บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

แลคติกแอสิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria; LAB) เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารหมัก โดยมีส่วนสำคัญในการปรุงแต่งรสชาติ กลิ่น ตลอดจนเนื้อสัมผัสของอาหาร นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในการแปรรูปและถนอมอาหารให้สามารถเก็บไว้ได้เป็นเวลานาน แม้ว่าอุตสาหกรรมการหมักอาหารไทยพื้นบ้านตั้งแต่อดีตมาจนถึงปัจจุบันได้มีการพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง แต่ส่วนใหญ่ก็ยังคงนิยมการหมักแบบธรรมชาติ (natural fermentation) คืออาศัยแบคทีเรียที่มีอยู่ในวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักหรือเกิดขึ้นเองในขณะหมัก แต่ข้อเสียคือไม่สามารถควบคุมการหมักได้ และต้องอาศัยภูมิปัญญาหรือความรู้พื้นบ้านในการหมักเป็นสำคัญ ส่งผลให้อาหารหมักไม่ได้มาตรฐานในการหมักแต่ละครั้ง และยังมีโอกาสที่จะสูญเสียผลผลิตหรือผลิตภัณฑ์การหมักในครั้งนั้น ๆ ได้หากไม่มีการควบคุมการหมักอย่างดีพอ นอกจากนี้การที่อาหารหมักพื้นบ้านไม่ค่อยได้รับความนิยมในการบริโภค หรือบริโภคกันอยู่เฉพาะในวงที่จำกัด เนื่องจากเกรงว่าจะไม่ปลอดภัยต่อผู้ที่ไม่คุ้นเคยในการบริโภค เช่น อาจมีการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคบางชนิด เป็นต้น

การนำแลคติกแอสิดแบคทีเรีย (LAB starter culture) มาใช้เป็นหัวเชื้อ (starter culture) ในการหมักจึงได้รับความสนใจมากขึ้นโดยเฉพาะในอุตสาหกรรมการหมักขนาดใหญ่ ข้อดีของการใช้หัวเชื้อในการหมักคือ สามารถควบคุมคุณภาพของอาหารหมักที่ผลิตในแต่ละครั้งให้เหมือนกันหรือใกล้เคียงกันได้ และยังสามารถเพิ่มเติมคุณสมบัติบางอย่างลงไปในผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ได้ด้วย โดยการเลือกใช้หัวเชื้อที่มีคุณสมบัติตามต้องการเติมลงไปในกระบวนการหมัก เช่น ใช้แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เพื่อไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคหรือแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ใช้แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารให้ความหวานเพิ่มมากขึ้นกว่าปกติ (enhanced sweetness) หรือให้กลิ่นหอม (aroma generation) และใช้แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตน้ำตาลที่มีแคลอรีต่ำ (low-calorie sugar) เป็นต้น

จากการศึกษาก่อนหน้านี้โดยกลุ่มของผู้วิจัยเอง สามารถแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินที่ชื่อว่าไนซิน (nisin) ได้ โดยแบคทีเรียดังกล่าวนี้คือ *Lactococcus lactis* RP359 (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2008) ดังนั้นจึงมีความประสงค์ที่จะพัฒนาเชื้อดังกล่าวมาใช้เป็นหัวเชื้อในการหมัก เพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมการหมักอาหารพื้นบ้านของไทยให้มีมาตรฐานและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น แต่ปัญหาหนึ่งที่พบเมื่อนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียชนิดนี้ไปใช้ในกระบวนการหมักคือ แลคติกแอสิดแบคทีเรียหัวเชื้อถูกทำลายโดยแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage infection) มีผลทำให้กระบวนการหมักไม่เป็นไปตามที่คาดหวัง และส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่มีคุณสมบัติตรงตามที่ต้องการ ดังนั้นจึงนำมาสู่การทำงานวิจัยในครั้งนี้เพื่อจะได้หาแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่อไป

การวิจัยครั้งนี้เริ่มต้นจากการตรวจหาแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะหรือสามารถทำลายหัวเชื้อ *L. lactis* RP359 จากอาหารหมักพื้นบ้านในภาคอีสาน 30 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยอาหารหมักชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ผักดอง แหนม ไส้กรอกอีสาน หม่ำ กุ้งจ่อม ปลาส้ม และเค็มบักนัด และสามารถตรวจพบแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลาย *L. lactis* RP359 ได้ 1 ชนิด โดยตั้งชื่อว่าแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 จากลักษณะ clear zone โดยวิธี spot test และลักษณะ plaque โดยวิธี plaque assay ของแบคเทอริโอเฟจ

ϕRP359 ที่ปรากฏบน lawn ของแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ คือ เห็นเป็นวงใสอย่างชัดเจน แสดงว่าแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 ที่แยกได้นี้น่าจะเป็นไลติกเฟจ (lytic phage หรือ virulent phage) โดยสามารถเข้าไปอาศัยและเพิ่มจำนวนภายในโฮสต์เซลล์ และทำให้โฮสต์เซลล์แตกสลายในที่สุด (Matsuzaki et. al., 2005) lytic phage ที่สามารถทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียและตรวจพบในอาหารหมักที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ ได้แก่ แบคเทอริโอเฟจ ϕJL-1 ซึ่งแยกได้จาก cucumber fermentation และสามารถทำลาย *Lactobacillus plantarum* (Lu et. al., 2003) แบคเทอริโอเฟจ ϕR01, ϕR03, ϕR05, ϕR09, ϕR12 และ ϕR19 ซึ่งแยกได้จาก sauerkraut fermentation และสามารถทำลาย *Leuconostoc fallax* (Barrangou et. al., 2002) และแบคเทอริโอเฟจ asccϕ28 ซึ่งแยกได้จาก cheese & whey และสามารถทำลาย *Lactococcus lactis* (Kotsonis et. al., 2008) เป็นต้น

เมื่อนำแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 ไปศึกษาความสามารถในการทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ พบว่าแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 ไม่สามารถทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้เลย แสดงว่ามีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียได้อย่างจำเพาะ คือสามารถทำลายได้เฉพาะแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์เซลล์ (*L. lactis* RP359) เท่านั้น หรืออาจกล่าวได้ว่าแบคเทอริโอเฟจที่แยกได้นี้จัดเป็น narrow-host-range bacteriophage อย่างไรก็ตามความสามารถในการทำลายแบคทีเรียอย่างจำเพาะเจาะจงนั้นนับเป็นคุณสมบัติที่พบได้ในแบคเทอริโอเฟจส่วนใหญ่ (Lu et. al., 2003; Sandeep, 2006) แม้ว่าแบคเทอริโอเฟจบางชนิดสามารถทำลายแบคทีเรียที่อยู่ใน genus และ species เดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ (strain) ได้ก็ตาม (Barrangou et. al., 2002) นอกจากนี้ก็เคยมีรายงานด้วยว่า แบคเทอริโอเฟจบางชนิดสามารถทำลายแบคทีเรียได้มากกว่าหนึ่งชนิดและต่าง genus ได้ หรือจัดเป็น broad-host-range bacteriophage (Jensen et. al., 1998; Capra et. al., 2006)

การศึกษาผลของสารละลาย $CaCl_2$ ต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 พบว่าเมื่อใช้ $CaCl_2$ ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20 mM มีผลทำให้แบคเทอริโอเฟจถูกสร้างและปล่อยออกมานอกโฮสต์เซลล์ได้มากที่สุด แสดงว่า $CaCl_2$ มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจชนิดนี้ เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการยึดเกาะ (adsorption) ของแบคเทอริโอเฟจบนผิวเซลล์ของโฮสต์ ซึ่งนับเป็นจุดเริ่มต้นของของกระบวนการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจ (infection cycle) นั้น นอกจากจะต้องอาศัยความจำเพาะระหว่าง specific receptor บนผิวเซลล์ของโฮสต์กับ attachment site บนโครงสร้างภายนอกของแบคเทอริโอเฟจแล้ว (Topley and Wilson, 1990) บางครั้งยังจำเป็นต้องอาศัย divalent cations (เช่น calcium ions หรือ magnesium ions) ที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่แบคทีเรียและแบคเทอริโอเฟจอาศัยอยู่ร่วมกันด้วย เคยมีรายงานว่าบางครั้งแบคเทอริโอเฟจต้องการ divalent cations ในปริมาณที่มากกว่าที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ใช้เป็นโฮสต์เซลล์ (Watanabe and Takesue, 1972) ในการทดลองนี้พบว่าแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 มีความต้องการ $CaCl_2$ เพื่อการเพิ่มจำนวนคล้ายคลึงกับแบคเทอริโอเฟจ ϕJL-1 (Lu et. al., 2003) และแบคเทอริโอเฟจ MLC-A (Capra et. al., 2006) นอกจากนี้ยังเป็นไปได้ด้วยว่าความต้องการ divalent cations ในการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจนั้น อาจไม่เกี่ยวข้องกับขั้นตอน adsorption แต่ไปเกี่ยวข้องกับขั้นตอนอื่น ๆ ของการเพิ่มจำนวนในโฮสต์เซลล์ เช่น การบุกรุกเข้าสู่โฮสต์เซลล์ (penetration) หรือการเพิ่มจำนวนภายในโฮสต์เซลล์ (replication) (Paranchy, 1966; Watanabe and Takesue, 1972) เป็นต้น อีกทั้งยังเคยมีรายงานด้วยว่า calcium ions มีผลต่อการเกิด plaque (Quiberoni et. al., 2004)

การทดสอบความสามารถในการยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจบนผิวเซลล์ของโฮสต์ในครั้งนี้ มิได้เติมสารละลาย $CaCl_2$ ลงไปในขั้นตอนของการทดสอบ เพราะต้องการศึกษาการยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจบนผิวเซลล์ของโฮสต์ในสภาวะที่แบคทีเรียเจริญอยู่ในอาหาร MRS broth ปกติ ผลการทดลองพบว่าแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 สามารถยึดเกาะบนผิวเซลล์ของโฮสต์ได้ตั้งแต่ 5 นาทีแรกที่ทดสอบ และสามารถยึดเกาะบนผิวเซลล์ของโฮสต์ได้ประมาณ 50% เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 15 นาที และสามารถยึดเกาะบนผิวเซลล์ของโฮสต์ได้ 85% ภายในเวลา 20 นาที ทั้งนี้เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะบนผิวเซลล์ของโฮสต์ระหว่างแบคเทอริโอเฟจและโฮสต์แต่ละคู่อาจแตกต่างกันไป เช่น การศึกษาความสามารถในการยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจ ϕJL-1 บนผิวเซลล์ของโฮสต์คือ *Lactobacillus plantarum* ในอาหาร MRS broth ที่ไม่เติม $CaCl_2$ พบว่าแบคเทอริโอเฟจสามารถยึดเกาะบนผิวเซลล์ได้ 75% ภายในเวลา 10 นาที และยึดเกาะบนผิวเซลล์ได้สูงถึง 90% และ 96% ภายในเวลา 20 นาที และ 30 นาที ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่าเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยึดเกาะบนผิวเซลล์ของโฮสต์ของแบคเทอริโอเฟจ ϕJL-1 ในอาหาร MRS broth ที่เติม $CaCl_2$ ก็ให้ผลไม่แตกต่างกัน (Lu et. al., 2003) แต่จากการศึกษาความสามารถในการยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจ MLC-A บนผิวเซลล์ของโฮสต์คือ *Lactobacillus paracasei* ในอาหาร MRS broth ที่ไม่เติม $CaCl_2$ พบว่าแบคเทอริโอเฟจสามารถยึดเกาะบนผิวเซลล์เพียง 37% เมื่อเวลาผ่านไป 45 นาที แต่เมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการยึดเกาะบนผิวเซลล์ของโฮสต์ของแบคเทอริโอเฟจ MLC-A ในอาหาร MRS broth ที่เติม $CaCl_2$ กลับพบว่าสามารถยึดเกาะบนผิวเซลล์ได้สูงถึง 95% ภายในเวลา 15 นาที (Capra et. al., 2006)

แบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 สามารถทนความร้อนได้ดีเมื่ออยู่ในอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เนื่องจากจำนวนแบคเทอริโอเฟจแทบไม่ลดลงเลยเมื่อเวลาผ่านไป 3 นาที แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส จำนวนแบคเทอริโอเฟจที่รอดชีวิตจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดภายในเวลาเพียงแค่ 3 นาที อีกทั้งจำนวนแบคเทอริโอเฟจที่ลดลงแปรผันตรงกับอุณภูมิที่สูงขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 90 องศาเซลเซียส และเวลาผ่านไป 3 นาที ก็ยังคงมีแบคเทอริโอเฟจรอดชีวิตเหลืออยู่ จากผลการทดลองยังชี้ให้เห็นว่าแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 น่าจะสามารถทนความร้อนที่ใช้ในกระบวนการพาสเจอไรส์ (pasteurization) แบบ high-temperature, short time (HTST) ซึ่งใช้อุณหภูมิเท่ากับ 71.7 องศาเซลเซียส (หรือ 161 องศาฟาเรนไฮต์) นาน 15-20 วินาทีได้ ซึ่งสอดคล้องกันรายงานก่อนหน้านี้ที่กล่าวว่าแบคเทอริโอเฟจที่มีโฮสต์เป็นแบคทีเรียใน genus *Lactococcus* หรือเรียกว่า lactococcal phage ส่วนใหญ่สามารถทนการพาสเจอไรส์แบบ HTST ได้ และโดยทั่วไป lactococcal phage จะถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เมื่อใช้เวลานานอย่างน้อย 15 นาที ทั้งนี้ความสามารถในการทนความร้อนของแบคเทอริโอเฟจแต่ละชนิดอาจแตกต่างกันไป เช่น แบคเทอริโอเฟจ MLC-A สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 63 และ 72 องศาเซลเซียสได้นานอย่างน้อย 45 นาที (Capra et al., 2006) แบคเทอริโอเฟจ ϕJL-1 สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (Lu et. al., 2003) และแบคเทอริโอเฟจ ϕYS40 สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสได้ดีเมื่ออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เช่น HB8 broth (Sakaki and Oshima, 1975) เป็นต้น การทราบข้อมูลเกี่ยวกับความสามารถในการทนความร้อนของแบคเทอริโอเฟจ น่าจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการหาแนวทาง หรือวิธีการควบคุมการปนเปื้อนของแบคเทอริโอเฟจในกระบวนการหมัก

จากผลการศึกษาโปรตีนโครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 โดยวิธี SDS-PAGE พบว่าแบคเทอริโอเฟจมีโปรตีนโครงสร้างหลัก (major proteins) ที่มีขนาดเท่ากับ 80, 57, 40, 25 และ 15 กิโล

ดาลตัน (kDa) โปรตีนโครงสร้างหลักของแบคเทอริโอเฟจแต่ละชนิดอาจแตกต่างกันและเป็นเอกลักษณ์หรือลักษณะเฉพาะของแบคเทอริโอเฟจนั้น ๆ Braun และคณะ (1989) เคยทำการศึกษาโปรตีนโครงสร้างหลักของแบคเทอริโอเฟจ 10 ชนิด (6 ชนิดเป็น lytic phage และอีก 4 ชนิดเป็น temperate phage) ที่จำเพาะต่อ *Lactococcus lactis* โดยวิธี SDS-PAGE พบว่า รูปแบบของโปรตีนโครงสร้างหลักของแบคเทอริโอเฟจทั้ง 10 ชนิดไม่เหมือนกันเลย โดยทั่วไปแบคเทอริโอเฟจที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อนมักมีโปรตีนโครงสร้างหลักเพียงไม่กี่ชนิด ในขณะที่แบคเทอริโอเฟจที่มีโครงสร้างซับซ้อนมักจะมีโปรตีนโครงสร้างหลักเป็นจำนวนมากหรือหลากหลายกว่า โปรตีนโครงสร้างหลักของแบคเทอริโอเฟจส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่พบอยู่ที่แคปซิด (capsid) และที่ส่วนหาง (tail) แคปซิดเป็นโครงสร้างที่ทำหน้าที่ห่อหุ้มและปกป้องสารพันธุกรรมไว้ภายในและยังเป็นส่วนหัว (head) ของแบคเทอริโอเฟจบางชนิดด้วย สำหรับแบคเทอริโอเฟจที่มีหาง (เช่น genus *Myoviridae* และ *Siphoviridae* เป็นต้น) ส่วนหางนอกจากจะเป็นท่อกลวงที่เป็นทางให้สารพันธุกรรมเคลื่อนที่ผ่านจากหัวของแบคเทอริโอเฟจไปยังโฮสต์เซลล์แล้ว แบคเทอริโอเฟจบางชนิดยังอาจมีโปรตีนโครงสร้างอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น tail fibers และ base plate เป็นต้น นอกจากนี้แบคเทอริโอเฟจที่มีหางบางชนิด ตรงบริเวณรอบ ๆ ท่อกลวงของส่วนหาง อาจมีโครงสร้างที่เรียกว่า contractile sheath หุ้มไว้อีกด้วย ซึ่ง contractile sheath นี้นอกจากจะมีส่วนช่วยให้หางของ แบคเทอริโอเฟจสามารถยืดหดได้แล้ว ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับขั้นตอนการฉีด (injection) สารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์อีกด้วย tail fibers และ base plate ของแบคเทอริโอเฟจบางชนิดยังเป็นโครงสร้างที่ใช้ในการยึดเกาะกับ receptor บนผิวเซลล์ของโฮสต์ แต่สำหรับแบคเทอริโอเฟจที่ไม่มี tail fibers และ base plate ก็จะใช้โครงสร้างอื่นบนอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจในการยึดเกาะกับเซลล์ของโฮสต์

การศึกษารูปร่างและชนิดของสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการจำแนกชนิดของแบคเทอริโอเฟจ ในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจสอบรูปร่างของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 โดยการทำแบคเทอริโอเฟจให้บริสุทธิ์และมีความเข้มข้นมากพอก่อนที่จะนำไปย้อมด้วยวิธี negative staining และศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 มีรูปร่างแบบ complex structure ประกอบด้วยส่วนหัวและหาง ส่วนหัวมีลักษณะเป็น icosahedral และหางเป็นแบบยืดหดได้ (contractile tail) จากลักษณะรูปร่างดังกล่าวแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 จึงจัดอยู่ใน *Myoviridae* family ตามเกณฑ์ของ International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (Ackermann, 2003) และเมื่อศึกษาชนิดของสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 โดยการสกัดสารพันธุกรรมแล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ พบว่าสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ RNase และ restsriction endonucleases บางชนิดที่นำมาทดสอบ แต่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I จากผลการทดลองนี้แสดงว่าสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 เป็น double-stranded DNA ซึ่งสอดรับกับผลการศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอเฟจ ϕRP359 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจใน *Myoviridae* family ทุกตัวที่เคยมีรายงานมีสารพันธุกรรมเป็น double-stranded DNA (Ackermann, 2003) และจากการค้นคว้ารายงานก่อนหน้านี้เกี่ยวกับ lactococcal phage พบว่า มากกว่า 95% ของ lactococcal phage เป็นแบคเทอริโอเฟจแบบมีหาง ซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 3 family คือ *Myoviridae* (เป็น แบคเทอริโอเฟจที่มีหางยาว และหางยืดหดได้) *Siphoviridae* (เป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีหางยาว และหางยืดหดไม่ได้) และ *Podoviridae* (เป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีหางสั้น) โดย family ที่พบมากที่สุดคือ *Siphoviridae* รองลงมาคือ *Podoviridae* และ *Myoviridae* ตามลำดับ (Deveau et al., 2006)