิยมเติมไปช่วยในการเผาผนึก $BaTiO_3$ ที่ใช้งานทาง PTCR เป็นของผสมระหว่าง Al_2O_3 SiO_2 และ TiO_2 เรียกว่า AST system (Matsuo, 1968; Bomlai, 2005)

ตัวอย่างการใช้ PTCR-$BaTiO_3$

ตัวอย่างการนำ PTCR-$BaTiO_3$ ไปใช้ ได้แก่ การนำไปทำตัวทำความร้อนในเครื่องรีดผมดังรูปที่ 7 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของชิ้น PTCR จากเครื่องรีดผมสองเครื่องด้วยเครื่องเอกซ์เรย์ฟลูออเรสเซนซ์ (X-ray fluorescent) แสดงในตารางที่ 1 จากตารางจะเห็นว่าชิ้น PTCR ในเครื่องรีดผมมีธาตุ Ba, Pb และ Ti เป็นองค์ประกอบหลัก Ba และ Ti คงเป็นส่วนผสมหลักใน $BaTiO_3$ นั้นเอง ส่วน Pb น่าจะเป็นอะตอมของไอโซเวเลนซ์ที่เติมลงไปเพื่อให้ PTCR-$BaTiO_3$ แสดงพฤติกรรม PTCR ที่อุณหภูมิประมาณ 200-250 องศาเซลเซียส เพื่อให้เครื่องรีดผมตัดไฟที่อุณหภูมิไม่ต่ำเกินไป เพราะ $BaTiO_3$ ที่ไม่ได้เติม Pb จะแสดงพฤติกรรม PTCR ตัดไฟที่อุณหภูมิประมาณ 120 องศาเซลเซียส (ดังแสดงในรูปที่ 6) ซึ่งต่ำเกินไปที่จะใช้งานในเครื่องรีดผม นอกจากนี้ PTCR ในเครื่องรีดผมยังประกอบด้วยอะตอมของธาตุ Nb อีกด้วยซึ่งคงเป็นอะตอมของสารเจือตัวให้ (donor dope) ที่เติมลงไปเพื่อทำให้ $BaTiO_3$ แสดงสมบัติ PTCR ตามแบบจำลองที่กล่าวไปแล้วนั้นเอง อนึ่งจะเห็นว่า PTCR ในเครื่องรีดผมยังประกอบด้วยธาตุ Fe อีกด้วย ซึ่งผู้ผลิตคงจะเติม Fe ลงไปเป็นสารเจือตัวรับ (acceptor dope) เพื่อกระตุ้นให้ $BaTiO_3$ แสดงสมบัติ PTCR มากยิ่งขึ้นนั้นเอง สุดท้ายจะเห็นว่า PTCR ในเครื่องรีดผมประกอบด้วยธาตุ Si และ Al ด้วยซึ่งอาจจะเป็นสารเติมแต่งที่ผู้ผลิตใส่เข้าไปเพื่อช่วยในการเผาผนึกนั้นเอง ส่วน Ca ที่พบใน PTCR ของเครื่องรีดผมนั้นยังไม่ทราบแน่ชัดว่าทำหน้าที่อะไรในเซรามิกแบบนี้



(a)



(b)

รูปที่ 7 a) เครื่องรีดผม b) เครื่องรีดผมที่ถอดเป็นชิ้นๆ เพื่อแสดงชิ้นเซรามิก PTCR-BaTiO ที่ใช้ทำเป็นตัวทำความร้อน (heating element)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของชิ้น PTCR-$BaTiO_3$ ที่ใช้ในเครื่องรีดผม

องค์ประกอบ	ชิ้นตัวอย่างที่ 1	ชิ้นตัวอย่างที่ 2
Barium oxide (BaO)	44.5	43.8
Lead oxide (PbO)	23.9	25.7
Titanium dioxide (TiO_2)	27.9	27.9
Silica (SiO_2)	1.03	1.07
Alumina (Al_2O_3)	1.18	0.52
Calcium oxide (CaO)	0.34	0.4
Ferric oxide (Fe_2O_3)	0.26	0
Niobium Pentoxide (Nb_2O_5)	0.21	0.17

เอกสารอ้างอิง

Alles, A. B., Amarakoon, V. W. and Burdick, V. L. (1989). Positive Temperature Coefficient of Resistivity Effect in Undoped,Atmospherically Reduced Barium Titanate. J. Am. Ceram. Soc. 72(1): 148-51.

Andrich, E. (1965-66). Properties and Applications of PTC Thermistors. Electronic Application. 26(3): 123.

Bomlai, P., Sirikurat, N., Brown, A. and Milne, S. (2005). Effects of TiO_2 and SiO_2 additions on Phase Formation, Microstructures and PTCR Characteristics of Sb-doped Barium Strontium Titanate Ceramics. J. Euro. Ceram. Soc. 25: 1905-1918.

Capurso, J. S. and Schulze, W. A. (1998). Piezoresistivity in PTCR Barium Titanate Ceramics: I, Experimental Findings. J. Am. Cer. Soc. 81(2): 337-46.

Cho, S. H. (2006). Theoretical Aspects of PTC Thermistors. J. of the Korean Ceramic Society. 43(11): 673-679.

Daniels, J., Hardtl, K. H. and Wernicke, R. (1978-79). The PTC Effect of Barium Titanate. Philips Tech Rev. 38(3): 73-82.

Daniels, J. and Hardtl, K. H. (1976). Part I Electrical Conductivity at High Temperature of Donor Doped Barium Titanate Ceramics. Philips Res. Repts. 31: 489-504.

Haayman, P. W., Dam, R. W. and Klasens, H. A. (1955). Method of Preparation of Semiconducting Materials. West German Pat. No. 929 350, June 23.

Heywang, W. (1961). Barium titanate as a Semiconductor with Blocking Layers. Solid State Electron 3(1): 51-58.

Heywang, W. (1964). Resistivity Anomaly in Doped Barium Titanate. J. Am. Ceram. Soc. 47(10): 484-490.

Hill, D. C. and Tuller, H. L. (1991). Ceramic Sensors: Theory and Practice. in Ceramic Materials for Electronics Processing, Properties and Applications (2nd edition) edited by Buchanan, R. C. Marcel Dekker Inc., 249-347.

Hubrechts, B., Ishizaki K. and Takata, M. (1995). Review the Positive Temperature Coefficient of Resistivity in Barium Titanate. J. Mater. Sci. 30: 2463-74.

Jonker, G. H. (1964). Some Aspects of Semiconducting Barium Titanate. Solid State Electron. 7: 895-903.

Jonker, G. H. and Havinga, E. E. (1982). The Influence of Foreign Atoms on the Crystal Lattice of Barium Titanate. Mater. Res. Bull. 17: 345-350.

Kulwicki, B. M. (1981). PTC Material Technology 1955-1980. in Advanced in Ceramics Vol. 1, Grain Boundary Phenomena in Electronic Ceramics. edited by Levinson, L. M. Columbus, Ohio: American Ceramic Society. 138-54.

LaCourse, B. C. and Amarakoon, V. W. (1995). Characterization of the Firing Schedule for Positive Temperature Coefficient of Resistance $BaTiO_3$. J. Am. Ceram. Soc. 78(12): 3352-3356.

Matsuo, Y., Fujimura, M., Sasahi, H., Nagase, K. and Hayakawa, S. (1968). Semiconducting $BaTiO_3$ with Al_2O_3 SiO_2 and TiO_2. Am. Ceram. Soc. Bull. 47: 292-297.

Moulson, A. J. and Herbert, J. M. (2003). Electroceramics. (2nd edition). New York: John Wiley & Sons Inc. 167-173.

Ueoka, H. and Yodogawa, M. (1974). Ceramic Manufacturing Technology for the High Performance PTC Themistor. IEEE Trans. Manuf. Technol. 32: 77-82.

❑❑❑❑❑

ว.วิทย. มข. 39(1) 80-95 (2554) KKU Sci. J.39(1) 80-95 (2011)

คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของผลผลิตจากปฏิกิริยาเมลลาร์ดของไคโตแซนและน้ำตาล

Antioxidant Activity of Maillard Reaction Product from Chitosan and Sugar

นพรัตน์ มะเห [1] ผุสดี มุหะหมัด [2] และ อุไรวรรณ วัฒนกุล [1]*

บทคัดย่อ

การทดลองครั้งนี้ศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของผลผลิตของปฏิกิริยาเมลลาร์ดจากไคโตแซนและน้ำตาล 6 ชนิด คือ กลูโคส ฟรุกโตส แลคโตส อะราบิโนส มอลโตส และ กาแลคโตส โดยตรวจวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และการวัด reducing power ตรวจวัดสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นซึ่งคือผลผลิตปฏิกิริยาเมลลาร์ด และหาความสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นกับคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกัน คือ สารประกอบเชิงซ้อนทุกชนิดจะมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าไคโตแซนเดี่ยวๆ โดยสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลอะราบิโนส และ สารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลกาแลคโตส มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารประกอบเชิงซ้อนของน้ำตาลชนิดอื่น โดยมีค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถทำให้ค่า % radical scavenging activity ลดลงร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 26.38 กรัม/มิลลิลิตร และ 28.50 กรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนค่า Antiradical Efficiency เท่ากับ 0.03791 และ 0.03509 ตามลำดับ สารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลกาแลคโตสมีค่า reducing power ที่ไม่แตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเทียบกับ BHA (Butylated hydroxyanisole) คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์ที่ค่อนข้างสูงกับการเกิดสารสีน้ำตาล (A_{420}) ซึ่งเป็น final stage ของปฏิกิริยาเมลลาร์ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลมาใช้เป็นตัวเลือกหนึ่งของสารจากธรรมชาติเพื่อใช้ทดแทนสารเติมแต่งในอาหารที่ได้จากการสังเคราะห์

[1] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อ.สิเกา จ.ตรัง 92150

[2] คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

* Corresponding Author, E-mail: mnopparat@hotmail.com

Abstract

Antioxidant activity of maillard reaction products from chitosan and six types of sugar including glucose, fructose, lactose, arabinose, maltose, and galactose was investigated. Antioxidant property was measured the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging capacity and measurement of reducing power. The chitosan-sugar complex or maillard reaction product was measured and its correlation with antioxidant property was evaluated. Two methods of antioxidant property measurement showed similar profiles of antioxidant activity. All of the chitosan-sugar complex exhibited better antioxidant activity than chitosan. The chitosan-arabinose complex and the chitosan-galactose complex showed the most effective, compared to other sugar complex. The concentration that cause 50% inhibition (IC_{50}) of chitosan-arabinose complex and chitosan-galactose complex were determined to be 26.38 g/ml and 28.50 g/ml, respectively, while antiradical efficiency were 0.03791 and 0.03509 , respectively. Reducing power of chitosan-galactose complex was not statistically significant ($p>0.05$), compared with BHA (Butylated hydroxyanisole). High correlation between antioxidant activity and browning polymer (A_{420}), final stage of maillard reaction, was observed. Therefore, chitosan-sugar complexes may be use as alternative natural products for synthetic food additive replacement.

คำสำคัญ : ไคโตแซน ปฏิกิริยาเมลลาร์ด สารต้านอนุมูลอิสระ

Keywords : Chitosan, Maillard reaction, Antioxidant

บทนำ

ปัจจุบันความสนใจเกี่ยวกับสารเติมแต่งในอาหารที่ผลิตจากธรรมชาติมีความสนใจเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากอันตรายจากสารเติมแต่งในอาหารที่ได้จากการสังเคราะห์ ไคโตแซนเป็นวัสดุจากธรรมชาติอีกชนิดหนึ่งที่มีการนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหาร เช่น ใช้เป็นสารให้ความหนืด สารให้ความคงตัว อิมัลซิฟายเออร์ สารช่วยเก็บรักษากลิ่น สารช่วยให้น้ำผลไม้ใส และสารช่วยให้สีคงตัวเป็นต้น (Shahidi, 2007) ไคโตแซนเป็นพวกโพลีอะมิโนแซคคาไรด์ (polyaminosaccharide) ซึ่งได้จากกระบวนการกำจัดหมู่อะซิติล (deacetylation) ของไคติน ทำให้หมู่อะซิตาไมด์ (acetamide group) ของไคติน ถูกเปลี่ยนเป็นหมู่อะมิโน (amino group,-NH_2) ไคโตแซนมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของ D-กลูโคซามีน (D-glucosamine) เป็นชีวโมเลกุลที่มีสีขาว ไม่มีกลิ่นและย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Singh and Ray, 1994; Qurashi et al., 1992) ไคโตแซนมีความเป็นพิษต่ำ ค่า LD_{50} ของไคโตแซน จากการทดลองด้วยหนูในห้องปฏิบัติการ มีค่าเท่ากับ 16 กรัม/กิโลกรัม ของน้ำหนักร่างกาย ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเกลือและน้ำตาล (Kroschwitz, 1990)

ไคโตแซนและอนุพันธ์ของไคโตแซนเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระอีกแหล่งหนึ่งที่ได้รับความสนใจเนื่องจากไคโตแซนมีความปลอดภัย สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของไคโตแซนจะขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลและความหนืด โดยไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและความหนืดต่ำจะมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูง (Kamil et al., 2002; Xie et al., 2001) จากการศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของไคโตแซนซึ่งสกัดได้จากเห็ด shiitake พบว่ามีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะความสามารถในการจับอนุมูลไฮดรอกซิล และความสามารถในการจับเฟอรัสไอออน (Yen et al., 2007)

ปฏิกิริยาเมลลาร์ดเกิดจากการรวมตัวกันระหว่างหมู่คาร์บอนิลของ reducing sugar หรืออัลดีไฮน์ หรือ คีโตน กับหมู่เอมีนของกรดอะมิโน หรือโปรตีน หรือสารประกอบไนโตรเจน ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาหนึ่งที่เกิดขึ้นในอาหาร (Hodge and Rist, 1953) สำหรับผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดของไคโตแซนมีการศึกษาในก๋วยเตี๋ยวสด ซึ่งเตรียมผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction product, MRP) โดยผสมไคโตแซนและน้ำตาลไซโลสในสัดส่วน 1:1.5 (w/w) ปรับพีเอชแล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จนครบ 60 ชั่วโมง จากนั้นนำ MRP ที่ได้มาผสมกับแป้งที่ใช้ผลิตก๋วยเตี๋ยว ผลการทดลองพบว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาเมลลาร์ดของไคโตแซนและไซโลส สามารถยืดอายุของก๋วยเตี๋ยวได้ (Huang et al., 2007) นอกจากนั้น Kanatt et al. (2008) พบว่าการนำไคโตแซนมาทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับกลูโคส (chitosan glucose complex) จะทำให้คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพดีขึ้นกว่าไคโตแซนปกติ ซึ่งผลิตภัณฑ์สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นเป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด

การทดลองครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบเชิงซ้อนไคโตแซนและน้ำตาลโดยใช้น้ำตาล 6 ชนิด คือ กลูโคส ฟรุกโตส แลคโตส อะราบิโนส มอลโตส และกาแลคโตส เพื่อเป็นแนวทางในการนำสารประกอบเชิงซ้อนจากน้ำตาลดังกล่าวมาใช้ทดแทนสารเติมแต่งในอาหารที่ได้จากการสังเคราะห์ต่อไป

วิธีการทดลอง

การเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาล

เตรียมสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาล ตามวิธีการของ Kanatt et al. (2008) โดยนำไคโตแซนมาละลายในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 1 จากนั้นนำสารละลายไคโตแซนที่เตรียมไว้มาทำการ autoclave กับน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด สำหรับน้ำตาลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จะประกอบด้วยน้ำตาลจำนวน 6 ชนิด คือ กลูโคส ฟรุกโตส แลคโตส อะราบิโนส มอลโตส และกาแลคโตส

สำหรับร้อยละ 100 สารประกอบเชิงซ้อนในการทดลองครั้งนี้เกิดจากปฏิกิริยาของการละลายน้ำตาล 1 กรัม ในสารละลายร้อยละ 1 ของไคโตแซนในกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วให้ความร้อน

การศึกษาการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล

วัดการเกิดสีน้ำตาลตามวิธีของ Ajandouz et al. (2001) โดยทำการวัด UV-absorbance และความเข้มของการเกิดสีน้ำตาล (browning intensity) ของสารผสมระหว่างไคโตแซนและน้ำตาล และน้ำตาลหรือไคโตแซนเดี่ยวๆ ที่อุณหภูมิห้อง ความยาวคลื่น 294 นาโนเมตร สำหรับขั้นการเกิดสารตัวกลาง (intermediate stages) ของ nonenzymatic browning reaction และ 420 นาโนเมตร สำหรับขั้นสุดท้าย (final stage) ของ nonenzymatic browning reaction ทำการเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม การวัดค่าการดูดกลืนแสงทำการวัด 3 ครั้ง รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย

การศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

ศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระโดยตรวจสอบความสามารถในการจับ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) (DPPH Radical Scavenging Capacity) ตามวิธีของ Singh et al. (2002) ตรวจสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี measurement of reducing power ตามวิธีของ Oyaizu (1986) โดยศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของไคโตแซน น้ำตาล และสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนกับน้ำตาลทั้ง 6 ชนิด

1. การวัด Radical Scavenging Activity โดยใช้ DPPH Method

ตรวจสอบกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical Scavenging Capacity Assay โดยดัดแปลงจากวิธีของ Singh et al. (2002) เตรียมสารละลายตัวอย่างความเข้มข้นแตกต่างกันหลายความเข้มข้น โดยเจือจางสารตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น ปิเปตสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นมา 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างรุนแรง ทิ้งไว้ 20 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร แล้วจึงนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณเป็น % radical scavenging activity ดังสมการที่ 1 สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง นำค่า % radical scavenging activity ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มาสร้างกราฟ เพื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัด (กรัม/ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร) ที่สามารถทำให้ค่า % radical scavenging activity ลดลงร้อยละ 50 (IC_{50}) แล้วนำค่า IC_{50} มาคำนวณเป็นค่าประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antiradical Efficiency, AE) ดังสมการที่ 2

$$\%\ radical\ scavenging\ \ activity \ = \ \frac{(control\ OD - sample\ OD)}{control\ OD} \times 100 \quad \text{----} \quad 1$$

เมื่อ control OD = ค่าการดูดกลืนแสงควบคุม

sample OD = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

$$AE \ = \ \frac{1}{IC_{50}} \quad \text{----} \quad 2$$

เมื่อ AE = Antiradical Efficiency

IC_{50} = ความเข้มข้นของสารที่สามารถทำให้ค่า % radical scavenging activity ลดลงร้อยละ 50

2. การวัดคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Measurement of reducing power

การวัด reducing power ของตัวอย่างทำการตรวจวัดตามวิธีของ Oyaizu (1986) โดยนำตัวอย่างปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมกับ sodium phosphate buffer (pH 6.6) ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และ potassium ferricyanide ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร แล้วนำสารผสมไป incubate ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม TCA ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร แล้วนำของผสมไปหมุนเหวี่ยงที่ 650 g เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนบนปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ ferric chloride ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร

ผลและวิจารณ์

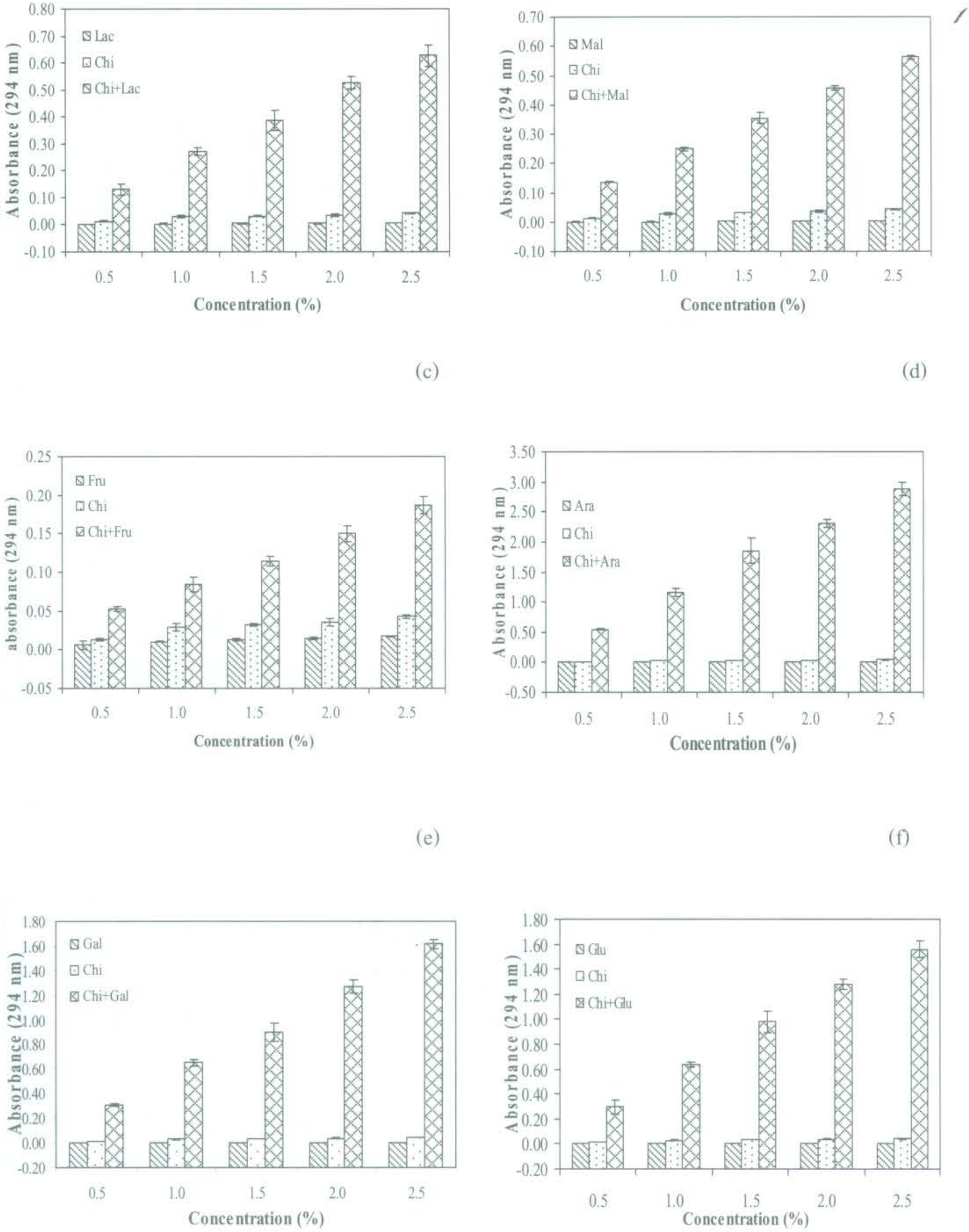
การศึกษาการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล

จากการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล โดยวัด UV-absorbance และความเข้มของการเกิดสีน้ำตาลของสารผสมระหว่างไคโตแซนและน้ำตาล น้ำตาลเดี่ยวๆ และไคโตแซนเดี่ยวๆ ที่อุณหภูมิห้อง โดยการวัดขั้นการเกิดสารตัวกลางของ nonenzymatic

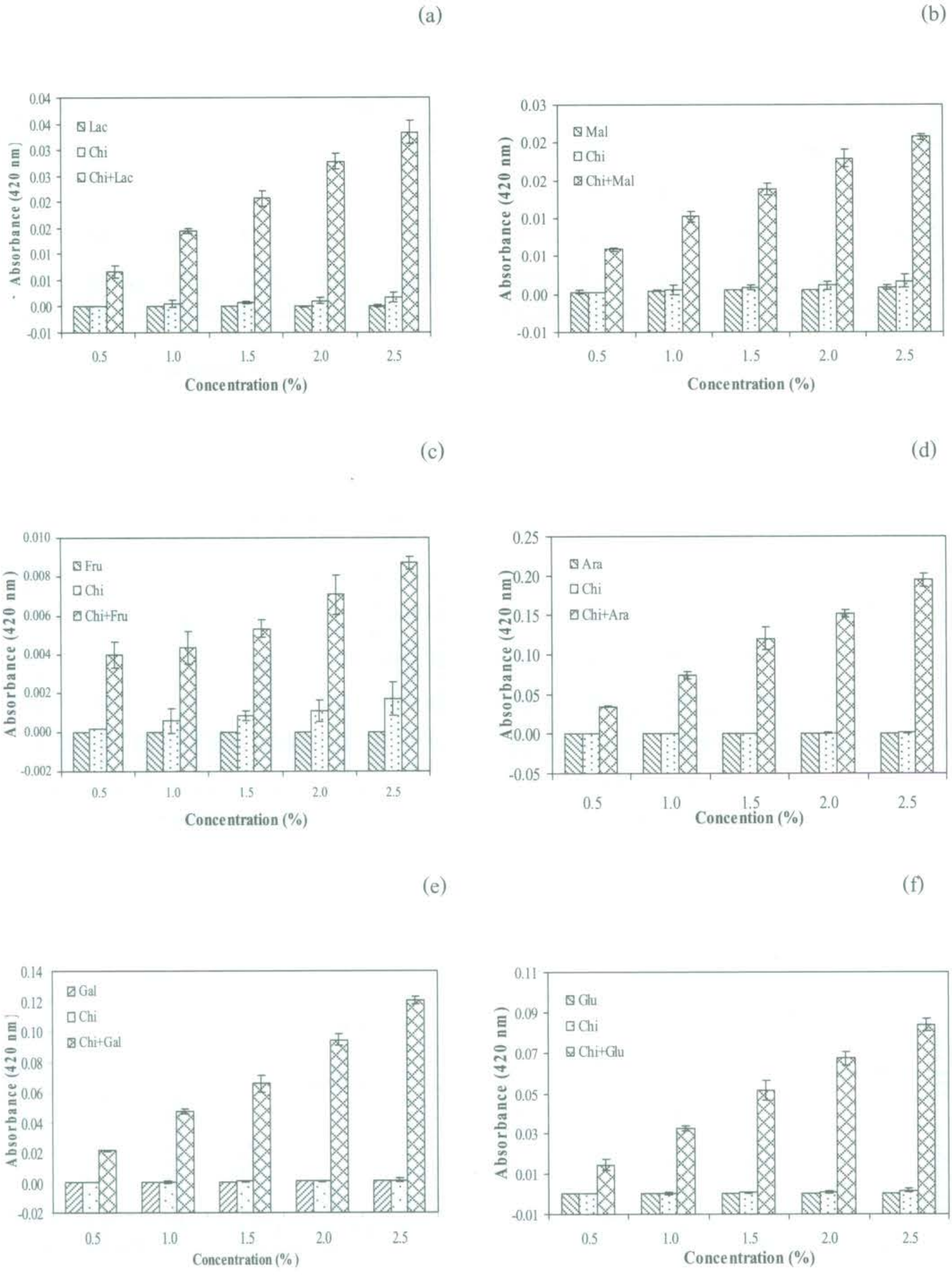
browning reaction หรือการวัด UV-absorbance ทำการวัดที่ความยาวคลื่น 294 นาโนเมตร ส่วนการวัดขั้นสุดท้ายของ nonenzymatic browning reaction หรือการวัดความเข้มของการเกิดสีน้ำตาล ทำการวัดที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 1-3

จากรูปจะพบว่าเมื่อผสมไคโตแซนและน้ำตาลต่างๆทั้ง 6 ชนิดเข้าด้วยกันและให้ความร้อน จะเกิดสารตัวกลาง (วัดที่ความยาวคลื่น 294 นาโนเมตร) และเกิดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (วัดที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร) โดยสามารถสังเกตได้จากกราฟของสารประกอบเชิงซ้อนของน้ำตาลทุกชนิดกับไคโตแซนจะสูงขึ้นเป็นปริมาณที่สูงมากเมื่อเทียบกับกราฟของน้ำตาลหรือไคโตแซนเดี่ยวๆ (รูปที่ 1-2) ผลการทดลองดังกล่าวสามารถยืนยันได้ว่ามีปฏิกิริยาสีน้ำตาลเกิดขึ้นซึ่งแสดงถึงการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาล โดยสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลอะราบิโนส (Chi-Ara) ซึ่งเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลสูงสุดมีปริมาณของสารประกอบเชิงซ้อนเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 114 เมื่อเทียบกับไคโตแซนเดี่ยวๆ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5

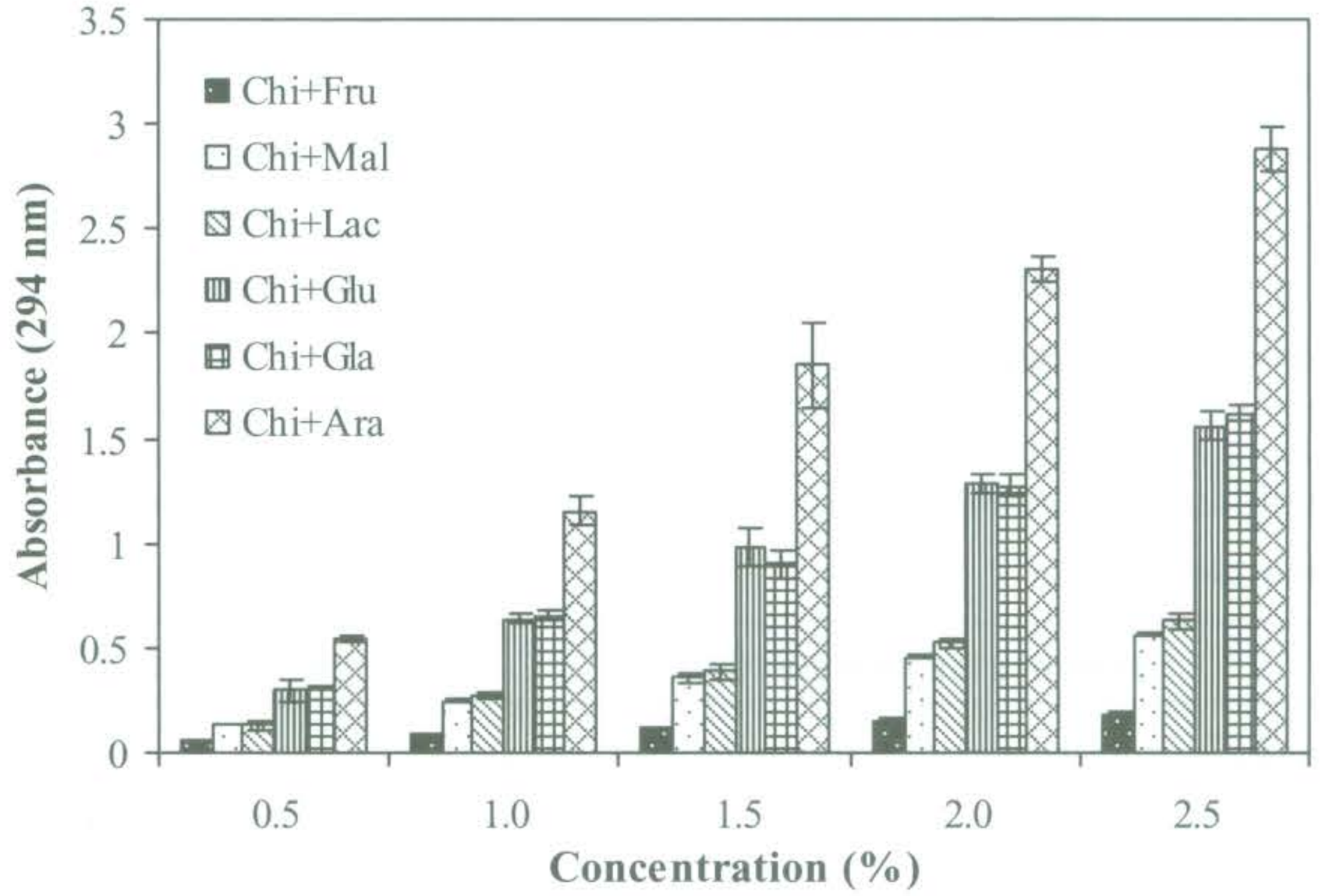
เมื่อเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลของสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลทั้ง 6 ชนิด (รูปที่ 3) พบว่า สารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลอะราบิโนส (Chi-Ara) จะเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลสูงสุด รองลงมาคือ สารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลกาแลคโตส (Chi-Gal) สารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลกลูโคส (Chi-Glu) สารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลแลคโตส (Chi-Lac) สารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลมอลโตส (Chi-Mal) และสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลฟรุกโตส (Chi-Fru) ตามลำดับ ในช่วงแรกๆ ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับ nonenzymatic browning reaction นั้น พบว่า การเกิดสีน้ำตาลของสารละลายฟรุกโตสที่มีหมู่อะมิโนจากแหล่งอื่นในระบบจะเกิดได้รวดเร็วกว่ากลูโคส (Hodge, 1953; Reynolds, 1965) แต่มีงานวิจัยที่แสดงผลในทางตรงกันข้ามกับงานวิจัยข้างต้น นั่นคือแสดงผลว่ากลูโคสเกิดสีน้ำตาลได้เร็วกว่า (Ellingson et al., 1954; Bobbio et al., 1981; Baxter, 1995) นอกจากนั้นยังมีงานวิจัยที่รายงานว่าการเกิดสีน้ำตาลของสารละลายฟรุกโตสจะเกิดขึ้นมากหรือน้อยกว่ากลูโคส ขึ้นอยู่กับสภาวะในการให้ความร้อน (Kato et al., 1969; Buera et al., 1987; Wijewickreme et al., 1997)



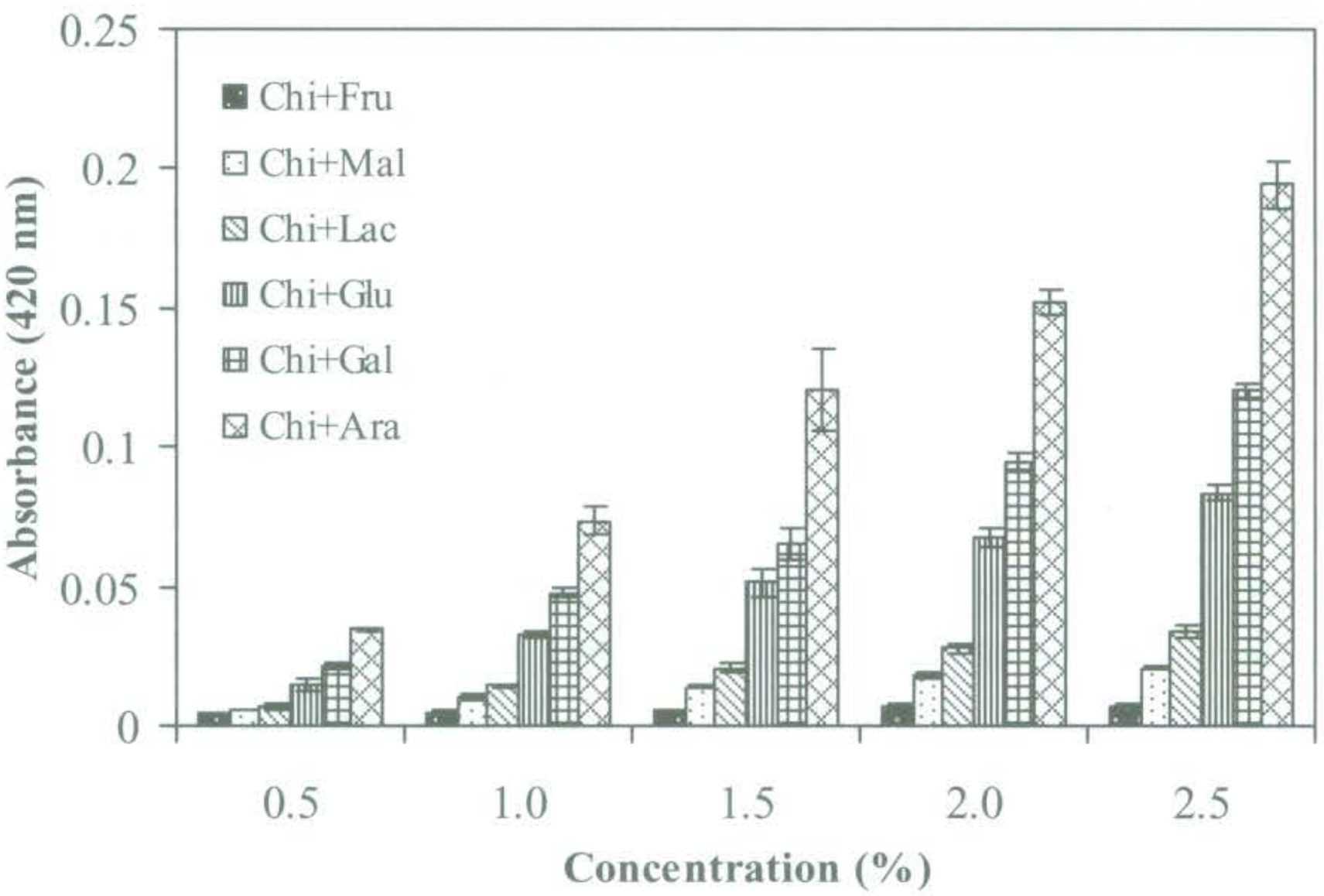
รูปที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่ intermediate state (A_{294}) ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและน้ำตาล (a : lactose, b: maltose, c: fructose, d: arabinose, e: galactose and f: glucose) เปรียบเทียบกับน้ำตาลเดี่ยวๆ และไคโตแซนเดี่ยวๆ (Chi)



รูปที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นต่างๆกัน จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่ final state (A_{420}) ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและน้ำตาล (a : lactose, b: maltose, c: fructose, d: arabinose, e: galactose and f: glucose) เปรียบเทียบกับน้ำตาลเดี่ยวๆ และไคโตแซนเดี่ยวๆ (Chi)



(b)



รูปที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดที่ final state (a) และ intermediate state (b) ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตแซนและน้ำตาลชนิดต่างๆ

ผลการตรวจวัดการเกิด polymerization ซึ่งเป็นการเปลี่ยนสารตัวกลาง (UV absorbing compound, A_{294}) เป็นสารสีน้ำตาล (brown polymer, A_{420}) แสดงดังตารางที่ 1 โดยแสดงในรูปของ 294/420 ratio (Ajandouz et al., 2001) นั้นคือหากค่า 294/420 ratio มีค่าต่ำแสดงถึงการเกิด polymerization ของสารตัวกลาง (UV absorbing compound) มีค่าสูง จากการทดลองครั้งนี้สารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลกาแลคโตส (Chi+Gal) และ สารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลอะราบิโนส (Chi+Ara) จะมีการเกิด polymerization สูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่น

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนสารตัวกลาง (UV absorbing compound) เป็นสารสีน้ำตาล (brown polymer) แสดงในรูปของ 294/420 ratio

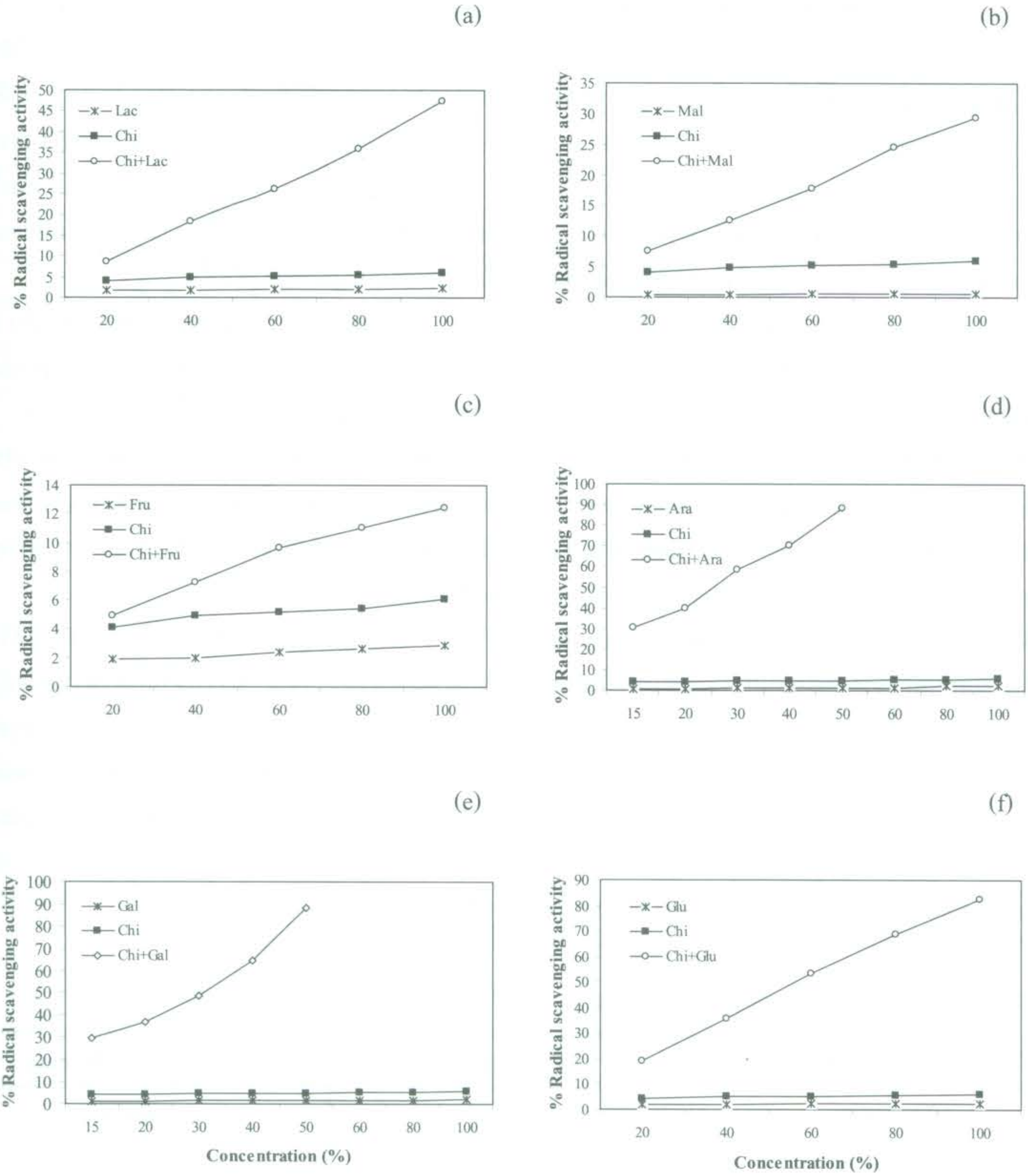
ชนิดของสารประกอบเชิงซ้อน	294/420 ratio
สารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลฟรุกโตส (Chi+Fru)	21.49 ± 0.62
สารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลมอลโตส (Chi+Mal)	27.08 ± 0.72
สารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลแลคโตส (Chi+Lac)	18.81 ± 0.12
สารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลกลูโคส (Chi+Glu)	18.62 ± 0.15
สารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลกาแลคโตส (Chi+Gal)	13.43 ± 0.03
สารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลอะราบิโนส (Chi+Ara)	14.82 ± 0.16

สำหรับปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction, nonenzymic browning reaction) นั้น เป็นปฏิกิริยาของ reducing sugar กับ free amino group และ maillard browning product จะเกิดขึ้นเมื่อให้ความร้อนสารประกอบทั้งสองที่อยู่ด้วยกัน (BeMiller and Whistler, 1996) ความสัมพันธ์ระหว่าง 294/420 ratio และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (ซึ่งเป็นการวัดการเกิด final stage ของปฏิกิริยาสีน้ำตาล) พบว่า $r = -0.771$ โดยเป็นความสัมพันธ์ในทิศทางที่ตรงข้ามกัน นั้นคือ เมื่อ 294/420 ratio มีค่าต่ำ (ซึ่งแสดงถึงการเกิด polymerization ที่มาก) การเกิดสารสีน้ำตาลที่ final stage จะสูง แสดงว่าการเกิดสารสีน้ำตาลเกิดจาก polymerization ซึ่งเป็นการเปลี่ยนสารตัวกลาง (UV absorbing compound) เป็นสารสีน้ำตาล (brown polymer)

การศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

1 การวัด Radical Scavenging Activity โดยใช้ DPPH Method

จากการวัดคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลชนิดต่างๆ โดยการวัด radical scavenging activity ด้วย DPPH Method เปรียบเทียบกับน้ำตาลเดี่ยวๆ และไคโตแซนเดี่ยวๆ พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลทุกชนิดมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระวิเคราะห์โดยวิธี DPPH method สูงกว่าน้ำตาลและไคโตแซนเดี่ยวๆ ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลต่างๆ (a : lactose, b: maltose, c: fructose, d: arabinose, e: galactose and f: glucose) เปรียบเทียบกับไคโตแซนและน้ำตาลเดี่ยวๆ

ตารางที่ 2 แสดงค่า IC_{50} และค่า Antiradical Efficiency (AE)ของไคโตแซนและน้ำตาลเดี่ยวๆ ซึ่งพบว่าไคโตแซนมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูล DPPH สูงกว่าน้ำตาลทุกชนิด ส่วนตารางที่ 3 แสดงค่า IC_{50} และค่า Antiradical Efficiency ของสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลชนิดต่างๆ ผลการทดลองพบว่าสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลอะราบิโนสมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูล DPPH สูงกว่าสารประกอบเชิงซ้อนชนิดอื่นๆ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนกับน้ำตาลกาแลคโตส ($p > 0.5$) เมื่อพิจารณาค่า IC_{50} แต่แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.5$) เมื่อพิจารณาค่า AE ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Benjakul et al. (2005) ซึ่งทดลองในระบบที่มีโปรตีนจากพลาสมาหมูและน้ำตาล โดยผลการทดลองพบว่า คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของ maillard reaction product จากน้ำตาลกาแลคโตสจะสูงกว่าน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสเมื่อวัดด้วยวิธี DPPH test และการวัด reducing power

สำหรับการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบเชิงซ้อนที่สูงขึ้นอาจเป็นไปในแนวทางเดียวกับการศึกษาของ Guérara and Sumaya-Martinez (2003) ซึ่งศึกษาในระบบของโปรตีนไฮโดรไลเสตทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคส ผลการศึกษา chromatographic profile ก่อนและหลังการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดพบว่า การเกิดการจัดเรียงตัวกันใหม่ของโมเลกุลอาจเป็นตัวช่วยในการปรับปรุงคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระให้ดีขึ้น

ตัวอย่างระบบต่างๆที่มีการศึกษาสารสีน้ำตาลจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (maillard reaction products, MRP) ต่อคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น ระบบของกลูโคส-ไกลซีน (Yoshimura et al., 1997) ระบบของ Ovalbumin และ *D*-Aldohexoses (Sun et al., 2006) และระบบของ coffee brews (Cämmerer and Kroh, 2006) เป็นต้น

การประยุกต์ใช้ MRP มีการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น การประยุกต์ใช้ในการยับยั้งเอนไซม์ polyphenoloxidase (PPO) ในกุ้งกุลาดำ (Matmaroh et al., 2006) การประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ปลาซาร์ดีน (Tanaka et al., 1988) และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์บัตเตอร์คุกกี้ (Bressa et al., 1996) เป็นต้น

ตารางที่ 2 ค่า IC_{50} และค่า Antiradical Efficiency ของสารละลายไคโตแซนและน้ำตาลเดี่ยวๆ

ชนิดของสาร	IC_{50} (g/ml)	Antiradical Efficiency
น้ำตาลมอลโตส (Mal)	19571.56[a]	0.00005[a]
น้ำตาลกลูโคส (Glu)	13487.11[b]	0.00007[a]
น้ำตาลแลคโตส (Lac)	7604.60[c]	0.00013[ab]
น้ำตาลกาแลคโตส (Gla)	4844.83[cd]	0.00021[ab]
น้ำตาลฟรุกโตส (Fru)	3710.59[cd]	0.00027[b]
น้ำตาลอะราบิโนส (Ara)	2531.34[d]	0.00040[c]
ไคโตแซน (Chi)	2102.12[d]	0.00048[d]

หมายเหตุ - IC_{50}: ความเข้มข้นของสารละลาย (g/ml) ที่สามารถทำให้ค่า % radical scavenging activity ลดลงร้อยละ 50

- อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 3 ค่า IC_{50} และค่า Antiradical Efficiency ของสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาล

ชนิดของสาร	IC_{50} (g/ml)	Antiradical Efficiency
สารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลฟรุกโตส (Chi+Fru)	488.45[a]	0.00205[a]
สารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลมอลโตส (Chi+Mal)	172.56[b]	0.00579[b]
สารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลแลคโตส (Chi+Lac)	106.35[c]	0.00940[c]
สารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลกลูโคส (Chi+Glu)	57.52[d]	0.01738[d]
สารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลกาแลคโตส (Chi+Gal)	28.50[e]	0.03509[e]
สารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลอะราบิโนส (Chi+Ara)	26.38[e]	0.03791[f]

หมายเหตุ - IC_{50}: ความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อน (g/ml) ที่สามารถทำให้ค่า % radical scavenging activity ลดลงร้อยละ 50
- อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า IC_{50} และ AE กับค่าการดูดกลืนแสงซึ่งแสดงถึงความเข้มของการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลแบบไม่ใช้เอนไซม์ (nonenzymatic browning reaction) โดยวัดที่ความยาวคลื่น 294 นาโนเมตร สำหรับ intermediate stages และ ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร สำหรับ final stage พบว่าความเข้มของการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลมีความสัมพันธ์ที่ค่อนข้างสูงกับ AE นั้นคือคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระมาจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาสีน้ำตาลที่เกิดขึ้น

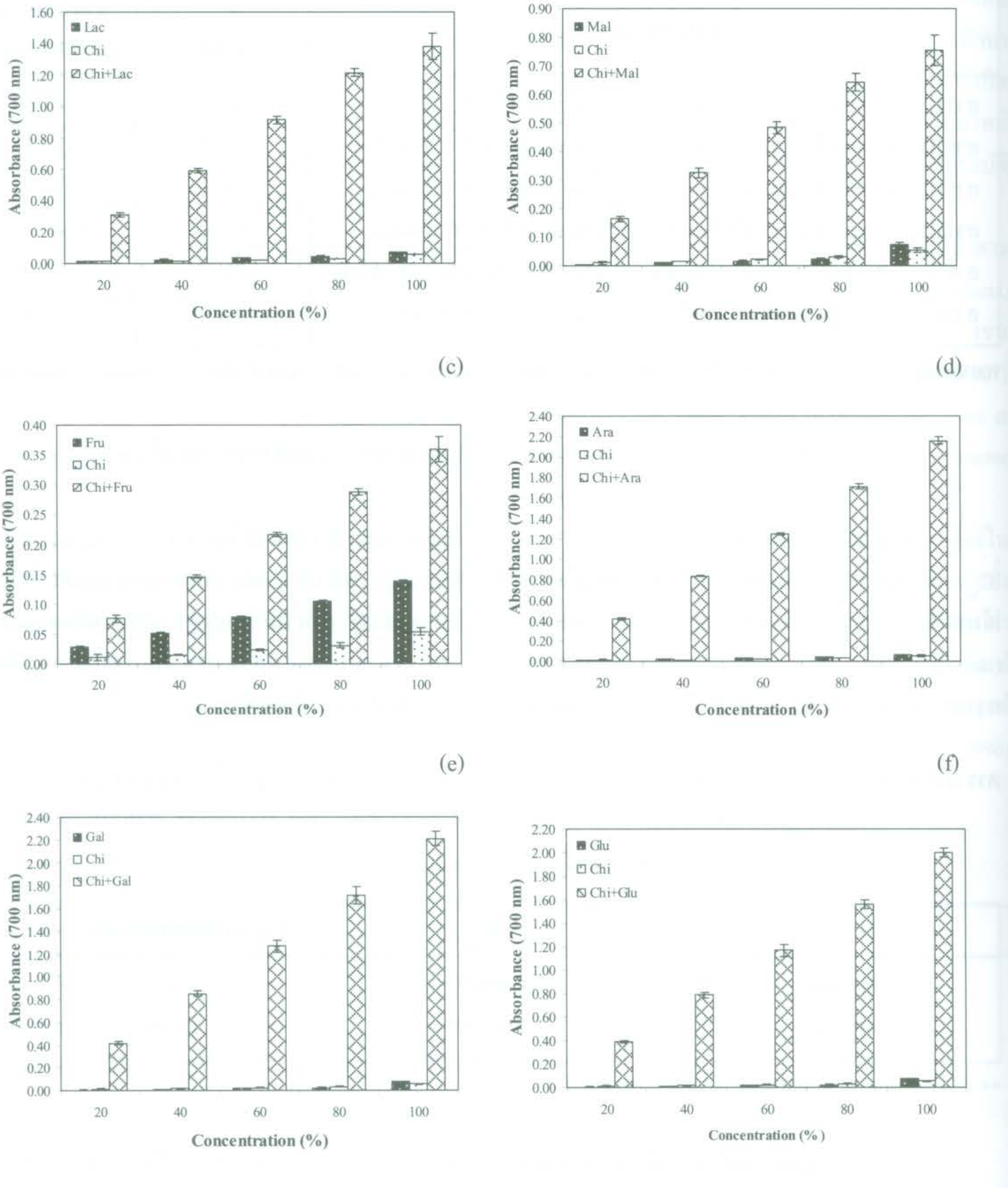
ตารางที่ 4 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างค่า IC_{50} และ AE กับค่าการดูดกลืนแสงซึ่งเพิ่มความเข้มของการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลแบบไม่ใช้เอนไซม์ (ความยาวคลื่น 294 นาโนเมตร สำหรับ intermediate stages และ 420 นาโนเมตร สำหรับ final stage)

	IC_{50}	Antiradical Efficiency (AE)
$Absorbance_{294}$	-0.680**	0.918**
$Absorbance_{420}$	-0.713**	0.959**

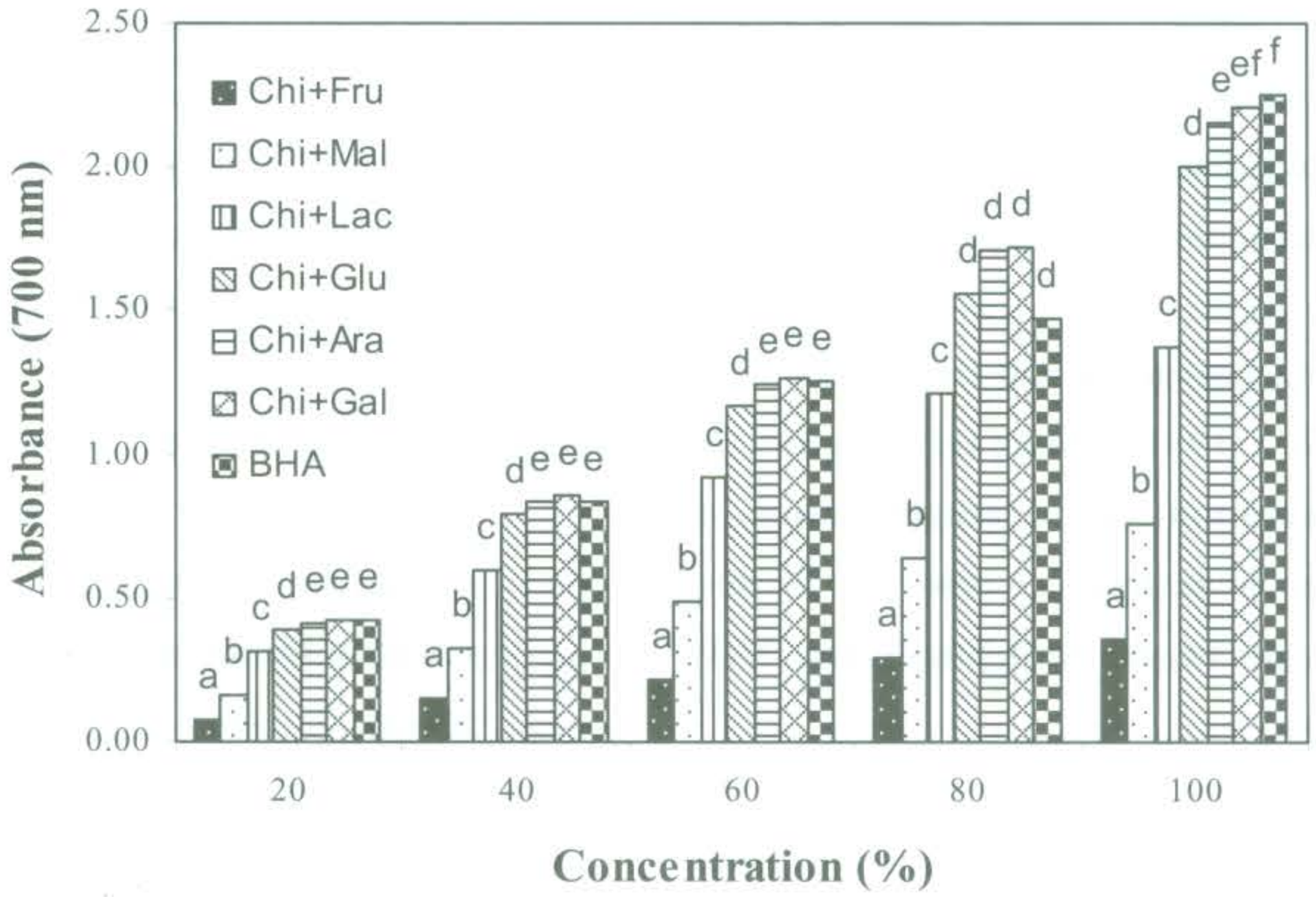
** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

2. การวัดคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี measurement of reducing power

จากการศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี measurement of reducing power ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 5 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลทุกชนิดมี reducing power สูงกว่าไคโตแซนและน้ำตาลเดี่ยวๆ และเมื่อเปรียบเทียบแต่ละสารประกอบเชิงซ้อนพบว่า สารประกอบเชิงซ้อนของ Chi+Gal มีค่า reducing power สูงสุด (รูปที่ 6) และค่า reducing power ไม่แตกต่างจาก BHA ($p > 0.05$)



รูปที่ 5 Reducing power ของสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลชนิดต่างๆ (a : lactose, b: maltose, c: fructose, d: arabinose, e: galactose and f: glucose) เปรียบเทียบกับไคโตแซนและน้ำตาลเดี่ยวๆ



รูปที่ 6 Reducing power ของสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับ BHA (100% สารประกอบเชิงซ้อน: เกิดจากปฏิกิริยาของการละลายน้ำตาล 1 กรัม ในสารละลาย 1% ของไคโตแซนในกรดอะซิติด 1% ปริมาตร 100 มิลลิลิตรแล้วให้ความร้อน, 100% BHA : ละลาย BHA 1 กรัมใน น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) อักษร a, b, c, d และ e แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

สรุป

การศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของผลผลิตจากปฏิกิริยาเมลลาร์ดของไคโตแซนและน้ำตาล 6 ชนิด พบว่า สารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลทุกชนิดมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าไคโตแซนเดี่ยวๆ โดยสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลอะราบิโนสมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบเชิงซ้อนที่เพิ่มขึ้นมากกว่าไคโตแซนหรือน้ำตาลเดี่ยวๆ มีความเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเมลลาร์ดและการเกิด polymerization ซึ่งกลไกการเพิ่มขึ้นของคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระอาจเกิดจากการจัดเรียงตัวใหม่ของโมเลกุล การศึกษาครั้งนี้แสดงถึงศักยภาพของสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตแซนและน้ำตาลในการนำไปใช้เป็นสารกันหืนในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อลดการใช้สารเติมแต่งในอาหารที่ได้จากการสังเคราะห์

เอกสารอ้างอิง

Ajandouz, E. H., Tchiakpe, L. S., Ore, F. D., Benajiba, A. and Puigserver, A. (2001). Effects of pH on Caramelization and Maillard Reaction Kinetics in Fructose-Lysine Model Systems. Journal of Food Science. 66(7): 926-931.

Baxter, J. H. (1995). Free amino acid stability in reducing sugar systems. Journal of Food Science. 60(2): 405-408.

BeMiller, J. N. and Whistler, R. L. (1996). Carbohydrates. In Fennema, O. R. (ed). Food Chemistry third edition. New York: Marcel Dekker, Inc. pp. 157-223.

Benjakul, S., Lertitikul, W., and Bauer, F. (2005). Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-sugar model system. Food Chemistry. 93(2): 189-196.

Bobbio, P. A., Imasato, H. and De Andrade Leite, S. R. (1981). Maillard reaction V: preparation and characterization of melanoidins from glucose and fructose with glycine. An Acad Brazi Cienc. 53(1): 83-86.

Bressa, F., Tesson, N., Marco Dalla Rosa, M., Sensidoni, A., and Tubaro, F. (1996). Antioxidant effect of maillard reaction products: application to a butter cookie of a competition kinetics analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 44(3): 692-695.

Buera, D. P., Chirife, J., Resnik, S. L. and Wetzler, G. (1987). Nonenzymatic browning in liquid model systems of high water activity: kinetics of color changes due to maillard reaction between different single sugars and glycine and comparison with caramelization browning. Journal of Food Science. 52(4): 1063-1067.

Cämmerer, B. and Kroh, L. W. (2006). Antioxidant activity of coffee brews. European Food Research and Technology. 223: 469-474.

Ellingson, R. C., Mueller, A. J. and Kemmerer, K. S. (1954). Differences between fructose and glucose in the browning reaction. Fed Proc. 13: 24.

Guérara, F. and Sumaya-Martinez, M. T. (2003). Antioxidant effects of protein hydrolysates in the reaction with glucose. Journal of the American Oil Chemists' Society. 80(5): 467-470.

Hodge, J. E. (1953). Dehydrated foods: Chemistry of browning reactions in model systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1(15): 928-943.

Hodge, J. E. and Rist, C. E. (1953). Amadori rearangment under new conditions and its significant for nonenzymatic browning reactions. Journal of the American Chemical Society. 75: 316-322.

Huang, J. R., Huang, C. Y., Huang, Y. W. and Chen, R. H. (2007). Shelf-life of fresh noodles as affected by chitosan and its Maillard reaction products. LWT - Food Science and Technology. 40(7): 1287-1291.

Kamil, J., Jeon, Y. J. and Shahidi, F. (2002). Antioxidant activity of chitosan of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (*Clupea harengus*). Food Chemistry. 79(1): 69-77.

Kanatt, S. R., Chander, R. and Shama, A. (2008). Chitosan glucose complex - A novel food preservative. Food Chemistry. 106(2): 521-528.

Kato, H., Yamamoto, M. and Fujimaki, M. (1969). Mechanisms of browning degradation of D-fructose in special comparison with D-glucose-glycine reaction. Agricultural and Biological Chemistry. 33(6): 939-948.

Kroschwitz, J. I. (1990). Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. New York: John Wiley & Son, Inc.

Matmaroh, K., Benjakul, S. and Tanaka, M. 2(006). Effect of reactant concentration on the Maillard reaction in a fructose-glycine model

system and the inhibition of black tiger shrimp polyphenoloxidase. Food Chemistry. 98(1): 1-8.

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition. 44: 307-315.

Qurashi, M. T., Blair, H. S. and Allen, S. J. (1992). Studies on modified chitosan membrane. I Preparation and characterization. Journal of Applied Polymer Science. 46(2): 255-261.

Reynolds, T. M. (1965). Chemistry of nonenzymatic browning. II. Advances in Food Research. 14: 167-283.

Shahidi, F. (2007). Chitin and chitosan from marine by-products. In Shahidi, F. (ed). Maximizing the Value of Marine By-products. Abington: Woodhead Publishing Limited. pp. 340-373.

Singh, R. P., Chaidamdara, M. and Jayaprakasha, G. K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50(1): 81-86.

Singh, D. K. and Ray, A. R. (1994). Graft copolymerization of 2-hyrdoxyethylmethacrylate onto chitosan film and their blood compatibility. Journal of Applied Polymer Science. 53(8): 1115-1121.

Sun, Y., Hayakawa, S., Chuamanochan, M., Fujimoto, M., Innun, A., and Izumori, K. (2006). Antioxidant Effects of Maillard Reaction Products Obtained from Ovalbumin and Different D-Aldohexoses. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 70(3): 598-605.

Tanaka, M., Kuei, C. W., Nagashima, Y. and Taguchi, T. (1988). Application of antioxidative Maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan). 54(8): 1409-1414.

Wijewickreme, A. N., Kitts, D. D. and Durance, T. D. (1997). Reaction conditions influence the elementary composition and metal chelating affinity of nondialyzable model Maillard reaction. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45(12): 4577-4583

Xie, W., Xu, P. and Liu, Q. (2001). Antioxidant activity of water soluble chitosan derivatives. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. 11: 1699-1701.

Yen, M. T., Tseng, Y. H., Li, R. C. and Mau, J. L. (2007). Antioxidant properties of fungal chitosan from shiitake stipes. LWT-Food Science and Technology. 40(2): 255-261.

Yoshimura, Y., Iijima, T., Watanabe, T. and Nakazawa, H. (1997). Antioxidative effect of maillard reaction products using glucose-glycine model system. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45(10): 4106-4109.

ว.วิทย. มข. 39(1) 96-104 (2554) KKU Sci. J.39(1) 96-104 (2011)

คุณลักษณะและอายุการเก็บรักษาของน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็น

Characterization and Shelf Life of Cold Pressed Organic Jasmine Rice Bran oil

ภัทราภรณ์ แก้วกูล [1]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพเคมีและอายุการเก็บรักษาของน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นตามมาตรฐาน มอก. 47-2553 น้ำมันพืชบริโภค ผลการศึกษาพบว่า ค่าดัชนีหักเห ค่าความชื้น ค่ากรด ค่าเปอร์ออกไซด์ และค่าไอโอดีน มีค่าเท่ากับ 1.3294 ร้อยละ 0.20 1.36 มิลลิกรัม KOH / กรัมน้ำมัน 3.12 มิลลิกรัม/ กิโลกรัมน้ำมัน และ 93.02 มิลลิกรัม/กรัมน้ำมัน ตามลำดับ กรดไขมันองค์ประกอบ ประกอบด้วย กรดปาล์มิติก (ร้อยละ 21.79) กรดสเตียริก (ร้อยละ 1.86) กรดโอเลอิก (ร้อยละ 44.85) กรดลิโนเลอิก (ร้อยละ 31.32) และกรดลิโนเลนิก (ร้อยละ 0.19) นอกจากนี้ยังพบแกมมา-โอไรซานอลสูงถึง ร้อยละ 1.298 หรือ 12,980 ppm ซึ่งแกมมา-โอไรซานอลเป็นสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติที่พบเฉพาะในน้ำมันรำข้าว ผลการศึกษาของอายุการเก็บรักษาของน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นพบว่า ค่ากรดมีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ร้อยละ 0.127 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน และเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 0.310 ในหนึ่งเดือน ขณะที่อุณหภูมิ 50 และ 40 องศาเซลเซียส มีอัตราการเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 0.270 และ 0.200 ตามลำดับ เมื่อนำค่ากรดมาคาดคะเนอายุการเก็บรักษาน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นมีอายุการเก็บรักษาเป็นเวลา 1697.23 วัน หรือ 4.6 ปี ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

[1] สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร ภาควิชาเกษตรและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์ จังหวัดสุรินทร์ 32000

* E-mail: p_kaewkool@yahoo.com

Abstract

In this research work, the physico-chemical parameters and shelf-life of cold pressed organic jasmine rice bran oil are examined based on Thai Industrial Standards TIS 47-2533 (1990) Edible oil. The results indicate that the refractive index, moisture value, acid value, peroxide value and iodine value are 1.3294, 0.20%, 1.36 mg KOH/g oil, 3.12 mg/kg oil and 93.02 mg/g oil, respectively. The fatty acid compositions include palmitic acid (21.79%), stearic acid (1.86%), oleic acid (44.85%), linoleic acid (31.32%) and linolenic acid (0.19%). Gamma-oryzanol which serves as a natural antioxidant is found in cold pressed organic jasmine rice bran oil at a high level up to 1.298%. The results of shelf-life of cold pressed organic jasmine rice bran oil show that the acid value increased slowly in the second day (0.127 %) at 60°C and reached the value of 0.310% in one month. Moreover, the increment of acid value is 0.270% and 0.200%, at 50°C and 40°C, respectively. By using acid values, it was estimated that shelf-life of the cold pressed organic jasmine rice bran oil was 1697.23 day (4.6 year) at 25°C.

คำสำคัญ : คุณสมบัติทางกายภาพเคมี น้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็น อายุการเก็บรักษา

Keywords : Physico-chemical parameters, Cold pressed organic jasmine rice bran oil, Shelf - life

บทนำ

น้ำมันรำข้าวเป็นน้ำมันที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง สามารถสกัดได้จากส่วนของรำข้าว (rice bran) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการขัดสีข้าว (milling process) โดยมีรำข้าวเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักข้าวเปลือก จากรายงานการวิจัยน้ำมันรำข้าวจัดเป็นน้ำมันไม่อิ่มตัว เพราะมีสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวทั้งเชิงเดี่ยว (mono-unsaturated fatty acid) ร้อยละ 45 และเชิงซ้อน (poly-unsaturated fatty acid) ร้อยละ 37 ในขณะที่มีกรดไขมันอิ่มตัวน้อยคือร้อยละ 18 นอกจากนี้ยังพบว่ามีสารบางชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ เช่น วิตามินอี (โทโคฟีรอล; tocopherols และโทโคไตรอีนอล; tocotrienols) และแกมมา-โอไรซานอล (gamma-oryzanol) ซึ่งเป็นสารกลุ่มที่ไม่สามารถสะปอนนิฟายด์ (sponifly) ได้ จากการศึกษาของ Ju and Vali (2005) พบว่าสารกลุ่มนี้มีสูงถึงร้อยละ 4.2 ของน้ำหนักรำข้าวทั้งหมด Bergman and Xu (2003) พบว่าแกมมา-โอไรซานอลในน้ำมันรำข้าวจะสูงกว่าโทโคฟีรอล และโทโคไตรอีนอลถึง 13-20 เท่า จากการศึกษาถึงคุณประโยชน์ของแกมมา-โอไรซานอลในด้านต่างๆ มีมากมายทั้งทางด้านอาหาร เช่น Sasaki et al. (1990) ศึกษาการใช้สารแกมมา-โอไรซานอลเป็นสารกันหืนในน้ำมันพืช และเป็นสารกันเสียในอาหาร ทางด้านเครื่องสำอางใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ทาเส้นผม และทางการแพทย์ เช่น Rong et al. (1994) ได้ใช้เป็นตัวช่วยลดปริมาณโคเลสเตอรอลในพลาสมา ลดการรวมตัวของเกล็ดเลือด และช่วยเพิ่มการพัฒนากล้ามเนื้อ Tadahisa and Donald (1991) พบว่าแกมมา-โอไรซานอลไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติของยีน ไม่เป็นสารก่อมะเร็ง และเนื้องอก และจากการศึกษาของ Krishna et al. (2001) พบว่าปริมาณแกมมา-โอไรซานอลในน้ำมันรำข้าวคิดเป็นร้อยละ 2 ของน้ำมันรำข้าวดิบ และจะสูญเสียไปในขั้นตอนการทำน้ำมันให้บริสุทธิ์

น้ำมันรำข้าวมี 2 ชนิด คือ น้ำมันรำข้าวชนิดที่ผ่านกรรมวิธี (refined oil) และชนิดบีบเย็น (cold press oil) น้ำมันรำข้าวในท้องตลาดเป็นน้ำมันรำข้าวชนิดผ่านกรรมวิธีสกัดจากรำข้าว โดยการใช้สารเคมีและผ่านความร้อนสูงในกระบวนการผลิตน้ำมันบริโภค จึง

สูญเสียปริมาณสารอาหารที่สำคัญ เช่น วิตามินอี และแกมมา-โอไรซานอลไปเป็นจำนวนมาก ต่างจากน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นที่สกัดน้ำมันรำข้าวด้วยเครื่องบีบอัดแบบเกลียวอัด (screw press) จะยังคงมีสารสำคัญอยู่ ปริมาณแกมมา-โอไรซานอลที่มีอยู่ในน้ำมันรำข้าวนั้นจะขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวและวิธีการสกัด คมสัน หุตะแพทย์ (2550) พบว่าการสกัดน้ำมันรำข้าวด้วยเครื่องเกลียวอัดแบบบีบเย็นจะมีแกมมา-โอไรซานอลสูงถึงร้อยละ 1-2 หรือ 10,000-20,000 ppm (ส่วนในล้านส่วน) ขณะที่น้ำมันรำข้าวแบบผ่านกระบวนการใช้สารเคมีและความร้อนจะมีแกมมา-โอไรซานอลเหลืออยู่เพียงร้อยละ 0.0005 หรือ 500 ppm ปัจจุบันผู้ผลิตบางรายปรับปรุงกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวแบบผ่านกรรมวิธีที่ใช้ปรุงอาหารให้คงมีปริมาณแกมมา-โอไรซานอลสูงขึ้นถึงร้อยละ 0.004 หรือ 4,000 ppm Krishna et al. (2006) พบว่าปริมาณแกมมา-โอไรซานอลที่เติมลงไปในน้ำมันพืชมีผลทำให้อัตราการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิสระลดลง ซึ่งกรดไขมันอิสระจะเป็นตัวบ่งบอกคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของน้ำมันพืช โดยกรดไขมันอิสระจะทำให้เกิดกลิ่นหืนส่งผลให้อายุการเก็บรักษาของน้ำมันสั้นลง ดังนั้นกระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทยจึงได้กำหนดมาตรฐานให้ปริมาณของกรดไขมันอิสระในน้ำมันพืชบริโภคไม่ควรสูงกว่าร้อยละ 0.6 หรือ 6,000 ppm และปริมาณของกรดไขมันอิสระในน้ำมันพืชชนิดบีบเย็นไม่ควรสูงกว่าร้อยละ 4.0 หรือ 40,000 ppm

จังหวัดสุรินทร์เป็นแหล่งปลูกข้าวหอมมะลิคุณภาพดีที่สุดของประเทศ และเป็นจังหวัดนำร่องผลิตข้าวหอมมะลิอินทรีย์ (organic jasmine rice) สหกรณ์เกษตรอินทรีย์กองทุนข้าวสุรินทร์ (Rice Fund Surin Organic Agriculture Cooperative Ltd.; RFSOAC) ส่งเสริมเกษตรกรผลิตข้าวหอมมะลิอินทรีย์ จนกระทั่งได้มาตรฐานผลิตภัณฑ์เกษตรอินทรีย์ (Organic Agriculture Certification Thailand; A.C.T.) นอกจากนี้ยังผลิตน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นจากรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์ (cold pressed organic jasmine rice bran oil) หากจะส่งเสริมน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นเป็นสินค้าเกษตรอินทรีย์ ประเภทอาหารเสริมสุขภาพ (health food) ของจังหวัดสุรินทร์ในอนาคต จำเป็นต้องทราบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาคุณลักษณะและอายุการเก็บรักษาของน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็น เพื่อใช้เป็นแนวทางในการขอรับรองมาตรฐานเกษตรอินทรีย์ต่อไป

วิธีการวิจัย

วัตถุดิบและสารเคมี

1. น้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นจากสหกรณ์เกษตรอินทรีย์กองทุนข้าวสุรินทร์ จังหวัดสุรินทร์

2. กรดอะซิติก เฮกเซน โทลูอีน เมทานอล เอทานอล ไดเอธิลอีเทอร์ และคลอโรฟอร์ม เป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์จากบริษัท RCI Lab Scan จำกัด ประเทศไทย โปแตสเซียมไอโอไดด์ และโซเดียมไธโอซัลเฟต เป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์จากบริษัท Rankem ประเทศอินเดีย โซเดียมซัลเฟตปลอดน้ำ โซเดียมคาร์บอเนตปลอดน้ำ และโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์จากบริษัท Merck จำกัด ประเทศเยอรมัน

3. สารมาตรฐาน แกมมา-โอไรซานอล 95 % จากบริษัทซูโน (Suno) ประเทศญี่ปุ่น เฮพตะเดคาโนอิกแอซิด 99 % จากบริษัทซิกมา เคมิคอล เซนหลุยส์ ประเทศสหรัฐอเมริกา

ขั้นตอนการทดลอง

1. นำน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพเคมี คือ ค่าดัชนีหักเห ค่ากรด ค่าเปอร์ออกไซด์ และค่าไอโอดีน ตามวิธีการของ AOAC (2000)

2. เตรียมน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นวิเคราะห์กรดไขมันองค์ประกอบในรูปกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ ดัดแปลงวิธีจาก Jeyashoke et al. (1998) โดยชั่งน้ำมันตัวอย่าง 0.1 กรัม ใส่หลอดทดลองฝาเกลียวขนาดประมาณ 20 มิลลิลิตร เติมโทลูอีน 10 มิลลิลิตร

แล้วเขย่าให้เข้ากัน ดูดสารละลายมา 3 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองอีกหลอด เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 มิลลิลิตร (1 % in MeOH) ปิดฝาในแน่นเขย่าให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนในไมโครเวฟ 10 ถึง 15 วินาที ทำให้เย็นทันที เติมกรดอะซิติก 1 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 1 มิลลิลิตร (4 % in H_2O) เขย่าให้เข้ากันล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง รอให้แยกชั้นดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก เติมผงโซเดียมซัลเฟตปลอดน้ำลงไปเล็กน้อยเพื่อดูดน้ำที่ติดค้างออก เก็บส่วนใสใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC Shimadzu รุ่น GC-14B ตรวจวัดแบบเฟลมไอออไนเซชัน (FID) จากบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น คอลัมน์ BPX-70 เคลือบด้วย 70 % cyanopropyl polysilphene siloxane ความหนาฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ยาว 15 เมตร จากบริษัท SGE International Pty.Ltd. ประเทศออสเตรเลีย ภาวะที่ใช้ในการทดลอง คือ แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพา (carrier gas) อุณหภูมิคอลัมน์ 160 องศาเซลเซียส อุณหภูมิอินเจกเตอร์ และตัวตรวจวัด 230 องศาเซลเซียส ฉีดสารปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร

3. เตรียมน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-โอไรซานอลด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer Shimadzu รุ่น UV-1601 โดยการเจือจางน้ำมันรำข้าวมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นด้วยเฮกเซนที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 315 นาโนเมตร จากนั้นทำการคำนวณหาปริมาณของแกมมา-โอไรซานอลต่อน้ำหนักแห้งของน้ำมันรำข้าวมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นได้โดยการเทียบกับกราฟมาตรฐาน

4. เตรียมน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นเพื่อคาดคะเนอายุการเก็บรักษาของน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็น โดยบรรจุน้ำมันใส่ขวดสีชาปริมาณ 40 มิลลิกรัม เก็บบ่มที่อุณหภูมิ 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ ค่ากรดและค่าเปอร์ออกไซด์ทุกวันในสัปดาห์แรก และทุก 3 วันในสัปดาห์ที่สองจนครบ 1 เดือน นำอัตราการเพิ่มขึ้นของค่ากรดและค่าเปอร์ออกไซด์มาคาดคะเนอายุการเก็บรักษาด้วยสมการอาร์เรเนียส (arrhenius equation) สมการที่ (1) (สมพล ประคองพันธ์, 2534)

$$\log k = \log A - \frac{Ea}{2.303RT} \quad (1)$$

เมื่อให้ k = ค่าคงที่อัตราเร็ว (rate constant; $time^{-1}$)

A = ค่าคงที่จากแฟกเตอร์ความถี่ (frequency factor; $mole^{-1}.sec^{-1}$)

Ea = พลังงานกระตุ้น (activation energy; $cal.mole^{-1}$)

R = ค่าคงที่ของแก๊ส (gas constant = 1.987 $cal.mole.\ K^{-1}$)

T = อุณหภูมิองศาสัมบูรณ์ (Temperature; K= $^{\circ}C + 273$)

ซึ่งการใช้สมการอาร์เรเนียสค่า A และ Ea หาได้จากการทดลองโดยวัดค่าคงที่ของอัตราเร็ว (k) การเพิ่มขึ้นค่ากรดและค่าเปอร์ออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส แล้วพล็อตระหว่าง log k กับ 1/T ได้กราฟเส้นตรง ความชันคือ -Ea/2.303R และจุดตัดแนวแกนตั้ง คือ log A

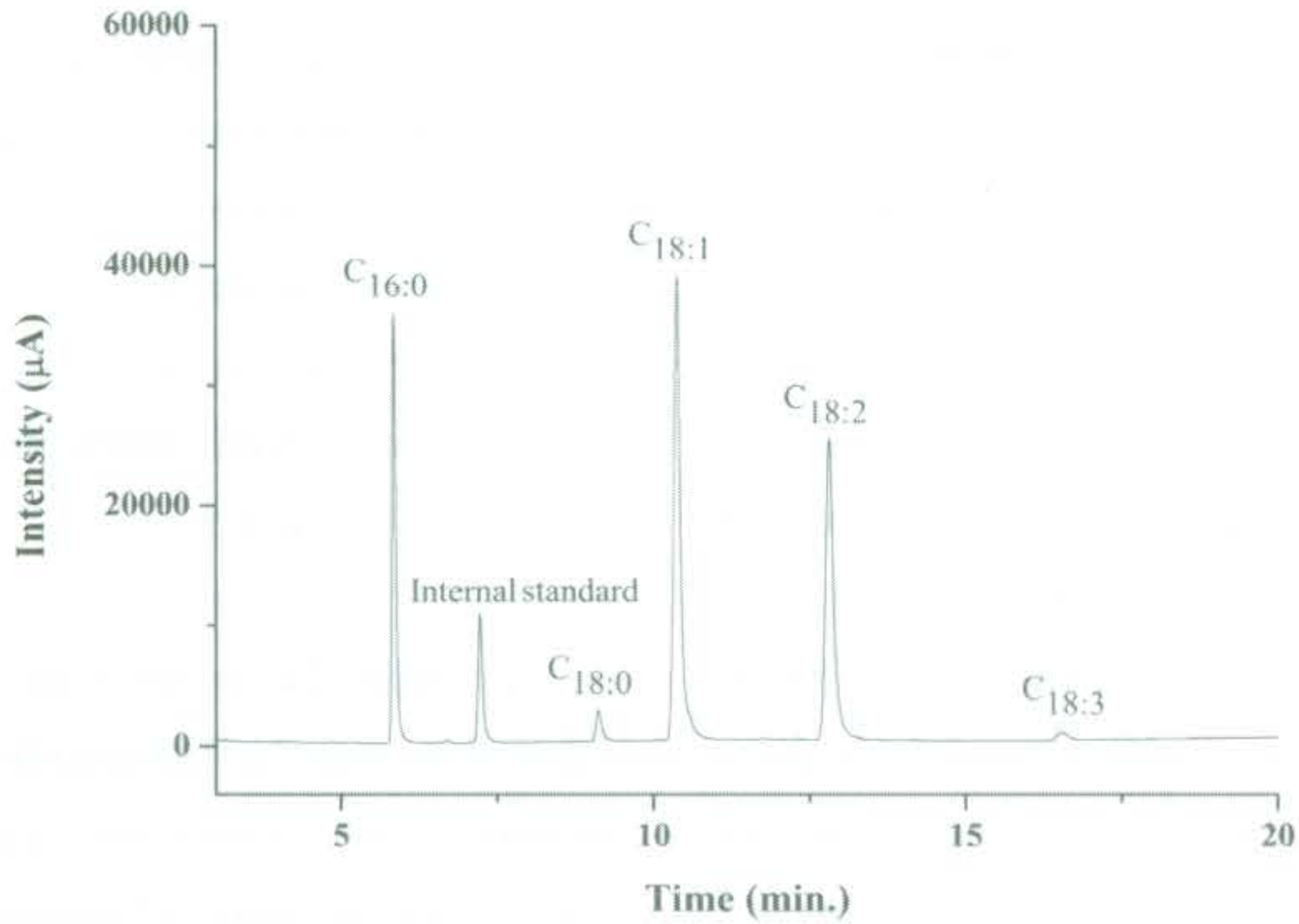
ผลการทดลอง

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพเคมีของน้ำมันรำข้าวหอมมะลิแบบบีบเย็น

จากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพเคมีของน้ำมันรำข้าวหอมมะลิแบบบีบเย็นประกอบด้วย ค่าดัชนีหักเห ค่าความชื้น ค่ากรด ค่าเปอร์ออกไซด์ และค่าไอโอดีน เท่ากับ 1.3294 ร้อยละ 0.20 1.36 มิลลิกรัม KOH/ กรัมน้ำมัน 3.12 มิลลิกรัม/ กิโลกรัมน้ำมัน และ 93.02 มิลลิกรัม/ กรัมน้ำมัน ตามลำดับ ผลการศึกษาเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 47-2533 น้ำมันพืชบริโภค กำหนดคุณสมบัติทางกายภาพเคมีของน้ำมันรำข้าวผลิตวิธีธรรมชาติมีค่าดัชนีหักเห

ระหว่าง 1.46-1.47 ค่าความชื้นไม่เกินร้อยละ 0.2 ค่ากรดไม่เกิน 4 มิลลิกรัม KOH/ กรัมน้ำมัน ค่าเปอร์ออกไซด์ไม่เกิน 10 มิลลิกรัม/ กิโลกรัมน้ำมัน และค่าไอโอดีนระหว่าง 92-115 มิลลิกรัม/ กรัมน้ำมัน

ปริมาณและชนิดกรดไขมันองค์ประกอบของน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็น วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC โครมาโตแกรมแสดงดังรูปที่ 1 กรดไขมันองค์ประกอบ ได้แก่ กรดปาล์มิติก (C16:0) ร้อยละ 21.79 กรดสเตียริก (C18:0) ร้อยละ 1.86 กรดโอเลอิก (C18:1) ร้อยละ 44.85 กรดลิโนเลอิก (C18:2) ร้อยละ 31.32 และกรดลิโนเลนิก (C18:3) ร้อยละ 0.19 ผลงานวิจัยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sugano and Tsuji (1997), Tahira et al. (2007) และ Van Hoed et al. (2006) รายงานว่าปริมาณของกรดโอเลอิกและกรดลิโนเลอิกในน้ำมันรำข้าวมีมากกว่าร้อยละ 70 ของอองค์ประกอบของกรดไขมันทั้งหมด

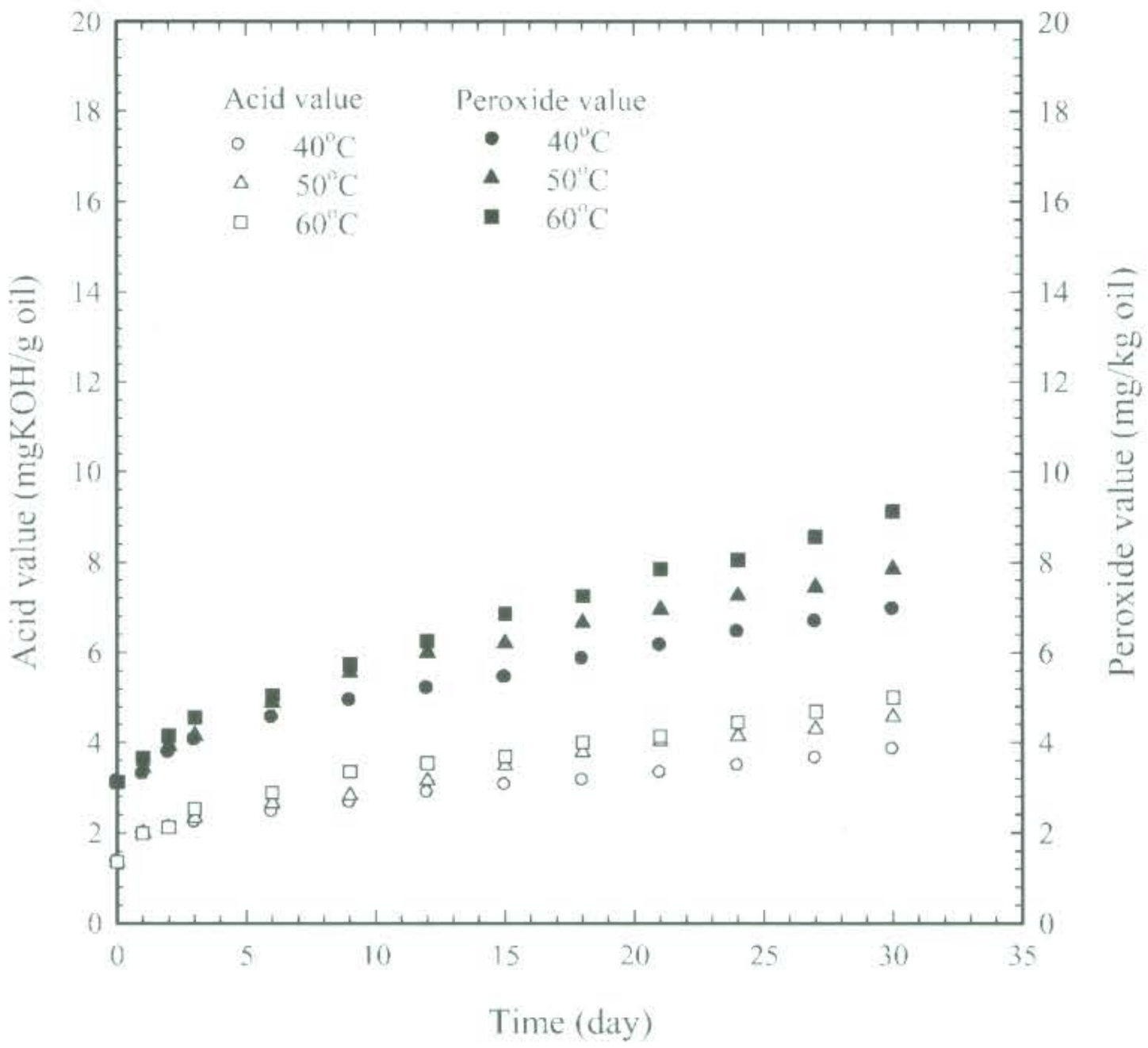


รูปที่ 1 โครมาโตแกรมของกรดไขมันต่างๆในน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC 14B คอลัมน์ BPX-70 (15m x 0.25mm i.d.) อุณหภูมิคอลัมน์ 160 องศาเซลเซียส อุณหภูมิอินเจกเตอร์ และตัวตรวจวัด 230 องศาเซลเซียส

ปริมาณแกมมา-โอไรซานอลในน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นวัดจากค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 315 นาโนเมตร ใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย และเทียบกับกราฟมาตรฐานแกมมา-โอไรซานอล พบว่า ปริมาณแกมมา-โอไรซานอลในน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นมีสูงถึงร้อยละ 1.298 หรือ 12,980 ppm สูงกว่าน้ำมันรำข้าวผ่านกรรมวิธี และจากการศึกษาของคณิศา กิตติรัตนไพบูลย์ และคณะ (2552) พบว่าปริมาณแกมมา-โอไรซานอลในน้ำมันรำข้าวผ่านกรรมวิธีที่วางขายในท้องตลาดมีปริมาณเท่ากับ 1,543 และ 300 ppm ทั้งนี้เนื่องมาจากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ของแต่ละโรงงานมีความแตกต่างกัน Krishna et al. (2001) ได้ศึกษาผลกระทบของการทำน้ำมันรำข้าวดิบให้บริสุทธิ์ และองค์ประกอบแกมมา-โอไรซานอลในข้าวอินเดีย พบว่า ปริมาณแกมมา-โอไรซานอลในน้ำมันรำข้าวของอินเดีย 18 ชนิดจะอยู่ในช่วงร้อยละ 1.63-2.72 ในน้ำมันดิบ และงานวิจัยของ นพมาศ มนัสวรากุล (2545) ระบุว่าปริมาณแกมมา-โอไรซานอลและวิตามินอีในข้าวไทยสายพันธุ์ต่างๆ จะอยู่ในช่วงร้อยละ 1.04-1.96 ในน้ำมันดิบ

ผลวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงค่ากรดและค่าเปอร์ออกไซด์

ค่ากรดและค่าเปอร์ออกไซด์เป็นตัวดัชนีบ่งชี้คุณภาพของน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเก็บบ่มตัวอย่างน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นที่อุณหภูมิ 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงค่ากรดและค่าเปอร์ออกไซด์ด้วยการไตเตรทตามวิธี AOAC (2000) ผลแสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของค่ากรดและเปอร์ออกไซด์ในน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นที่อุณหภูมิต่างๆ

จากรูปจะเห็นว่าอัตราการเพิ่มขึ้นของค่ากรดและค่าเปอร์ออกไซด์ในน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นขึ้นกับอุณหภูมิที่อุณหภูมิสูงปฏิกิริยาเกิดได้เร็วกว่านั้นคือ อุณหภูมิ 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน ค่ากรดเพิ่มขึ้นร้อยละ 0.124 0.126 และ 0.127 ตามลำดับ และค่าเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นร้อยละ 0.171 0.313 และ 0.535 ตามลำดับ และภายใน 1 เดือน ค่ากรดเพิ่มขึ้นร้อยละ 0.200 0.270 และ 0.310 ตามลำดับ และค่าเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นร้อยละ 0.270 0.402 และ 0.571 ตามลำดับ

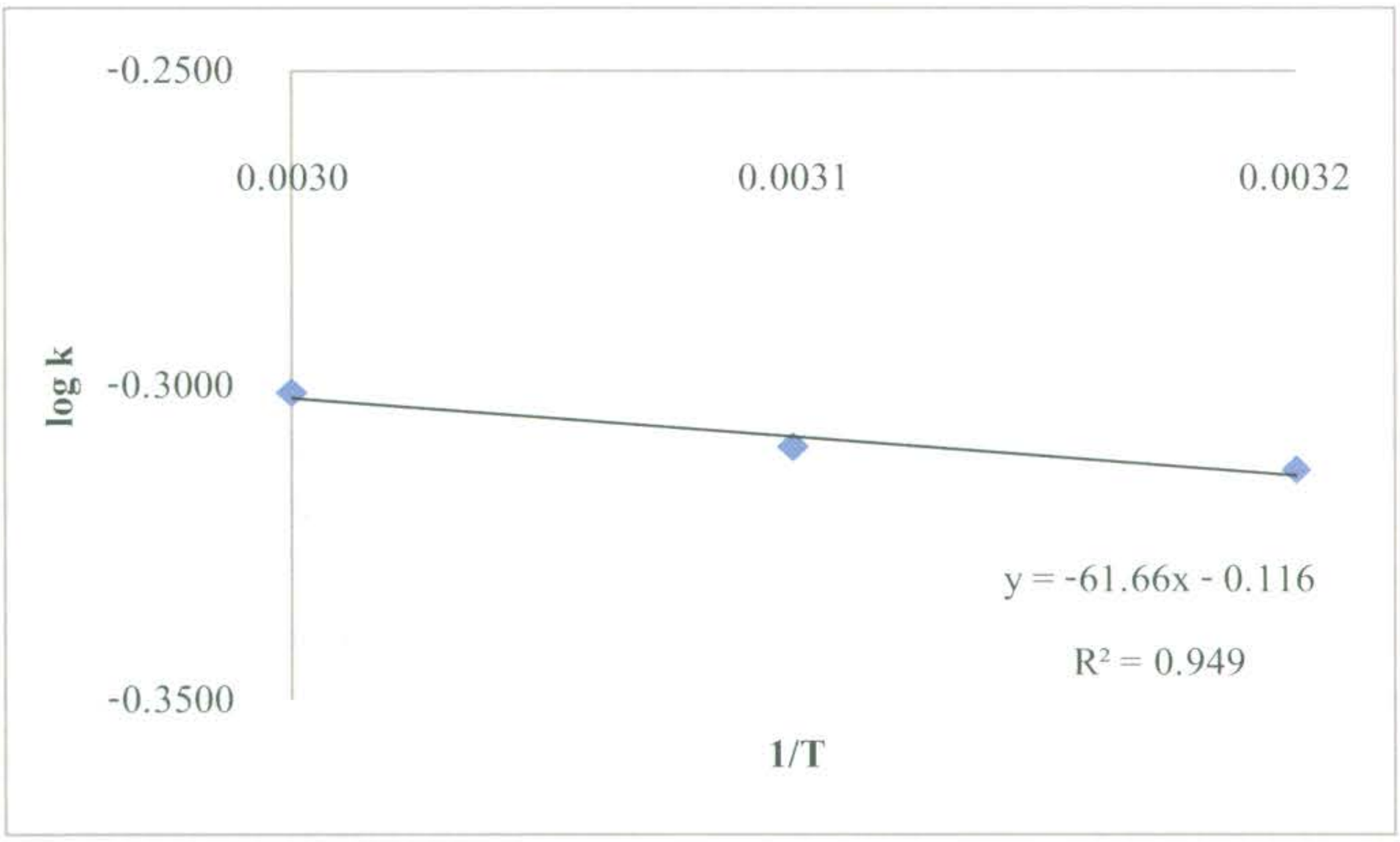
ผลการคาดคะเนอายุการเก็บรักษาน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็น

การกำหนดคุณภาพหรืออายุของน้ำมันสามารถดูได้จากการสลายตัวของไตรกลีเซอไรด์เกิดกรดไขมันอิสระ กรดไขมันอิสระเมื่อถูกออกซิไดซ์จะเกิดกลิ่นเห็นหืนในน้ำมันทำให้ไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค ดังนั้นการคาดคะเนอายุการเก็บรักษาของน้ำมันรำข้าวหอมมะลิแบบบีบเย็น จึงใช้ค่าการเปลี่ยนแปลงของค่ากรด และค่าเปอร์ออกไซด์ โดยใช้อุณหภูมิเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเสื่อมสภาพของน้ำมัน ปรกติอัตราการสลายตัวของผลิตภัณฑ์จะเพิ่มขึ้นในราว 2-3 เท่า ทุกๆ 10 องศาเซลเซียสที่เพิ่มขึ้น ความสัมพันธ์

เช่นนี้เป็นไปตามสมการที่ (1) จากผลการวิจัยเมื่อนำอัตราการเพิ่มขึ้นของค่ากรดและค่าเปอร์ออกไซด์จากวันที่ 0 ไป วันที่ 1 ของน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นเป็นค่าคงที่อัตราเร็ว (k) มาพล๊อตกราฟแสดงความสัมผัสระหว่าง log k กับ 1/T ได้กราฟดังรูปที่ 3 และ 4



รูปที่ 3 Arrhenius plot ของอัตราการเพิ่มขึ้นของค่ากรด



รูปที่ 4 Arrhenius plot ของอัตราการเพิ่มขึ้นของค่าเปอร์ออกไซด์

เมื่อทราบค่าคงที่อัตราเร็ว (k) ที่อุณหภูมิสูง สามารถคำนวณหาค่าคงที่อัตราเร็วที่อุณหภูมิห้องปรกติ (25 องศาเซลเซียส) ได้ จึงทำให้สามารถทำนายอายุของผลิตภัณฑ์ได้จากสมการอาร์เรเนียสสมการที่ (1) ซึ่งสามารถดัดแปลงเพื่อใช้คำนวณค่าคงที่อัตราเร็ว (k) ที่อุณหภูมิต่างกันได้ดังสมการที่ (2)

$$\log\frac{k_2}{k_1} = \frac{Ea}{2.303R}\left(\frac{T_2 - T_1}{T_1 T_2}\right) \qquad (2)$$

เมื่อให้ k_1 และ k_2 = ค่าคงที่อัตราเร็วที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส

T_1 และ T_2 = อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส

จากสมการที่ (2) ได้ค่าคงที่อัตราเร็วของค่ากรดและค่าเปอร์ออกไซด์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.000062 day^{-1} และ 0.000059 day^{-1} และอายุการเก็บรักษาของน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นสามารถคาดคะเนจากสมการอายุการเก็บรักษาสมการที่ (3)

$$t_{90} = \frac{0.105}{k} \qquad (3)$$

จากการคาดคะเนอายุการเก็บรักษาของน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าผลิตภัณฑ์มีอายุการเก็บรักษาเป็นเวลา 1697.23 วัน หรือ 4.6 ปี เมื่อพิจารณาจากค่ากรด และ 1771.02 วัน หรือ 4.9 ปี เมื่อพิจารณาจากค่าเปอร์ออกไซด์ นั้นคือ หากเก็บน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นไว้นานเกิน 4.6 ปี หรือ 4.9 ปี ผลิตภัณฑ์จะมีค่ากรด และค่าเปอร์ออกไซด์เกินกว่าเกณฑ์มาตรฐานน้ำมันพืชบริโภคกำหนดไว้ คือ ค่ากรดไม่เกิน 4 มิลลิกรัม KOH/ กรัมน้ำมัน และค่าเปอร์ออกไซด์ไม่เกิน 10 มิลลิกรัม/ กิโลกรัมน้ำมัน ดังนั้นหากกำหนดให้น้ำรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นมีอายุการเก็บรักษาที่ 4.9 ปี ผลิตภัณฑ์จะมีค่ากรดเกินมาตรฐาน งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เกณฑ์มาตรฐานน้ำมันพืชบริโภคกำหนดอายุการเก็บรักษาน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นที่ 4.6 ปีโดยพิจารณาจากค่ากรด

สรุปผลการทดลอง

คุณสมบัติทางกายภาพเคมีของน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นที่นำมาศึกษาในครั้งนี้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานน้ำมันพืชบริโภค โดยมีค่าดัชนีหักเห ค่าความชื้น ค่ากรด ค่าเปอร์ออกไซด์ และค่าไอโอดีน เท่ากับ 1.3294 ร้อยละ 0.20 1.36 มิลลิกรัม KOH / กรัมน้ำมัน 3.12 มิลลิกรัม/ กิโลกรัมน้ำมัน และ 93.02 มิลลิกรัม/ กรัมน้ำมัน ตามลำดับ กรดไขมันองค์ประกอบที่สำคัญ คือ กรดปาล์มิติก ร้อยละ 21.79 กรดสเตียริกร้อยละ 1.86 กรดโอเลอิก ร้อยละ 44.85 กรดลิโนเลอิก ร้อยละ 31.32 และกรดลิโนเลนิก ร้อยละ 0.19 มีแกมมา-โอไรซานอลซึ่งเป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชั่นตามธรรมชาติที่มีเฉพาะในน้ำมันรำข้าวเท่านั้นสูงถึงร้อยละ 1.298 หรือ 12,980 ppm และผลิตภัณฑ์มีอายุการเก็บรักษาเป็นเวลา 1697.23 วัน หรือ 4.6 ปี การศึกษานี้ถือเป็นแนวทางในการพัฒนาและผลิตน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็นเป็นสินค้าเกษตรอินทรีย์ประจำจังหวัดสุรินทร์ที่มีคุณภาพที่ดีได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์ จากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์ และขอขอบคุณสหกรณ์เกษตรอินทรีย์กองทุนข้าวสุรินทร์ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำมันรำข้าวหอมมะลิอินทรีย์แบบบีบเย็น

เอกสารอ้างอิง

คมสัน หุตะแพทย์. (2550). น้ำมันรำข้าวคุณค่าดังทอง. เกษตรกรรมธรรมชาติ ฉบับที่ 4: หน้า 28-36.

คณิศา กิตติรัตนศักดิ์ไพบูลย์ จินดารัตน์ โตกมลธรรม และ คณิต กฤษณังกูล. (2552). การหาองค์ประกอบรองต่างๆ ในน้ำมันพืชบริโภคที่วางจำหน่ายในประเทศไทยโดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวแรงดันสูงแบบแยกตามขนาด. วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ. 32(2-3) หน้า 242-251.

นพมาศ มนัสวรากุล. (2545). การสำรวจปริมาณแกมมา-โอไรซานอลและวิตามินอีในข้าวไทยสายพันธุ์ต่างๆ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวเคมี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพฯ: หน้า 82-106.

สมพล ประคองพันธ์. (2534). การศึกษาความคงสภาพแบบเร่งและกำหนดวันสิ้นอายุของยา. การศึกษาความคงตัวของเภสัช, ศูนย์บริการเทคโนโลยีเภสัชอุตสาหกรรม, คณะเภสัช-ศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: 23-44.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. (2533). มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, มอก. 47-2533. น้ำมันพืชบริโภค.

AOAC. (2000). Methods of Analysis. . Association of Official Analytical Chemists. The Association: Washington. DC.

Bergman, C. J., and Xu, Z. (2003). Genotype and environment effects on tocopherols, tocotrienols and gamma-oryzanol content of Southern US rice. Cereal Chemistry. 80: 446-449.

Jeyashoke, N., Krisnangkura, K. and Chen, S. T. (1998). Microwave induced rapid transmethylation of fatty acids for analysis of food oil. Journal of Chromatography A. 818:133-137.

Ju, Y. H. and Vali, S. R. (2005). Rice Bran Oil as a Potential Resource for Biodiesel. Journal of Science Industrial Research. 64: 822.

Krishna, A. G. G., Hemakumar, K. H. and Khatoon, S. (2006): Acidity of Oryzanol and Its Contribution to Free Fatty Acids Value in Vegetable Oils. Journal American Oil Chemists's Society. 83: 999-1005.

Krishna, A. G. G., Khatoon, S. Shela, P. M., Sarmandal, C. V., Indira, T. N., Mishra, A. (2001). Effect of refining of crude rice bran oil on the retention of oryzanol in the refined oil. Journal American Oil Chemists's Society. 78: 127-131.

Rong, N., Ausman, L. M. and Nicholosi, R. J. (1994). Rice bran oil decrease plasma LDL cholesterol by inhibitory dietary cholesterol absorption. Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 8: A162.

Sasaki, J. Takada, Y. Kusuda, M. Tanabe, Y. Matsunaga, A. and Arakawa, K. (1990). Effects of gamma-oryzanol on serum lipids and apolipoproteins in dyslipidemic schizophrenics receiving major tranquilizero. Clinical Therapeutics. 12: 263-268.

Sugano, M. and Tsuji, E. (1997). Rice bran oil and cholesterol metabolism. Nutrition. 127: 521S-524S.

Tadahisa, H. and Donald, A. (1991). Preventive effect of antioxidants on lipid peroxidation in the retina. Ophthalmic Research .23: 196-203.

Tahira, R. Rehman, A. and Muhanmmad Anwar, B. (2007). Characterization of rice bran oil. Journal of Agricultural Research. 45: 225-230.

Van Hoed,V. Depaemelaere, G. Vila Ayal, J. Santiwattana, and P. Verhé, R. (2006). Influence of Chemical Refining on the Major and Minor Components of Rice Bran Oil. Journal American Oil Chemists's Society. 83: 315-321.

❑❑❑❑❑

ว.วิทย. มข. 39(1) 105-112 (2554) KKU Sci. J.39(1) 105-112 (2011)

KKU SCIENCE JOURNAL

ลายนิ้วมือและพหุปัญญา: การศึกษาเบื้องต้น

Fingerprint Pattern and Multiple Intelligence: a Preliminary Study

Somsong Nanakorn[1], *Niyada Honark*[1], *Supannee Ungpansattawong*[2], *Wichuda Chaisiwamongkol*[2], *Amnuay Maneesriwongul*[2], *Rassame Suwanwerakamtorn*[3], *Sarintip Raksasataya*[4] *and Kusuma Chusilp*[5]

Abstract

This study aims at investigation of a relationship between fingerprint patterns and multiple intelligences (MI) i.e. the linguistic, logical-mathematical, spatial, musical, bodily-kinesthetic, interpersonal, intrapersonal and naturalistic intelligences of school children. Subjects are 72 high school children who attended the Olympic academic course at the Faculty of Science, Khon Kaen University, northeastern Thailand. The MI data were assessed by the self-administered questionnaire which consists of 80 questions. Ten fingerprints of each subject were collected by scanning with the fingerprint scanner and the Automated Inkless Fingerprint Imaging Software. Results are as follows: (1) ten fingerprint patterns of most subjects are of two types i.e. whorls plus ulnar loops; (2) The right middle finger of whorl pattern is significantly related to the logical-mathematical intelligence high score. It is concluded that the whorl pattern on the right middle finger may be able to indicate the logical-mathematical intelligence high score. Large sample size is examined to determine a relationship between fingerprint patterns and other MI.

Keywords: Fingerprint, Whorl pattern, Multiple intelligence

[1] Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002

[2] Department of Statistics, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002

[3] Department of Computer Science, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002

[4] Faculty of Education, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002

[5] Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002

Introduction

Dermal ridges on palm, fingertips, and soles appear in the third to fifth month of fetal development and the patterns remain unchanged (Penrose, 1969; Penrose and Ohara, 1973; Okajima, 1975; Nora and Fraser, 1989). Disturbances can be caused environmentally by diseases such as fetal rubella, thalidomide poisoning (Penrose and Ohara, 1973) or chromosomal aberration (Schaumann and Alter, 1976; Rajangam et al., 1995) or maternal stress during prenatal period (Babler, 1991; Brown et al., 2000; Rosa et al., 2001). The dermal ridges on fingertips called fingerprints are arranged in patterns and classified based on the number of triradii present (Holt, 1961). Thus, there is no triradius in a simple arch pattern, one triradius in loops (ulnar and radial), and two triradii in a whorl.

Since Professor Howard Gardner (1983) initially identified the original seven different kinds of human intelligences i.e. linguistic, logical-mathematical, spatial, musical, bodily-kinesthetic, interpersonal, and intrapersonal intelligences in Frames of Mind, then added an eighth intelligence - naturalistic intelligence (Gardner, 1999). Short descriptions of those multiple intelligences (MI) are as follows: linguistic = smart in spoken & written language; logical-mathematical = smart in numbers & reason; spatial = smart in patterns of wide space; musical = smart in rhythm; bodily-kinesthetical = smart in bodily movement; interpersonal = smart in understanding other people; intrapersonal = smart in understanding themselves; naturalistic = smart in nature & the environment. Human beings are organisms who possess a basic set of intelligences and have a unique blend of their intelligences (Gardner, 1999). Though Gardner's theory of MI has not been readily accepted within academic psychology, it has however has met with a strong positive response from many educators and has helped them to reflect on their practices, and given them a basis to broaden their focus, and to attend to what might assist people to live their lives well (Smith, 2008). Factors affecting human intelligences are biological endowment (including genes, and brain injuries during development), personal life history, and cultural background (Armstrong, 1994). The fingerprint pattern is also inherited from many genes (Penrose, 1969) and prenatal environments (Babler, 1991; Brown et al., 2000; Rosa et al., 2001). Therefore, the authors hypothesize that MI and fingerprint patterns may be related. To assess MI from a fingerprint pattern would be easy, quick and useful for parents and teachers to promote the potentialities of their children. The aim of the pilot study was to describe the MI scores and analyze relationships between each MI score and the fingerprint patterns of school children. This research protocol had been reviewed and received ethical approval from the Khon Kaen University Ethics Committee for Human Research.

Materials and methods

Subjects: A total of 72 high school children who attended the Olympic academic course at the Faculty of Science, Khon Kaen University, northeastern Thailand participated in the study.

Instruments: Four kinds of instruments were used as follows:

1. Laptop PC.
2. Fingerprint sensor (digitalPersona Inc., IT WORKS Co., Ltd., 2005).

3. The Automated Inkless Fingerprint Imaging software (Nanakorn et al., 2006; 2007; 2008).

4. MI questionnaire (Sintuwong, 2002; with written permission) which consists of 80 questions of the 8 MI categories (10 questions for each MI) scoring in 5 levels from 0 to 4 (This is not like me at all = 0, This is a bit like me = 1, This is sometimes like me = 2, I am like this more often than not = 3, I am always like this = 4).

Sample collection: Prior to answering the MI questionnaire and scanning of fingertips, signed informed consents were obtained. Each subject's ten fingertips were scanned using the fingerprint sensor coupled with the Automated Inkless Fingerprint Imaging Software. The scanning method is described elsewhere (Nanakorn et al., 2007; 2008). Briefly, researchers performed scanning by touching each subject's fingertips on a touchpad of the fingerprint sensor, starting from the left hand; thumb, index, middle, ring, little fingers, followed by the right fingers of little, ring, middle, index, and thumb. These fingertips' images are stored into a data base as a portable digital format (PDF) file before printing. Subjects also answered the MI questionnaire by themselves.

Data analyses: Types of fingerprint patterns were identified by the first author according to the standard method set by Cummins and Midlo (1943). Four main types of fingerprint patterns were classified as whorl, ulnar loop, radial loop, and arch. Reliability of the MI questionnaire was analyzed using the alpha Cronbach. Sex difference of each mean MI score was analyzed using an independent sample t-test. Relationships between types of fingerprint pattern and means of each MI score were analyzed using an analysis of variances (ANOVA) and the independent sample t-test. The SPSS for Windows version 17.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA.) was used for statistical analyses at 95% level of confidence.

Results

Demographic characteristics

Seventy two subjects were 43 males and 29 females who identified themselves for training in Computers (20 persons = 27.8%), Physics (20 persons = 27.8%), Mathematics (18 persons = 25.0%), and Biology (14 persons = 19.4%).

Reliability

Cronbach's alpha of the 80 questions was equal to 0.917

Multiple intelligence

Descriptive analysis of mean scores of each MI by sex found that the intrapersonal intelligence of male subjects was higher than other MI (29.1±4.7; mean ± standard deviation). The second and the third highest mean scores were logical-mathematical intelligence and musical intelligence (28.7±4.2, 26.8±6.9, respectively). Female subjects also had the highest score of intrapersonal intelligence (27.5±3.5) followed by spatial intelligence (25.4±4.8), logical-mathematical intelligence (25.4±4.2), and interpersonal intelligence (25.3±4.3). Sex differences of MI mean scores analyzed by the independent sample t-test showed that male subjects had significantly higher mean MI scores than those of females [$t_{(71)}$=3.22, $p<0.05$].

Types of fingerprint pattern and ten-fingerprint image

Ulnar loop pattern on the left little finger was found the most prevalent (70.8%) while whorl pattern on the right thumb and ring fingers were

found at 63.9%. Arch pattern was found on the right index (12.5%), the left index and middle fingers (11.1%), radial loop pattern appeared only on the index fingers (8.3% on the left index; 5.6% on the right index) as shown in Table 1. Diversity of types of fingerprint patterns of ten-finger was found mostly in two types of patterns i.e. whorl plus ulnar loop (41 subjects or 56.9%) as shown in Fig. 1.

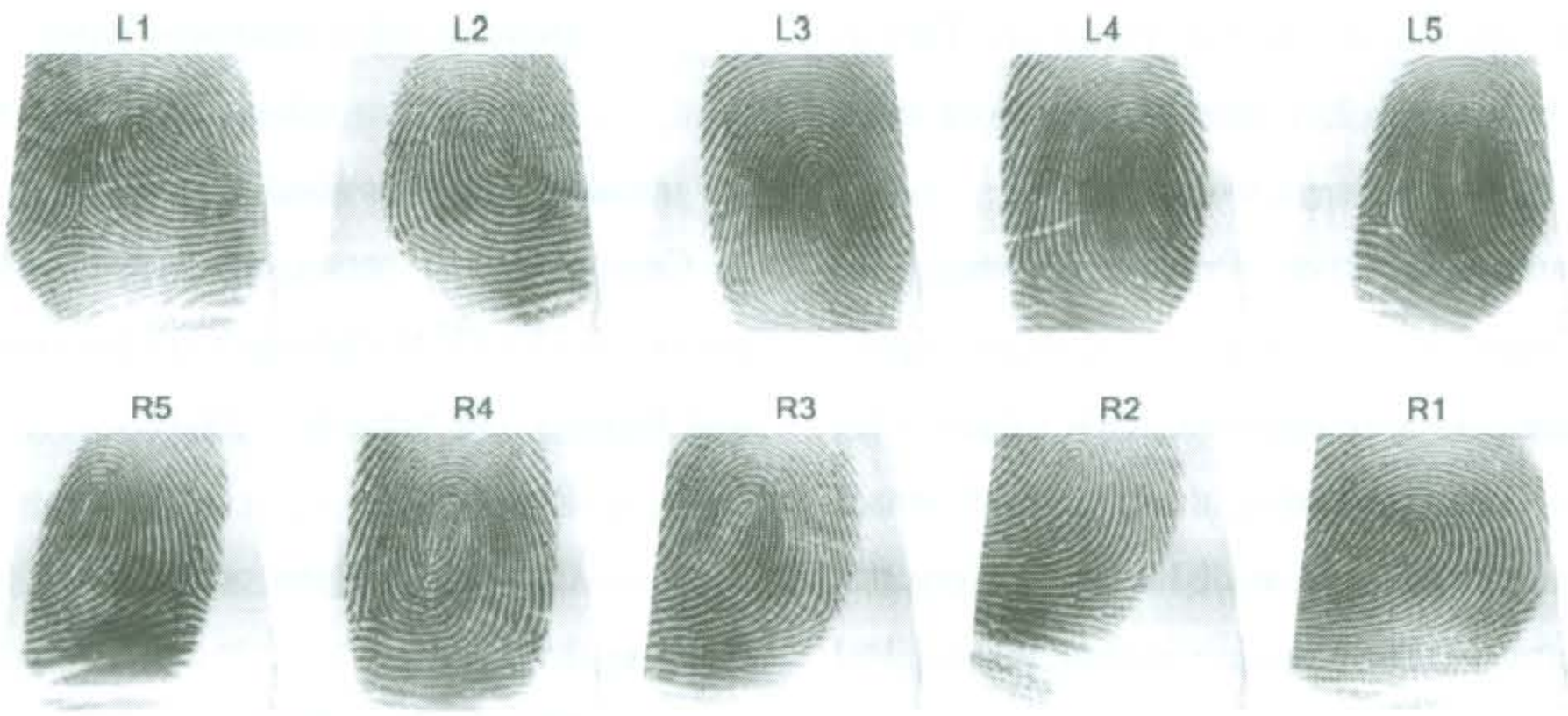


Figure 1. Image of ten-fingerprint obtained from the Automated Inkless Fingerprint Imaging Software. There are 8 ulnar loops [left thumb (L1), middle (L3), ring (L4), little (L5), and the right thumb (R1), index (R2), Middle (R3), and little fingers (R5)] and 2 whorls on the left index (L2) and right ring fingers (R4).

Table 1. Percentages of types of fingerprint pattern by left and right fingers

Pattern	L1	L2	L3	L4	L5	R1	R2	R3	R4	R5
W	56.9	50.0	30.6	61.1	25.0	**63.9**	47.2	38.9	**69.4**	34.7
UL	41.7	30.6	58.3	33.3	**70.8**	36.1	34.7	59.7	29.2	61.1
RL	0	**8.3**	0	0	0	0	**5.6**	0	0	0
A	1.4	**11.1**	**11.1**	5.6	4.2	0	**12.5**	1.4	1.4	4.2
Total (n)	100.0 (72)	100.0 (72)	100.0 (72)	100.0 (72)	100.0 (72)	100.0 (72)	100.0 (72)	100.0 (72)	100.0 (72)	100.0 (72)

L1 = left thumb L2 = left index finger L3 = left middle finger

L4 = left ring finger L5 = left little finger

R1 = right thumb R2 = right index finger R3 = right middle finger

R4 = right ring finger R5 = right little finger

W = whorls (double loop whorl is included) UL = ulnar loop RL = radial loop A = arch

Relationship between fingerprint pattern and multiple intelligence

The ANOVA showed that only the mean score of the logical-mathematical MI had a statistical significant difference between three types of fingerprint patterns on the right middle finger i.e. whorl, ulnar loop, and arch [$F_{(2,70)}$=4.42, p=0.02). In other words, pattern type on the right middle finger is able to indicate a subject who has a high mean score of the logical-mathematical MI. The other MI mean scores show no significant difference between groups of fingerprint pattern types. The next step of the analysis was to identify which type of fingerprint pattern on the right middle finger is able to indicate high mean scores of the logical-mathematical MI. Considering frequencies of each pattern type on the right middle finger, it was found that the ulnar loop was the most prevalent (59.7%), 38.9% showed the whorl and only 1 subject (1.4%) had the arch. Thus the least frequency was deleted resulting in 71 subjects for the next analysis using the independent sample t-test. Results showed that the group of the whorl type had a significantly higher logical-mathematical MI mean score (29.21) than that of the ulnar loop type (26.12) [$t_{(69)}$=-3.03, p=0.002]. This indicates that the whorl type pattern on the right middle finger is related to the logical-mathematical MI.

Regarding analyses of an individual's fingerprint pattern type and MI score as shown in Fig. 2, it helps each subject to know both of his or her eight multiple intelligences in ranking and the types of fingerprint patterns.

Discussion

The reliability of the MI checklist of this study was quite high and similar to that of a previous study (alpha Cronbach=0.911) by Sintuwong (2002) probably caused by similarity of subjects' characteristics and words using in questions which had been adapted for students.

The logical-mathematical MI mean score ranks the highest among the present study's subjects and the previous one by Sintuwong (2002) because both were students from the Science and Technology field. Remarkably, students who study in the Science and Technology field have highly intelligence in logical-mathematics.

Authentic assessment of MI, documentation of individual profiles and problem-solving, can be performed by using several kinds of tools for data collection (Armstrong, 1994) for example; anecdotal records, work samples, audio cassettes, video tapes, photography, sociograms, informal tests, checklists etc.

Types of fingerprint pattern by fingers particularly on the left and right thumbs seem to be comparable to the previous study which had a larger sample size of 684 subjects (Nanakorn et al., 2007). The previous study revealed significant sex differences of fingerprint pattern types on the left and right thumbs, while the present study had too small sample size to determine this statistically.

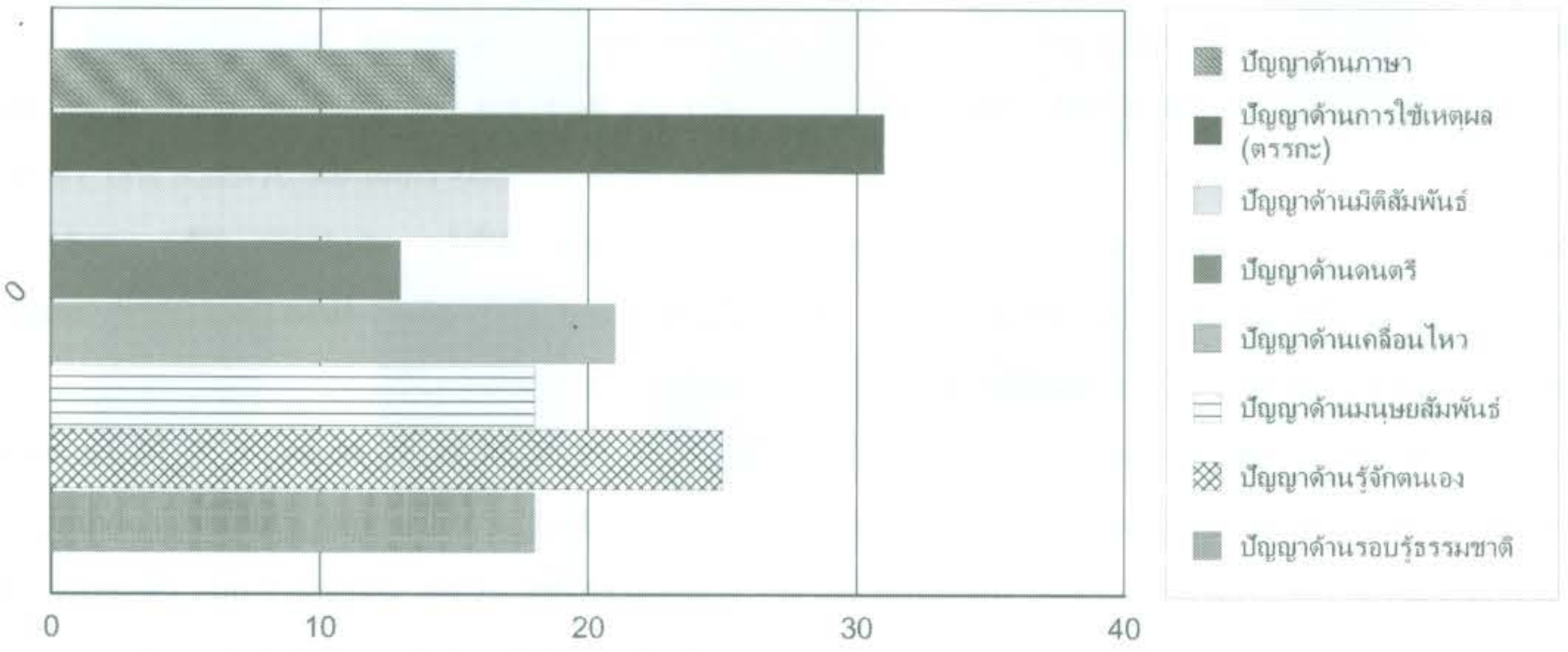
The sample size of this pilot study encourages researchers to calculate the appropriate sample size for future study of 1893 subjects (Lemeshow et al., 1990; Nanakorn et al., 2009) for investigation of 8 MI and fingerprint pattern types' relationships.

แบบรายงานผล พหุปัญญา และแบบลายนิ้วมือ
(Multiple Intelligence and Fingerprint Pattern Report)

ชื่อ Physics โรงเรียน Olympic Student

เลขประจำตัวนักเรียน 2018124012XXX ชั้น 2

พหุปัญญา 8 ด้าน (คะแนนสูงหมายถึงมีปัญญาด้านนั้นสูง)



พหุปัญญา 8 ด้าน

แบบลายนิ้วมือ

<u>มือซ้าย</u>

นิ้วหัวแม่มือ = ก้นหอยกลม
นิ้วชี้ = มัดหวายปัดก้อย
นิ้วกลาง = ก้นหอยกลม
นิ้วนาง = ก้นหอยกลม
นิ้วก้อย = ก้นหอยกลม

<u>มือขวา</u>

นิ้วหัวแม่มือ = ก้นหอยกลม
นิ้วชี้ = มัดหวายปัดก้อย
นิ้วกลาง = ก้นหอยกลม
นิ้วนาง = ก้นหอยกลม
นิ้วก้อย = ก้นหอยกลม

<u>ปัญญาด้านภาษา</u> - เก่งในการจำชื่อสถานที่ วันที่และรายละเอียดเล็กๆ น้อยๆ เรียนรู้ได้ดีด้วยการพูด ฟัง และการเห็นคำต่างๆ
<u>ปัญญาด้านการใช้เหตุผล (ตรรกะ)</u> - เก่งในการจำแนกประเภท แก้ปัญหา เรียนรู้ได้ดีด้วยการทำงานกับรูปแบบหรือความสัมพันธ์ที่เป็นนามธรรม
<u>ปัญญาด้านมิติสัมพันธ์</u> - เก่งในการสร้างจินตนาการ อ่านแผ่นที่ เรียนรู้ได้ดีด้วยการมองภาพ การสร้างภาพในใจ
<u>ปัญญาด้านดนตรี</u> - เก่งในการรับรู้เรื่องเสียง จำทำนองดนตรี เรียนรู้ได้ดีด้วยการอาศัยจังหวะ และท่วงทำนองของดนตรี
<u>ปัญญาด้านร่างกายและการเคลื่อนไหว</u> - เก่งในกิจกรรม กีฬา เต้น รำ การแสดง หัตถกรรม เรียนรู้ได้ดีด้วยการสัมผัส เคลื่อนไหว
<u>ปัญญาด้านมนุษยสัมพันธ์</u> - เก่งในการทำความเข้าใจผู้คน การจัดการ การสื่อสาร สร้างความเชื่อมโยง การเป็นผู้นำ เรียนรู้ได้ดีด้วยการทำงานร่วมกัน
<u>ปัญญาด้านรู้จักตนเอง</u> - เก่งในการแก้ไขความขัดแย้ง คล้อยตามความสนใจ สัญชาตญาณ และความปรารถนาของตนเอง เรียนรู้ได้ดีด้วยการทำงานตามลำพัง วางกรอบความก้าวหน้าด้วยตนเอง
<u>ปัญญาด้านรอบรู้ธรรมชาติ</u> - เก่งในการระบุชื่อสิ่งต่างๆ รอบตัว ความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งของ เรียนรู้ได้ดีด้วยการสำรวจ สังเกต

รายงานผลโดย ผศ. ดร. สมทรง ณ นคร หัวหน้าโครงการวิจัย "ความสัมพันธ์ระหว่างแบบลายนิ้วมือกับศักยภาพพหุปัญญา" คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Figure 2. Individual report form of 8 MI scores and fingerprint pattern types

Conclusions

72 male and female high school students answered the MI questionnaire of 80 items and their ten-fingers were scanned using the fingerprint sensor and the Automated Inkless Fingerprint Imaging Software to investigated relationships between types of fingerprint patterns and each of the 8 multiple intelligences derived from Gardner. Analyses revealed that the whorl pattern on the right middle finger had a statistically significant relationship to the logical-mathematical MI score. This is the first report of an integrated analytical study of fingerprint research and educational knowledge on multiple intelligences. Further studies of appropriate sample sizes need to be undertaken to further develop this research.

Acknowledgements

The authors would like to thank all those who participated in the study, and Professor Brian Sheehan for checking the English. The research was supported by Khon Kaen University.

References

Armstrong, T. (1994). Multiple intelligence in the class room. Virginir: ASCD.

Babler, W. J. (1991). Embryonic development of epidermal ridges and their configurations. Birth Defects Original Article Series. 27: 95-112.

Brown, A. S., Schaefer, C. A., Wyatt, R. J., Goetz, R. B., Gorman, J. M. and Susser, E. S. (2000). Maternal exposure to respiratory infections and adult schizophrenia spectrum disorders: a prospective birth cohort study. Schizophrenia Bulletin. 26: 287-295.

Cummins, H. and Midlo, C. (1943). Fingerprints, palms, and soles. New York: Blakinson.

Gardner, H. (1983). Frames of mind: the theory of multiple intelligences. New York: Basic Books.

Gardner, H. (1999). Intelligence reframes: multiple intelligences for the 21st century. New York: Basic Books.

Holt, S. (1961). Quantitative genetics of fingerprint patterns. British Medical Bulletin. 17: 247-50.

IT WORKS Co., Ltd. (2005). (cited 10 April 2006). Available from: http://www.itworksolutions.com/ idworks_integrator/index.html

Lemeshow, S., Hosmer, Jr. D. W., Klar, J. and Lwanga, S. K. (1990). Adequacy of sample size in health studies. WHO, Geneva Switzerland: John Wiley & Sons.

Nanakorn, S., Poosankam, P. and Mongconthawornchai, P. (2006). Imaging software for automated inkless fingerprinting. Proceedings of the First International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Great Mekong Subregion, Khon Kaen Thailand, Khon Kaen. 15-16 August. p.128.

Nanakorn, S., Poosankam, P. and Nanakorn, A. (2007). An application of automated inkless fingerprint imaging software for fingerprint research. Second International Conference on Innovative Computing, Information and Control, ICICIC, Art No. 4427698.

Nanakorn, S. Poosankam, P. and Mongconthawornchai, P. (2008). Perspective automated inkless fingerprint imaging software in fingerprint collection and pattern analysis. Journal of Medical Association Thailand. 91: 82-85.

Nanakorn, S. Honark, N., Ungpansattawong, S., Chaisiwamongkol, W., Maneesriwongul, A. and Suwanwerakamtorn, R. (2009). Relationship between fingerprint pattern and multiple intelligence: phase 1. Research report. Khon Kaen: Khon Kaen University. (in Thai)

Nora, J. J. and Fraser, F. C. (1989). Medical genetics: principles and practice. 3rd edition. Philadelphia: Lea Febiger.

Okajima, M. (1975). Development of dermal ridge in the fetus. Journal of Medical Genetics. 12: 243-250.

Penrose, L. S. (1969). Effects of additive genes at many loci compared with those of a set of alleles at one locus in parent-children and sib correlations. Annals of Human Genetics. 33: 15-21.

Penrose, L. S. and Ohara, P. T. (1973). The development of the epidermal ridges. Journal of Medical Genetics. 10: 201-208.

Rajangam, S. Thomas, L. M. and Janakiram, S. (1995). Dermatoglyphics in Down's syndrome. Journal of Indian Medical Association. 93: 10-30.

Rosa, A., Gutierrez, B., Guerra, A., Arias, B. and Fananas, L. (2001). Dermatoglyphics and abnormal palmar flexion creases as markers of early prenatal stress in children with idiopathic intellectual disability. Journal of Intellectual Disability Research. 45: 416-423.

Schaumann, B. A. and Alter, M. (1976). Dermatoglyphics in medical disorders. New York: NY Springer-Verlag.

Sintuwong, K., Klomjit, C., Bunterm, T., Chaijareon, S. and Mungsing, W. (2002). Multiple intelligence of Khon Kaen University students. Research report. Khon Kaen: Klungnanavitaya. (in Thai)

Smith, M. K. (2008). Howard Gardner and multiple intelligences: the encyclopedia of informal education. (Cited 2 November, 2008). Available from: http://www.infed.org/thinkers/gardner.htm

SPSS Statistics Rel. 17.0 (2009). SPSS SN: 5068054, Chicago: SPSS Inc. USA.

ว.วิทย. มข. 39(1) 113-119 (2554) KKU Sci. J.39(1) 113-119 (2011)

Effect of Chitosan on Growth and Development of *Phalaenopsis cornucervi* (Breda) Blume & Rchb.f.

Somporn Prasertsongskun[1*] *Witool Chaipakdee*[1]

บทคัดย่อ

เตรียมไคโตซานจากแกนหมึก โดยดัดแปลงจากวิธีของ Alimunair และ Zainuddin (1992) ได้ปริมาณไคโตซานร้อยละ 20 (w/w) เมื่อนำโพรโทคอร์มของกล้วยไม้เอื้องเขากวางอ่อน มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร VW (Vacin and Went, 1949) ที่เติมไคโตซานที่ได้จากแกนหมึก ความเข้มข้น 5 10 15 20 และ 25 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าไคโตซานทุกระดับความเข้มข้นกระตุ้นการเพิ่มปริมาณของโพรโทคอร์ม เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมไคโตซาน เมื่อนำโพรโทคอร์มมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง พบว่าไคโตซานกระตุ้นการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะไคโตซานความเข้มข้น 15 มิลลิกรัม/ลิตร ให้จำนวนใบ (4.3 ใบ/ต้น) จำนวนราก (2.5 ราก/ต้น) และจำนวนหน่อ (1.5 หน่อ/ต้น) เฉลี่ยสูงที่สุด อย่างไรก็ตามเมื่อให้ไคโตซานความเข้มข้นสูงขึ้น จะยับยั้งการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์ม ต้นกล้าที่เจริญเติบโตเมื่อนำย้ายออกปลูกในวัสดุปลูกที่เป็นถ่านและรดด้วยไคโตซานความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าต้นกล้ามีชีวิตรอดมากกว่าร้อยละ 50

Abstract

The chitosan was prepared from cuttlebone by the modified method of Alimunair and Zainuddin (1992) with the yield of 20% (w/w). Protocorms of *Phalaenopsis cornucervi* (Breda) Blume & Rchb.f. were cultured in VW (Vacin and Went, 1949) liquid medium added with chitosan from cuttlebone at five various concentrations of 5, 10, 15, 20 and 25 mg/l for 4 weeks. All chitosan concentrations could enhance protocorm production when compared to the control without chitosan. Additionally, protocorms were also cultured on VW semi-solid medium. The results showed the highest number of leaves (4.3 leaves), roots (2.5 roots) and shoots (1.5 shoots) could obtain when 15 mg/l of chitosan was added to the VW semi-solid medium. However, chitosan at higher concentration showed the inhibitory effect on the growth of protocorm. After the regenerated plantlets were potted in charcoal and watered with various concentrations of chitosan for 4 weeks, more than 50% were of them survived.

Keywords : Chitosan, Phalaenopsis, Protocorm

[1] Department of Science, Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University, Pattani, Thailand 94000

* Corresponding Author, E-mail : psomporn@bunga.pn.psu.ac.th

Introduction

Chitosan is an N-deacetylated product of chitin which is a natural carbohydrate polymer found in crab and shrimp shells, which are waste products from food-processing. Chitin is also found in wings of some insects such as butterflies and ladybugs, as well as in cell walls of yeast, mushroom and other fungi (Devlieghere et al., 2004). Chitosan production involves three steps: deproteination, demineralization and deacetylation. Chitosan has been applied in waste water treatment, biotechnology. In agriculture, chitosan has been primarily use to enhance plant growth and to boost the ability of plant in defending against fungal infections (Hadwiger et al., 2002; Barka et al., 2004). *Phalaenopsis* is a dominantly epiphytic genus and most intensively hybridized and propagated orchids. *Phalaenopsis* has been known worldwide as the most valuable potted plant. In Thailand, multiplication by tissue culture is mostly done for mass-propagation (Young et al., 2000). There have been many reports that chitosan has ability to stimulate the differentiation of orchid plant tissue (Limpanavech et al., 2003; Nge et al., 2006; Pornpienpakdee et al., 2010; Kananont et al., 2010). The objectives of the present study was to determine the effect of chitosan, prepared from cuttlebone, on micropropagation of *P. cornucervi* (Breda) Blume & Rchb.f. This is the first attempt to prepared chitosan from cuttlebone and use it to enhance the growth of *P. cornucervi* (Breda) Blume & Rchb.f.

Materials and Methods

Preparation of chitosan

Chitosan was prepared from cuttlebones using the modified process of Alimunair and Zainuddin (1992). Cuttlebones were obtained from Teppitak Seafood Co.Ltd., Pattani, Thailand. They (100 g) were cleaned with water and deproteinized by treating with 4% sodium hydroxide for 4 h and washed with distilled water to neutralize pH. After this step, they were demineralized at room temperature with 4% hydrochloric acid for 24 h, washed with distilled water and then dried. The obtained chitin was deacetylated using 50% sodium hydroxide solution for 3 h. Samples were washed with distilled water and dried in an oven at 80°C.

Degree of Deacetylation (DD)

Chitosan was dissolved and stirred in 0.1 M acetic acid. After 24 h 10% sodium hydroxide was added and stirred for 4 h. The mixture was washed with distislled water to neutralize pH and then wash with ethanol. The film of chitosan was incubated in dessicator for 24 h and evaluated the degree of deacetylation using Fourier Transform Infrared Spectrometry, employing the method of Baxter et al. (1992).

Plant materials

The mature pods of *P. cornucervi* (Breda) Blume & Rchb.f. were surface sterilized with water and then dipped in 95% ethanol and flamed in a short period for 3 times. Seeds were scapen from the placentae and put on Vacin and Went (VW) (1949) medium and incubated at 25±2°C in the darkness, all germinated seeds were moved to light condition for further development.

Effect of chitosan on protocorm growth and development in liquid and semi-solid medium

The 12 week-old protocorms were used as explant in VW liquid and solid medium. Protocorms (0.6 g fresh weight/flask) were cultured in VW liquid medium, supplemented with chitosan 5, 10,

15, 20 and 25 mg/l. Suspension of protocorms were maintained at 25±2 °C, shaked at 110 rpm. Protocorms were cultured on VW semi-solid medium supplemented with chitosan 5, 10, 15, 20 and 25 mg/l (30 explants were used for each treatments). Semi-solid culture medium were kept at 25±2°C and provided photoperiods of 16 h per day using cool white fluorescent. After 12 weeks, the number of the leaves, roots, shoots and the fresh weight (FW) of plant in semi-solid medium were measured. Only the fresh weight of plant in liquid medium was measured after 4 weeks of culturing.

Transplantation of plantlets

Plantlets of *P. cornucervi* (Breda) Blume & Rchb.f. were dipped into fungicide solution for 15 min. They were then transferred to plastic basket (size 27.5x13.2x12.3 cm) containing of charcoal as planting material and watered with various concentrations of chitosan solution at 5, 10, 15, 20 and 25 mg/l and kept under the plastic cover. The cover were occasionally removed after the second week to allow air circulation and to decrease the internal humidity. After 4 weeks, the percentage of survival was calculated using the formula as followed:

% survival = number of plants survival x 100/total number of plants

Experimental design and data analysis

Each experiment contained 30 explants was performed in a complete randomize design (CRD) and repeated twice. All data were analyzed by ANOVA and mean values were compared using Duncan's Multiple Range Test (DMRT) at 5% significant level.

Results and discussion

Chitosan preparation

The chitosan was yielded from cuttlebone in 20% (w/w) with 56% degree of deacetylation (DD). The results showed that cuttlebone chitosan had a lower degree of acetylation than brine shrimp chitosan (67-74%) (Tajik et al., 2008). The DD is an important parameter affecting solubility, chemical reactivity and biodegradability. It may range from 30-95% depending on the source and preparation procedure (Martino et al., 2005).

Effect of chitosan on the growth of protocorm in liquid and semi-solid medium

The results of chitosan on the growth of protocorms in liquid were showed in Table 1 and Figure 1. The protocorm (original weight 0.6 g) in the medium supplemented with chitosan at various concentrations; 5, 10, 15, 20 and 25 mg/l, were produced more in higher weight than in the control medium without chitosan. The effect of chitosan on growth of protocorms cultured on the semi-solid medium for 12 weeks was presented in Table 2. The results showed that the highest number of leaves (4.3 leaves), roots (2.5 roots) and shoots (1.5 shoots) could obtain when cultured on the medium with 15 mg/l of chitosan. The result also showed that concentration of chitosan higher than 15 mg/l caused decreasing of growth and development of protocorm. It was reported that chitosan stimulated the development of *Vitis vinifera* L. (Barka et al., 2004). Pornpienpakdee et al. (2010) also reported that chitosan was found to enhance the in vitro micropropagation of *Dendrobium* 'Eiskul'.

Table 1. Effect of the chitosan concentration on increasing weight of protocorm after 4 weeks of culturing.

Concentration of chitosan (mg/l)	Fresh weight (g)/flask	Physical characteristic of protocorm
0	0.61	green color and globular shape
5	0.63	green color and globular shape
10	0.65	green color and sharp-tip shape
15	0.67	green color and one leaf emerge from top of protocorm
20	0.65	green color and sharp-tip shape
25	0.65	green color change to yellow color

Data are shown as the mean and are derived from three replications.



Figure 1. Protocorms developed in liquid VW medium supplemented with different concentrations of chitosan; 5, 10, 15, 20 and 25 mg/l (from left to right) after 4 weeks of culture.

Table 2. The effect of different concentrations of chitosan on protocorm growth developing on VW medium after culturing for 12 weeks.

Concentration of chitosan (mg/l)	Average number of leaves (leaves/plantlet)	Average number of roots (roots/plantlet)	Average number of shoots (shoots/plantlet)	Fresh weight (g)/plantlet
0	3.3±0.87ab*	2.0±0.78b	1.1±0.28b	0.10±0.05a
5	3.2±1.03b	2.3±0.90ab	1.1±0.26b	0.12±0.07a
10	3.8±1.88ab	2.3±0.97ab	1.2±0.58ab	0.14±0.15a
15	4.3±2.92a	2.5±1.21a	1.5±1.03a	0.11±0.05a
20	3.1±0.86c	2.1±0.72b	1.1±0.26b	0.10±0.08a
25	3.4±0.81ab	2.0±0.85b	1.0±0.18b	0.10±0.05a

*Each value represented the mean ±SD of replicated explants which were recorded after 12 weeks of culture. The different letters indicated significant different at $p < 0.05$ by DMRT.

Transplantation of plantlets

Plantlets transferred to charcoal (Table 3 and Figure 2) had no statistical difference among given chitosan. However, about 77.78% of survival could receive on plants developed in charcoal and treated with 10 mg/l chitosan solution. The regenerated plants were characterized by growth and produced well of normal shoot. Our investigation was similar to the previous report that 10 mg/l chitosan stimulated shoot and root in *Paphiopedium bellatum* x PAPH. Angthong (Kleangkeo et al., 2003).

Table 3. Effect of chitosan on the percentage of survival of *P. cornucervi* (Breda) Blume & Rchb.f. after 4 weeks of transplantation.

Concentration of chitosan (mg/l)	survival rate (%)	characteristic of plantlets
0	72.22 a	leaves and roots were well developed
5	61.11a	plantlet were stunted
10	77.78a	multiplicated of shoot, leaves and roots were well developed
15	70.00a	leaves and roots were well developed
20	71.60a	leaves and roots were well developed
25	60.00a	leaves and roots were well developed



Figure 2. Transplantation of plants on charcoal and watering with 10 mg/l chitosan after 4 weeks of transfer.

In conclusion, chitosan could be prepared from cuttlebone and was applied successively to stimulate the growth and development of *P. cornucervi* (Breda) Blume & Rchb.f.

Acknowledgement

The authors are grateful to Asst. Prof. Dr. Vanida Chairgulprasert, Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University, for her kind proof-reading and comment of this manuscript and Mr. Jirasak Kongkoon for his help preparation of chitosan. This study was supported by grant from the Research Fund, Prince of Songkla University, Thailand.

References

Alimunair, A. and Zainuddin, R. (1992). An Economical Technique for Producing Chitosan Advances in Chitin and Chitosan. Brine, C. J., Sandford, P. A. Zikakis, J. P. (Ed). Elsevier Applied Science. Essex, UK. pp. 627-632.

Barka, E. A., Eullaffroy, P., Clement, C. and Vernet, G. (2004). Chitosan improve development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea.* Plant Cell Rep. 22: 608-614.

Baxter, A., Dillon, M., Taylor, K. D. A. and Roberts, G. A. F. (1992). Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. J. Biol. Macromol. 14: 166-169.

Devlieghere, F., Vermeulen, A. and Debevere, J. (2004). Chitosan : antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. Food Microbiol. 26(6): 703-714.

Hadwiger, L. A., Kloserman, S. J. and Choi, J. J. (2002). The Mode of Action of Chitosan and Its Oligomer in Inducing Plant Promoters and Developing Disease Resistance in Plants. (Suchiva, K., Chandrkrachang, S., Methacanon., Peter, M.G., eds.). Advances in Chitosan Science ISBN, Bangkok: 452-457.

Kananont, N., Pichyangkura, R., Chanprame, S., Chadchawan, S. and Limpanavech, P. (2010). Chitosan specificity for the *in vitro* seed germination of two *Dendrobium* orchids (Asparagales: Orchidaceae). Scientia Horticulturae. 124: 239-247.

Kleangkeo, C., Chankrajang, S. and Sawetsila, P. (2003). A study on the influences of chitosan upon the transplanting on growth of *Paphiopedilum bellatulum* x PAPH. angthong derived from tissue culture. In the National Chitin-Chitosan Conference July 17-18. 2003. at Institue Building III. Chulalongkorn University. Organized by Center for Chitin-Chitosan Biomaterials (CCB). Chulalongkorn University. pp. 65-68.

Limpanavech, P., Pichyangkura, R., Khumwasi, C., Chadchawan, S., Lotrakul, P., Bunjongrat, R., Chaidee, A. and Akaraeakpanya, T. (2003). The effects of polymer type, concentation and $DD of biocatalyte modified Chitosan on floral production of *Dendrobium* ? Eiskol ?. In the National-Chitin-chitosan Conference. Bangkok. Thailand. July 17-18, 2003. pp. 60-64.

Martino, A. D., Sittinger, M. and Risbud, M. V. (2005). Chitin: A versatile biopolymer for

orthopaedic tissue-engineering. Biomaterials. 26: 5983-5990.

Nge, K. L., New, N., Chandrkrachang, S. and Stevens, W. F. (2006). Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. Plant Sci. 170: 1185-1190.

Pornpienpakdee, P., Singhasurasak, R., Chaiyasap, P., Pichyangkura, R., Bunjongrat, R., Chadchawan, S. and Limpanavech, P. (2010). Improving the micropropagation efficiency of hybrid *Dendrobium* orchids with chitosan. Scientia Horticulturae. 124: 490-499.

Tajik, H, Moradi, M., Rohani, S. M. R., Erfani, A. M. and Jalali, F. S. S. (2008). Preparation of chitosan from brine shrimp (*Artemia urmiana*) cyst shells and effects of different chemical processing sequences on the physiochemical and functional properties of the product. Molecules. 13: 1263-1274.

Vacin, E. and Went, F. (1949). Some pH change in nutrient solution. Bot. Gaz. 110: 605-613.

Young, P. S., Murthy, H. N. and Yoeup, P. K. (2000). Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in Phalaenopsis. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 63: 67-72.

❑❑❑❑❑

ว.วิทย. มข. 39(1) 120-129 (2554) KKU Sci. J.39(1) 120-129 (2011)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์อย่างง่ายในตัวอย่างยาด้วยเทคนิคสเปคโตรโฟโตเมตรีโดยใช้ 8 – ไฮดรอกซีควิโนลีนเป็นรีเอเจนต์ในการทำปฏิกิริยาร่วม

Simple Analytical Method for the Determination of Sulfonamides in Pharmaceutical Preparations by Spectrophotometry Using 8-Hydroxyquinoline as Coupling Reagent

อริศรา จรากร [1] *วิภารัตน์ เชื้อชวด* [1*] *และ รัตนา สนั่นเมือง* [1]

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ด้วยเทคนิคสเปคโตรโฟโตเมตรี ซึ่งง่าย รวดเร็ว และมีความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์สูง ซึ่งอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาของสารอนุพันธ์กลุ่มซัลโฟนาไมด์กับ 8 - ไฮดรอกซีควิโนลีน โดยทำปฏิกิริยาร่วมกับ ซัลฟาเมทอกซาโซล (SFMx) ซัลฟาไดอะซีน (SFD) และ ซัลฟาเมทาซีน (SFM) ในสภาวะที่เป็นเบสหลังจากทำให้เกิดปฏิกิริยาไดอะโซไทซ์เซชัน ได้เป็นสารประกอบสีส้มแดงซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นในช่วง 500 นาโนเมตร ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ของ SFMx, SFD และ SFM มีค่าเท่ากับ 0.0283 0.0292 และ 0.0298 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ความเที่ยงในการวิเคราะห์อยู่ในช่วงร้อยละ 0.41 - 5.17 ความแม่นในการวิเคราะห์แสดงในรูปค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 92.2 - 123.4 ได้นำเทคนิคที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ที่มีในตัวอย่างยาทางเภสัชกรรมต่างๆ ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ

Abstract

A rapid, selective and simple spectrophotometric method for the determination of some sulfonamide preparations was developed in present work. The method was based on the diazotization reaction of sulfamethoxazole (SFMx), sulfadiazine (SFD) and sulfamethazine (SFM) with 8-hydroxyquinoline in alkaline

[1] ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

* Corresponding Author, E-mail : wipharatc@nu.ac.th

media. The absorbance of the resulting orange red azo products were measured at the maximum wavelength of 500 nm. The limit of detection for SFMx, SFD and SFM were 0.0283, 0.0292 and 0.0298 mg L^{-1}, respectively. The precision (%RSD) in the range of 0.41 - 5.17 % and accuracy (%recovery) in the range of 92.2 - 123.4 % were obtained. The method was successfully applied for the determination of sulfonamides in various pharmaceutical preparations with satisfactory results.

คำสำคัญ : ซัลโฟนาไมด์ ไดอะโซไทซ์เซชัน สเปคโตรโฟโตเมตรี ตัวอย่างยา

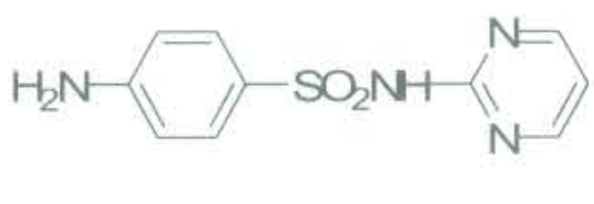
Keywords : Sulfonamides, Diazotization, Spectrophotometry, Pharmaceutical preparations

บทนำ

ยากลุ่มซัลโฟนาไมด์ (sulfonamides) เป็นยาอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากมีฤทธิ์กว้างและมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดีและมีราคาถูก โดยนำมาใช้ในการบำบัดรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เช่น ซัลฟาไดอะซีน (SFD) นิยมใช้สำหรับการติดเชื้อที่ผิวหนัง ซัลฟาเมทอกซาโซน (SFMx) ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ (โอภา วัชระคุปต์, 2551) และซัลฟาเมทาซีน (SFM) ใช้รักษาโรคติดเชื้อในร่างกาย (กมลชัย ตรงวานิชนาม, 2544) ซึ่งสูตรโครงสร้างของยาทั้งสามชนิด แสดงในรูปที่ 1



Sulfamethoxazole (STMx)



Sulfadiazine (SFD)



Sulfamethazine (SFM)

รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของซัลฟาเมทอกซาโซล (SFMx) ซัลฟาไดอะซีน (SFD) และ ซัลฟาเมทาซีน (SFM) (ที่มา: กมลชัย ตรงวานิชนาม, 2544)

ในปัจจุบันผู้บริโภคนิยมซื้อยามารักษาเองโดยไม่มีแพทย์หรือเภสัชกรแนะนำจึงมีโอกาสได้รับยาด้อยคุณภาพหรือใช้ยาผิดวิธีในการใช้บำบัดรักษาสูง ทำให้ผู้ใช้ยาได้รับอันตรายจากการใช้ยาอย่างไม่ถูกวิธีและไม่ได้มาตรฐานได้ ถ้าหากใช้ในขนาดต่ำๆ เป็นเวลานานจะทำให้แบคทีเรียเกิดการดื้อยา นอกจากนี้ยังพบว่ายากลุ่มซัลโฟนาไมด์ทำให้เกิดการแพ้ยาได้ในผู้ป่วยบางคน ซึ่งพบได้ประมาณร้อยละ 3-5 ของผู้ป่วย เช่น เกิดหลอดเลือดแดงอักเสบ (arteritis) ในอวัยวะต่างๆ เช่น ตา ไต ตับอักเสบ เป็นต้น โดยฤทธิ์แทรกแซงของยาซัลโฟนาไมด์อาจทำให้ผู้ป่วยบางรายเสียชีวิตได้ ในการใช้ยากลุ่มซัลโฟนาไมด์ต้องแน่ใจว่าเชื้อไวต่อยานี้ และใช้ในปริมาณที่เหมาะสม ดังนั้นจึงต้องมีการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ที่มีใน

ตัวอย่างยาทางเภสัชกรรมว่าได้มาตรฐานตามปริมาณที่ระบุไว้ตามข้างผลิตภัณฑ์หรือไม่ เพื่อป้องกันอันตรายต่างๆ หรืออาการไม่พึงประสงค์ที่จะเกิดขึ้นจากการใช้ยาและยังเป็นการควบคุมคุณภาพของยากลุ่มซัลโฟนาไมด์ที่มีจำหน่ายทั่วไปอีกด้วย

จากการค้นคว้ารายงานการวิจัยที่ผ่านมาการหาปริมาณยากลุ่มซัลโฟนาไมด์นิยมใช้เทคนิคไนไตรท์ไทเทรชัน (nitrite titration) (U.S. Pharmacopeia) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับใช้หาปริมาณยากลุ่มซัลโฟนาไมด์ (Antonio Hernandez - Cardoso, B.S., Scientist, Latin American Specialist, 2553) ซึ่งมีข้อเสีย คือ ไม่สามารถทำการวิเคราะห์ในระดับต่ำได้ (ต่ำกว่าระดับความเข้มข้น โมล/ลิตร) นอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไนไตรท์ไทเทรชันยังต้องใช้รีเอเจนต์ในการวิเคราะห์ในปริมาณมาก ซึ่งสิ้นเปลืองสารเคมีในการวิเคราะห์ ต่อมามีการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์โดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาของสารอนุพันธ์ของซัลโฟนาไมด์กับรีเอเจนต์ที่เหมาะสมหลายชนิด เช่น 7,8,8, 8-tetracyanoquinodimethane (Mohamed, 1989), *p*-aminohippurate (Preuss et al., 1988), Immodibenzyl (Nagaraja et al., 2002), 3-Aminophenol (Nagaraja et al., 2003) และ 8 - hydroxyquinoline (Nagaraja et al., 2007) แล้วทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ของสารประกอบที่มีสี ในรูปของ Azo dye และสารประกอบอื่นๆ ซึ่งสามารถทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ได้โดยเทคนิคสเปคโตรโฟโตเมตรี ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ 3 ชนิด (SFMx, SFD, SFM) โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาไดอะโซไทซ์เซชันแล้วทำปฏิกิริยาร่วมกับ 8 - ไฮดรอกซีควิโนลีน เนื่องจาก 8 - ไฮดรอกซีควิโนลีน ให้ค่า ε_{max} สูงซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อยากลุ่มซัลโฟนาไมด์ นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ง่ายและใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยเมื่อเทียบกับรีเอเจนต์ชนิดอื่นๆ ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบที่มีสัมแดง โดยจะนำสภาวะที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณยากลุ่มซัลโฟนาไมด์ที่มีจำหน่ายภายในประเทศไทยบางชนิด เพื่อเป็นการประเมินคุณภาพของยากลุ่มซัลโฟนาไมด์โดยเทคนิคสเปคโตรโฟโตเมตรีซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว และมีความจำเพาะเจาะจงต่อการวิเคราะห์ตรวจหาปริมาณสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ในตัวอย่างยาทางเภสัชกรรมได้อย่างถูกต้อง โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไนไตรท์ไทเทรชัน

วิธีดำเนินงาน

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

การหาค่าความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ของซัลโฟนาไมด์แต่ละชนิดใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ชนิดลำแสงคู่ (Double beam spectrophotometer, Perkin-Elmer รุ่น Lambda 20) ส่วนการหาสภาวะที่สมในการวิเคราะห์หาปริมาณซัลโฟนาไมด์แต่ละชนิดโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ชนิดลำแสงเดี่ยว (Single beam UV-VIS spectrophotometer รุ่น UNICAM 862) และในการหาปริมาณซัลโฟนาไมด์ในตัวอย่างยาชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิคไนไตรท์ไทเทรชันใช้เครื่อง Potentiometer (HORIBA pH / ion Meter F - 23)

2. รีเอเจนต์สำหรับการทดลอง

เตรียมสารละลายมาตรฐาน SFMx (Sigma - Aldrich, Switzerland), SFD (Sigma - Aldrich, Switzerland) และ SFM (Sigma - Aldrich, Switzerland) ความเข้มข้น 506 500 และ 556 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในกรดซัลฟูริก (Labscan , Thailand) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และใช้น้ำปราศจากไอออนในการปรับปริมาตร สารละลายโซเดียมไนไตรท์ (Univar, Auckland, New Zealand) ความเข้มข้น 1 % w/v ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สารละลายกรดซัลฟามิค (Riedel - de Haen AG -D -30926 Seelze, Germany) ความเข้มข้น 2 % w/v ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

(Pro analysis Merck, Germany) ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในการเตรียมสารละลายดังกล่าวใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลายและปรับปริมาตร สำหรับสารละลาย 8 - ไฮดรอกซีควิโนลีน (Acros Organincs, New Jersey, USA) ความเข้มข้น 0.5 % w/v ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เตรียมโดยใช้เมทานอล (Labscan , Thailand) เป็นตัวทำละลายและปรับปริมาตร

3. วิธีการทดลอง

ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 1 % w/v ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติม 8 - ไฮดรอกซีควิโนลีนความเข้มข้น 0.5 % w/v ปริมาตร 1 มิลลิลิตรและเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 25 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปสแกนหาค่าความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง 300 - 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ชนิดลำแสงคู่เพื่อหาค่า λ_{max} ของสารมาตรฐาน SFMx, SFD และ SFM

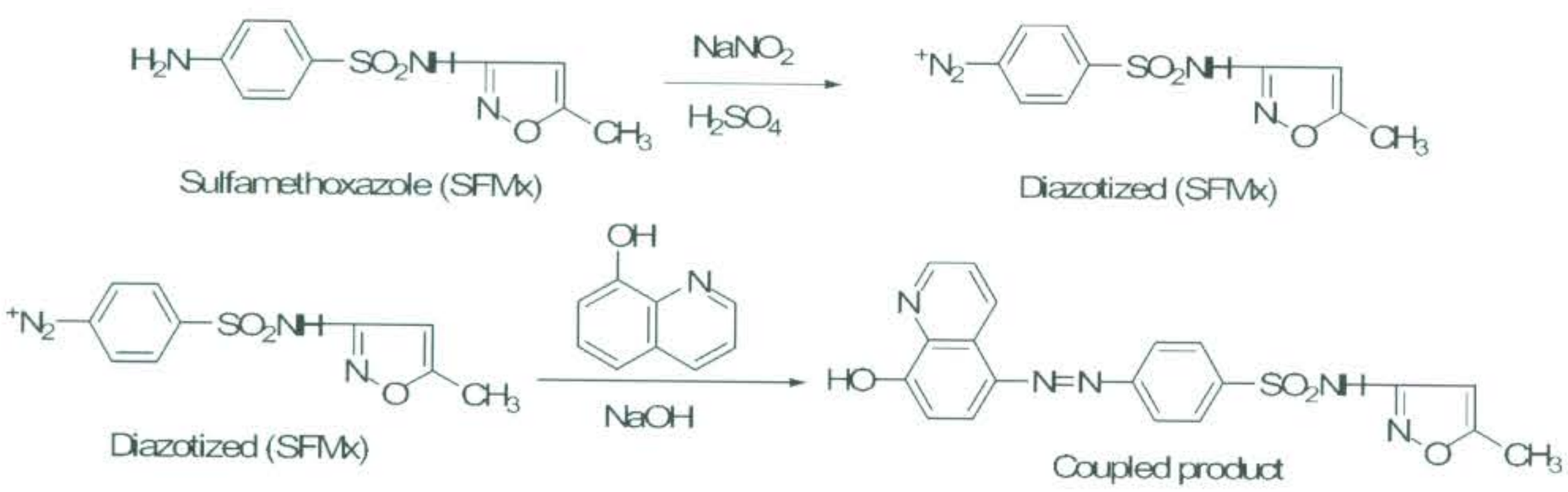
การเตรียมตัวอย่างยาเม็ด ทำการสุ่มและเตรียมยาตามวิธีมาตรฐานของ USP โดยนำยาเม็ดจำนวน 20 เม็ด มาบดให้ละเอียดแล้วชั่งตัวอย่างมา 0.0250 กรัมโดยใช้เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Shimadzu AW220, Japan) นำไปละลายด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตรแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 50 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติมโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 1 % w/v ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันแล้วทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติม 8 - ไฮดรอกซีควิโนลีนความเข้มข้น 0.5 % w/v ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 25 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตร-โฟโตมิเตอร์ชนิดลำแสงเดี่ยวโดยใช้สารละลายแบลงค์ปรับค่าการดูดกลืนแสงเป็นศูนย์ก่อนการวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่างยาน้ำ ทำการสุ่มและเตรียมยาตามวิธีมาตรฐานของ USP โดยปิเปตตัวอย่างยาน้ำแล้วนำไปละลายด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตรทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 50 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เตรียมใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติมโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 1 % w/v ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติม 8 - ไฮดรอกซีควิโนลีนความเข้มข้น 0.5 % w/v ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 25 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ชนิดลำแสงเดี่ยวโดยใช้สารละลายแบลงค์ปรับค่าการดูดกลืนแสงเป็นศูนย์ก่อนการวิเคราะห์

การศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ (Limit of detection, LOD) ขีดจำกัดในการวิเคราะห์หาปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) ความเที่ยง (precision) และความแม่น (accuracy) ในการวิเคราะห์ทำได้โดยการเตรียมสารมาตรฐานซัลโฟนาไมด์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1 3 5 7 และ 9 มิลลิกรัม/ลิตร สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแบลงค์จำนวน 10 ครั้ง เพื่อนำไปหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากนั้นคำนวณหาขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์จาก 3 SD_{blk} / slope ค่าขีดจำกัดในการวิเคราะห์หาปริมาณคำนวณได้จาก

10 SD_{blk} / slope การศึกษาความเที่ยงในการวิเคราะห์ทำโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นซ้ำจำนวน 3 ครั้ง เพื่อนำไปหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) สำหรับการหาความแม่นในการวิเคราะห์นั้นสามารถทำได้โดยการวิเคราะห์หาปริมาณซัลโฟนาไมด์แต่ละชนิดที่มีอยู่ในตัวอย่างยาชนิดต่างๆ แล้วนำความเข้มข้นที่ได้ไปเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่ระบุไว้ข้างฉลากผลิตภัณฑ์

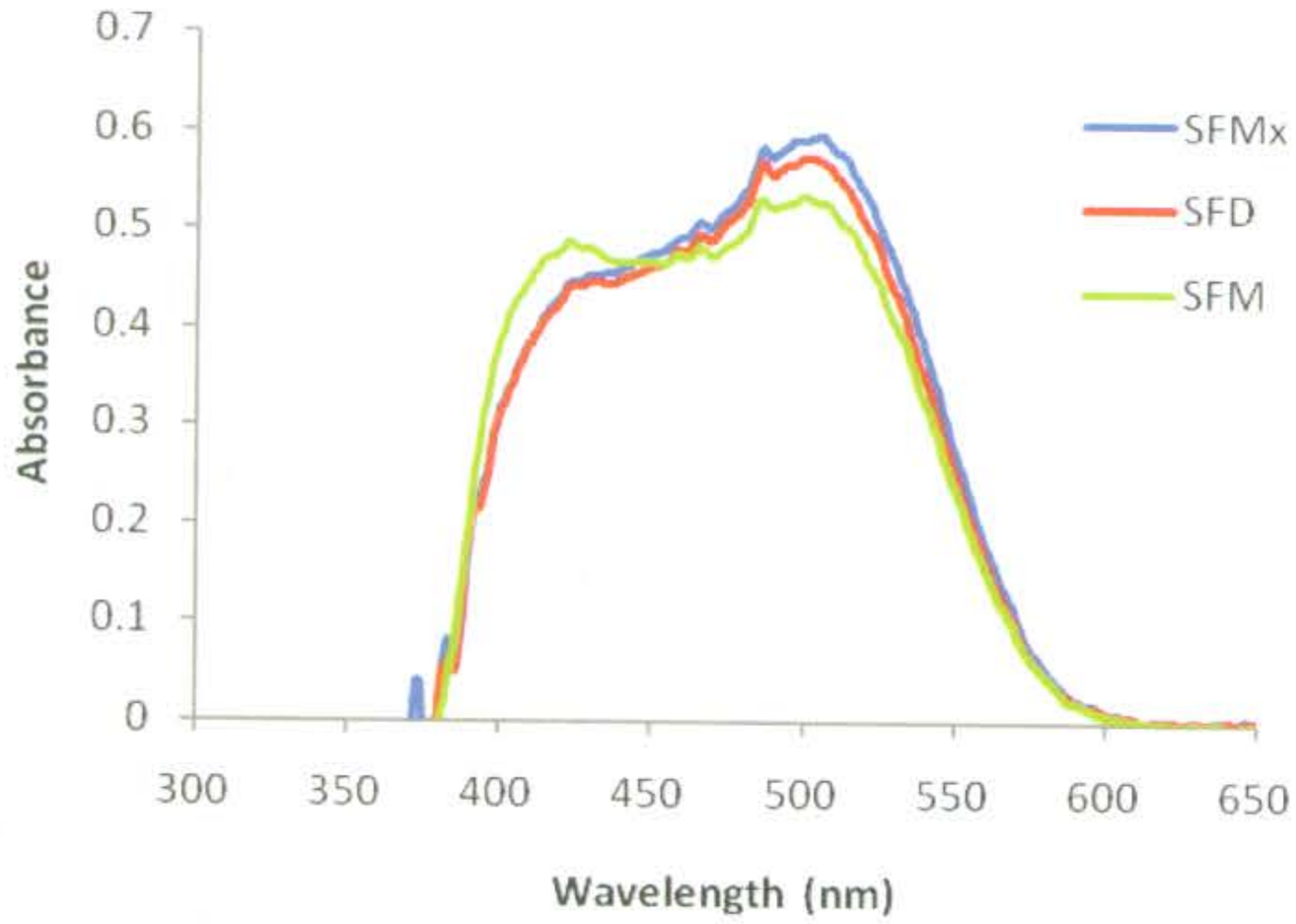
การพัฒนาเทคนิคสเปคโตรโฟโตเมตรีสำหรับการวิเคราะห์ตรวจหาปริมาณสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ในตัวอย่างยาทางเภสัชกรรมนั้นอาศัยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดังแสดงตาม รูปที่ 2



รูปที่ 2 ปฏิกิริยาในการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์โดยใช้ 8 - ไฮดรอกซีควิโนลีน เป็นรีเอเจนต์ในการทำปฏิกิริยาร่วม (ที่มา: Nagaraja et al., 2007)

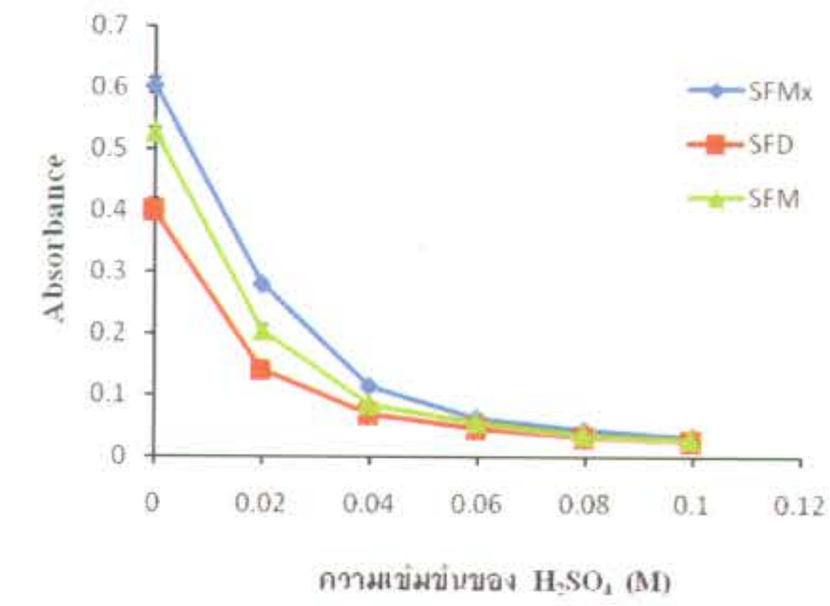
ผลการวิจัย

การวิเคราะห์หาปริมาณยากลุ่มซัลโฟนาไมด์โดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาของสารอนุพันธ์ของซัลโฟนาไมด์กับ 8 - ไฮดรอกซีควิโนลีน ในสภาวะที่เป็นเบสหลังทำให้เกิดปฏิกิริยาไดอะโซไทซ์เซชัน จะได้เป็นสารประกอบสีส้มแดงซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 3

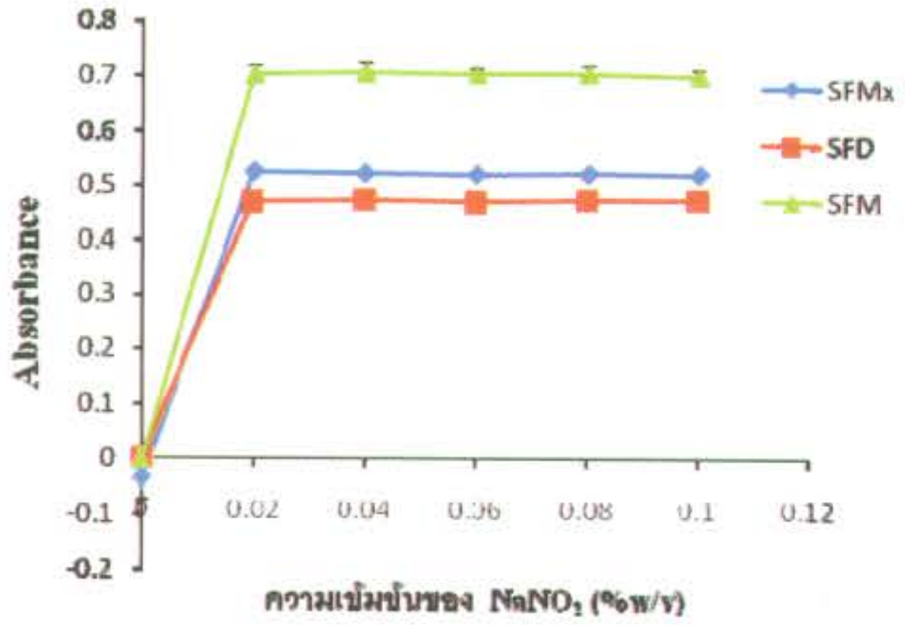


รูปที่ 3 สเปคตรัมการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานซัลโฟนาไมด์ SFMx, SFD และ SFM ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร

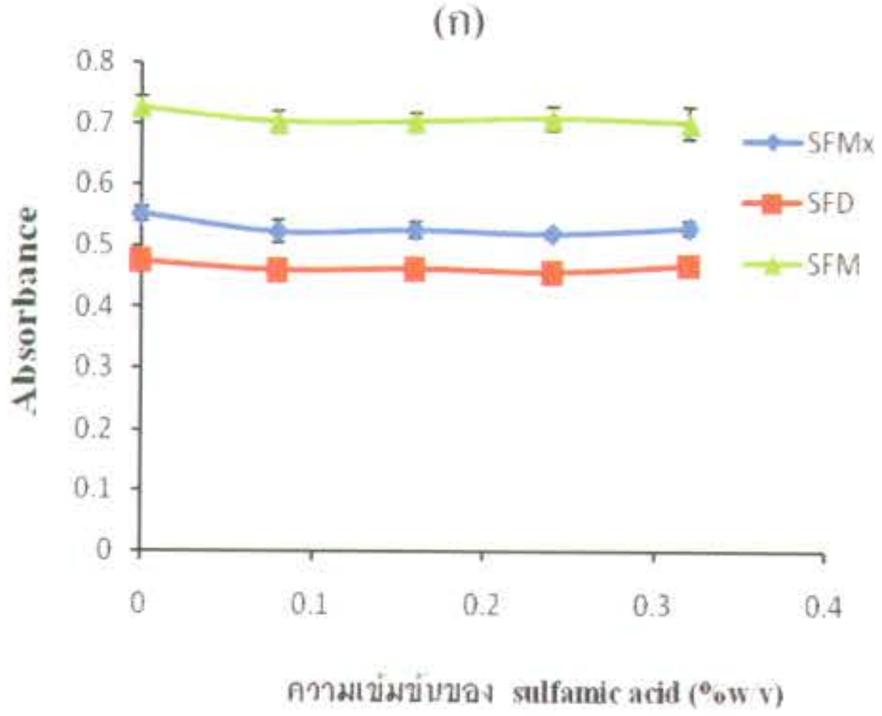
จากผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณยากลุ่มซัลโฟนาไมด์โดยเทคนิคสเปคโตรโฟโตเมตรีดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งได้ทำการศึกษาทั้งหมด 5 พารามิเตอร์ ได้แก่ ผลของความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก ความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ ความเข้มข้นของกรดซัลฟามิค ความเข้มข้นของ 8 - ไฮดรอกซีควิโนลีน และผลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าในการวิเคราะห์หาปริมาณยากลุ่มซัลโฟนาไมด์ไม่จำเป็นต้องมีการเติมกรดซัลฟูริกเพิ่มเติม



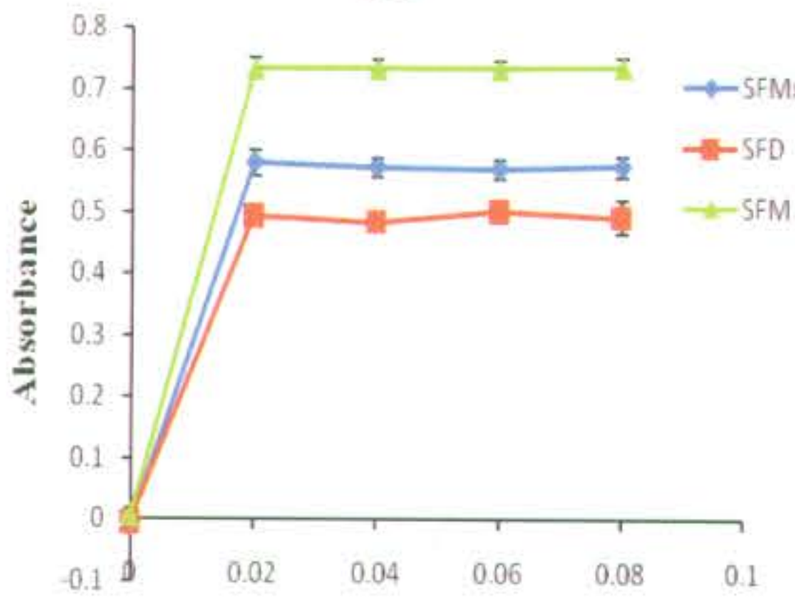
(ก)



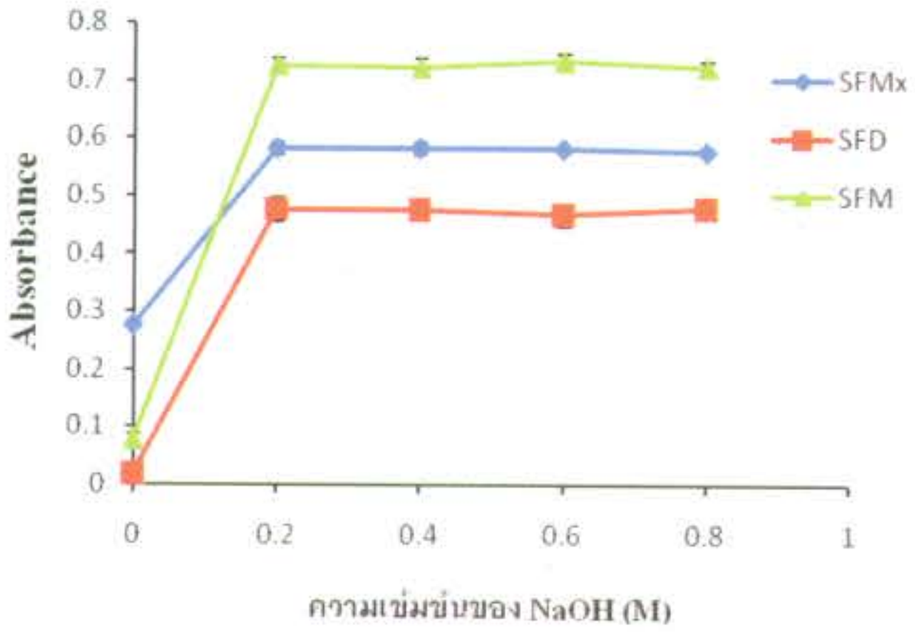
(ข)



(ค)



(ง)



(จ)

รูปที่ 4 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ (SFMx, SFD และ SFM ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร) โดยเทคนิคสเปคโตรโฟโตเมตรี (ก) กรดซัลฟูริกในช่วงความเข้มข้น 0 - 0.1 โมลาร์ (ข) โซเดียมไนไตรท์ในช่วงความเข้มข้น 0 - 0.05 %w/v (ค) กรดซัลฟามิคในช่วงความเข้มข้น 0 - 0.8 %w/v (ง) 8 - ไฮดรอกซีควิโนลีนในช่วงความเข้มข้น 0 - 0.020 %w/v (จ) โซเดียมไฮดรอกไซด์ในช่วงความเข้มข้น 0 - 0.2 M (n = 3)

เนื่องมาจากในการเตรียมตัวอย่างยาซัลโฟนาไมด์ได้ใช้กรดซัลฟูริกในการละลายตัวอย่างยาแล้ว ซึ่งมีปริมาณมากพอในการทำปฏิกิริยาในสภาวะที่เป็นกรด จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไนไตรท์พบว่าที่ความเข้มข้น 0.02 % w/v นั้นให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดและมีแนวโน้มคงที่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นจึงเลือกที่ความเข้มข้น 0.02 %w/v เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการศึกษาขั้นต่อไป นอกจากนี้ในการวิเคราะห์หาปริมาณยากลุ่มซัลโฟนาไมด์ไม่จำเป็นต้องเติมกรดซัลฟามิคในการกำจัดโซเดียมไนไตรท์ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยา เนื่องจากใช้โซเดียมไนไตรท์ในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น สำหรับผลของความเข้มข้นของ 8 - ไฮดรอกซีควิโนลีน พบว่าที่ความเข้มข้น 0.02 % w/v ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากสุด แต่เมื่อความเข้มข้นของ 8 - ไฮดรอกซีควิโนลีนเพิ่มมากขึ้นจะให้ค่าการดูดกลืนแสงคงที่ ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นนี้ในการศึกษาขั้นต่อไป ส่วนผลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์พบว่าที่ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์เป็นสภาวะที่เหมาะสมแต่เมื่อความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์เพิ่มมากขึ้นจะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงคงที่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

จากสภาวะเหมาะสมที่ได้ในการวิเคราะห์หาปริมาณยากลุ่มซัลโฟนาไมด์โดยเทคนิคสเปคโตร-โฟโตเมตรี ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ (analytical performance) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ (3 S_{blk} / slope) ของ SFMx, SFD และ SFM มีค่าเท่ากับ 0.0283 0.0292 และ 0.0298 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ค่าขีดจำกัดในการวิเคราะห์หาปริมาณ (10 SD_{blk} / slope) ของ SFMx SFD และ SFM มีค่าเท่ากับ 0.0944 0.0973 และ 0.0992 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ความเที่ยงในการวิเคราะห์ (%RSD) โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้น 1 3 5 7 และ 9 มิลลิกรัม/ลิตร จากทดลองวัดค่าการดูดกลืนแสงซ้ำ 3 ครั้ง มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.41 - 5.17 และใช้เวลาในการวิเคราะห์ต่อหนึ่งตัวอย่างเป็นเวลา 25 นาที

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ (analytical performance) ในการหาปริมาณสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์โดยเทคนิคสเปคโตรโฟโตเมตรี

ตัวแปรในการวิเคราะห์	ชนิดของ Sulfonamides		
	SFMx	**SFD**	**SFM**
สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน (y = ax + b)	y = 0.1059X + 0.0563	y = 0.1029X + 0.0833	y = 0.1008X + 0.0435
R^2	0.9990	0.9945	0.9976
%RSD	0.77 - 5.17	0.41 - 1.58	1.03 - 1.96
LOD (mg L^{-1})	0.0283	0.0292	0.0298
LOQ (mg L^{-1})	0.0944	0.0973	0.0992
λ_{max}	505.0	500.8	501.7
ε_{max}	2.98×10^4	2.87×10^4	2.97×10^4
slope	0.1059	0.1029	0.1008

การศึกษาความแม่นของวิธีในการวิเคราะห์หาปริมาณซัลโฟไมด์แต่ละชนิดโดยใช้เทคนิคที่พัฒนาขึ้น ซึ่งแสดงในรูปค่าร้อยละการกลับคืน (% recovery) สามารถแสดงได้ดังตารางที่ 2 จากผลการทดลองพบว่าค่าร้อยละการกลับคืนของสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ในตัวอย่างยาทางเภสัชกรรมจำนวน 9 ชนิด โดยตัวอย่างยาที่เป็นยาเม็ด คือ ตัวอย่างที่ 1 (SFMx), 2 (SFMx) 3 (SFMx) 4 (SFD) 5 (SFD) และ 9 (SFMx) สำหรับตัวอย่างยาที่เป็นยาน้ำคือ 6 (SFMx) 7 (SFMx) และ 8 (SFM) มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 92.2 - 123.4 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ และความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์ที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างยาชนิดต่างๆ โดยใช้เทคนิคที่พัฒนามีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ระบุไว้ในฉลากผลิตภัณฑ์ยาและจากการวิเคราะห์ทางสถิติ (Paired t-test) โดยเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จากเทคนิคสเปคโตรโฟโตเมตรีที่พัฒนาขึ้นกับเทคนิคไนไตรท์ไทเทรชันซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณซัลโฟนาไมด์ในตัวอย่างยาชนิดต่างๆ พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 (P=0.05) โดยค่า t_{stat} มีค่าเท่ากับ 2.21 (t_{crit} = 2.31)

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณยากลุ่มซัลโฟนาไมด์และร้อยละการกลับคืน (% recovery) โดยเทคนิคเปคโตรโฟโตเมตรีเปรียบเทียบกับวิธีไนไตรท์ไทเทรชัน

ตัวอย่างที่	ชนิดของซัลโฟนาไมด์	ความเข้มข้นที่พบ[a] ± SD (n=3)		Label claim[a]	% Recovery	Remark
		วิธีทำปฏิกิริยาร่วมกับ 8 -ไฮดรอกซีควิโนลีน	วิธีไนไตรท์ไทเทรชัน			
1	SFMx	920.82 ± 0.01	741.30 ±13.70	800	115.10 ± 0.01	Tablets
2	SFMx	917.45 ± 0.03	751.41± 6.64	800	114.68± 0.00	Tablets
3	SFMx	819.70 ± 0.01	374.44± 8.55	800	102.46± 0.01	Tablets
4	SFD	553.01 ± 0.01	470.00± 6.98	500	110.60± 0.01	Tablets
5	SFD	579.76 ± 0.01	460.00± 13.32	500	115.95± 0.01	Tablets
6	SFMx	213.11 ± 0.02	147.50± 5.33	200	106.61± 0.02	Solution
7	SFMx	246.91 ± 0.02	170.78± 12.79	200	123.45± 0.02	Solution
8	SFM	11,530.30 ± 0.07	10,411.00± 1.72	12,500	92.24± 0.07	Solution
9	SFMx	418.25 ± 0.05	379.50± 11.27	400	104.55± 0.05	Tablets

หมายเหตุ [a]ตัวอย่างยาชนิดเม็ด 1 2 3 4 5 และ 9 หน่วยเป็น มิลลิกรัม/เม็ด ตัวอย่างยาชนิดน้ำ 6 หน่วยเป็น มิลลิกรัม/ 5 มิลลิลิตร ตัวอย่างยาชนิดน้ำ 7 หน่วยเป็น มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตัวอย่างยาชนิดน้ำ 8 หน่วยเป็น มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร

สรุปและวิจารณ์

จากเทคนิคสเปคโตรโฟโตเมตรีที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์หาสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ในตัวอย่างยาทางเภสัชกรรม ซึ่งอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาของสารอนุพันธ์กลุ่มซัลโฟนาไมด์กับ 8-ไฮดรอกซีควิโนลีน โดยทำปฏิกิริยาร่วมกับซัลฟาเมทอกซาโซล (SFMx) ซัลฟาไดอะซีน (SFD) และซัลฟาเมทาซีน (SFM) ในสภาวะที่เป็นเบสหลังจากทำให้เกิดปฏิกิริยาไดอะโซ-ไทซ์เซชัน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบสีส้มแดงซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร พบว่าค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ของ SFMx SFD และ SFM มีค่าเท่ากับ 0.0283 0.0292 และ 0.0298 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ค่าขีดจำกัดในการวิเคราะห์หาปริมาณของ SFMx SFD และ SFM คือ 0.0944 0.0973 และ 0.0992 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ความเที่ยงในการวิเคราะห์อยู่ในช่วงร้อยละ 0.41 - 5.17 ความแม่นในการวิเคราะห์แสดงในรูปร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วงร้อยละ 92.24 - 123.45 วิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้ใช้รีเอเจนต์ในการทำปฏิกิริยาน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา (Nagaraja et al., 2007) และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์ที่มีในตัวอย่างยาทางเภสัชกรรมชนิดต่างๆ เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพของยาที่มีจำหน่ายภายในประเทศ โดยมีความแม่นและความเที่ยงดีกว่าวิธีไนไตรท์ไทเทรชัน ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ยากลุ่มซัลโฟนาไมด์ นอกจากนี้ยังสามารถนำเทคนิคที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้เพื่อหาปริมาณยากลุ่มซัลโฟนาไมด์ที่ตกค้างอยู่ในตัวอย่างชนิดอื่นๆ เช่น น้ำผึ้ง เนื้อสัตว์ ปลา ไข่ เป็นต้น ซึ่งเป็นงานวิจัยต่อยอดในอนาคต โดยเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้มีข้อดี คือ เป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็วและมีขั้นตอนในการวิเคราะห์ไม่ซับซ้อน อีกทั้งยังมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อสารกลุ่มซัลโฟนาไมด์และไม่จำเป็นต้องใช้อุณหภูมิสูงมากในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาร่วมก่อนการวิเคราะห์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.ยุทธพงษ์ อุดแน่น ที่ให้คำปรึกษาตลอดการวิจัย ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรที่ให้ความอนุเคราะห์ทางด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ในการวิจัย สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (โครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์) ที่ให้เงินทุนสนับสนุนในการศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา

เอกสารอ้างอิง

กมลชัย ตรงวานิชนาม. (2544). การใช้ยาต้านจุลชีพในสัตว์. (พิมพ์ครั้งที่ 3). ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 33 - 54.

โอภา วัชระคุปต์. (2551). เคมีของยา ฉบับ 1. นนทบุรี : สำนักพิมพ์ พี.เอส.พริ้นท์. 218-232.

Antonio Hernandez - Cardoso, B. S., Scientist, Latin American Specialist. (2553). Nitrite titration. สืบค้นเมื่อวันที่ 7 มีนาคม 2553 จาก http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c451.html

Mohamed, A. M. (1989). Spectrophotometric Determination of some benzene sulfonamides with 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane. Assoc. Off. Anal. Chem. 72(6): 885 - 889.

Nagaraja, P., Naik, S. D., Shrestha, A. K. and Shivakumar, A. (2007). A sensitive spectrophotometric method for the determination of sulfonamides in pharmaceutical preparations. Acta. Pharm. 57: 333 - 342.

Nagaraja, P., Sunitha, K., Vasantha, R. A. and Yathirajan, H. S. (2002). Iminodibenzyl as a novel coupling agent for the

spectrophotometric determination of sulfonamide derivatives. Eur. J. Pharm. Biopharm. 53(2): 187 - 192.

Nagaraja, P., Yathirajan, H. S. Raju, C. R. Vasantha, R. A. Nagendra, P. and Hemantha Kumar, M. S. (2003). 3-Aminophenol as a novel coupling agent for the spectrophotometric determination of sulfonamide derivatives. II Farmaco. 58(12): 1295 - 1300.

Preuss, H. G., Razavi, M. H., Slemmer, D. and Zein, M. (1988). Colorimetry of p-aminohippurate in the presence of sulfomethoxazole. Clin. Chem. 34: 422 - 423.

ว.วิทย. มข. 39(1) 130-136 (2554) KKU Sci. J.39(1) 130-136 (2011)

การคำนวณปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้ในบรรยากาศของประเทศไทย

Calculation of Precipitable Water Vapor in the Atmosphere of Thailand

สายันต์ โพธิ์เกตุ [1]

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคำนวณหาปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้ในบรรยากาศของประเทศไทย ปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้คำนวณได้จากข้อมูลความชื้นสัมพัทธ์ และอุณหภูมิอากาศที่ได้จากการตรวจอากาศชั้นบนซึ่งมีการตรวจวัดที่สถานีอุตุนิยมวิทยาจังหวัดเชียงใหม่ สถานีอุตุนิยมวิทยาจังหวัดอุบลราชธานี สถานีอุตุนิยมวิทยาจังหวัดสงขลา และกรมอุตุนิยมวิทยา กรุงเทพมหานคร โดยใช้ข้อมูลที่ตรวจวัดต่อเนื่องกันในช่วงปี พ.ศ. 2535 ถึง พ.ศ. 2550 เมื่อนำปริมาณไอน้ำที่ได้จากข้อมูลตรวจอากาศชั้นบนทั้ง 4 สถานีดังกล่าวมาหาความสัมพันธ์กับความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิของอากาศซึ่งเป็นข้อมูลภาคพื้นดินที่สถานีเดียวกันในรูปแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ผลที่ได้พบว่า เมื่อศึกษาการแปรค่าตามเวลาในรอบปีพบว่าที่สถานีเชียงใหม่ อุบลราชธานี และกรุงเทพมหานครมีลักษณะการแปรค่าคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ จะมีค่ามากในช่วงฤดูฝน และจะมีค่าน้อยในช่วงฤดูแล้ง สำหรับสถานีสงขลามีค่าเกือบคงที่ตลอดทั้งปี ค่าปริมาณไอน้ำที่ได้จากข้อมูลการตรวจอากาศชั้นบนจะมีค่าใกล้เคียงกับค่าปริมาณไอน้ำที่ได้จากแบบจำลองโดยมีความแตกต่างในรูปของ Root Mean Square Error (RMSE) เท่ากับ 0.354 เซนติเมตร จากนั้นผู้วิจัยนำแบบจำลองที่ได้ไปคำนวณค่าปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้จากข้อมูลภาคพื้นดินที่สถานีอุตุนิยมวิทยา 85 แห่งทั่วประเทศ ผลที่ได้พบว่าปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้มีค่าเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 2.431 เซนติเมตร - 6.146 เซนติเมตร โดยมีค่าน้อยในช่วงฤดูแล้ง (พฤศจิกายน - มีนาคม) และมีค่ามากในช่วงฤดูฝน (เมษายน - ตุลาคม) โดยมีค่าเฉลี่ยต่อปีเท่ากับ 4.571±0.107 เซนติเมตร

[1] สาขาวิชาฟิสิกส์ประยุกต์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40000

E-mail: syphokate@hotmail.com

Abstract

This research aims to calculate the amount of precipitable water vapor in the atmosphere of Thailand. From upper air checking data, relative humidity and temperature. The data were collected continuously from four meteorological monitoring stations, Chiang Mai, Ubon Ratchathani, Bangkok and Songkhla station during 1992-2007. The data from this investigation were used to predict a mathematical model to make correlations to the precipitable water with surface climatological data, relative humidity and temperature. Results show that precipitable water vapor at Chiang Mai, Ubon Ratchathani and Bangkok station were higher in the rainy season and lower in the dry season. The precipitable water vapor in Songkhla station was quite constant throughout the year. The precipitable water vapor obtained from upper air corrended to value of the model. Difference in the Root Mean Square Error (RMSE) was 0.354 cm. After calculation the amount of precipitable water vapor from surface data at 85 meteorological stations nationwide, it varied from 2.431 cm to 6.146 cm. The result showed that the precipitable water vapor were relative low in the dry (November to March) and relative high in the rainy season (April to October) with an average was 4.571±0.107 cm per year.

บทนำ

โดยทั่วไปไอน้ำเป็นองค์ประกอบของบรรยากาศที่แสดงให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของลมฟ้าอากาศ การก่อตัวของเมฆ และก่อให้เกิดฝน หมอก หิมะ ลูกเห็บ ฯ นอกจากนี้ ปริมาณไอน้ำในบรรยากาศมีอิทธิพลที่สำคัญต่อการลดลงของรังสีดวงอาทิตย์ที่เคลื่อนที่ผ่านบรรยากาศมายังพื้นผิวโลก (Iqbal, 1983; Christian, 1994) กล่าวคือ ไอน้ำในบรรยากาศจะดูดกลืนรังสีดวงอาทิตย์ในช่วงความยาวคลื่นกว้าง (0.25-4.0 ไมโครเมตร)ได้ถึงร้อยละ 15 (Nunez, 1993) การดูดกลืนจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณไอน้ำในบรรยากาศ (Gautier et al., 1980; Iqbal, 1983; Nunez, 1993) โดยปกติเราจะแสดงปริมาณไอน้ำในบรรยากาศในรูปของปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้ (Precipitable Water Vapor) ซึ่งจะบอกได้ในรูปของความสูงของน้ำในคอลัมน์ของบรรยากาศ โดยสมมติว่าไอน้ำที่แทรกตัวอยู่ในคอลัมน์ของบรรยากาศนั้นกลั่นตัวกลายเป็นน้ำ (Iqbal, 1983)

ปริมาณไอน้ำในอากาศโดยทั่วไปมักหาได้ยาก และในประเทศไทยยังไม่มีการตรวจวัดปริมาณไอน้ำในอากาศ ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจะคำนวณปริมาณไอน้ำจากความสัมพันธ์ระหว่างความชื้นสัมพัทธ์ และอุณหภูมิของอากาศที่ได้จากการตรวจอากาศชั้นบน (Upper Air Data) สำหรับประเทศไทยมีหน่วยงานที่ตรวจอากาศชั้นบนคือกรมอุตุนิยมวิทยาซึ่งทำการตรวจอากาศโดยปล่อยบอลลูนตรวจอากาศ (Weather Balloon) ทุกวัน เนื่องจากอุปกรณ์ที่ใช้ในภารกิจนี้มีราคาค่อนข้างแพง ในการตรวจวัดแต่ละครั้งต้องเสียค่าใช้จ่ายเป็นจำนวนมาก ดังนั้นการตรวจอากาศชั้นบนจึงมีการตรวจเฉพาะสถานีอุตุนิยมวิทยา เพียง 4 สถานีเท่านั้น ได้แก่ สถานีอุตุนิยมวิทยาจังหวัดเชียงใหม่ สถานีอุตุนิยมวิทยาจังหวัดอุบลราชธานี สถานีอุตุนิยมวิทยาจังหวัดสงขลา และกรมอุตุนิยม-วิทยากรุงเทพมหานคร งานวิจัยนี้ใช้ข้อมูลที่มีการตรวจวัดติดต่อกันในช่วงปี พ.ศ. 2535 ถึง พ.ศ. 2550 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับคำนวณปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้ในบรรยากาศของประเทศไทย ผลการวิจัยที่ได้จะสามารถลดค่าใช้จ่ายและประมาณค่าปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้สำหรับสถานีที่ไม่มีการตรวจอากาศชั้นบนซึ่งในการศึกษา

เกี่ยวกับความเข้มรังสีดวงอาทิตย์ที่เข้ามายังพื้นโลก จำเป็นต้องทราบค่าปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้ รวมทั้งคุณสมบัติในการดูดกลืนรังสีดวงอาทิตย์ของปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้ (Brine and Iqbal, 1983; Nunez, 1993) เพื่อใช้ในการออกแบบเครื่องมือทางด้านพลังงานแสงอาทิตย์ เช่น การหาการกระจายของความเข้มรังสีดวงอาทิตย์ที่พื้นผิวโลก (solar radiation mapping) จากภาพถ่ายดาวเทียม งานออกแบบอุปกรณ์ทางด้านพลังงานแสงอาทิตย์ การอนุรักษ์พลังงานในอาคาร หรือใช้ในงานอุตุนิยมวิทยา เช่น การสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายสภาพภูมิอากาศ เป็นต้น

วิธีการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยคำนวณปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้จากความสัมพันธ์ระหว่างความชื้นสัมพัทธ์ และอุณหภูมิของอากาศที่ได้จากการตรวจอากาศชั้นบน ซึ่งเป็นการคำนวณตามทฤษฎี โดยมีการตรวจวัด 4 สถานี ได้แก่ สถานีอุตุนิยมวิทยาจังหวัดเชียงใหม่ สถานีอุตุนิยมวิทยาจังหวัดอุบลราชธานี สถานีอุตุนิยมวิทยาจังหวัดสงขลา และสถานีอุตุนิยมวิทยากรุงเทพมหานคร ซึ่งใช้ข้อมูลที่ทำการวัดติดต่อกันในช่วงปี พ.ศ. 2535 ถึง พ.ศ. 2550 โดยใช้สมการ (Garrison, 1992)

$$w = \frac{1}{g}\int_{p_o}^{0}\left(\frac{M_p}{\rho}\right)dp \qquad (1)$$

เมื่อ w เป็นปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้ (Precipitable Water Vapor) ในหน่วย เซนติเมตร

M_p เป็น Mixing Ratio ที่ระดับความดัน p ใดๆ

g เป็นความเร่งเนื่องจากแรงโน้มถ่วงของโลก (986.665 เซนติเมตร/วินาที^{2})

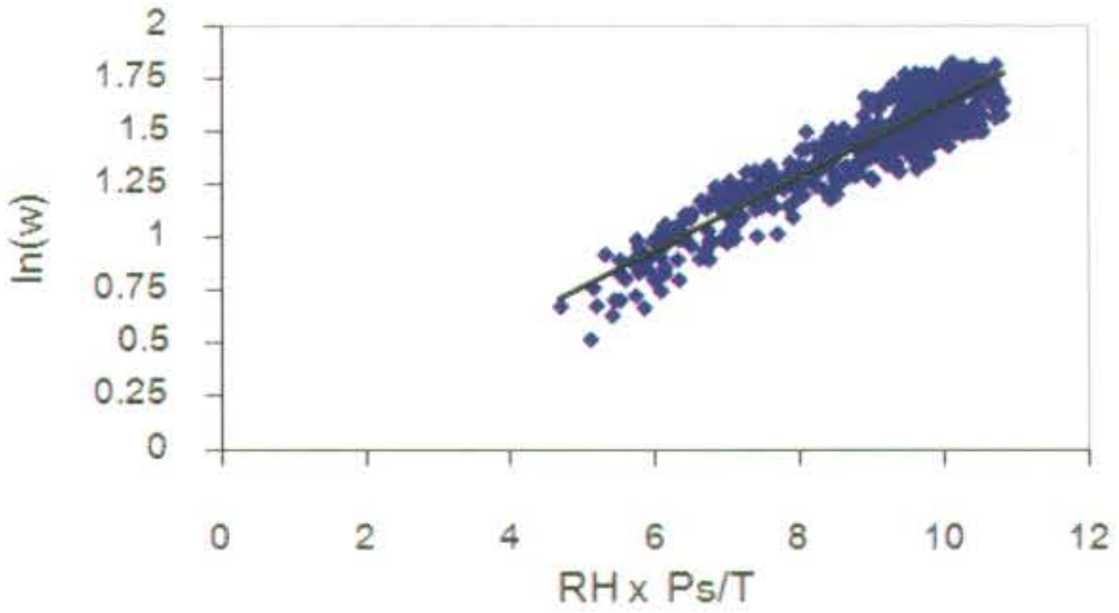
p_o เป็นความดันบรรยากาศที่พื้นผิวโลก (มิลลิบาร์)

ρ เป็นความหนาแน่นของน้ำ (กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร)

นำค่าปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้ที่คำนวณจากข้อมูลตรวจอากาศชั้นบนมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศซึ่งเป็นข้อมูลผิวพื้น (surface data) ที่สถานีเดียวกัน ผลที่ได้นำมาสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับนำไปใช้คำนวณปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้ตามสถานที่ต่าง ๆ ผู้วิจัยได้ทดสอบแบบจำลองโดยใช้ข้อมูลของปี พ.ศ. 2551 ซึ่งเป็นข้อมูลอิสระไม่ได้ใช้ในการสร้างแบบจำลองเพื่อยืนยันความถูกต้องของแบบจำลองที่สร้างขึ้น และนำแบบจำลองที่ได้ไปคำนวณปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้จากข้อมูลผิวพื้นที่ได้จากการตรวจวัดที่สถานีอุตุนิยมวิทยา 85 แห่งทั่วประเทศ จากนั้นหาค่าปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้บริเวณพื้นที่ระหว่างสถานีวัดด้วยวิธีการคาดคะเนแนวโน้ม (interpolation) เพื่อให้ได้ครอบคลุมพื้นที่ทั่วประเทศนำมาจัดแสดงในรูปแผนที่ปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้

ผลการวิจัย

ผู้วิจัยสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อคำนวณค่าปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้ของสถานีที่ไม่มีข้อมูลตรวจอากาศชั้นบน โดยการนำค่าปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้ (w) ที่ได้จากข้อมูลตรวจอากาศชั้นบนมาหาความสัมพันธ์กับอุณหภูมิ (T) ความชื้นสัมพัทธ์ (RH) ของอากาศที่สถานีเดียวกัน ผลที่ได้แสดงไว้ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้ (w) กับอุณหภูมิของอากาศ (T) ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ (RH) และความดันไออิ่มตัวของไอน้ำในอากาศ (p_s)

จากรูปที่ 1 เราสามารถสร้างสมการเอมพิริคัล (Empirical) แทนความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้กับอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ ซึ่งเป็นข้อมูลผิวพื้นได้ ดังสมการที่ (2)

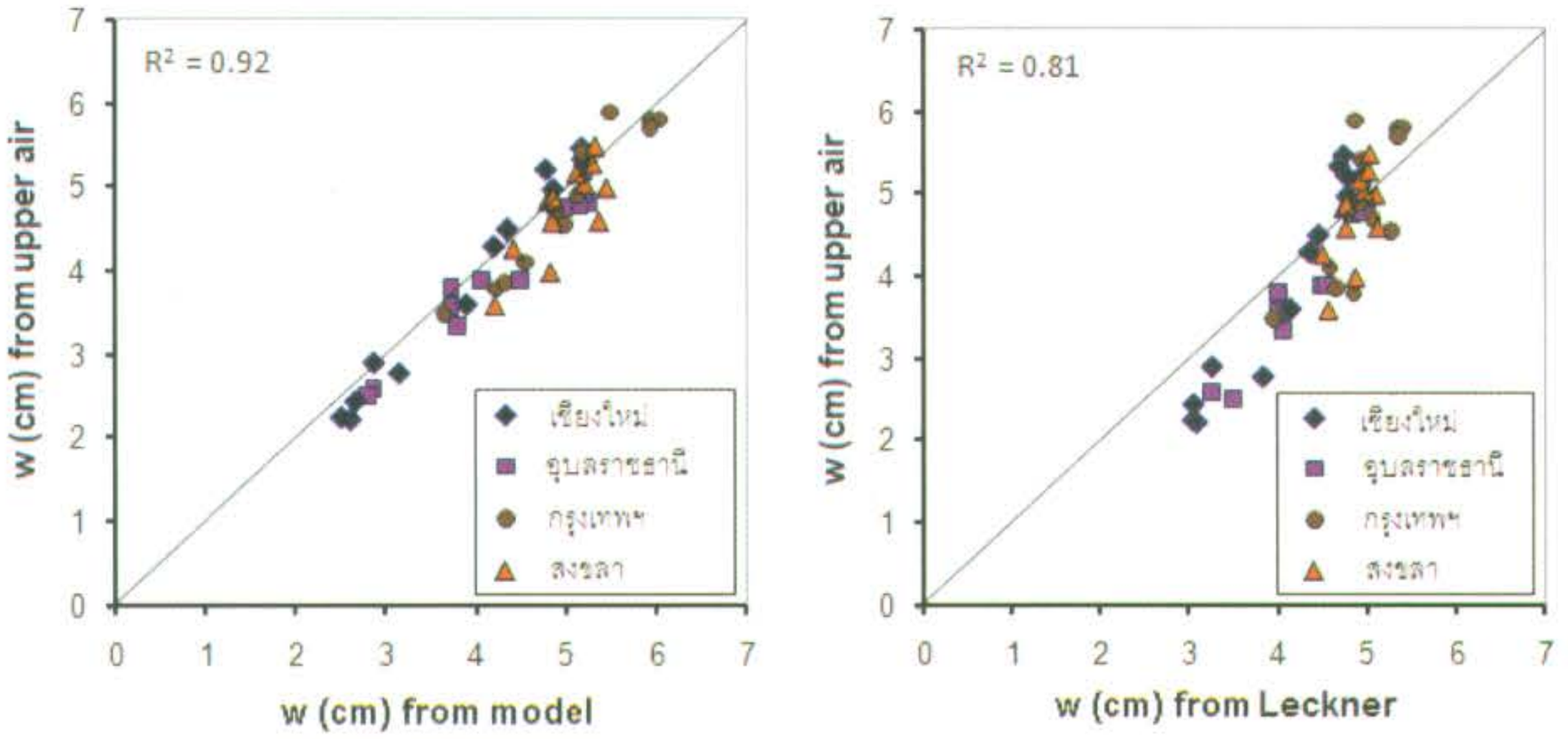
$$w = 0.90176 \exp\left[0.1738 \times \frac{RH \times p_s}{T}\right] \quad (2)$$

เมื่อ w เป็นปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้ (เซนติเมตร)
RH เป็นความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ (decimal)
T เป็นอุณหภูมิของอากาศ (เคลวิน)
p_s เป็นความดันไออิ่มตัวของไอน้ำในอากาศ (มิลลิบาร์)

ค่าความดันไออิ่มตัวของไอน้ำในอากาศหาได้จากสมการ (Iqbal, 1983)

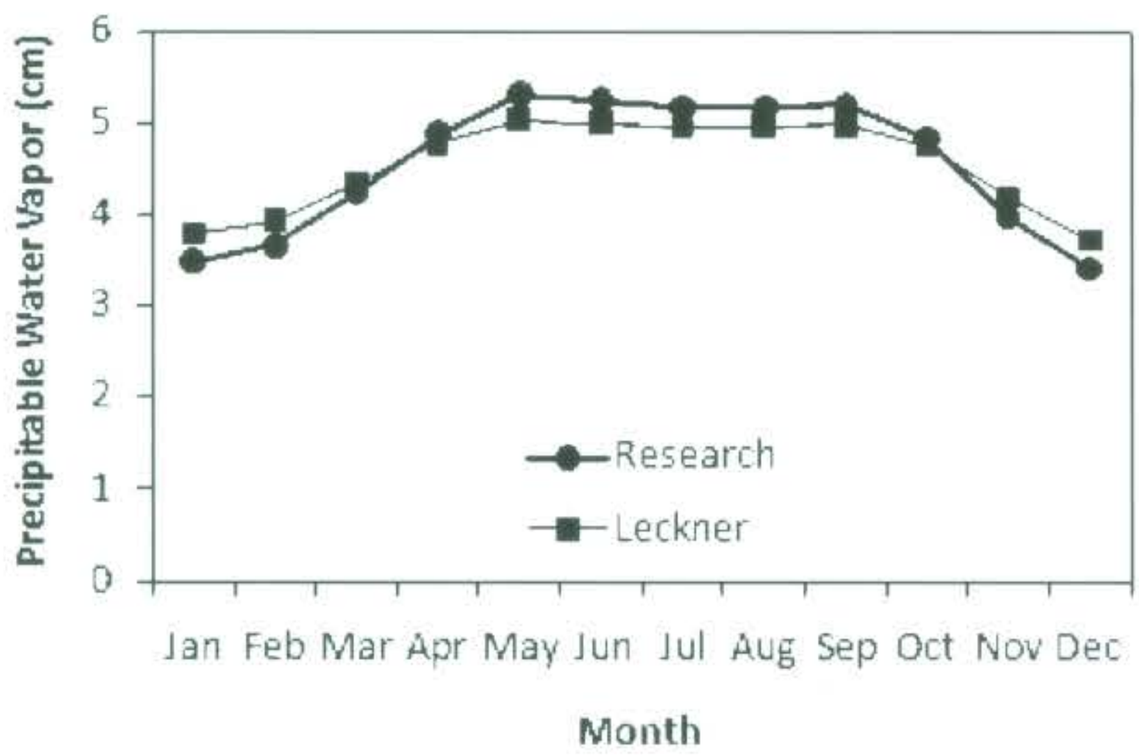
$$p_s = \exp\left(26.23 - \frac{5416}{T}\right) \quad (3)$$

ในการตรวจสอบความถูกต้องของสมการ (2) นี้ผู้วิจัยได้เปรียบเทียบค่าปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้จากแบบจำลองสมการที่ (2) และค่าปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้จากข้อมูลตรวจอากาศชั้นบนสมการที่ (1) โดยใช้ข้อมูลจาก 4 สถานี ดังกล่าวข้างต้น ของปี พ.ศ. 2551 ซึ่งเป็นข้อมูลอิสระและไม่ได้ใช้ในการสร้างแบบจำลอง ผลที่ได้แสดงไว้ดังรูปที่ 2



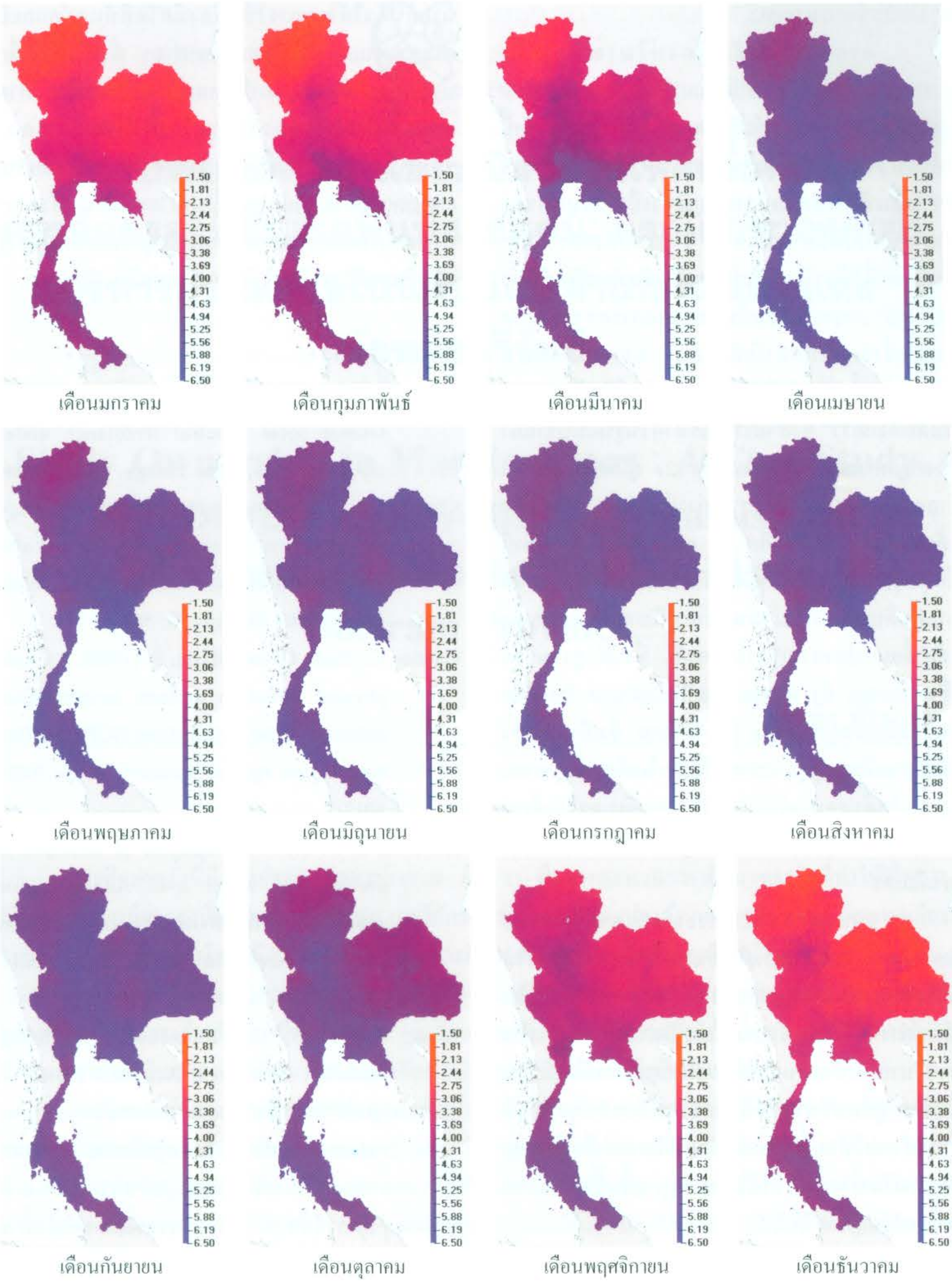
รูปที่ 2 ปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้จากข้อมูลตรวจอากาศชั้นบนตามสมการ (1) เปรียบเทียบกับปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้ ซึ่งคำนวณจากแบบจำลองตามสมการที่ (2) และแบบจำลองของ Leckner (1978) โดยใช้ข้อมูลผิวพื้นของปี พ.ศ. 2551 ที่สถานีเดียวกัน

จากรูปที่ 2 (ก) เป็นการเปรียบเทียบปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้ที่คำนวณจากข้อมูลตรวจอากาศชั้นบนกับแบบจำลองที่ผู้วิจัยสร้างขึ้นโดยใช้ข้อมูลผิวพื้นที่สถานีเดียวกัน พบว่าค่าปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้จากการตรวจอากาศชั้นบนส่วนใหญ่มีค่าใกล้เคียงกับค่าปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้ที่ได้จากแบบจำลอง โดยมีความแตกต่างในรูปของ Root Mean Square Error (RMSE) เท่ากับ 0.354 เซนติเมตร และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) มีค่าสูงกว่า 0.90 ซึ่งถือได้ว่าเป็นความสัมพันธ์ที่ค่อนข้างสูง ผลการคำนวณดังกล่าวมีความละเอียดถูกต้องในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ เมื่อเปรียบเทียบกับแบบจำลองของ Leckner (1978) ในรูปที่ 2 (ข) โดยใช้ข้อมูลเดียวกันความสัมพันธ์จากแบบจำลองที่ผู้วิจัยสร้างขึ้นจะดีกว่าอย่างเห็นได้ชัดทั้งจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ และความสัมพันธ์ของข้อมูล ผู้วิจัยได้นำข้อมูลความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิของอากาศซึ่งเป็นข้อมูลผิวพื้นที่ได้จากการตรวจวัดที่สถานีอุตุนิยมวิทยา 85 แห่งทั่วประเทศ จากข้อมูลเฉลี่ยในช่วงปี พ.ศ. 2535 ถึง พ.ศ. 2550 มาคำนวณหาค่าปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ พบว่าปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้มีการเปลี่ยนแปลงตามเวลาในรอบปีโดยจะมีค่ามากในช่วงฤดูฝน (เมษายน-ตุลาคม) และจะมีค่าลดลงในช่วงฤดูแล้ง (พฤศจิกายน-มีนาคม) โดยมีค่าเฉลี่ยต่อปีเท่ากับ 4.5710.107 เซนติเมตร มีความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Standard Error of the Mean) เท่ากับ 0.0547 เมื่อเปรียบเทียบงานวิจัยนี้กับงานวิจัยของ Leckner (1978) โดยใช้ข้อมูลในช่วงเวลาและสถานีเดียวกัน ผลที่ได้จากงานวิจัยมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงตามเวลาในรอบปีสอดคล้องกัน ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 การแปรค่าของปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้ ที่คำนวณจากงานวิจัย เปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากสมการของ Leckner (1978) โดยใช้ข้อมูลผิวพื้นเฉลี่ยรายเดือนในช่วงปี พ.ศ. 2535 ถึง พ.ศ. 2550 ของ 85 สถานีทั่วประเทศ

ค่าปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้บริเวณพื้นที่ระหว่างสถานีวัดหาได้โดยอาศัยการคาดคะเนแนวโน้ม (interpolation)เพื่อให้ได้ครอบคลุมพื้นที่ทั่วประเทศแล้วนำมาจัดแสดงในรูปแผนที่แสดงการกระจายตามพื้นที่ พบว่าปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง ในช่วงเดือนพฤศจิกายน ถึงมีนาคม มีค่าน้อยเนื่องจากเป็นช่วงฤดูแล้ง สำหรับเดือนเมษายน ถึง ตุลาคม ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝนปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้จะมีค่ามาก โดยจะมีลักษณะการกระจายตัวตามพื้นที่คล้ายคลึงกัน ส่วนภาคใต้ปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้มีค่าใกล้เคียงกันตลอดทั้งปี ดังรูปที่ 4



เดือนมกราคม เดือนกุมภาพันธ์ เดือนมีนาคม เดือนเมษายน

เดือนพฤษภาคม เดือนมิถุนายน เดือนกรกฎาคม เดือนสิงหาคม

เดือนกันยายน เดือนตุลาคม เดือนพฤศจิกายน เดือนธันวาคม

รูปที่ 4 แผนที่การกระจายตามพื้นที่ของปริมาณไอน้ำกลั้นตัวได้ในบรรยากาศของประเทศไทยในรอบปีจากข้อมูลผิวพื้น

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากความสำคัญของปริมาณไอน้ำในบรรยากาศที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของลมฟ้าอากาศและมีอิทธิพลต่อความเข้มรังสีดวงอาทิตย์ ในงานวิจัยนี้ได้คำนวณค่าปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้จากข้อมูลความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิซึ่งเป็นข้อมูลตรวจอากาศชั้นบนที่มีการตรวจวัด 4 สถานีดังกล่าว จากนั้นนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับข้อมูลอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์จากการตรวจวัดภาคพื้นดินซึ่งวัดได้ที่สถานีเดียวกัน ผลการวิเคราะห์ปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้มีความสัมพันธ์กับข้อมูลภาคพื้นดินดังกล่าว ซึ่งสามารถเขียนได้ในรูปแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ดังสมการที่ (2) ผู้วิจัยได้นำแบบจำลองดังกล่าวไปใช้คำนวณค่าปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้ของสถานีวัดอื่นๆ อีก 85 สถานีทั่วประเทศ ซึ่งมีข้อมูลอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์จากการตรวจวัดภาคพื้นดินผลการคำนวณพบว่าค่าปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้เปลี่ยนแปลงตามเวลาในรอบปี ซึ่งมีค่าสูงในช่วงเดือนเมษายน ถึง ตุลาคม ซึ่งเป็นฤดูฝนและมีค่าน้อยในช่วงเดือนพฤศจิกายน ถึง มีนาคม ซึ่งเป็นฤดูแล้ง โดยมีค่าเฉลี่ยสูงสุด 5.329 เซนติเมตรในเดือนพฤษภาคม และเฉลี่ยต่ำสุดเท่ากับ 3.435 เซนติเมตรในเดือนธันวาคม ค่าเฉลี่ยตลอดทั้งปีอยู่ในช่วง 4.5710.107 เซนติเมตร

จากการศึกษาการกระจายตัวตามพื้นที่และวิเคราะห์การแปรค่าของค่าปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้ในบรรยากาศตามละติจูดของสถานี พบว่าการแปรค่าในเดือนต่างๆ มีลักษณะแนวโน้มเป็นระบบ กล่าวคือ ค่าปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้ในเดือนเมษายนถึงตุลาคม ซึ่งเป็นฤดูฝนปริมาณไอน้ำมีค่าใกล้เคียงกันทุกสถานีทั่วประเทศ ส่วนในช่วงเดือนพฤศจิกายน ถึง มีนาคม ปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจากภาคเหนือลงไปสู่ภาคใต้

เนื่องจากการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้จากข้อมูลตรวจอากาศชั้นบนที่มีอยู่จำกัดและจากการคำนวณทางทฤษฎีซึ่งเป็นวิธีการศึกษาทางอ้อม ดังนั้นในอนาคตควรที่จะทำการศึกษาปริมาณไอน้ำกลั่นตัวได้โดยการใช้เครื่องมือวัดที่ทันสมัยและมีกระจายตามสถานีอุตุนิยมวิทยาต่างๆ ทั่วประเทศเพื่อนำข้อมูลมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงของลมฟ้าอากาศตลอดจนอิทธิพลของปริมาณไอน้ำที่มีต่อการลดลงของความเข้มรังสีดวงอาทิตย์ ซึ่งจะทำให้ผลที่ได้มีความละเอียดถูกต้องยิ่งขึ้นอันจะเป็นประโยชน์ต่องานด้านการทำนายสภาพอากาศและการศึกษาข้อมูลระยะไกลโดยใช้ดาวเทียมและงานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Brine, D. T. and Iqbal, M. (1983). Diffuse and Global solar spectral irradiance under cloudless skies. Solar Energy. 30: 447-456.

Christian, G. (1994). Analysis of Monthly Average Atmospheric Precipitable Water and Turbidity in Canada and Northem United States. Solar Energy. 53: 50-71.

Gautier, C., Diak, G. and Masse, S. (1980). Asimple physical model to estimate incident solar radiation at the surface from GOES satellite data. Journal Applied Meteorology. 36: 1005-1012.

Garrison, J. D. (1992). Estimation of atmospheric precipitable water over Auatralia for application to the division of solar radiation into its direct and diffuse components. Solar energy. 48: 89-96.

Iqbal, M. (1983). An Introduction to Solar Radiation. New York: Academic Press.

Leckner, B. (1978). The spectral distribution of solar radiation at the earth's surface elements of a model. Solar Energy. 20: 143-150.

Nunez, M. (1993). The development of a satellite-based insulation model for the Tropical Pacific Ocean. Journal of Climatology. 13: 607-627.

ว.วิทย. มข. 39(1) 137-148 (2554) KKU Sci. J.39(1) 137-148 (2011)

การประยุกต์เทคโนโลยีภูมิสารสนเทศเพื่อศึกษาการถือครองที่ดินเขตพื้นที่ชายแดน: กรณีศึกษาองค์การบริหารส่วนตำบลโนนดินแดง อำเภอโนนดินแดง จังหวัดบุรีรัมย์

An Application of Geoinformation Technology to Study Ownership in Margin Areas : A Case Study in Non Din Deang Sub-district Administrative Organization, Amphoe Non Din Deang, Buriram Province

ครรชิต พิระภาค [1]

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์สองประการ คือ 1) ศึกษากระบวนการพัฒนาของรัฐที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการถือครองที่ดินในพื้นที่ชายขอบ ภายใต้กระบวนการเปลี่ยนแปลงด้านเศรษฐกิจ สังคม และการเมือง 2) เพื่อประยุกต์ใช้เทคโนโลยีภูมิสารสนเทศเกี่ยวกับการถือครองที่ดินและการใช้ประโยชน์ในที่ดิน

การศึกษานี้ได้ใช้แนวความคิดสามประการคือ แนวคิดการขยายอำนาจ และการควบคุมสิทธิ โดยใช้กฎหมายของรัฐในการอ้างสิทธิเหนือทรัพยากร แนวคิดความซับซ้อนและความขัดแย้งเกี่ยวกับสิทธิในการเข้าถึงทรัพยากรภายใต้บริบทของการพัฒนา และแนวคิดการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีภูมิสารสนเทศ

การวิเคราะห์ข้อมูล การวิเคราะห์ข้อมูลการใช้ประโยชน์ที่ดินปี พ.ศ. 2547- 2552 ที่ได้จากการแปลภาพถ่ายทางอากาศ และข้อมูลภาพดาวเทียม Landsat 5 TM นำข้อมูลที่ได้มานำเสนอในรูปของแผนที่การใช้ประโยชน์ที่ดินและซ้อนทับข้อมูลแปลงที่ดิน สปก. 4-01 และการสำรวจตำแหน่งพื้นที่บุกรุกจากเครื่องกำหนดตำแหน่งพิกัดบนพื้นโลกรวมทั้งการวิเคราะห์เกี่ยวกับการบุกรุกที่ดินและความขัดแย้งเกี่ยวกับที่ดินในพื้นที่เพื่อหาทางออกในการบริหารจัดการที่ดินในอนาคต

[1] สาขาเทคโนโลยีสำรวจและภูมิสารสนเทศ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์ ต.ท่าอิฐ อ.เมือง จ.อุตรดิตถ์ 530000

E-mail: Kunchitpirapake@hotmail.com

ผลการศึกษามีสองประการ คือ ประการแรกการเปลี่ยนแปลงของระบอบกรรมสิทธิ์และเอกสารสิทธิ์ในพื้นที่องค์การบริหารส่วนตำบลโนนดินแดง อำเภอโนนดินแดง จังหวัดบุรีรัมย์ เป็นอีกพื้นที่หนึ่งที่เกิดขึ้นตามการเปลี่ยนแปลงของเศรษฐกิจระดับประเทศและระดับท้องถิ่น เนื่องจากพื้นที่อยู่ในเขตเชื่อมต่อกับพื้นที่ชายแดนติดต่อกับจังหวัดสระแก้ว การขยายตัวของชุมชนเมืองจึงเกิดขึ้นในพื้นที่ ไม่ว่าจะเป็นร้านค้า รีสอร์ท เป็นต้น การขยายตัวในลักษณะดังกล่าวส่งผลให้วิถีชีวิตของผู้คนในพื้นที่ที่ต้องปรับตัวเพื่อให้สามารถยังคงอยู่ได้ในสังคมเศรษฐกิจที่เปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา

การพัฒนาของรัฐเกี่ยวกับการถือครองที่ดินในพื้นที่องค์การบริหารส่วนตำบลโนนดินแดงไม่ต่างอะไรจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากนโยบายระดับประเทศที่มุ่งเน้นให้ประชาชนในพื้นที่มีการถือครองที่ดินที่มั่นคง โดยมีการออกหนังสืออนุญาตให้เข้าทำประโยชน์ในเขตปฏิรูปที่ดินและแจกที่ดินทำกินในรูปของ สปก. 4-01 ให้ชาวบ้านที่เป็นเกษตรกรและไม่มีที่ทำกิน ซึ่งแนวคิดนี้เป็นแนวคิดที่ดี แต่การปฏิบัติในทุกขั้นตอนยังไม่รอบคอบชัดเจน ทำให้ป่าไม้หรือที่สาธารณะประโยชน์ต่างๆที่เป็นของรัฐลดลง และที่สำคัญ สปก. 4-01 ไม่ได้มีการรังวัดอย่างชัดเจน เป็นเพียงการเปิดแผนที่แล้วใช้ปากกาขีดวัดเท่านั้น ทำให้เนื้อที่มีความคลาดเคลื่อนไป นำมาซึ่งปัญหาความขัดแย้งในการบริหารจัดการการถือครองที่ดินในพื้นที่ดังเช่นที่เกิดขึ้นในปัจจุบัน

ทิศทางการถือครองที่ดินในพื้นที่องค์การบริหารส่วนตำบลโนนดินแดงและเขตพื้นที่องค์การปกครองส่วนท้องถิ่นใกล้เคียงเขตอำเภอโนนดินแดงในอนาคตนั้น ปัจจุบันยังคงมีการออกสปก. 4-01 ให้กับชาวบ้านที่ร้องขอตามเงื่อนไขของสำนักงานปฏิรูปที่ดินเพื่อการเกษตรกรรมอยู่ หากแต่รัฐบาลในยุคสมัยของนายกรัฐมนตรี นายอภิสิทธิ์ เวชชาชีวะ ได้มีแนวคิดเรื่องโฉนดชุมชนเกิดขึ้นและพยายามผลักดันให้เป็นแนวทางที่สามารถทำให้รัฐบาลมีความคล่องตัวในการเข้าไปแก้ปัญหาที่ทำกินในหลายพื้นที่มากยิ่งขึ้น และพยายามแก้ปัญหาที่มีความยั่งยืนในอนาคต

ประการที่สอง การใช้ประโยชน์จากเทคโนโลยีภูมิสารสนเทศร่วมกับการถือครองที่ดินถือเป็นอีกหนึ่งการประยุกต์ใช้ที่หลากหลายหน่วยงานนำมาใช้ในการบริหารจัดการเกี่ยวกับข้อมูลเชิงพื้นที่ไม่ว่าจะเป็นกรมการปกครองส่วนท้องถิ่น กรมที่ดิน กรมอุทยานสัตว์ป่าและพันธุ์พืช เป็นต้น หน่วยงานดังกล่าวได้เล็งเห็นความสำคัญเพื่อนำมาใช้เป็นฐานข้อมูลในการบริหารจัดการ เช่น การจัดเก็บภาษีในรูปของระบบแผนที่ภาษีและทะเบียนทรัพย์สิน การสร้างฐานข้อมูล การถือครองที่ดิน การสร้างฐานข้อมูลในพื้นที่เขตวนอุทยาน เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า อุทยานแห่งชาติ เป็นต้น

การจัดทำฐานข้อมูลการถือครองที่ดินและการใช้ประโยชน์ที่ดิน รวมถึงข้อมูลเชิงพื้นที่ในระดับแปลงโดยอาศัยเทคโนโลยีภูมิสารสนเทศในเขตพื้นที่องค์การบริหารส่วนตำบลโนนดินแดงถือเป็นหนึ่งในการสร้างเครื่องมือในการบริหารจัดการพื้นที่ที่เปี่ยมประสิทธิภาพในการบริหารจัดการเชิงพื้นที่ของท้องถิ่นและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องเป็นอย่างดี และหน่วยงานยังสามารถปรับปรุงข้อมูลให้ทันสมัยและใช้งานต่อเนื่องอย่างมีประสิทธิภาพในอนาคตได้

Abstract

The objectives of the study were 1) to study government developing process caused ownership change in bordering areas under he changes of economy, social politics. 2) to apply the Geoinformation Technology involved ownership and the use of the areas.

The three concepts had been employed in the study namely; territorailization by state legislation to claim resource right, complexity and conflict involved the right in resources under the development and the application in the use of Geography Information Systems.

The data analysis: the data analysis of the land used between 2004 - 2009 was from the interpretation of aerial photography and satellite photograph; Landsat 5 TM. The provided photographs were presented in map indicating the use of the land and overlap of the data in and the use of the land 4-01 (SPK 4-01) in border areas under the changes of economy, social and politics. 2) to apply the use Geoinformation Technology involved land ownership and the use of the land 4-01, the survey the trespassed areas from global positioning systems including analysis on land trespass and conflict involved the areas in order to manage the land administration in the future.

The results of the study; firstly, the change of ownership (properties right) and documentary right in NonDinDeang Sub-district Administrative Organization Amphoe NonDinDeang, Buriram Province. That was one of the areas encountered the problem due to the change of national and local economy. Because of the areas were the borders connecting to Sakaew Province. The extension of the city community caused the stores, resorts and other constructions arisen. That affected the way of life of the people in those areas to acclimatize themselves to survive in the community in such a social and economical changes all the time.

The governments' development involved the ownership in NonDinDeang Sub-district Administrative Organization, Amphoe NonDinDeang, Buriram Province was like the change affected from the national policy concentrated on providing people in the areas an ownership with official permission to take the use of the land and provided the use of the land 4-01 for those unavailable.

That was a right concept but the procedure has not been assured and considerate. Moreover, that also caused the national forest and public lands were increased. SPK 4-01 lands had not been surveyed considerately, only marked on the map, therefore, the mistaken was existed leading to the conflict in management of land possession in those areas as in the present.

The tendency of land ownership in NonDinDeang Sub-district Administrative Organization nearby areas in the future; nowadays the use of the land 4-01 have been contributed to the villagers. The government under the prime minister; Apisit Vetchachewa, arose the ideas of providing title deeds that may lead the government the way to deal with the land problems in many areas in the future.

Secondly, the utility of Geoinformation Technology to deal with land ownership was another application providing many organizations to handle with land management including Department of Local Administration, Department of lands, and Department of wildlife sanctuary and national parks.

Those organizations realized the utility of the data base managements such as system of tax map and property record, the contribution data base on land ownership including contribution of area data base as for national park, .

The providing data base in land ownership and land utility including detail data based on Geoinformation Technology in NonDinDeang Sub-district Administrative Organization was one invention of effective land management in local areas and related organization as well. Moreover, the organizations may be able to modernize the data effectively for further use in the future.

คำสำคัญ : การประยุกต์เทคโนโลยีภูมิสารสนเทศ การถือครองที่ดินเขตพื้นที่ชายแดน โฉนดชุมชน

Keywords : Apply of Geoinformation Technology, Land ownership, Community properties right

บทนำ

ในทุกประเทศในทุกรัฐจะต้องมีอำนาจจัดการแผ่นดิน เรื่องราวต่างๆ บนแผ่นดิน ไม่ว่าจะเป็นดิน น้ำ และป่ารวมไปถึงอำนาจในการจัดการประชากร ซึ่งถือว่าเป็นทรัพยากรแผ่นดินของประเทศด้วย ก่อนปี พ.ศ. 2475 อำนาจในการจัดการแผ่นดินและอำนาจในการจัดการชีวิตของประชากรนั้นถือว่าเป็นอำนาจของพระมหากษัตริย์แต่เมื่อเกิดเหตุการณ์เปลี่ยนแปลงการปกครองเมื่อวันที่ 24 มิ.ย. 2475 เหตุการณ์ครั้งนั้นมีนัยสำคัญ คือ อำนาจในการจัดการที่ดิน อำนาจในการจัดการทรัพยากรอำนาจในการจัดการประชากรถูกเปลี่ยนไปสู่อำนาจในระบอบประชาธิปไตย ความหมายคือ เปลี่ยนให้ที่ดินบนแผ่นดินไทยทุกตารางนิ้วเป็นของคนไทยทุกคน กรรมสิทธิ์เป็นของประชาชน (ฉลาดชาย รมิตานนท์, 2548)

ในปัจจุบันแนวคิดเรื่องระบบสิทธิในทรัพย์สินโดยเฉพาะเรื่องที่ดินมักให้ความสำคัญเฉพาะสิทธิในที่ดินของรัฐ (state property) และที่ดินของเอกชน (private property) ซึ่งเป็นแนวคิดในการจัดการที่ดินหรือทรัพย์สินที่มีรากฐานมาจากแนวคิดเกี่ยวกับระบบกรรมสิทธิ์แบบปัจเจกบุคคลและการมีแนวคิดเกี่ยวกับความเป็นเจ้าของ (ownership system) จึงทำให้มองทรัพย์สินในลักษณะที่เป็นหน่วย (unit) หรือเป็นสิ่งของ (things) จนทำให้เกิดรูปแบบของการจัดการทรัพย์สินที่เป็นแบบเบ็ดเสร็จเด็ดขาด (exclusiveness) ในการกีดกันสิทธิของคนอื่นออกไป ซึ่งถือว่าเป็นการมองเฉพาะความสัมพันธ์ของคนกับสิ่งของเท่านั้น แนวคิดนี้ตั้งอยู่บนพื้นฐานของระบบทุนนิยมที่มุ่งแสวงหาประโยชน์สูงสุดนั่นเอง (คมกฤษณ์ จันกลิ่น, 2549)

แนวคิดข้างต้นเป็นพื้นฐานสำคัญของระบบกฎหมายที่ดินในสังคมไทย เช่น ประมวลกฎหมายเพ่งและกฎหมายที่ดิน โดยกำหนดให้สิทธิในที่ดินแยกระหว่างสิทธิความเป็นเจ้าของกับสิทธิการใช้ประโยชน์ที่ดิน (พรใจ เตมวารี, 2534) แนวคิดดังกล่าวส่งผลให้กฎหมายที่ดินบัญญัติเฉพาะการบังคับใช้กับความสัมพันธ์ของเอกชนกับเอกชน แต่กลับมองข้ามความสัมพันธ์ทางสังคมของกลุ่มคนในสังคม

การพัฒนาประเทศไทยตั้งแต่แผนพัฒนาเศรษฐกิจ ฉบับที่ 1 เป็นต้นมา ได้ให้ความสำคัญกับการวางแผนโดยการเปลี่ยนแปลงและขยายการผลิตในภาคเกษตรเพื่อยังชีพไปสู่การผลิตเพื่อการค้าเพื่อนำเงินมาพัฒนาภาคอุตสาหกรรมที่เน้นเรื่องกำไรและการเจริญเติบโตอย่างไม่มีขีดจำกัด ส่งผลให้มุมมองและวิธีคิดเกี่ยวกับทรัพยากร เป็นเพียงปัจจัยการผลิตหรือสินค้า และมองธรรมชาติเป็นเพียงที่ดินและวัตถุหรือต้นทุนการผลิตเท่านั้น การเปลี่ยนรูปแบบการผลิตตามแนวพัฒนาของรัฐ เกษตรกรต้องอาศัยทุนจากแหล่งทุนภายนอกทั้งในระบบและนอกระบบเพื่อนำมาใช้ในการผลิตตามความต้องการของตลาดหาก แต่การเกษตรยังต้องพึ่งพาธรรมชาติเป็นสำคัญ อีกอย่างหนึ่งที่เพิ่มขึ้นของเกษตรกร นั่นคือภาวะต้นทุนการผลิตสูงขึ้นและเผชิญกับภาวะราคาผลผลิตตกต่ำ รวมทั้งภาวะหนี้สิน ผลลัพธ์สุดท้ายที่เกิดขึ้นกับเกษตรกรนั่นคือการสูญเสียที่ดินในภาคเกษตรกรรมให้กับคนอื่น จนต้องกลายเป็นแรงงานรับจ้างและผู้เช่าที่ดิน

การเปลี่ยนแปลงประเทศเข้าสู่การเป็นประเทศอุตสาหกรรมใหม่ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2530 ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมากมาย นับตั้งแต่การปั่นราคาที่ดินเพื่อเก็งกำไรที่ทำให้ราคาที่ดินเพิ่มขึ้นมากกว่า 10 เท่า ทำให้ที่ดินกลายเป็นสินค้าที่ซื้อขายคล่องขึ้น มีการกว้านซื้อที่ดินจากนายทุนเพื่อเก็งกำไรและขยายธุรกิจขนาดใหญ่ซึ่งถือว่าเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ประเทศเข้าสู่วิกฤติเศรษฐกิจในปี พ.ศ. 2540 (มูลนิธิสถาบันที่ดิน, 2545)

กระแสของชุมชนเข้าสู่ยุคโลกาภิวัฒน์ รัฐกับทุนจับมือกันมุ่งสู่ระบบทุนนิยมเสรีเน้นระบบตลาดเกิดการแย่งชิงทรัพยากรจากท้องถิ่นมากขึ้นเรื่อยๆ พร้อมกับเริ่มมีกระแสการกระจายอำนาจการจัดการทรัพยากรไปสู่ชุมชนท้องถิ่น การปฏิรูปที่ดินมีการกล่าวถึงอีกครั้งหนึ่ง แม้ว่าภาครัฐจะกล่าวถึง แต่ก็มิได้เป็นไปเพื่อแก้ปัญหาเกษตรที่ขาดแคลนที่ดินทำกินแต่อย่างใด

ในยุคของรัฐบาลทักษิณ พ.ศ. 2545 มีการประกาศให้มีนโยบายทำประเทศไทยให้เป็นครัวของโลก ครัวของโลก คือ แหล่งผลิตอาหาร การจะผลิตอาหารนั้นต้องมีที่ดินแต่ว่าหุ้นส่วนใหญ่ของรัฐบาล คือ บริษัทธุรกิจการเกษตรขนาดยักษ์ที่มีทุนไปลงในประเทศต่างๆกลุ่มทุนพวกนี้เป็นผู้ผลักดันให้ใช้นโยบายดังกล่าว ดังนั้นทำให้นโยบายครัวของโลกจึงไม่ใช่นโยบายที่เอื้อให้แก่เกษตรคนจนที่ดินที่มีอยู่อย่างจำกัด จึงตอบสนองกลุ่มธุรกิจการเกษตร

แม้รัฐบาลทักษิณมีนโยบายเกี่ยวกับการจัดการปัญหาที่ดิน แต่เป็นนโยบายการแปลงสินทรัพย์ให้เป็นทุน ซึ่งก็ไม่สามารถแก้ปัญหาที่ดินที่แท้จริงได้ ยิ่งทำให้ชุมชนขาดสิทธิโอกาสในการเข้าถึงการถือครองที่ดินไปยิ่งขึ้นเรื่อยๆ มีผลในทางลบต่อคนจน ถือเป็นการช่วยคนรวย คือธนาคาร แต่คนจนจะยิ่งจนลง นอกจากนี้คนจนยังประสบปัญหาเรื่องราคา พืชผลทางการเกษตรที่ตกต่ำ เพราะการเปิดเสรีการค้าอีกด้วย ดังนั้นสถานการณ์ของคนจนในชนบทยิ่งย่ำแย่

การผลักดันเรื่องนโยบายการปฏิรูปที่ดิน ต้องให้คนจนเข้าถึงทรัพยากร เป็นเจ้าของทรัพยากรและใช้ทรัพยากร ด้วยเหตุนี้เองเกษตรกรจำนวนหนึ่งจึงคิดว่ารอรัฐต่อไปคงไม่ไหว มีที่ดินรกร้างว่างเปล่า หรือที่ดินมีเจ้าของแต่ได้กรรมสิทธิ์มาโดยมิชอบจำนวนมาก ที่ดินดังกล่าวถูกปล่อยไว้เฉยๆ ในขณะที่คน 30-40 ล้านคนมีปัญหาไม่มีที่ดินทำกิน ประเด็นปัญหาอยู่ที่รัฐไม่กล้าเข้าไปยุ่งกับที่ดินของเอกชนที่มีมากมายเกิน 200 ไร่ ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะเป็นที่ดินที่เหมาะสมสำหรับการเกษตร ทำให้เกษตรกรต้องลุกขึ้นมายึดครองที่ดิน

จังหวัดบุรีรัมย์เป็นอีกหนึ่งจังหวัดที่ได้รับผลกระทบเรื่องของกรรมสิทธิ์ที่ดิน โดยเฉพาะภาคเกษตรกรรมที่เกษตรกรต้องอาศัยที่ดินและความอุดมสมบูรณ์ของธรรมชาติ หากแต่ที่ดินที่เกษตรกรมีอยู่ไม่เพียงพอกับการขยายตัวของพืชเศรษฐกิจตามกลไกตลาด ก่อเกิดปัญหาการบุกรุกที่ดินทำกินและการอ้างสิทธิเหนือที่ดินของผู้มีอำนาจ เช่น กรณีข่าวการออก น.ส.3 ก. เนื้อที่หลายร้อยไร่ทับที่สาธารณะในบริเวณอุทยานเขากระโดงจังหวัดบุรีรัมย์ของนักการเมืองท้องถิ่น (หนังสือพิมพ์เดลินิวส์, 2551) คดีบุกรุกที่ดินในเขตป่าสงวนบริเวณเขาพนมรุ้งของนักการเมืองท้องถิ่น เป็นต้น

ในยุคปัจจุบันรัฐบาลมีนโยบายที่ชัดเจนในการส่งเสริมและสนับสนุนให้หน่วยงานภาครัฐ สถาบันการศึกษาและภาคเอกชนทั้งหน่วยงานส่วนกลางส่วนภูมิภาคและส่วนท้องถิ่นใช้ข้อมูลภูมิสารสนเทศในการบริหารจัดการทรัพยากรธรรมชาติ สิ่งแวดล้อมและภัยพิบัติ เนื่องจากเป็นข้อมูลที่มีความถูกต้องสามารถปรับปรุงให้เป็นปัจจุบันทันต่อเหตุการณ์ได้อย่างต่อเนื่อง

เทคโนโลยีภูมิสารสนเทศเป็นเทคโนโลยีใหม่ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการบริหารจัดการและวางแผนการใช้ทรัพยากรในท้องถิ่นอย่างกว้างขวาง ซึ่งเทคโนโลยีดังกล่าวประกอบด้วย ระบบสารสนเทศทางภูมิศาสตร์ (geographic information systems) รีโมทเซนซิ่ง/การรับรู้ระยะไกล (remote sensing) และระบบกำหนดตำแหน่งพิกัดบนโลก (global positioning system) การนำเทคโนโลยีภูมิสารสนเทศมาใช้นั้นสามารถตอบคำถามต่างๆ ในเชิงพื้นที่ทั้งทางตรงและทางอ้อม อาทิเช่น การเปลี่ยนแปลงการใช้ที่ดินและสิ่งปกคลุมดิน การถือครองที่ดิน การเปลี่ยน-แปลงของทรัพยากรกายภาพ การจัดทำแผนที่ภาษี การเติบโตของชุมชนและอุตสาหกรรม เป็นต้น

อำเภอโนนดินแดง จังหวัดบุรีรัมย์ เป็นพื้นที่ชายแดนที่มีอาณาเขตติดต่อกับจังหวัดสระแก้วและประเทศกัมพูชา ปัญหาการบุกรุกและการถือครองกรรมสิทธิ์ในที่ดินทำกินของชาวบ้านเกิดขึ้นมาอย่างยาวนาน ยุคแรกของการเข้ามาอาศัยในพื้นที่ชาวบ้านสามารถแผ้วถางและจับจองพื้นที่ตามที่รัฐอนุญาต หากแต่เมื่อรัฐประกาศให้มีระบบการถือครองที่ดินโดยมีการออกเอกสารสิทธิ์ในรูปของ สปก.4-01 ปัญหาความขัดแย้งและปัญหาในการถือครองที่ดินจึงเกิดขึ้นในรูปแบบที่หลากหลาย เช่น กรณีกลุ่มชาวบ้านบุกรุกที่ดินเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่ โดยก่อนได้รับ

อนุญาต (หนังสือพิมพ์ผู้จัดการออนไลน์ , 2552) ก่อเกิดเป็นปัญหาในระดับนโยบายและการปฏิบัติในหลายหน่วยงาน ไม่ว่าจะเป็น อุทยานแห่งชาติตาพระยา กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม จังหวัดบุรีรัมย์ และสำนักจัดการทรัพยากรป่าไม้ที่ 8

จากผลกระทบข้างต้น ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาร่วมกับชาวบ้าน โดยมีคำถามวิจัยว่า ในอดีตชาวบ้านมีกรรมสิทธิ์ในการถือครองที่ดิน การใช้ประโยชน์ในที่ดินอย่างไร สิทธิในการการจัดการการถือครองที่ดินมีการเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่อย่างไร ในอดีตชาวบ้านใช้ยุทธศาสตร์ในการคัดค้านและต่อรองอย่างไร เมื่อการคัดค้านและต่อรองในอดีตไม่เป็นผล ชาวบ้านพยายามหันมาใช้ปฏิบัติการอย่างไรเพื่อใช้การต่อรองและแสวงหาทางเลือกใหม่ในการจัดการการถือครองที่ดินให้เกิดการใช้ทรัพยากรอย่างยั่งยืนและเป็นธรรม ระบบภูมิสารสนเทศจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้เกี่ยวกับการถือครองที่ดินในพื้นที่ได้หรือไม่อย่างไร

วัตถุประสงค์

1. ศึกษากระบวนการพัฒนาของรัฐที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการถือครองที่ดินในพื้นที่ชายขอบภายใต้กระบวนการเปลี่ยนแปลงด้านเศรษฐกิจ สังคม และการเมือง

2. เพื่อประยุกต์ใช้เทคโนโลยีภูมิสารสนเทศเกี่ยวกับการถือครองที่ดินและการใช้ประโยชน์ในที่ดิน

กรอบแนวคิดในการวิจัย

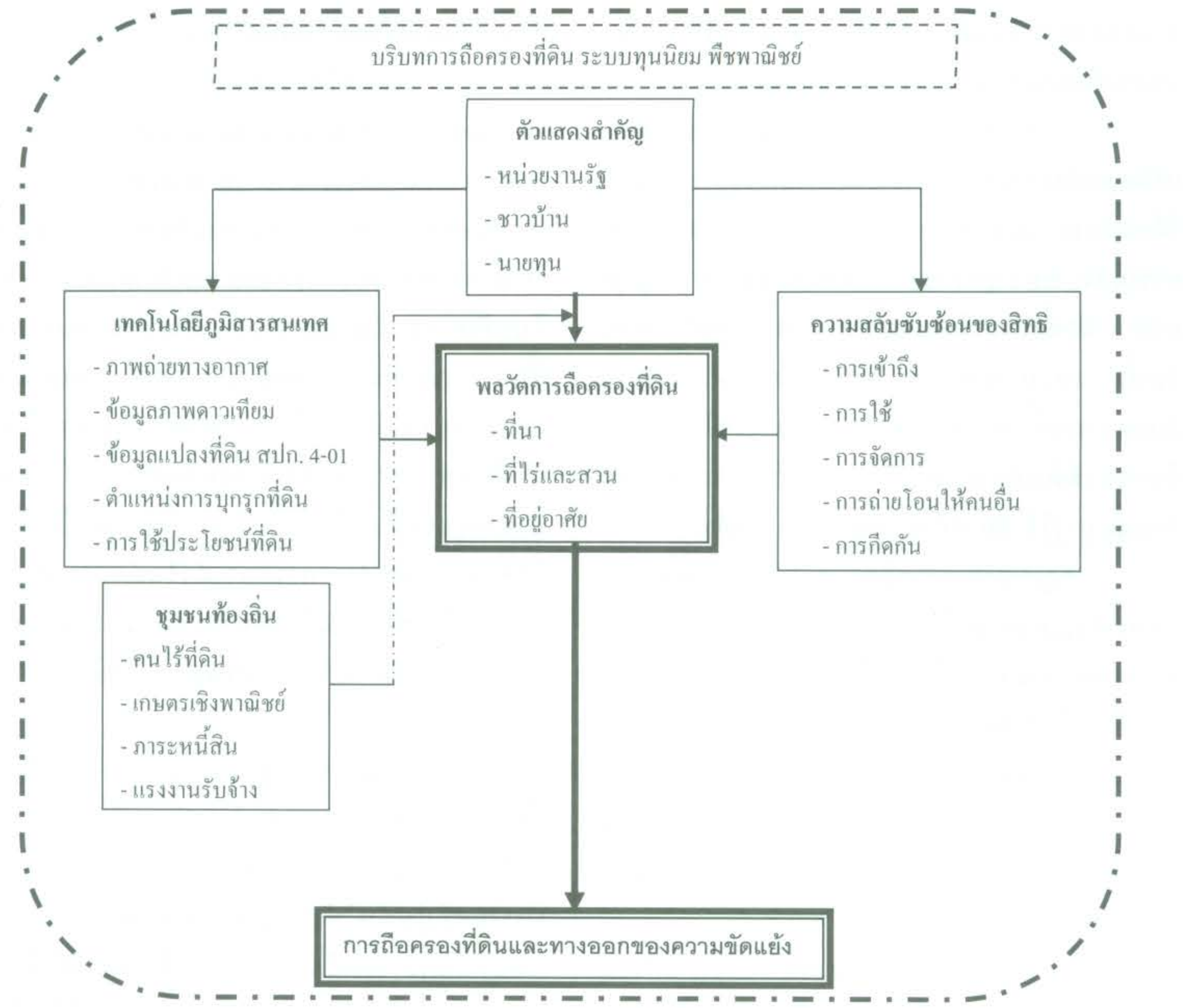
เพื่อตอบคำถามวิจัยว่าชาวบ้านมีกรรมสิทธิ์ในการถือครองที่ดิน การใช้ประโยชน์ในการถือครองที่ดินอย่างไร มีความขัดแย้งในการถือครองที่ดินอย่างไร สิทธิในการการจัดการการถือครองที่ดินมีการเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่อย่างไร ทางออกของการแก้ปัญหาความขัดแย้งเกี่ยวกับการถือครองที่ดินและปัญหาการบุกรุกที่ดินจะสามารถทำได้อย่างไร ผู้วิจัยมุ่งศึกษาการถือครองที่ดินโดยใช้แนวคิดสามประการช่วยเป็นแนวทางในการศึกษา ดังนี้ คือ 1) การขยายอำนาจและการควบคุมสิทธิ โดยใช้กฎหมายของรัฐสมัยใหม่ในการอ้างสิทธิเหนือทรัพยากร 2) ความซับซ้อนและความขัดแย้งเกี่ยวกับสิทธิในการเข้าถึงทรัพยากรภายใต้บริบทของการพัฒนา และ 3) แนวคิดการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีภูมิสารสนเทศในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้พัฒนากรอบแนวคิดในการวิจัย โดยมุ่งเน้นการศึกษาในด้านการถือครองที่ดิน ได้แก่ พื้นที่นา ไร่ สวน ที่อยู่อาศัย เป็นต้น และการบุกรุกที่ดินในพื้นที่อุทยานแห่งชาติตาพระยา และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่

วิธีดำเนินการวิจัย

เนื่องจากการวิจัยนี้เป็นการวิจัยแบบมีส่วนร่วม (participatory research) โดยศึกษา การถือครองที่ดิน ซึ่งมีความสลับซับซ้อนในด้านพื้นที่ สิทธิ ความรู้ และตัวแสดงสำคัญ ดังนั้น ผู้วิจัยทั้งวิธีการเชิงปริมาณและวิธีการเชิงคุณภาพ เพื่อช่วยให้เข้าใจแง่มุมต่างๆ ของการถือครองที่ดิน

วิธีการวิจัยเป็นวิธีการวิจัยที่อาศัย การวิจัยเชิงปริมาณและการวิจัยเชิงคุณภาพ คือ ส่วนแรกเป็นข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับพื้นที่ (spatial data) ได้แก่ ข้อมูลเชิงพื้นที่ (spatial data) ได้แก่ ข้อมูลแปลงที่ดิน จากสำนักงานการปฏิรูปที่ดินเพื่อการเกษตรกรรมจังหวัดบุรีรัมย์ ข้อมูลการใช้ประโยชน์ที่ดินปี พ.ศ. 2547 จากการแปลภาพถ่ายทางอากาศ ปี พ.ศ. 2547 มาตราส่วน 1: 4,000 และภาพดาวเทียม Landsat 5 TM รายละเอียดจุดภาพ 30 เมตร ปี พ.ศ. 2552 ข้อมูลเชิงพื้นที่ทั้งหมดนำมาซ้อนทับกัน (overlay) เพื่อดูการถือครองที่ดิน รวมทั้งการตรวจสอบความถูกต้องเชิงตำแหน่งของพื้นที่ด้วยเครื่องกำหนดตำแหน่งพิกัดบนพื้นผิวโลก (GPS)

ประชากรเป้าหมายที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ ชาวบ้านในพื้นที่ จำนวน 300 ราย (โดยใช้สูตร Yamane ที่ระดับ ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และขนาดตัวอย่างความความคลาดเคลื่อนที่ $\pm$ 5 เปอร์เซ็นต์) เจ้าหน้าที่



รูปที่ 1 กรอบแนวคิดในการวิจัย

ของหน่วยงานรัฐที่เกี่ยวข้องในพื้นที่ จำนวน 30 ราย (ใช้การกำหนดขนาดตัวอย่างแบบจำเพาะเจาะจง)

การวิเคราะห์ข้อมูล การวิเคราะห์ข้อมูลการใช้ประโยชน์ที่ดินปี พ.ศ. 2547-2548 ที่ได้จากการแปลภาพถ่ายทางอากาศ นำข้อมูลที่ได้มานำเสนอในรูปของแผนที่การใช้ประโยชน์ที่ดิน และการสำรวจตำแหน่งพื้นที่บุกรุกจากเครื่องกำหนดตำแหน่งพิกัดบนพื้นโลก

การวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ การใช้ประโยชน์และการถือครองที่ดินของพื้นที่ เศรษฐกิจและการเมือง โดยการพิจารณาถึงเหตุแห่งที่มาที่เกิดขึ้นในชุมชน ระหว่างชุมชน โดยวิเคราะห์จากการสัมภาษณ์ชาวบ้าน ผู้นำชุมชน และเจ้าหน้าที่รัฐรวมทั้งภาคเอกชน

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์จะใช้การวิเคราะห์เนื้อหาด้วยวิธีการพรรณนา (content analysis) ประกอบกับการแสดงข้อมูลด้วยแผนที่และตาราง รวมทั้งการวิเคราะห์การซ้อนทับข้อมูลเชิงพื้นที่ การหาค่าความถี่ การกระจายร้อยละ ค่าเฉลี่ย

ผลการวิจัย

การสรุปผลจากการศึกษามุ่งอธิบายตามวัตถุประสงค์ในการศึกษาสองข้อ ได้แก่ 1) ศึกษากระบวนการพัฒนาของรัฐที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการถือครองที่ดินในพื้นที่ชายขอบ ภายใต้กระบวนการเปลี่ยนแปลงด้านเศรษฐกิจ สังคม และการเมือง 2) เพื่อประยุกต์ใช้เทคโนโลยีภูมิสารสนเทศเกี่ยวกับ

การถือครองที่ดินและการใช้ประโยชน์ในที่ดิน ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. กระบวนการพัฒนาของรัฐที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการถือครองที่ดินในพื้นที่ชายขอบ ภายใต้กระบวนการเปลี่ยนแปลงด้านเศรษฐกิจ สังคม และการเมือง พบว่าการใช้ประโยชน์ของชาวบ้านในยุคแรกๆ มักตั้งบ้านเรือนและทำการเพาะปลูกในที่ราบริมน้ำ และมีรูปแบบการใช้ที่ดินที่แตกต่างกันตามลักษณะของพื้นที่ลักษณะพื้นฐานของการใช้ และการถือครองที่ดินมักจะแยกเป็น 4 ประเภทหลักตามลักษณะการใช้ คือ ที่บ้าน ที่นา ที่สวน ที่ไร่

กฎเกณฑ์และจารีตในการถือครองที่ดินในแต่ละประเภทนั้นเป็นการถือครองที่ดินโดยกลุ่มตระกูลและสามารถ สืบต่อเป็นมรดกสู่ลูกหลาน โดยส่วนใหญ่สืบสายจากตระกูลของฝ่ายแม่ (ผู้หญิง) ซึ่งลักษณะการใช้ที่ดินรูปแบบดังกล่าวในขณะนั้นเป็นไปในลักษณะที่ไม่ถาวรและไม่มีการใช้ประโยชน์อย่างต่อเนื่อง ดังนั้นในยุคนี้จึงยังไม่มีการนำกฎหมายที่ดินเข้ามาบังคับใช้ในพื้นที่

แนวคิดการพัฒนาประเทศโดยเฉพาะตั้งแต่แผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 1 ปี พ.ศ. 2504 ที่ได้ให้ความสำคัญกับการวางแผนที่จะเปลี่ยนแปลงและขยายการผลิตในภาคเกษตรจากเกษตรเพื่อยังชีพไปสู่การผลิตเพื่อการค้าและการส่งออกเพื่อนำเงินตราจากการค้า การผลิตทางการเกษตรมาเป็นทุนสำหรับการพัฒนาภาคอุตสาหกรรม

รัฐบาลจัดตั้งกรมที่ดินเพื่อออกเอกสารสิทธิ์ในที่ดินทำกินภายใต้ประมวลกฎหมายที่ดิน พ.ศ. 2497 ในยุคนี้เอกสารสิทธิ์ที่ชาวบ้านแจ้งกับทางเจ้าหน้าที่นั้นส่วนใหญ่แจ้งเฉพาะที่บ้านและที่นา เนื่องจากเป็นพื้นที่ที่ใช้ประโยชน์อย่างต่อเนื่องและมีความชัดเจนในเรื่องอาณาเขตส่วนพื้นที่ไร่ และสวนที่ส่วนใหญ่เกิดจากการแผ้วถางพื้นที่เพื่อขยายพื้นที่การเกษตร ชาวบ้านจึงไม่ได้แจ้งเพื่อขอออกเอกสารสิทธิ์

โครงการพัฒนาของรัฐเกี่ยวกับการถือครองที่ดินที่เข้ามาในพื้นที่ นั่นคือ โครงการเร่งรัดออกโฉนดที่ดิน หลังจากที่คณะรัฐมนตรีมีมติ เมื่อวันที่ 3 เมษายน พ.ศ. 2527 อนุมัติให้กรมที่ดินดำเนินโครงการพัฒนากรมที่ดินและเร่งรัดออกโฉนดที่ดินทั่วประเทศ โดยกำหนดให้แล้วเสร็จภายใน 20 ปี (พ.ศ. 2528 - 2547) การเปลี่ยนแปลงของระบอบกรรมสิทธิ์และเอกสารสิทธิ์ในพื้นที่องค์การบริหารส่วนตำบลโนนดินแดง อำเภอโนนดินแดง จังหวัดบุรีรัมย์ เป็นอีกพื้นที่หนึ่งที่เกิดขึ้นตามการเปลี่ยนแปลงของเศรษฐกิจระดับประเทศและระดับท้องถิ่น เนื่องจากพื้นที่อยู่ในเขตเชื่อมต่อกับพื้นที่ชายแดน ติดต่อกับจังหวัดสระแก้ว การขยายตัวของชุมชนเมืองจึงเกิดขึ้นในพื้นที่ไม่ว่าจะเป็นร้านค้า รีสอร์ท เป็นต้น การขยายตัวในลักษณะดังกล่าวส่งผลให้วิถีชีวิตของผู้คนในพื้นที่ต้องปรับตัวเพื่อให้สามารถยังอยู่ได้ในสังคม เศรษฐกิจ ที่เปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา

การพัฒนาของรัฐเกี่ยวกับการถือครองที่ดินในพื้นที่องค์การบริหารส่วนตำบลโนนดินแดงไม่ต่างอะไรจาก การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากนโยบายระดับประเทศที่มุ่งเน้นให้ประชาชนในพื้นที่มีการถือครองที่ดินที่มั่นคง โดยมีการออกหนังสืออนุญาตให้เข้าทำประโยชน์ในเขตปฏิรูปที่ดินและในแจกที่ดินทำกินในรูปของ สปก.4-01 ให้ชาวบ้านที่เป็นเกษตรกรและไม่มีที่ทำกิน ซึ่งเป็นแนวคิดที่ดี แต่การปฏิบัติในทุกขั้นตอนยังไม่รอบคอบชัดเจน ทำให้ป่าไม้หรือที่สาธารณประโยชน์ต่างๆ ที่เป็นของรัฐลดลง และที่สำคัญ สปก.4-01 ไม่ได้มีการรังวัดอย่างชัดเจนเป็นเพียงการเปิดแผนที่แล้วใช้ปากกาขีดวัดเท่านั้น ทำให้เนื้อที่มีความคลาดเคลื่อนไป

ทิศทางการถือครองที่ดินในพื้นที่อำเภอโนนดินแดงในอนาคตนั้น ปัจจุบันยังคงมีการออก สปก.4-01 ให้กับชาวบ้านที่ร้องขอตามเงื่อนไขของสำนักงานปฏิรูปที่ดินเพื่อการเกษตรกรรมอยู่ หากแต่รัฐบาลในยุคสมัยของนายกรัฐมนตรี นายอภิสิทธิ์ เวชชาชีวะ ได้มีแนวคิดเรื่องโฉนดชุมชนเกิดขึ้นและพยายามผลักดันให้เป็นแนวทางที่สามารถทำให้รัฐบาลมีความคล่องตัวในการเข้าไปแก้ปัญหาที่ทำกินใน

หลายพื้นที่มากยิ่งขึ้น และเกิดการแก้ปัญหาที่มีความยั่งยืนในอนาคต

2. ประยุกต์ใช้เทคโนโลยีภูมิสารสนเทศเกี่ยวกับการถือครองที่ดินและการใช้ประโยชน์ในที่ดิน (ตารางที่ 1) การใช้ประโยชน์จากเทคโนโลยีภูมิสารสนเทศร่วมกับการถือครองที่ดิน ถือเป็นอีกหนึ่งการประยุกต์ใช้ที่หลากหลายหน่วยงานนำมาใช้ในการบริหารจัดการเกี่ยวกับข้อมูลเชิงพื้นที่ไม่ว่าจะเป็นกรมการปกครองส่วนท้องถิ่น กรมที่ดิน กรมอุทยานสัตว์ป่าและพันธุ์พืช เป็นต้น หน่วยงานดังกล่าวได้เล็งเห็นความสำคัญเพื่อนำมาใช้เป็นฐานข้อมูลในการบริหารจัดการ เช่น การจัดเก็บภาษีในรูปของระบบแผนที่ภาษีและทะเบียนทรัพย์สิน การสร้างฐานข้อมูล การถือครองที่ดิน การสร้างฐานข้อมูลในพื้นที่เขตวนอุทยาน เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า อุทยานแห่งชาติ เป็นต้น

ตารางที่ 1 พื้นที่การใช้ประโยชน์ที่ดินในเขตองค์การบริหารส่วนตำบลโนนดินแดง ปี พ.ศ. 2549

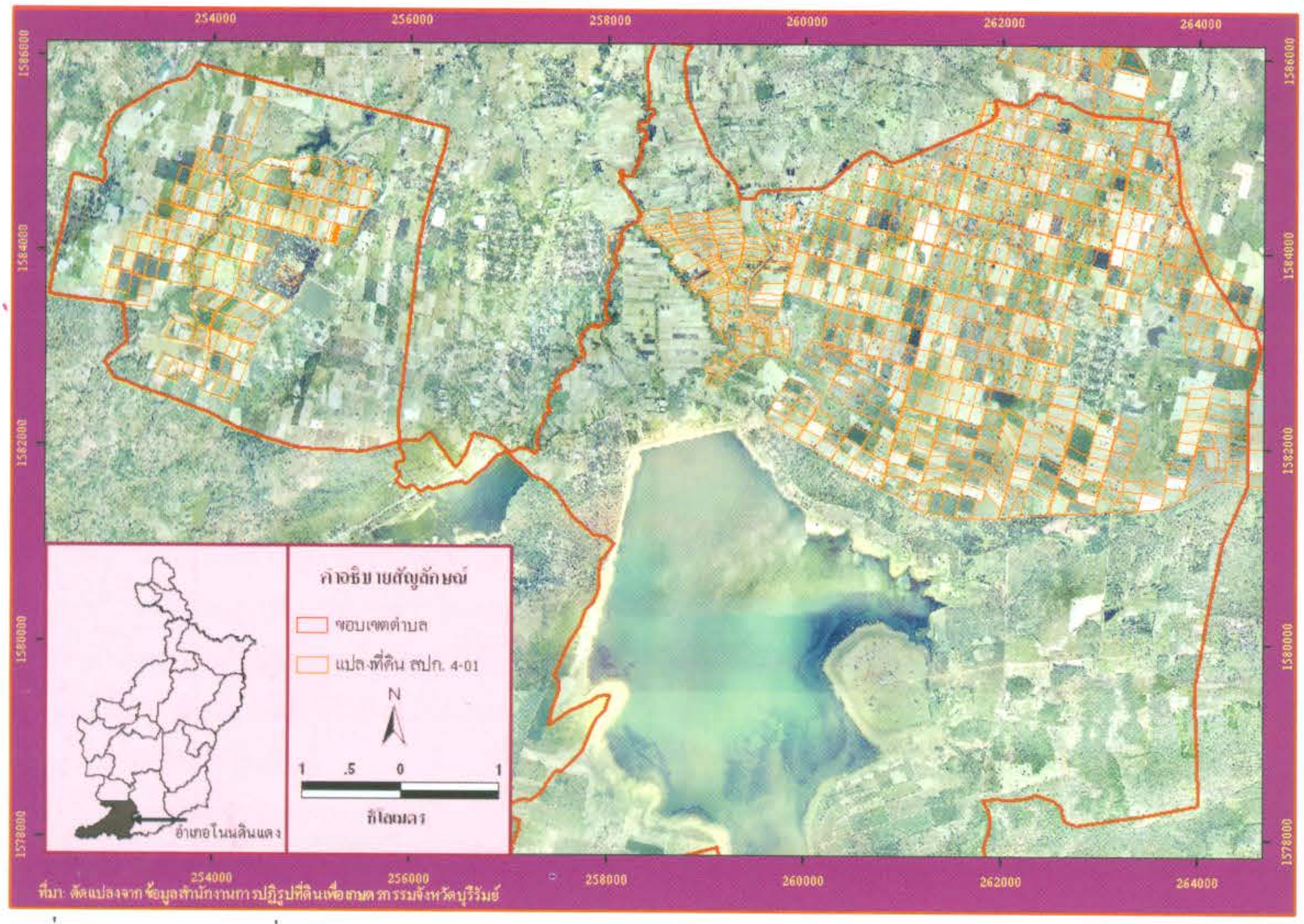
การใช้ประโยชน์ที่ดิน	พื้นที่ (ไร่)	การใช้ประโยชน์ที่ดิน	พื้นที่ (ไร่)
1) ยูคาลิปตัส	10,026.44	13) สถานที่ราชการ	346.47
2) มันสำปะหลัง	9,031.02	14) อ่างเก็บน้ำ	316.52
3) นา	7,779.94	15) พืชไร่ผสม	274.80
4) เขื่อนลำนางรอง	7,258.79	16) สัก	271.74
5) ป่าเบญจพรรณ	5,464.91	17) ไม้ผลผสม	170.31
6) อ้อย	3,582.76	18) ถนน	100.48
7) ยางพารา	2,237.04	19) กระถิน	83.09
8) หมู่บ้านบนพื้นที่ราบ/ไม้ผลผสม	1,376.18	20) เหมืองแร่ บ่อขุด	60.45
9) ป่าผลัดใบเสื่อมโทรม	726.54	21) หมู่บ้านบนพื้นที่ราบ	37.23
10) พื้นที่ลุ่ม	649.20	22) ลำไย	15.44
11) ทุ่งหญ้าและป่าละเมาะ	454.39	23) ไม้ยืนต้นผสม	19.01
12) แม่น้ำลำคลอง	359.29	24) บ่อน้ำในไร่นา	10.29
รวม	**50,652.33**		

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีภูมิสารสนเทศกลายเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการวางแผนและบริหารจัดการทรัพยากรในระดับท้องถิ่น การที่ท้องถิ่นหรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในการบริหารจัดการในพื้นที่มีฐานข้อมูลการถือครองที่ดินและข้อมูลส่วนอื่นๆ ที่จำเป็นของประชากรในเขตพื้นที่เป็นของตนเองและเชื่อมโยงกัน ทำให้ง่ายต่อการใช้งานและการสืบค้นเมื่อต้องการบริหารจัดการงานที่เกี่ยวข้องกับพื้นที่

การจัดทำฐานข้อมูลการถือครองที่ดินและการใช้ประโยชน์ที่ดิน รวมถึงข้อมูลเชิงพื้นที่ในระดับแปลง โดยอาศัยเทคโนโลยีภูมิสารสนเทศในเขตพื้นที่องค์การบริหารส่วนตำบลโนนดินแดง (รูปที่ 2) ถือเป็นหนึ่งในการสร้างเครื่องมือในการบริหารจัดการพื้นที่ที่เปี่ยมประสิทธิภาพในการบริหารจัดการเชิงพื้นที่ของท้องถิ่นและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องเป็นอย่างดี และหน่วยงานยังสามารถปรับปรุงข้อมูลให้ทันสมัยและใช้งานต่อเนื่องอย่างมีประสิทธิภาพในอนาคตได้

การอภิปรายข้อถกเถียงเชิงทฤษฎี ผู้ศึกษาได้แบ่งตามแนวความคิด ทฤษฎี และข้อถกเถียงทางวิชาการที่เกี่ยวข้องดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในบทที่หนึ่ง

ได้แก่ แนวคิดเกี่ยวกับการขยายอำนาจและการควบคุมสิทธิ โดยใช้กฎหมายของรัฐในการอ้างสิทธิเหนือทรัพยากร แนวคิดเกี่ยวกับความซับซ้อนและความขัดแย้งเกี่ยวกับสิทธิในการเข้าถึงทรัพยากรภายใต้บริบทของการพัฒนา และแนวคิดการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีภูมิสารสนเทศ โดยมีรายละเอียด ดังนี้



รูปที่ 2 ข้อมูลแปลงที่ดิน สปก. 4-01 ปี พ.ศ. 2552 เขตองค์การบริหารส่วนตำบลโนนดินแดง อ.โนนดินแดง จ.บุรีรัมย์

แนวคิดเกี่ยวกับการขยายอำนาจและการควบคุมสิทธิ โดยใช้กฎหมายของรัฐในการอ้างสิทธิเหนือทรัพยากร ตามแนวคิดนี้ซึ่งมีพื้นฐานแนวคิดที่เกี่ยวกับการสถาปนาอำนาจเหนือพื้นที่ โดยให้ความสำคัญกับการสร้างหน่วยพื้นที่ที่มีการกำหนดอาณาเขตเพื่อการครอบครองและควบคุมคนและทรัพยากรในพื้นที่ โดยแบ่งพื้นที่ให้เป็นส่วนๆ หรือโซนและการสร้างกฎระเบียบขึ้นบังคับตามแนวคิดของ Vandergeest และ Peluso (1995) นั้น จากการศึกษาของผู้ศึกษาพบว่า มีความแตกต่างกันในบริบทของพื้นที่ กล่าวคือ การขยายอำนาจและควบคุมสิทธิของรัฐในพื้นที่ศึกษารัฐใช้อำนาจทางกฎหมายในการอ้างสิทธิเพื่อการควบคุมสิทธิในทรัพยากรของชาวบ้านผ่านข้อกล่าวอ้างที่ว่าที่ดินทำกินในพื้นที่ที่ชาวบ้านใช้ประโยชน์สืบทอดจากบรรพบุรุษมาหลายชั่วอายุคนไม่มีเอกสารสิทธิ์ที่ถูกต้องตามกฎหมาย ดังนั้นพื้นที่ดังกล่าวจึงต้องตกเป็นของรัฐและชาวบ้านต้องเสียสละเพื่อประชากรส่วนใหญ่ของประเทศ ทำให้รัฐสามารถใช้พื้นที่ดังกล่าวได้อย่างถูกต้องและชอบธรรม ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนจากการศึกษาประวัติศาสตร์ของพื้นที่เกี่ยวกับการถือครองที่ดิน ซึ่งพบว่าในอดีตพื้นที่อำเภอโนนดินแดงอยู่ภายใต้การดูแลของกรมป่าไม้ ไม่มีผู้คนอาศัยอยู่

เมื่อเหตุการณ์ผู้ก่อการร้ายคอมมิวนิสต์สงบลง รัฐบาลจึงมีนโยบายให้ชาวบ้านเข้ามาแผ้วถางที่ดินเพื่อทำมาหากิน แต่กลับไม่มีเอกสารสิทธิที่แสดงถึงความมั่นคงในการถือครองที่ดิน และก่อให้เกิดปัญหาตามามากมายในปัจจุบัน

การบังคับใช้กฎหมายที่ดินของรัฐไม่ได้เป็นไปตามเจตนารมณ์เพื่อให้เกิดความมั่นคงในการถือครองที่ดินแต่เป้าหมายที่แท้จริงในการบัญญัติกฎหมายของรัฐเป็นการปฏิบัติเพื่อขยายอำนาจรัฐให้เกิดความมั่นคงของรัฐชาติตามแนวคิดของ Peluso (1992) การศึกษามีความแตกต่างกันตามบริบท กล่าวคือ แนวทางการจัดการของรัฐที่เน้นการใช้หลักกฎหมายนั้น ชาวบ้านในพื้นที่ยึดหลักกฎหมาย รวมถึงการใช้หลักสิทธิการใช้ที่สืบทอดจากบรรพบุรุษและการยอมรับของคนในชุมชนเพื่อให้สามารถปฏิบัติไปตามความเป็นจริงทางสังคมและสถานการณ์ที่เปลี่ยนแปลงไปได้ เช่น ชาวบ้าน ส่วนใหญ่มีที่ดินทำกินที่มีเอกสารสิทธิ สปก. 4-01 ชาวบ้านบางส่วนมีที่ดินทำกินมาตั้งแต่ยุคบุกเบิกแต่ไม่ได้มีเอกสารสิทธิใดๆ ที่ถูกต้องตามกฎหมายของรัฐ และชาวบ้านหลายรายยังคงทำมาหากินในที่ดินที่สืบทอดจากบรรพบุรุษโดยไม่สนใจเอกสารสิทธิที่รัฐบาลพยายามครอบงำเชิงนโยบาย

การถือครองที่ดินที่รัฐบาลเน้นให้เป็นแบบปัจเจกโดยเฉพาะการออกเอกสารสิทธิ์ในรูปของ สปก.4-01 ที่ถูกต้องตามกฎหมายนั้น ชาวบ้านเชื่อว่าสามารถนำหลักฐานการถือครองที่ดินดังกล่าวไปเป็นเครื่องมือในการแสดงสิทธิเหนือที่ดินและซื้อขายได้อย่างถูกต้องตามกฎหมาย หากแต่ที่ดิน สปก.4-01 ตามกฎหมายไม่สามารถซื้อขายได้ ชาวบ้านจำนวนหลายรายกลับอาศัยช่องว่างทางกฎหมายซื้อขายที่ดินให้กับนายทุนโดยการขายสิทธิ ซึ่งชาวบ้านในที่ดินใกล้เคียงจะรับรู้เกี่ยวกับเจ้าของกรรมสิทธิ์ที่ดินแห่งนั้นโดยปริยาย

ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะมีสองอย่าง คือ ข้อเสนอแนะทางวิชาการและข้อเสนอแนะต่อสังคม

1. หน่วยงานที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับกรรมสิทธ์การถือครองที่ดินและรูปแบบการใช้ที่ดินในพื้นที่ควรมีการเผยแพร่ข้อมูลเชิงพื้นที่ โดยเฉพาะข้อมูลระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ในส่วนที่สามารถเปิดเผยได้ให้แก่หน่วยงานอื่นๆ เพื่อทำการปรับปรุงข้อมูลให้มีความทันสมัยมากขึ้น เนื่องจากข้อมูลดังกล่าวเป็นกลไกสำคัญในการพัฒนาพื้นที่ในอนาคต

2. การศึกษาครั้งนี้ต้องการให้เกิดการเสริมสร้างความรู้ความเข้าใจแก่ประชาชนและหน่วยงานรัฐเกี่ยวกับการถือครองที่ดิน กรรมสิทธิ์ รูปแบบ และการบุกรุกที่ดินที่เกิดขึ้นจากปัจจัยแวดล้อม ทั้งด้านเศรษฐกิจ สังคม และการเมืองที่เกิดขึ้นในพื้นที่ รวมทั้งการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีภูมิสารสนเทศมาใช้เพื่อให้ง่ายในการบริหารจัดการเกี่ยวกับข้อมูลเชิงพื้นที่ในเขตพื้นที่องค์การปกครองส่วนท้องถิ่น และนำเสนอข้อมูลเพื่อประกอบการตัดสินใจเชิงนโยบายต่อไป

เอกสารอ้างอิง

คมกฤษณ์ จันกลิ่น. (2549). การเมืองของการอ้างสิทธิในการถือครองที่ดินระดับท้องถิ่นของจังหวัดลำพูน. วิทยานิพนธ์ศิลปศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการพัฒนาสังคม คณะสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ฉลาดชาย รมิตานนท์. (2548). มหกรรมปฏิรูปที่ดินโดยชุมชน ระหว่างวันที่ 17-19 พฤศจิกายน 2548 (ระบบออนไลน์) แหล่งที่มา: http://www.google.co.th/interstitial?url=http://www.ftawatch.org/news/view.php%3Fid%3D10399 (พฤศจิกายน 2552).

พรใจ เติมวารี. (2534). การเปลี่ยนแปลงความมั่นคงในการถือครองที่ดินในประวัติศาสตร์ของสังคมชนบทภาคเหนือ กรณีศึกษาหมู่บ้านในจังหวัดเชียงใหม่. วิทยานิพนธ์มานุษยวิทยามหาบัณฑิต คณะสังคมวิทยาและมานุษยวิทยา มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

มูลนิธิสถาบันที่ดิน. (2545). การถือครองและใช้ประโยชน์ที่ดิน. กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย.

หนังสือพิมพ์ผู้จัดการออนไลน์. (2552, พฤษภาคม). "ทรัพยากรฯบุรีรัมย์ขู่ดำเนินคดีชาวบ้านบุกยึดป่าดงใหญ่" (ระบบออนไลน์) แหล่งที่มา: (http://www.manager.co.th/Local/ViewNews.aspx?NewsID=9520000058498.

หนังสือพิมพ์เดลินิวส์. (2551, ธันวาคม). "ป.ป.ป. พบบุกรุกที่ดินสาธารณะบุรีรัมย์ อาจมีมูล" (ระบบออนไลน์) แหล่งที่มา: (http://www.giggog.com/politic/cat3/news6131/.

Peluso, N. L. (1992). Rich Forest, Poor People: Resource Control and Resistance in Java. Berkeley: University of California Press.

Vandergeest, P. and Nancy, L. P. (1995). "Territorialization and State Power in Thailand". Theory and Society. 24: 385-426.

❑❑❑❑❑

ว.วิทย. มข. 39(1) 149-158 (2553) KKU Sci. J.39(1) 149-158 (2010)

ตัวประมาณอัตราส่วนตัวใหม่ของค่าเฉลี่ยประชากร ในการสุ่มตัวอย่างแบบอย่างง่าย

A new Ratio Estimator of a Population in Random Sampling

จันทรา ประเสริฐสกุล [1] และ นิภาดา พาภักดี [1]*

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อนำเสนอตัวประมาณอัตราส่วนตัวใหม่สำหรับประมาณค่าเฉลี่ยประชากร ซึ่งพัฒนามาจากตัวประมาณของ Mohanty and Sahoo (1995); Bedi (1996) และ Kadilar and Cingi (2006) พร้อมทั้งหาความคลาดเคลื่อนกำลังสองเฉลี่ย (Mean Square Error: MSE) ของตัวประมาณโดยใช้อนุกรมเทย์เลอร์ และทำการเปรียบเทียบ MSE ของตัวประมาณที่นำเสนอกับตัวประมาณอัตราส่วนของค่าเฉลี่ยประชากรแบบดั้งเดิมและตัวประมาณของ Mohanty and Sahoo ตัวประมาณของ Bedi และตัวประมาณของ Kadilar and Cingi ผลการวิจัยพบว่า ตัวประมาณที่นำเสนอมีประสิทธิภาพดีกว่าตัวประมาณของค่าเฉลี่ยประชากรแบบดั้งเดิม ตัวประมาณของ Mohanty and Sahoo ตัวประมาณของ Bedi และ Kadilar and Cingi ในบางเงื่อนไข ซึ่งผลการวิจัยครั้งนี้มีความสอดคล้องกับการคำนวณเชิงตัวเลข

Abstract

The objective of this research is to propose a new ratio estimator for the population mean which is developed from the study by Mohanty and Sahoo (1995) Bedi (1996) and Kadilar and Cingi (2006) The mean square error (MSE) was obtained by utilizing Taylor series method and was compared with the MSE of the traditional ratio estimator Mohanty and Sahoo's estimator Bedi's estimator and Kadilar and Cingi's estimator in some conditions. This result is satisfied with the numerical study.

คำสำคัญ : ตัวประมาณอัตราส่วน ค่าเฉลี่ยประชากร การสุ่มตัวอย่างแบบอย่างง่าย ตัวแปรช่วย

Keywords : Rastioestimator, Population, Sampling random sampling, Auxiliary Variable

[1] สาขาสถิติประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสานวิทยาเขตขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40000

บทนำ

เมื่อต้องการศึกษาคุณลักษณะของประชากร วิธีการที่จะทำให้ทราบคุณลักษณะของประชากรที่สนใจศึกษาได้ถูกต้องและแม่นยำที่สุดคือ การเก็บข้อมูลจากทุกหน่วยตัวอย่างในประชากร หรือเรียกว่า การสำมะโน แต่หากประชากรที่ต้องการศึกษามีขนาดใหญ่มาก และเป็นไปได้ยากที่จะสามารถเก็บข้อมูลได้ครบทั้งประชากร เนื่องจากอาจมีข้อจำกัดในด้านเวลา ค่าใช้จ่าย หรืออื่นๆ วิธีการที่เหมาะสมที่จะทำให้ได้ข้อมูลที่ใกล้เคียงกับประชากรมากที่สุดก็คือ การเลือกตัวอย่าง ซึ่งจะต้องได้ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนที่ดีของประชากร การที่จะได้ตัวแทนที่ดีของประชากรนั้นจะต้องอาศัยวิธีการทางสถิติที่เรียกว่า เทคนิคการสุ่มตัวอย่าง (Sampling Techniques) เข้ามาช่วย เมื่อได้ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนที่ดีแล้วนั้นก็จะนำค่าสถิติจากตัวอย่าง ไปประมาณค่าพารามิเตอร์ของประชากรก็จะทราบคุณลักษณะที่สนใจศึกษาที่มีค่าใกล้เคียงความเป็นจริง

เมื่อทำการเก็บรวบรวมข้อมูลจากตัวอย่างซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของประชากร โดยการสุ่มตัวอย่างแล้ว ตัวประมาณ (Estimator) ถือเป็นสิ่งสำคัญที่นักสถิติพยายามที่จะพัฒนาเพื่อจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์และสรุปผลไปยังคุณลักษณะของประชากรที่ศึกษา โดยตัวประมาณที่ถูกพัฒนาขึ้นมีหลายรูปแบบ เช่น เมื่อต้องการประมาณค่าเฉลี่ยประชากร $\overline{Y}$ (Population Mean) ตัวประมาณที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อประมาณค่าเฉลี่ยประชากร ได้แก่ ค่าเฉลี่ยตัวอย่าง $\overline{y}$ (Sample Mean) ตัวประมาณอัตราส่วน (Ratio Estimator) $\overline{y}_R$ และตัวประมาณถดถอย (Regression Estimator) $\overline{y}_{lr}$ ซึ่งจะได้กล่าวต่อไป หรือหากต้องการประมาณค่าความแปรปรวนของประชากร S^2 (Population Variance) เราสามารถประมาณด้วยค่าความแปรปรวนของตัวอย่าง s^2 (Sample Variance) และถ้าต้องการประมาณสัดส่วนของประชากร P (Population Proportion) เราสามารถประมาณด้วยสัดส่วนของตัวอย่าง p (Sample Proportion) เป็นต้น

ในการสุ่มตัวอย่างแบบอย่างง่าย ถ้าเลือกตัวอย่างขนาด n จากประชากรขนาด Nโดยกำหนดให้ตัวอย่างแต่ละตัวอย่างมีโอกาสถูกเลือกได้เท่าๆกัน ตัวประมาณที่ใช้ประมาณค่าเฉลี่ยประชากร คือ $\overline{y}=\frac{\sum_{i=1}^{n} y_i}{n}$ ซึ่งตัวประมาณนี้ถือเป็นตัวประมาณที่ดีตัวหนึ่ง เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นตัวประมาณที่ไม่เอนเอียง

นอกจากตัวประมาณค่าเฉลี่ยประชากรข้างต้นแล้ว ยังมีตัวประมาณอีกรูปแบบหนึ่งที่นำตัวแปรช่วย (auxiliary variable: x) เข้ามาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการประมาณค่าเฉลี่ยประชากรให้ดียิ่งขึ้น โดยตัวแปรช่วยนั้นต้องมีความสัมพันธ์กับตัวแปรที่สนใจศึกษา Y โดยตัวประมาณดังกล่าวเรียกว่า ตัวประมาณอัตราส่วน และตัวประมาณถดถอย สำหรับตัวประมาณอัตราส่วนของค่าเฉลี่ยประชากร หรือเรียกว่าตัวประมาณอัตราส่วนของค่าเฉลี่ยประชากรแบบดั้งเดิม (Traditional Ratio Estimator) มีรูปแบบ คือ

$$\overline{y}_R=\frac{\overline{y}}{\overline{x}}\overline{X} \qquad (1)$$

เมื่อ $\overline{y}$ คือ

$\overline{x}$ คือ

$\overline{X}$ คือ

ที่มีค่าความคลาดเคลื่อนกำลังสองเฉลี่ย (Mean Square Error : MSE) คือ

$$MSE(\overline{y}_R) \cong \frac{1-f}{n}(R^2 S_x^2 - 2R\rho S_x S_y + S_y^2) \quad (2)$$

โดย S_x^2 คือ ความแปรปรวนของตัวแปร x

S_y^2 คือ ความแปรปรวนของตัวแปร y

ρ คือ สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของตัวแปร y และ x และ $R = \frac{\overline{y}}{\overline{x}}$

Ochran (1977) กล่าวว่า $\overline{y}_R$ เป็นตัวประมาณที่มีความคงเส้นคงวา (consistent) และเป็นตัวประมาณที่มีความเอนเอียง แต่หากตัวอย่างมีขนาดใหญ่พอความเอนเอียงนี้จะมีขนาดเล็กมากจนไม่ต้องคำนึงถึง สำหรับประสิทธิภาพของตัวประมาณอัตราส่วนนั้นจะขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ระหว่าง Y กับ X ซึ่งก็คือ ตัวประมาณอัตราส่วน $\overline{y}_R$ จะมีประสิทธิภาพดีกว่า $\overline{y}$ เมื่อ $\rho > \frac{1}{2}\frac{C_x}{C_y}$ เมื่อ ρ คือ สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง y และ X

ตัวประมาณอีกรูปแบบหนึ่งที่ได้นำตัวแปรช่วย X มาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการประมาณค่าเฉลี่ยประชากร คือ ตัวประมาณถดถอย มีรูปแบบดังนี้

$$\overline{y}_{lr} = \overline{y} + b(\overline{X} - \overline{x}) \quad (3)$$

ที่มีค่าความคลาดเคลื่อนกำลังสองเฉลี่ย คือ

$$MSE(\overline{y}_{lr}) \cong \frac{1-f}{n} S_y^2 (1-\rho^2) \quad (4)$$

โดยเมื่อ Y และ X มีความสัมพันธ์กันแล้วตัวประมาณถดถอย $\overline{y}_{lr}$ จะมีประสิทธิภาพดีกว่า $\overline{y}$ และเมื่อเปรียบเทียบกับตัวประมาณอัตราส่วนแล้ว พบว่าตัวประมาณ $\overline{y}_{lr}$ มีประสิทธิภาพดีกว่า $\overline{y}_R$ ยกเว้นกรณีที่ $R = \rho S_y / S_x$

มีผู้วิจัยหลายท่านพยายามที่จะปรับปรุงตัวประมาณอัตราส่วนให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น โดยได้นำสารสนเทศของตัวแปรช่วย x เช่น สัมประสิทธิ์ความผันแปร (Coefficient of Variation: C_X) สัมประสิทธิ์ความโด่ง (Coefficient of Kurtosis: $\beta_2(x)$) สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Coefficient of Correlation : ρ_{xy}) ยอดรวมประชากรของตัวแปรช่วย (Population Total : X) ค่าต่ำสุด (Min: x_{min}) ค่าสูงสุด (Max: x_{max}) มาประกอบการประมาณค่าเฉลี่ยประชากร เป็นต้นว่า Mohanty and Sahoo (1995) ได้นำเสนอตัวประมาณอัตราส่วนของค่าเฉลี่ยประชากร โดยได้นำต่ำสุดและค่าสูงสุดประชากรของตัวแปรช่วย X มาประกอบการประมาณค่าเฉลี่ยประชากร คือ

$$t_{MS1} = \frac{\bar{y}}{\nu}\bar{V} \qquad (5)$$

$$t_{MS2} = \frac{\bar{y}}{\omega}\overline{\Omega} \qquad (6)$$

ที่มีค่าความคลาดเคลื่อนกำลังสองเฉลี่ย คือ

$$MSE(t_{MS1}) \cong \frac{1-f}{n}\left(R_1^2 S_x^2 - 2R_1 \rho S_y S_x + S_y^2\right) \qquad (7)$$

$$MSE(t_{MS2}) \cong \frac{1-f}{n}\left(R_2^2 S_x^2 - 2R_2 \rho S_y S_x + S_y^2\right) \qquad (8)$$

โดยตัวประมาณ t_{MS1} และ t_{MS2} จะมีประสิทธิภาพดีกว่า $\bar{y}$ เมื่อ $K > \frac{1}{2m_1}$ และ $K > \frac{1}{2m_2}$ ตามลำดับ

โดย $R_1 = \frac{\bar{Y}}{\bar{X} + X_{min}}$, $R_2 = \frac{\bar{Y}}{\bar{X} + X_{max}}$, $\bar{\nu} = \frac{x + X_{min}}{X_{max} + X_{min}}$, $\bar{V} = \frac{X + X_{min}}{X_{max} + X_{min}}$

$$\bar{\omega} = \frac{x + X_{max}}{X_{max} + X_{min}}, \bar{\Omega} = \frac{X + X_{max}}{X_{max} + X_{min}}$$

$$K \in (0, \frac{1}{2m_2}), l = \frac{n}{N-n}$$

$$m_1 = 1 + \frac{X_{min}}{\bar{X}}, m_2 = 1 + \frac{X_{max}}{\bar{X}}$$

Bedi (1996) ได้นำเสนอตัวประมาณอัตราส่วนของค่าเฉลี่ยประชากร โดยได้นำยอดรวมประชากรของตัวแปรช่วย (X) มาประกอบการประมาณค่าเฉลี่ยประชากร คือ

$$\hat{T}_R = \bar{y}\left(\frac{\bar{Z}}{\bar{z}}\right) = \bar{y}\left(\frac{\bar{X}+X}{\bar{x}+X}\right) \qquad (9)$$

ที่มีค่าความคลาดเคลื่อนกำลังสองเฉลี่ย คือ

$$MSE(\hat{T}_R) \cong \frac{1-f}{n}\left(\frac{R_T^2 S_x^2}{(N+1)^2} - \frac{2R_T \rho S_y S_x}{N+1} + S_y^2\right) \qquad (10)$$

โดยที่

$$R_T = \frac{\bar{y}}{\bar{X}+X}$$

โดยตัวประมาณ $\hat{T}_R$ จะมีประสิทธิภาพดีกว่า $\bar{y}$ เมื่อ $\rho \frac{C_y}{C_x} > \frac{1}{2(N+1)}$

Kadilar and Cingi (2006) ได้ปรับปรุงตัวประมาณอัตราส่วนของค่าเฉลี่ยประชากร โดยอาศัยตัวประมาณอัตราส่วนของ Singh และ Tailor ตัวประมาณอัตราส่วนของค่าเฉลี่ยประชากรที่นำเสนอมีดังนี้

$$\bar{y}_{pr1} = \frac{\bar{y}}{\bar{x}C_x + \rho}(\bar{X}C_x + \rho) \quad (11)$$

$$\bar{y}_{pr2} = \frac{\bar{y}}{\bar{x}\rho + C_x}(\bar{X}\rho + C_x) \quad (12)$$

$$\bar{y}_{pr3} = \frac{\bar{y}}{\bar{x}\beta_2(x) + \rho}(\bar{X}\beta_2(x) + \rho) \quad (13)$$

$$\bar{y}_{pr4} = \frac{\bar{y}}{\bar{x}\rho + \beta_2(x)}(\bar{X}\rho + \beta_2(x)) \quad (14)$$

ซึ่งมีค่าความคลาดเคลื่อนกำลังสองเฉลี่ย คือ

$$MSE(\bar{y}_{pr1}) \cong \frac{1-f}{n}\left(R_{pr1}^2 S_x^2 - 2R_{pr1}\rho S_x S_y + S_y^2\right) \quad (15)$$

$$MSE(\bar{y}_{pr2}) \cong \frac{1-f}{n}\left(R_{pr2}^2 S_x^2 - 2R_{pr2}\rho S_x S_y + S_y^2\right) \quad (16)$$

$$MSE(\bar{y}_{pr3}) \cong \frac{1-f}{n}\left(R_{pr3}^2 S_x^2 - 2R_{pr3}\rho S_x S_y + S_y^2\right) \quad (17)$$

$$MSE(\bar{y}_{pr4}) \cong \frac{1-f}{n}\left(R_{pr4}^2 S_x^2 - 2R_{pr4}\rho S_x S_y + S_y^2\right) \quad (18)$$

โดยที่

$$R_{pr1} = \frac{\bar{y}C_x}{\bar{X}C_x + \rho}, \quad R_{pr2} = \frac{\bar{y}\rho}{\bar{x}\rho + C_x}, \quad R_{pr3} = \frac{\bar{y}\beta_2(x)}{\bar{x}\beta_2(x) + \rho}, \quad R_{pr4} = \frac{\bar{y}\rho}{\bar{x}\rho + \beta_2(x)}$$

และตัวประมาณ $\bar{y}_{prj}$ จะมีประสิทธิภาพดีกว่า $\bar{y}_R$ เมื่อ

$$(R_{prj}^2 - R^2)S_x^2 - 2(R_{prj} - R)S_x S_y < 0, \quad j = 1, 2, 3, 4 \quad (19)$$

จากงานวิจัยข้างต้นผู้วิจัยเห็นว่า เมื่อเพิ่มสารสนเทศของตัวแปรช่วย x เข้าไปประกอบการประมาณค่าเฉลี่ยประชากร จะทำให้ตัวประมาณอัตราส่วนดังกล่าวน่าจะมีประสิทธิภาพดีขึ้น ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาตัวประมาณอัตราส่วนของค่าเฉลี่ยประชากรตัวใหม่ โดยอาศัยแนวความคิดของ ว่า Mohanty and Sahoo (1995) Bedi (1996) และ Kadilar and Cingi (2006) ปรับปรุงเข้ากับตัวประมาณอัตราส่วนตัวอื่นที่ได้พัฒนามาแล้ว

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อเสนอตัวประมาณอัตราส่วนตัวใหม่สำหรับประมาณค่าเฉลี่ยประชากร

วิธีการวิจัย

วิธีการวิจัยมีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

1. จากการศึกษางานวิจัยข้างต้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาตัวประมาณอัตราส่วนตัวใหม่ โดยตัวประมาณอัตราส่วนที่นำเสนอ คือ

$$\bar{y}_1 = \frac{\bar{y}}{(\bar{x}\rho + X_{min})}(\bar{x}\rho + X_{min}) \qquad (20)$$

$$\bar{y}_2 = \frac{\bar{y}}{(\bar{x}\, X_{min} + X)}(\bar{X}X_{min} + X) \qquad (21)$$

2. หาความคลาดเคลื่อนกำลังสองเฉลี่ยของตัวประมาณอัตราส่วนทีนำเสนอ โดยใช้อนุกรมเทเลอร์

3. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวประมาณอัตราส่วนที่นำเสนอ กับตัวประมาณอัตราส่วนแบบดั้งเดิม และตัวประมาณอัตราส่วนของ Mohanty and Sahoo (1995) Bedi (1996) และ Kadilar and Cingi (2006) โดยใช้ค่าความคลาดเคลื่อนกำลังสองเฉลี่ย เรากล่าวว่า $\hat{\theta}_1$ เป็นตัวประมาณที่มีประสิทธิภาพดีกว่า $\hat{\theta}_2$ เมื่อ $MSE(\hat{\theta}_1) < MSE(\hat{\theta}_2)$

4. แสดงตัวอย่างการคำนวณ

ผลการวิจัย

ผลการวิจัยแสดงเป็นขั้นตอนได้ดังนี้

1. การหาค่าความคลาดเคลื่อนกำลังเฉลี่ยของตัวประมาณ

$$\bar{y}_1 = \frac{\bar{y}}{(\bar{x}\rho + X_{min})}(\bar{x}\rho + X_{min})$$

$$\bar{y}_2 = \frac{\bar{y}}{(\bar{x}X_{min} + X)}(\bar{X}X_{min} + X)$$

หาได้จากอนุกรมเทย์เลอร์

$$h(\bar{x}, \bar{y}) \cong \left[\begin{array}{l} h(\bar{X}, \bar{Y}) + \left.\frac{\partial h(c,d)}{\partial c}\right|_{\bar{X},\bar{Y}} (\bar{x} - \bar{X}) \\ + \left.\frac{\partial h(c,d)}{\partial d}\right|_{\bar{X},\bar{Y}} (\bar{y} - \bar{Y}) \end{array} \right] \qquad (22)$$

เมื่อ c,d คือ ตัวแปรสุ่ม

โดยกำหนดให้ $\bar{y}_1 = h(\bar{x}, \bar{y})$, $\bar{Y} = h(\bar{X}, \bar{Y})$ จะได้

$$\bar{y}_1\text{-}\bar{Y} \cong \left[\begin{array}{l} \left.\frac{\partial h(\bar{x}, \bar{y})}{\partial \bar{x}}\right|_{\bar{X},\bar{Y}} (\bar{x} - \bar{X}) \\ + \left.\frac{\partial h(\bar{x}, \bar{y})}{\partial \bar{y}}\right|_{\bar{X},\bar{Y}} (\bar{y} - \bar{Y}) \end{array} \right] \qquad (23)$$

จาก (22), (23) เห็นความไม่สอดคล้องระหว่าง c,d

$$\cong \left(-\frac{\bar{Y}\rho}{\bar{x}\rho + X_{min}} \right)\left(\bar{x}\text{-}\bar{X}\right) + \left(\bar{y}\text{+}\bar{Y}\right)$$

$$(\bar{y}_1 - \bar{Y})^2 \cong \left[\begin{array}{l} \left(\frac{(\bar{Y}\rho)^2}{(\bar{x}\rho + x_{min})^2}\right)(\bar{x} - \bar{X})^2 \\ -2\left(\frac{\bar{Y}\rho}{(\bar{x}\rho + x_{min})}\right)(\bar{x} - \bar{X})(\bar{y}\text{-}\bar{Y}) + (\bar{y}\text{-}\bar{Y})^2 \end{array} \right]$$

$$E(\bar{y}_1\text{-}\bar{Y})^2 \cong \left[\begin{array}{l} \left(\frac{(\bar{Y}\rho)^2}{(\bar{x}\rho + X_{min})^2}\right) V(\bar{x}) \\ -2\left(\frac{\bar{Y}\rho}{(\bar{x}\rho + X_{min})}\right) Cov(\bar{x}, \bar{y}) + V(\bar{y}) \end{array} \right]$$

ให้ $R_1 = \frac{\bar{Y}\rho}{\bar{x}\rho + X_{min}}$, $S_{yx} = \rho S_x S_y$ จะได้

$$MSE(\bar{y}_i) \cong \frac{1-f}{n}\left(R_1^2 S_x^2 - 2R_1 \rho S_x S_y + S_y^2\right) \qquad (24)$$

$$MSE(\bar{y}_i) \cong \frac{1-f}{n}\left(R_i^2 S_x^2 - 2R_i \rho S_x S_y + S_y^2\right), i = 1,2 \qquad (25)$$

โดย $R_2 = \frac{\bar{Y}X_{min}}{\bar{X}X_{min} + X}$

2. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวประมาณ

เราทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวประมาณโดยการเปรียบเทียบ MSE ดังนี้

2.1 ประสิทธิภาพของ $\bar{y}_i$ เทียบกับ $\bar{y}_R$ $MSE(\bar{y}_i) < MSE(\bar{y}_R)$

$$(R_i^2 - R^2)S_x^2 - 2(R_i - R)\rho S_x S_y < 0, \ i = 1, 2 \qquad (26)$$

นั่นคือ เมื่อเป็นไปตามเงื่อนไข (24) แล้ว $\bar{y}_i$ จะ มีประสิทธิภาพดีกว่า $\bar{y}_R$

2.2 ประสิทธิภาพของ $\overline{y}_i$ เทียบกับ t_{MS1} และ t_{MS2}

$$MSE(\overline{y}_i) < MSE(t_{MS1}) \ (R_i^2 - R_{MS1}^2)S_x^2 - 2(R_i - R_{MS1})\rho S_x S_y < 0, \ i = 1,2 \qquad (27)$$

$$MSE(\overline{y}_i) < MSE(t_{MS2}) \ (R_i^2 - R_{MS2}^2)S_x^2 - 2(R_i - R_{MS2})\rho S_x S_y < 0, \ i = 1,2 \qquad (28)$$

นั่นคือ เมื่อเป็นไปตามเงื่อนไข (25) และ (26) แล้ว $\overline{y}_i$ จะ มีประสิทธิภาพดีกว่า t_{MS1} และ t_{MS2}

2.3 ประสิทธิภาพของ $\overline{y}_i$ เทียบกับ $\hat{T}_R$

$$MSE(\overline{y}_i) < MSE(\hat{T}_R) \ ((N+1)^2 R_i^2 - R_T^2)\frac{S_x^2}{(N+1)^2} - 2(N+1)((N+1)R_i - R_T)\rho S_x S_y < 0, \ i = 1,2 \qquad (29)$$

นั่นคือ เมื่อเป็นไปตามเงื่อนไข (27) แล้ว $\overline{y}_i$ จะมีประสิทธิภาพดีกว่า $\hat{T}_R$

2.4 ประสิทธิภาพของ $\overline{y}_i$ เทียบกับ $\overline{y}_{prj}$

$$MSE(\overline{y}_i) < MSE(\overline{y}_{prj}) \ (R_i^2 - R_{prj}^2)S_x^2 - 2(R_i - R_{prj})\rho S_x S_y < 0, \ i = 1,2,; \ j = 1,2,3,4 \qquad (30)$$

นั่นคือ เมื่อเป็นไปตามเงื่อนไข (28) แล้ว $\overline{y}_i$ จะมีประสิทธิภาพดีกว่า $\overline{y}_{prj}$

3. ตัวอย่างการคำนวณ

ประชากรที่เป็นตัวอย่างการคำนวณ โดยจำนวนโคที่ให้น้ำนม เป็นตัวแปร y ซึ่งเป็นตัวแปรที่สนใจศึกษา และจำนวนโคที่ให้น้ำนมที่ได้จากการสำมะโนเมื่อปีที่ผ่านมาเป็นตัวแปรช่วย x จาก 84 หมู่บ้านของ tehsil (ที่มา: Daroga Singh (1986, p. 176)) ข้อมูลลักษณะประชากร มีดังต่อไปนี้

$N = 84$ $\overline{Y} = 816.45$ $C_x = 0.83$

$n = 20$ $\overline{X} = 641.05$ $C_y = 5.22$

$\rho = 0.89$ $\beta_2(x) = 4.29$ $S_{yx} = 273,378.50$

$S_y = 576.82$ $S_x = 530.54$

$X_{max} = 2,242$ $X_{min} = 111$

ตารางที่ 1 ค่า MSE ของตัวประมาณอัตราส่วน

ตัวประมาณ	ค่า MSE
$\bar{y}_R$	3,540.52
$\hat{T}_R$	12,664.39
t_{MS1}	**2,704.42**
t_{MS2}	12,631.28
$\bar{y}_{pr1}$	3,526.69
$\bar{y}_{pr2}$	3,528.64
$\bar{y}_{pr3}$	3,537.84
$\bar{y}_{pr4}$	3,480.07
$\bar{y}_1$	**2,791.50**
$\bar{y}_2$	**2,819.78**

จาก**ตารางที่ 1** พบว่า ค่า MSE ของตัวประมาณ $\bar{y}_1$ มีค่าเท่ากับ 2,791.50 ซึ่งน้อยกว่าตัวประมาณอัตราส่วน $\bar{y}_R$ $\hat{T}_R$ t_{MS2} $\bar{y}_{pr1}$ $\bar{y}_{pr2}$ $\bar{y}_{pr3}$ และ $\bar{y}_{pr4}$ และผลลัพธ์ดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในข้อ 2 แต่จะมีค่า MSE มากกว่าตัวประมาณอัตราส่วน t_{MS1}

ค่า MSE ของตัวประมาณ $\bar{y}_2$ มีค่าเท่ากับ 2,819.78 ซึ่งน้อยกว่าตัวประมาณอัตราส่วน $\bar{y}_R$ $\hat{T}_R$ t_{MS2} $\bar{y}_{pr1}$ $\bar{y}_{pr2}$ $\bar{y}_{pr3}$ และ $\bar{y}_{pr4}$ และผลลัพธ์ดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในข้อ 2 แต่จะมีค่า MSE มากกว่าตัวประมาณอัตราส่วน t_{MS1}

สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยสรุปได้ว่า ตัวประมาณที่นำเสนอ $\bar{y}_i$ มีประสิทธิภาพดีกว่าตัวประมาณอัตราส่วนของตัวประมาณ $\bar{y}_R$ $\hat{T}_R$ t_{MS1} t_{MS2} และ $\bar{y}_{pri}$ แบบมีเงื่อนไข และผลการวิจัยข้างต้นสอดคล้องกับตัวอย่างการคำนวณ

ข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยครั้งต่อไปผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะดังต่อไปนี้

1. ควรศึกษาในการสุ่มตัวอย่างแบบอื่น เช่น การสุ่มตัวอย่างแบบแบ่งชั้นภูมิ เป็นต้น
2. ควรศึกษาโดยใช้ตัวแปรช่วย 2 ตัวแปร

เอกสารอ้างอิง

สุชาดา กีระนันทน์. (2538). ทฤษฎีและวิธีการสำรวจตัวอย่าง. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุรินทร์ นิยมางกูร. (2546). เทคนิคการสุ่มตัวอย่าง. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Cochran, W.G. (1977). Sampling Techniques. New York: John Wiley and Sons.

Daroga Singh, M. A. (1986). Theory and Analysis of Sample Survey Designs. New Delhi, India.

Mohanty, S. and Sahoo, J. (1995). A note on improving the ratio method of estimators through linear transformatiom using certain known population parameters. Sankhya B. 57(1): 93-102.

Bedi, P. K. (1996). Efficient Utilization of Auxiliary Information at Estimation Stage.Biometrical. Journal. 38(8): 973-976.

Kadilar, C. and Cingi, H. (2006). An improvement in estimating the population mean by using the correlation coefficient. Hacettepe Journal of Mathematics and Statistics. 35(1): 103-109.



Stang Mongkolsuk Library
Faculty of Science, Mahidol University

ข้อแนะนำในการเขียนบทความลงวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ประเภทของเรื่องที่จะตีพิมพ์

1. รายงานผลการวิจัยและค้นคว้าหรือการสำรวจที่ยังไม่เคยตีพิมพ์ในวารสารหรือหนังสืออื่นมาก่อน

2. บทความปริทัศน์ ได้แก่ งานเขียนที่รวบรวมหรือเรียบเรียงจากเอกสารหรือหนังสือต่าง ๆ เพื่อเผยแพร่และฟื้นฟูงานด้านวิชาการระดับต่าง ๆ

3. บทความแสดงข้อคิดเห็นหรือข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในด้านวิชาการ เรื่องแปล ข่าววิชาการ ย่อความจากงานวิจัยหรือหนังสือใหม่ที่น่าสนใจ

รูปแบบของการเขียนและเตรียมต้นฉบับ

1. ต้นฉบับ ต้องเป็นตัวพิมพ์ Angsana New

1.1 ชื่อเรื่อง ขนาดตัวอักษร 20 ตัวเข้ม ตำแหน่งตรงกลาง มีทั้งชื่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

1.2 ชื่อผู้เขียน ขนาดตัวอักษร 16 เอน ตำแหน่งขวาสุด และใส่หมายเลขไว้ท้ายนามสกุล เพื่อการระบุที่อยู่ด้านล่าง

1.3 หัวข้อใหญ่ในแต่ละส่วน ขนาดตัวอักษร 16 ตัวเข้ม ตำแหน่งซ้ายสุด ยกเว้น บทคัดย่อ และ Abstract อยู่ตรงกลาง หัวข้อย่อยตามความเหมาะสม

1.4 เนื้อความ ขนาดตัวอักษร 14

1.5 คำว่า รูปที่ x และตารางที่ x ขนาดตัวอักษร 14 ตัวเข้ม ส่วนข้อความบรรยายต่อท้ายตัวปกติ

1.6 ที่อยู่ ขนาดอักษร 12

1.7 ช่องห่างระหว่างบรรทัดตามมาตรฐาน

1.8 พิมพ์ลงในกระดาษขาว A4 (โรเนียวสั้น) โดยใช้กระดาษหน้าเดียว ความยาวไม่เกิน 10 หน้า ส่งต้นฉบับ 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) ใช้เฉพาะที่จำเป็นเพื่อขยายหรือให้รายละเอียดเพิ่มเติมแก่ใจความเฉพาะตอนในบทความ

9. ตารางและภาพประกอบ คำบรรยายประกอบตารางหรือภาพประกอบควรจะสั้นและชัดเจน ถ้าเป็นภาพถ่ายให้ใช้ภาพขาว-ดำ ขนาดโปสการ์ด ภาพเขียนลายเส้นควรเขียนด้วยหมึกดำ ภาพที่เขียนต้องชัดเจนและมีขนาดที่เหมาะสม

10. เอกสารอ้างอิง หรือบรรณานุกรม แนะนำให้เขียนตามแบบที่ทางวารสารกำหนด

11. หากไม่ปฏิบัติตามข้อแนะนำในการเขียนบทความ บทความของท่านอาจไม่ได้รับการตีพิมพ์หรือตีพิมพ์ล่าช้า

ส่งต้นฉบับมาที่

กองบรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์ มข.
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002
E-mail: kku_scijournal@kku.ac.th

อภินันทนาการสำหรับผู้เขียน

เรื่องที่ได้รับการตีพิมพ์ ผู้เขียนจะได้รับวารสารฉบับนั้น 1 เล่ม

ตัวอย่าง

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันและกรดไขมันของจิ้งหรีดทองลาย (*Gryllus* sp.) ที่เลี้ยงเพื่อการค้า

บรรจง เชื้อเมืองพาน[1] วิรัช ว่องพัฒนากุล[2] และ ปวีณา พงษ์ดนตรี [1]*

บทคัดย่อ

Xxxx

การเขียนเอกสารอ้างอิงในวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

เอกสารอ้างอิง (Reference) หมายถึง เอกสารหรือส่วนหนึ่งของเอกสารที่อ้างอิงถึงหรือแปลมาโดยตรง การเขียนเอกสารอ้างอิงในเนื้อหานั้น ให้ใช้ระบบชื่อและปี เช่น Williams (2001) รายงานว่า... หรือ... (Williams, 2001) การเขียนเอกสารอ้างอิงในตอนท้ายบทความนั้น ให้ใส่เฉพาะเล่มที่มีการอ้างไว้แล้วในเนื้อหาเท่านั้น หากอ้างจากเล่มภาษาไทย ต้องเขียนทั้งชื่อและนามสกุล

บรรณานุกรม (Bibliography) หมายถึง เอกสารที่ใช้อ้างถึงในลักษณะที่สรุปเป็นหลักการหรือทฤษฎีโดยมิได้อ้างอิงหรือแปลมาโดยตรง

การเขียนเอกสารอ้างอิง หรือบรรณานุกรม มีแนวทางการเขียนดังนี้

1. หนังสือ

ก. ภาษาไทย

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

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

ใบสั่งลงโฆษณา
ในวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

เขียนที่.....

วันที่.....

เรียน บรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ข้าพเจ้า.....ตำแหน่ง.....

เป็นตัวแทนของ (บริษัท/ห้างร้าน/องค์การ).....

ที่อยู่.....โทรศัพท์.....

โทรสาร..... มีความประสงค์จะลงโฆษณาในวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ดังรายการต่อไปนี้

ในฉบับ (สี)

○ เต็มหน้า

○ ครึ่งหน้า

โดยข้าพเจ้าขอให้ลงโฆษณา จำนวน.....ฉบับ นับตั้งแต่ฉบับแรก ที่จะพิมพ์ในครั้งต่อไป หลังจากที่ท่านได้รับหนังสือฉบับนี้แล้ว

พร้อมกันนี้ ข้าพเจ้าได้ส่งต้นฉบับเพื่อลงโฆษณา (แผ่น CD ข้อมูล) และเงินค่าโฆษณาเป็นธนาณัติ ในนาม คุณสุภาพร พิมพ์วาปี สั่งจ่าย ปท. มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002 เป็นจำนวนเงิน.....บาท (.....)

ลงนาม.....

(.....)

อัตราค่าโฆษณาในวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

		ลง 1 ฉบับ (บาท)	ลง 4 ฉบับ (บาท)
ในฉบับ (สี)	เต็มหน้า	1,000	3,600
	ครึ่งหน้า	500	1,800

ใบสมัครเป็นสมาชิก
วารสารวิทยาศาสตร์ มข.

เขียนที่.....

วันที่.....

เรียน บรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

ข้าพเจ้า.....

ที่อยู่.....รหัสไปรษณีย์.....

โทรศัพท์.....โทรสาร..... มีความประสงค์จะสมัคร

สมาชิก “วารสารวิทยาศาสตร์ มข.” ตั้งแต่ฉบับที่.....ปีที่.....ถึงฉบับที่.....

ปีที่..... รวมทั้งสิ้น.....ฉบับ

พร้อมกันนี้ ข้าพเจ้าได้ส่งเงินค่าสมัครสมาชิก เป็นธนาณัติ ในนาม คุณสุภาพร พิมพ์วาปี สั่งจ่าย ปท. มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002 เป็นจำนวนเงิน .....บาท (.....)

ลงนาม.....

(.....)

กำหนดออกของวารสารวิทยาศาสตร์ มข. และอัตราค่าสมัครสมาชิก
ปีละ 4 ฉบับ เป็นจำนวนเงิน 200 บาท

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

พิมพ์ที่ หจก. ขอนแก่นการพิมพ์ โทร. (043) 221938, 220128
64 - 66 ถนนรื่นรมย์ อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 2553
E-mail : kk_p902@hotmail.com
E-mail : khonkaenprint@yahoo.com

หนังสือในโครงการผลิตตำรา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Date Due
(กำหนดคืน)

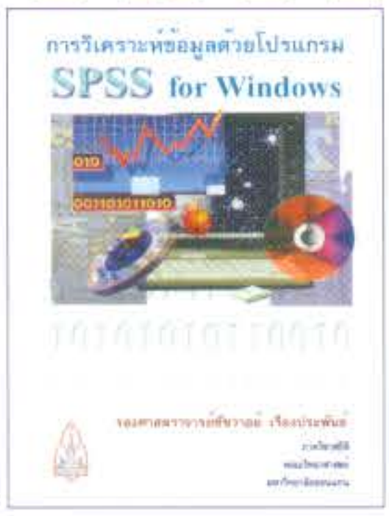


สถิติพื้นฐาน

พร้อมตัวอย่างการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม
MINITAB SPSS และ SAS

รองศาสตราจารย์ชัชวาลย์ เรืองประพันธ์
พิมพ์ครั้งที่ 5 2543 • 510 หน้า
ISBN 974-675-666-4
ราคา 200 บาท





การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS for Windows

รองศาสตราจารย์ชัชวาลย์ เรืองประพันธ์
2544 • 620 หน้า
ISBN 974-654-608-2
ราคา 300 บาท



โอต
ryote

2551 • 164 หน้า
ISBN 978-974-10-2673-9
ราคา 120 บาท



การวิเคราะห์ฟังก์ชันนัลขั้นแนะนำ

รองศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ ไวท์ยางกูร
2547 • 344 หน้า
ISBN 974-367-958-8
ราคา 200 บาท



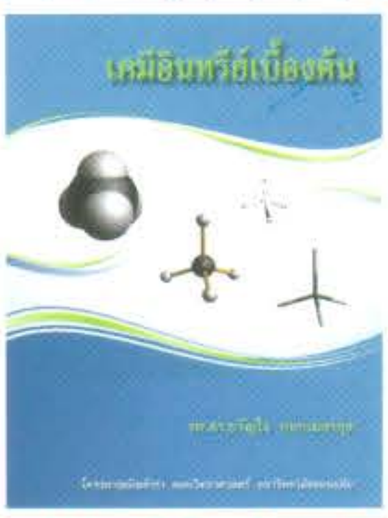
พอลิเมอร์และชีวโมเลกุลในสารประกอบอินทรีย์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัฒนา ธีรพรชัยสิทธิ์
2553 • 112 หน้า
ISBN 978-616-7183-57-2
ราคา 80 บาท



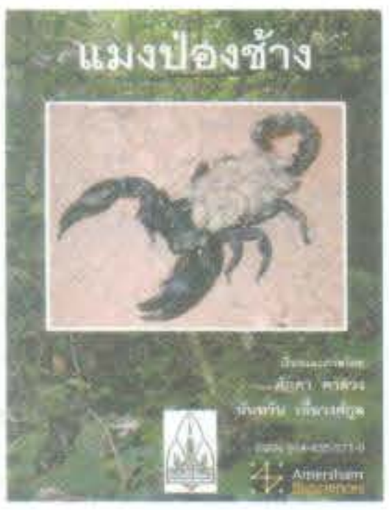
สเปกโทรสโกปี ในการพิสูจน์โครงสร้างของสารอินทรีย์

รองศาสตราจารย์ ดร. สมเดช กนกเมธากุล
2547 • 238 หน้า
ISBN 974-435-348-1
ราคา 180 บาท



เคมีอินทรีย์เบื้องต้น

รองศาสตราจารย์ ดร. ขวัญใจ กนกเมธากุล
2553 • 317 หน้า
ISBN 978-616-7183-75-6
ราคา 240 บาท



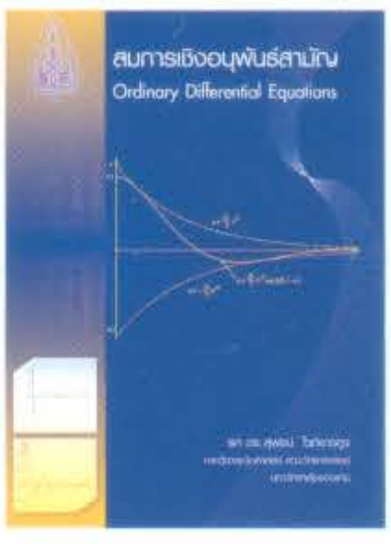
แมงป่องช้าง

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศักดา ดาดวง
นางสาวนันทวัน เอื้อวงศ์กูล
2547 • 64 หน้า
ISBN 974-435-571-9
ราคา 160 บาท



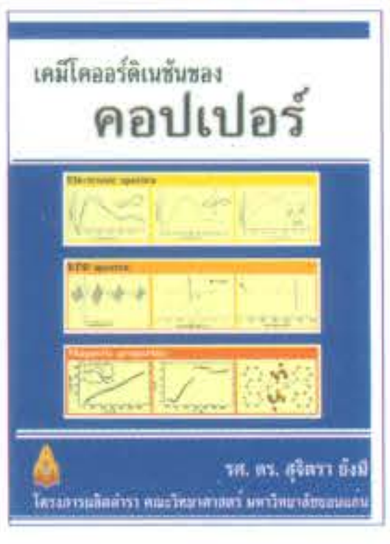
อนุกรมวิธานระดับโมเลกุลของพืช

รองศาสตราจารย์ ดร. อรุณรัตน์ ฉวีราช
2553 • 172 หน้า
ISBN 978-616-7183-76-3
ราคา 160 บาท



สมการเชิงอนุพันธ์สามัญ
Ordinary Differential Equations

รองศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ ไวท์ยางกูร
2550 • 470 หน้า
ISBN 978-974-7707-55-7
ราคา 240 บาท



เคมีโคออร์ดิเนชันของ คอปเปอร์

รองศาสตราจารย์ ดร. สุจิตรา ยังมี
2553 • 260 หน้า
ISBN 978-616-223-007-3
ราคา 200 บาท

ท่านที่สนใจหนังสือในโครงการผลิตตำรา ติดต่อสั่งซื้อได้ที่... **รองศาสตราจารย์ชัชวาลย์ เรืองประพันธ์**
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002 โทรศัพท์/โทรสาร 0 4320-2375 E-mail: chatchav@kku.ac.th