

## บทที่ 2

### การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

อะคริลามิด เป็นสารประกอบอะลิฟาติกเอนด์ที่มีพิษต่อระบบประสาท (Dearfield *et al.*, 1988; Tilson & Cabe, 1979) และมีรายงานยืนยันว่ามีแนวโน้มสูงที่จะเป็นสารก่อมะเร็งในคน (IARC, 1994; Segerback *et al.*, 1995; Tareke *et al.*, 2000) เมื่อคนได้รับอะคริลามิดเข้าไป จะเกิดความผิดปกติที่ระบบประสาทสันหลัง ส่วนกลางและระบบประสาทรอบนอก (Klaasen & Doull, 1986; Shanker & Seth, 1986; Tilson, 1981) โดยพิษของอะคริลามิดเชื่อว่าเกิดจากสารตัวกลางชื่อ ไกลซิตามิด ที่ได้จากการบวนการสลายอะคริลามิดภายในเซลล์ เข้าจับกับดีเอ็นเอและทำลายรหัสพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (Svensson *et al.*, 2003; Tareke *et al.*, 2000)

ในสภาวะโดยทั่วไป สารอะคริลามิดมีสถานะเป็นของแข็ง โนเลกูลเดี่ยวที่มีสีอ่อนจนถึงสีขาวที่อยู่ในรูปของผลึกที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิห้อง สามารถละลายได้ในน้ำหรือตัวทำละลายที่มีขึ้น เนื่องจากสารอะคริลามิดมีคุณสมบัติเป็น โนเลกูลเดี่ยว จึงทำให้ง่ายต่อการเกิดปฏิกิริยาโพลิเมอร์ไซซ์ัน (Polymerization) เมื่อถูกหลอมเหลวหรืออยู่ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต อย่างไรก็ตาม สารอะคริลามิดสามารถซึมผ่านผิวหนัง เยื่อหุ้น ที่มีลักษณะเป็นเมือก (Mucous membranes) ได้แก่ ปอดหรือทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็ว (Klaasen & Doull, 1986; Merck, 1989) เคยมีรายงานว่า พนสารอะคริลามิดตกค้างในร่างกายของคนงานมากกว่าสองหมื่นคนที่ทำงานในโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้อะคริลามิดเป็นสารเคมีในกระบวนการผลิต คาดว่า การตกค้างของสารอะคริลามิดนั้น เกิดจากการสัมผัสหรือสูดไอระเหยของสารอะคริลามิดเข้าไปในระบบทางเดินหายใจโดยความรู้สึกไม่ถึงการณ์ (Howard, 1989; IARC, 1986; Kirk-Othmer, 1978) มีรายงานพบว่า เมื่อคนและสัตว์ได้รับสารอะคริลามิดเข้าไป จะเกิดความผิดปกติที่ระบบประสาทสันหลัง ส่วนกลางและระบบประสาทรอบนอก (Klaasen & Doull, 1986; Shanker & Seth, 1986; Tilson, 1981) รวมทั้งส่งผลทำให้เกิดความผิดปกติต่อการแบ่งเซลล์ในระบบไมโทติก (Mitotic) และไมโอติก (Meiotic) ของสัตว์และพืชบางชนิดอีกด้วย (Shairashi, 1978; Shanker *et al.*, 1987)

จากอดีตจนถึงปัจจุบัน สารอะคริลามิดเป็นที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางในกระบวนการอุตสาหกรรม ไม่ว่า จะเป็นอุตสาหกรรมน้ำมัน การผลิตกระดาษ หนังพิมพ์ เครื่องสำอาง และการทำคอนแทคเลนส์ (Kirk-Othmer, 1978; Kirk-Othmer, 1979; Sax & Lewis, 1987; Sittig, 1985) นิยมใช้สารอะคริลามิดในปฏิกิริยาที่ต้องการการสังเคราะห์โพลิเมอร์ (Polymer) หรือการผลิตพลาสติก โดยเป็นสารที่ช่วยในการโพลิเมอร์ไรส์ (Polymerizing agent) ตัวประสาน (Grouting agent) สารช่วยเพิ่มความเสถียร (Stabilizer) การทำแข็ง (Hardener) การทำความ

หนา (Thickener) และสารช่วยเพิ่มความแข็งแรง (Strengthener) หรือใช้ในรูปของโพลีเมอร์ที่รู้จักกันดี คือ โพลีอะคริลามิด (Polyacrylamide) ในกระบวนการการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมหรือโรงงานน้ำมัน (Prasad, 1982) เนื่องจากการขยายตัวของอุตสาหกรรมต่างๆ ทำให้ในแต่ละปีมีการใช้สารอะคริลามิดมากกว่า ส่องแสงดัน (Nagasawa & Yamada, 1989) จากการใช้อxygrogenated polyacrylamide ไม่มีการควบคุมหรือกำจัดสารอะคริลามิดอย่างดีพอ จึงทำให้มีการปนเปื้อนของสารอะคริลามิดในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมปริมาณสูงถึงร้อยละ 5-0.3 ทำให้เกิดการตกค้างของสารอะคริลามิดในสิ่งแวดล้อมโดยทั่วไป สิ่งแวดล้อมทางทะเลรวมทั้งในระบบนิเวศของพืช (Cherry et al., 1956; Croll et al., 1974; Igisu et al., 1975)

ในอดีตมีรายงานการค้นพบจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถย่อยสารกลุ่มอะไมด์ได้ ทั้งกลุ่มอะลิฟติก (Aliphatic) และกลุ่มอะโรมาติก (Aromatic) (Friedrick & Mitrenga, 1981; Grant & Wilson 1973; Hynes & Pateman, 1970; Kagayama & Ohe, 1990) แต่สำหรับสารอะคริลามิดนั้น ยังไม่ค่อยมีการค้นพบจุลินทรีย์ที่สามารถใช้อะคริลามิดเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญมากนัก ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากการ降解ของสารอะคริลามิดที่มีผลขับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลู tha ไทโอนอส-ทรานส์เฟอเรส (Glutathione-s-*trans*-ferase) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการกำจัดสารพิษภายในเซลล์ (Detoxication) โดยการเข้าจับกับหมู่ชัลไฮดริล (Sulphydryl group) ของเอนไซม์ดังกล่าว (Dixit et al., 1980) ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ (Cavins & Friedman, 1968) ด้วยเหตุนี้ จึงทำให้วิธีการกำจัดการตกค้างของสารอะคริลามิดในอดีตทำได้เพียงแค่การโพลีเมอร์ไรส์อะคริลามิดให้เป็นโพลีอะคริลามิด ซึ่งเป็นรูปที่ไม่มีพิษ แต่จากข้อจำกัดของปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชั่นที่ต้องใช้สารเคมีเพิ่มเติมที่มีราคาแพง เช่น แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulphate) และทีเมด (*N, N, N', N'*-Tetramethylenediamine; TEMED) สำหรับให้ออนซูมูลอิสระในการเริ่มต้นของปฏิกิริยาและเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชั่น ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบปัญหาการโพลีเมอร์ไรส์ที่ไม่สมบูรณ์ (Incomplete polymerization) ของสารอะคริลามิดและการสลายได้ของของโพลีอะคริลามิดเป็นอะคริลามิดอีกครั้งเมื่อถูกความร้อนหรือแสง (Smith et al., 1996) จากปัญหาดังกล่าว กระ�ุนให้นักวิจัยหันกลับมาสนใจศึกษาการกำจัดอะคริลามิดโดยใช้จุลินทรีย์บำบัด (Bioremediation) อีกครั้ง เพราะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและมีราคาไม่แพง

จุลินทรีย์ที่สามารถใช้ประโยชน์จากอะคริลามิดเป็นแหล่งพลังงานและสารอาหารในการเจริญนั้น มีการค้นพบครั้งแรกจากตัวอย่างน้ำในแม่น้ำและคืน (Brown et al., 1982; Cherry et al., 1956; Croll et al., 1974; Lande et al., 1979) แต่ไม่ได้มีการคัดเลือกและจำแนกสายพันธุ์อย่างแน่นอน จนกระทั่งในปีค.ศ. 1982 Asano และคณะฯ ได้ทำการคัดเลือก *Pseudomonas chlororaphis* B23 จากตัวอย่างคืนที่มีการปนเปื้อนของอะคริลามิด ทำให้หลังจากนั้นได้มีการค้นพบและศึกษาคุณสมบัติในการสลายสารอะคริลามิดของแบคทีเรียชนิดต่างๆ หลากหลายมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นใน *Rhodococcus rhodocrhous* J1, *P. stutzeri*, *Xanthomonas maltophilia*, *R.*

*erythropolis*, *Rhodopseudomonas palustris* (Hirrlinger *et al.*, 1996; Nagasawa & Yamada, 1989; Nawaz *et al.*, 1993; Nawaz *et al.*, 1994; Shanker *et al.*, 1990; Wang & Lee, 2001; Wampler & Ensign, 2005; Zabaznaya *et al.*, 1998)

กลไกการสลายอะคริลามีด้วยตัวของมันเอง (Deamidation) จากการทำงานของเอนไซม์อะมิเดส (Amidase) หรือที่รู้จักกันคือว่าเอนไซม์อะมิโดไฮดรอลase (Amidohydrolase; EC 3.5.1.4) เป็นเอนไซม์อะมิเดสที่เป็นแอมโมเนียและกรดอะคริลิก (Acrylic acid) หรือที่รู้จักในชื่ออะคริเลต (Acrylate) (Nawaz *et al.*, 1998; Nawaz *et al.*, 1994; Shanker *et al.*, 1990, และ Sluis *et al.*, 2002) ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีพิษน้อยลงและไม่มีอันตรายต่อสัตว์มีชีวิต (Verschueren, 1977) ที่จะถูกสลายต่อไปโดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสลายอะคริเลต (Acrylate catabolism) ที่มีอยู่เองในเซลล์ของจุลินทรีย์นั้น เช่น เกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (Hydroxylation) เป็นบีตา-ไฮดรอกซิโพไฟโอนท (β-hydroxypropionate) ที่จะถูกออกซิไดส์ต่อไปเป็นการ์บอนไดออกไซด์ หรือเกิดปฏิกิริยาเรดักชัน (Reduction) เป็นโพไไฟโอนท (Propionate) โดยการทำงานของเอนไซม์กลุ่มอะคริลิกอีซิรีดักเทส (Acrylic acid reductase) เป็นต้น (จิตตินา เจริญพานิช, 2551; Wampler & Ensign, 2005)

ปัจจุบันในหลายประเทศ มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในการสลายสารตกค้างจากกระบวนการอุตสาหกรรม เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้เวลาไม่นานและไม่ก่อให้เกิดผลกระทบในภายหลัง สำหรับการกำจัดอะคริลามีด้วยมีรายงานเช่นกันถึงการนำเอนไซม์อะมิเดสบริสุทธิ์มาใช้ในการบำบัด อะคริลามีดที่ตกค้างในถังพกน้ำของระบบบำบัดน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรม (Nawaz *et al.*, 1993; Nawaz *et al.*, 1998; Prabu & Thatheyus, 2007; Wang & Lee, 2001) เช่นงานวิจัยของ Nagasawa และ Yamada (1989) ที่นำเอนไซม์อะมิเดสบริสุทธิ์จากเซลล์แบคทีเรียที่เรียกว่าอะคริลามีดในการเจริญมาถังพิษอะคริลามีดและใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในกระบวนการผลิตกรดอะคิลิกในระดับปริมาณมาก หรืองานวิจัยของ Shanker และคณะ ในปี 1990 ที่แยก *Pseudomonas* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria) รูปแท่งขนาดเล็ก (Short rod) เคลื่อนที่ได (Motile) และต้องการอากาศในการเจริญ (Aerobic) จากดินในสวนเขต้อนโดยวิธีการบำบูรุง (Enrichment) ในอาหารที่มีอะคริลามีด โดยพบว่าแบคทีเรียสามารถสลายอะคริลามีดไดถึง 4 กรัมต่อลิตร เป็นกรดอะคริลิกและแอมโมเนียเพื่อใช้เป็นแหล่งการ์บอนและไนโตรเจนในการเจริญ โดยใช้เอนไซม์อะมิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮดรอลไซติกของอะคริลามีด ซึ่งจะทำงานไดดีในเอโนมีดสายสั้น (Short chain amides) ไดแก่ ฟอร์มามีด (Formamide) อะซีตามีด (Acetamide) แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอนุพันธ์ของอะคริลามีด (Acrylamide analogues) เช่น เมทาคริลามีด (Methacrylamide) และบิสอะคริลามีด (*N,N*-Methylene bisacrylamide) ความสามารถของเอนไซม์จะถูกกดดัน (Repression) ไดโดยซัคซิเนท (Succinate) ในสภาวะที่มีและไม่มีแหล่งไนโตรเจน

หรือในปีค.ศ. 1993 Nawaz และคณะ ทำการแยก *Pseudomonas* และ *X.maltophilia* และประยุกต์ใช้ เชลล์ตรึงหรือ เอนไซม์อะมิเดส ที่ผลิตจากเชื้อเหล่านี้ ในการสลายการปนเปื้อนของอะคริลามีด และต่อมาในปี 1994 คณะผู้วิจัยเดียวกันทำการแยก *Rhodococcus* ที่ใช้อะคริลามีดเป็นสารตั้งต้นในการเจริญ จำกัดนิที่มีการเจือปนของยาฆ่าแมลง และทำบริสุทธิ์รวมทั้งศักยภาพเฉพาะของเอนไซม์อะมิเดสบริสุทธิ์ที่ได้ พบว่ามี น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 360 กิโลดอลตัน ที่ประกอบด้วยแปดหน่วยย่อย (Subunit) sage ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 8.5 มีค่า pH (Isoelectric point) ที่ pH 4.0 เอนไซม์มีความจำเพาะสูงกับ อะคริลามีด และ อซีตามิด (Acetamide) นอกจากนี้ยังพบว่า ในโมเลกุลของเอนไซม์ประกอบด้วยเหล็กแปดโมล แอดคิติวิติของเอนไซม์ถูกยึดได้โดยโลหะหนักและสารที่ขัดวางแผนหมู่ ไทโอล (Thiol blocking reagents) กรดอะมิโน 18 ตัวแรกที่ปลายอะมิโนแสดงความใกล้เคียง (Homology) 88 เปอร์เซ็นต์ กับ เอนไซม์อะลิฟาติกอะมิเดส (Aliphatic amidase) ใน *Brevibacterium* sp. Strain R312

Hirtlinger และคณะ (1996) แยก *R. erythropolis* จากเชื้อที่สลายเอริโลไฟโนนาไมด์ (2-Arylpropionamides) พบว่าสามารถสลายอะคริลามีดเป็นกรดอะคริลิกและแอมโมเนียได้ด้วยเห็นกัน ชี้ในปีเดียวกัน Nawaz และคณะ ทำบริสุทธิ์เอนไซม์อะมิเดสที่สามารถสลายอะคริลามีดและอะลิฟาติกอะมิเดสจาก *Klebsiella pneumoniae* NCTR1 พบว่าเอนไซม์มีลักษณะเป็นโมโนเมอร์ที่มีมวลโมเลกุล 62,000 ดอลตัน ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากัน 7.0 และที่อุณหภูมิเท่ากัน 65 องศาเซลเซียส เอนไซม์บริสุทธิ์มีหมู่ชัลไชคิล (Sulphydryl group) อยู่ในบริเวณแอดคิติฟและช่วยในการเร่งปฏิกิริยา และพบว่าในโมเลกุลของเอนไซม์มีโคนอล ( $\text{Co}^{2+}$ ) และเหล็ก ( $\text{Fe}^{2+}$ ) เป็นองค์ประกอบด้วย

ต่อมาในปี 1998 Nawaz และคณะ ทำการทดสอบปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อกระบวนการสลายอะคริลามีดโดยเชลล์ตรึง *Rhodococcus* sp. พบว่า ที่ความเข้มข้นสูงของอะคริลามีด 128 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชลล์แบบที่เรียกว่า และในที่อุณหภูมิสูงๆ ความสามารถในการสลายอะคริลามีดก็จะเพิ่มมากขึ้น ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการสลายอะคริลามีดของเชลล์ตรึงคือที่ 7.0 โลหะคอปเปอร์ ( $\text{Cu}^{2+}$ ) และ นิกเกล ( $\text{Ni}^{2+}$ ) สามารถยับยั้งการสลายอะคริลามีดได้ แสดงว่า ในบริเวณแอดคิติฟ (Active sites) ของเอนไซม์อะมิเดสที่เร่งปฏิกิริยาการสลายอะคริลามีดประกอบด้วยหมู่ชัลไชคิล (Sulphydryl; -SH) ส่วนอัตราเร็วในการสลาย (Rates of degradation) เพิ่มขึ้นได้โดยการเหนี่ยวนำของเหล็ก และจะลดลงได้จากการพ่วงคลีเลเตอร์ (Chelator) เช่น EDTA หรือ 1,10-Phenanthroline บ่งชี้ถึงความเกี่ยวข้องของเหล็กในบริเวณเร่งของเอนไซม์อะมิเดส นอกจากนี้ยังพบว่าเชลล์ตรึงที่เตรียมแล้วสามารถเก็บไว้ใช้งานต่อได้ นานถึงสิบวัน โดยไม่มีผลกระทบต่อการสูญเสียอัตราการสลายอะคริลามีดแต่อย่างไร

สำหรับงานวิจัยเกี่ยวกับการโคลนยืนและแสดงออกปริมาณสูงเอนไซม์อะมิเดสที่จำเพาะต่อ อะคริลามีด นั้นยังพบรายงานไม่นัก ที่มีรายงานได้แก่ รายงานวิจัยของ Cheong และ Oriel ในปี ค.ศ. 2000

ที่ทำการโคลนยืนยันมิเดสจาก *Bacillus stearothermophilus* BR388 เข้าสู่ *E.coli* DH5 $\alpha$  พบร่วาเอนไซม์ที่แสดงออกจากโคลนสามารถถลายอะคริลามิดได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 และความเข้มข้นของอะคริลามิดคือ 1 มิลลาร์ และเมื่อทำการมิวเตชั่น (Mutation) เอนไซม์ที่ได้โดยการกรดอะมิโนไฮดีดีนที่ตำแหน่ง 26 (His26) เป็นกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arginine) พบร่วมกับการทดสอบของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 23 เท่า และเมื่อเร็วๆนี้ Ryabchenko และคณะ (2006) ทำการโคลนยืนยันมิเดสจาก *Rhodococcus rhodochrous* M8 โดยเทคนิคพิชีอาร์ด้วยการใช้ไพรเมอร์ (Primer) ที่ออกแบบมาจากลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ (Peptide) ที่ได้จากการย่อยเอนไซม์อะมิเดสด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin) และตรวจสอบความสามารถในการไฮโดรโลซิส (Hydrolysis) สับสเตรทในกลุ่มเอ ไมด์พบว่า เเอนไซม์ที่แสดงออกมีความสามารถในการไฮโดรโลซิส (Hydrolysis) สับสเตรทในกลุ่มเอ ไมด์ (Aliphatic amide) สายสั้นรวมทั้งอะคริลามิดด้วย แต่ปริมาณของเอนไซม์อะมิเดสที่โคลนได้มีการแสดงออกในระดับที่ไม่สูงกว่าเชื้อดั้งเดิม (Wild type) มากนัก

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นว่า การถลายอะคริลามิดด้วยเอนไซม์อะมิเดสนั้นต้องใช้เอนไซม์ที่อยู่ในรูปของเอนไซม์บีรัสท์ที่มีการเตรียมหลายขั้นตอน หรือหากอยู่ในรูปของเอนไซม์ที่แสดงออกจากโคลนก็ยังไม่มีประสิทธิภาพในการถลายอะคริลามิดมากเท่าที่ควรทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องของระดับการแสดงออกของเอนไซม์ที่ต่ำ และจากข้อเท็จจริงที่ว่าเมื่อเอนไซม์เกิดปฏิกิริยาไปแล้วจะไม่สามารถนำเอนไซม์นั้นกลับมาใช้ซ้ำได้อีก นอกจากนี้เอนไซม์ที่อยู่ในรูปของเอนไซม์ตรึง ซึ่งจำเป็นต้องใช้ปริมาณเอนไซม์ต่ำทันในระดับปริมาณที่สูง ด้วยเหตุนี้งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะผลิตเอนไซม์อะลิฟติกอะมิเดสปริมาณสูง สำหรับใช้ในการถลายน้ำอะคริลามิดอย่างสมบูรณ์ โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม โคลนยืนของเอนไซม์อะลิฟติกอะมิเดสจากแบคทีเรียที่สามารถใช้ประโยชน์อะคริลามิด ที่คัดเลือกได้ในห้องปฏิบัติการชีวเคมีสิ่งแวดล้อมและจุลินทรีย์บำบัด ได้แก่ *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Kluyvera ascorbata* และ *Enterobacter aerogenes* เป็นต้น (จิตติมา เจริญพาณิช, 2551; Buranasilp et al., 2009; Buranasilp & Charoenpanich, 2011; Thanyacharoen et al., 2011) และคัดแปลงให้เกิดการแสดงออกปริมาณมาก จากนั้นจึงทำการตรึงรูปเอนไซม์ที่ได้จากการแสดงออก เพื่อนำมาใช้สำหรับกระบวนการถลายน้ำอะคริลามิด และการผลิตกรดอะคริลิกในระดับอุตสาหกรรมต่อไป เช่น ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตอะคริลิกอีสเทอร์ (Acrylic ester) ซึ่งเป็นโนโนเมอร์สำหรับโพลีอะคริลิก (Polyacrylic acid) ในอุตสาหกรรมการผลิตสีและการขัดเงาเครื่องหนัง หรือใช้เป็นโนโนเมอร์ร่วม (Co-monomer) กับเอทิลีน (Ethylene) ได้เป็นโพลีเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์เรซิโน่สามารถแยกเปลี่ยนไอออน (Ion-exchange resin) สำหรับใช้ในการผลิตเครื่องกรองหรือเครื่องกลั่นน้ำ ใช้ในระบบบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น (Danner et al., 1998)