

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

ธนัสถา เชียงอุทัย. 2549. การผลิตและลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากยีสต์ที่คัดเลือกได้ วิทยานิพนธ์ ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### ภาษาอังกฤษ

- Abu-Runaida, A.S., I.M. Banat, S. Haditirto, and A. Khamis. 1991. Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant-producing *Rhodococcus* bacterium. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 53-61.
- Amezcuca-Vega, C., H.M. Poggi-Varaldo, F. Esparza-Garcia, E. Rios-Leal, and R. Rodriguez-Vazquez. 2007. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and change of surface tension of culture media. *Biores. Technol.* **98**: 237-240.
- Arino, S., R. Marchal, and J.P. Vandecasteele. 1996. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 162-168.
- Ashby, R.D., A. Nunez, D.K.Y. Solaiman, and T.A. Foglia. 2005. Sophorolipid biosynthesis from a biodiesel co-product stream. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **82**: 625-630.
- Banat, I.M., R.S. Makkar, and S.S. Cameotra. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 495-508.
- Baviere, M., D. Degouy, and J. Lecourtier. 1994. Process for washing solid particles comprising a sophoroside solution. *US patent 5326407*.
- Bednarski, W., M.Adamczak, J.Tomasik, and M.Plaszczyk. 2004. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. *Bioresour. Technol.* **95**: 15-18.
- Bertland, J.C., P. Bonin, M. Goutex, and G. Mille. 1994. The potential application of biosurfactant in combating hydrocarbon pollution in marine environments. *Res. Microbiol.* **145**: 53-56.

- Brown, M. J. 1991. Biosurfactants for cosmetic applications. *Int. J. Cosmet. Sci.* **13**: 61-64.
- Brundish, D.E., N. Shaw, and J. Baddiley. 1967. *Biochem. Biophysic. Acta.* **120**: 148-155. In Cooper, D. G. and Zajic, J. E. 1980. Surface active compounds from microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* **26**: 229-256.
- Cameron, D. R., D.G. Cooper, and R.J. Neufeld. 1988. The monoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1420- 1425.
- Casas, J.A., S. Garcia de Lara, and F. Garcia-Ochoa. 1997. Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. *Enz. Microb. Technol.* **21**: 221-229.
- Casas, J.A. and F. Garcia-Ochoa. 1999. Sophorolipid production by *Candida bombicola* : medium composition and culture methods. *J. Biosci. Bioeng.* **88**: 488-494.
- Cavalero, D.A. and D.G. Cooper. 2003. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. *J. Biotechnol.* **103**: 31-41.
- Christofi, N. and I.B. Ivshina. 2002. A review: microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J. Appl. Microbiol.* **93**: 915-929.
- Cooper, D.G. and J.E. Zajic. 1980. Surface-active compounds from microorganism. *Adv. Appl. Microbiol.* **26**: 229-253.
- Cooper, D. G., and D.A. Paddock. 1983. *Torulopsis petrophilum* and surface activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 1426- 1429.
- Cooper, D.G. and D.A. Paddock. 1984. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 173-176.
- Cooper, D.G. and B.G. Goldenberge. 1987. Surface active agents from two *Bacillus* species. *Adv. Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 224-229.
- Culter, A. J. and R.J. Light. 1979. Regulation of hydroxydocosanoic and sophoroside production in *Candida bogoriensis* by the level of glucose and yeast extract in the growth medium. *J. Biol. Chem.* **254**: 1944-1950.

- David, D.A., H.C. Lynch, and J. Varley. 1999. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enz. Microb. Technol.* **25**: 322-329.
- Davila, A.M., R. Marchal, and J.P. Vandecasteele. 1992. Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition: sophorose lipid production by *Candida bombicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 6-11.
- Davila, A.M., R. Marchal, and J.P. Vandecasteele. 1994. Sophorose lipid production from lipidic precursors: predictive evaluation of industrial substrates. *J. Ind. Microbiol.* **13**: 249-257.
- Davila, A.M., R. Marchal, and J.P. Vandecasteele. 1997. Sophorose lipid fermentation with differentiated substrate supply for growth and production phases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 496-501.
- Desai, J.D. and I.M. Banat. 1997. Microbial production of surfactant and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 47-64.
- Deshpande, M. and L. Daniels. 1995. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. *Biores. Technol.* **54**: 143-150.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350.
- Ducreux, J., D. Ballerini, M. Baviere, C. Bocard, and N. Monin. 1997. Composition containing a surface active compound and glycolipids and decontamination process for a porous medium polluted by hydrocarbon. *US patent 5654192*.
- Espuny, M.J., S. Egido, I.R.A. Manresa, and M.E. Mercade. 1996. Nutritional requirements of a biosurfactant producing strain *Rhodococcus* sp. 51T7. *Biotechnol. Lett.* **18**: 521-526.
- Felse, P.A., V. Shah, J. Chan, K.J. Rao, and R.A. Gross. 2007. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. *Enz. Microb. Technol.* **40**: 316-323.
- Fiechter, A. 1992. Biosurfactant: moving towards industrial application. *Trends. Biotechnol.* **10**: 208-217.

- Frautz, B., S. Lang, and F. Wagner. 1986. Formation of cellobiose lipids by growing and resting cells of *Ustilago maydis*. *Biotechnol. Lett.* **8**: 757–760.
- Futura, T., K. Igarashi, and Y. Hirata. 2002. Low-foaming detergent compositions. *World patent 03/002700*.
- Gautam, K.K. and V.K. Tyagi. 2006. Microbial surfactants: a review. *J. Oleo Sci.* **55**: 155-166.
- Gerson, D.F. 1993. The biophysics of microbial surfactants: Growth on concentration, but also on surface property of cells and insoluble substrates, p. 257–268. In Kosaric, N., *Biosurfactants: Production, properties, application*. Marcel Dekker, New York.
- Gi, K.E. 2004. Redtide inhibiting agent comprising yellow earth and biodegradable sophorolipid. *Korean patent 20040083614*.
- Gillman, L. B. 1993. A review of instruments for static and dynamic surface and interfacial tension measurement. Present at the seminar by Kruss GmbH and Scientific promotion Co., Ltd., at Indra Regent Hotel, BK. Thailand, October 30, 1997.
- Gobbert, U., S. Lang, and F. Wagner. 1984. Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*. *Biotechnol. Lett.* **6**: 225-230.
- Gorin, P.A.J., J.F.T. Spencer, and A.P. Tulloch. 1961. Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnoliae*. *Can. J. Chem.* **39**: 846-855.
- Guerra-Santos, L.H., O. Kappeli, and A. Fiechter. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 301-305.
- Guerra-Santos, L.H., O. Kappeli, and A. Fiechter. 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 443-448.
- Guilmanov, V., A. Ballistreri, G. Impallomeni, and R.A. Gross. 2002. Oxygen transfer rate and sophorose lipid production by *Candida bombicola*. *Biotechnol. Bioeng.* **77**: 489-494.



- Gumienna, M., M. Czamecka, and Z. Czarnecki. 2005. Effect of selected lipid substrates on the process of biosynthesis of surface-active compounds by the *Candida bombicola* yeasts. [Online]. <http://www.ejpau.media.pl/volume8/issue2/art-12.html>.
- Hall, P.J., J. Haverkamp, C.G. Van Kralingen, and M. Schmidt. 1996. Laundry detergent composition containing synergistic combination of sophorose lipid and nonionic surfactant. *US patent 5520839*.
- Hewald, S., K. Josephs, and M. Bölker. 2005. Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 3033–3040.
- Hisatsuka, K., T. Nakahara, Y. Minoda, and K. Yamada. 1971. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*: its function in hydrocarbon fermentations. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 686-692.
- Hommel, P.K., O. Stüwer, W. Stuber, D. Haferburg, and H.P. Kleber. 1987. Production of water-soluble surface-active exolipids by *Torulopsis apicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 199-205.
- Hommel, P.K. and K. Huse. 1993. Regulation of sophorose lipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*. *Biotechnol. Lett.* **15**: 853-858.
- Hommel, P.K., L. Weber, L. Weiss, U. Himmelreich, O. Rilke, and H.P. Kleber. 1994. Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose. *J. Biotechnol.* **33**: 147-155.
- Hu, Y. and L.K. Ju. 2001a. Purification of lactonic sophorolipids by crystallization. *J. Biotechnol.* **87**: 263-272.
- Hu, Y. and L.K. Ju. 2001b. Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS. *Enz. Microb. Technol.* **29**: 593-601.
- Hudak, A.J. and D.P. Cassidy. 2004. Stimulating in-soil rhamnolipid production in a bioslurry reactor by limiting nitrogen. *Biotechnol. Bioeng.* **30**: 361-368.
- Inge, N.A., V. Bogaert, K. Saerens, C.D. Muynck, D. Develter, W. Soetaert, and E.J. Vandamme. 2007. Microbial production and application of sophorolipids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 23-34.
- Inoue, S. and S. Itoh. 1982. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola* as microbial surfactants in alkane fermentation. *Biotechnol. Lett.* **4**: 3-8.

- Ishigami, Y. and S. Suzuki. 1997. Development of biochemicals- functionalization of biosurfactants and natural dyes. *Prog. Org. Coat.* **31**: 51- 61.
- Isoda, H., D. Kitamoto, H. Shinmoto, M. Matsumura, and T. Nakahara. 1997. Microbial extracellular glycolipid induction of differentiation and inhibition of the protein kinase C activity of human promyelocytic leukemia cell line HL60. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 609-614.
- Ito, S. and S. Inoue. 1982. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*: possible relation to alkane uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 1278-1283.
- Jarvis, F.G. and M.J. Johnson. 1949. A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.* **71**: 4124-4126.
- Jing, C., S. Xin, Z. Hui, and Q. Yinbo. 2006. Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae*. *Enzyme Microbial Technol.* **39**: 501-506.
- Kappeli, O. and A. Fiechter. 1977. Component from the cell surface of the hydrocarbon-utilizing yeast *Candida tropicalis* with possible relation to hydrocarbon transport. *J. Bacteriol.* **131**: 917- 921.
- Kappeli, O., M. Muller, and A. Fiechter. 1978. Chemical and structural alterations at the cell surface of *Candida tropicalis*, induced by hydrocarbon substrate. *J. Bacteriol.* **133**: 952-958.
- Kim, H.S., B.D. Yoon, D.H. Choung, H.M. Oh, T. Katsuragi, and Y. Tani. 1999. Characterization of a biosurfactant, monosylerythritol lipid produced from *Candida* sp. SY16. *Appl. Microb. Biotechnol.* **52**: 713-721.
- Kim, H.S., J.E. Jeon, H.W. Lee, Y.I. Park, W.T. Seo, H.M. Oh, T. Katsuragi, Y. Tani, and B.D. Yoon. 2002. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid from *Candida Antarctica*. *Biotechnol. Lett.* **24**: 225-229.
- Kitamoto, D., S. Akiba, C. Hioki, and T. Tabuchi. 1990. Extracellular accumulation of mannosylerythritol lipids by a strain of *Candida Antarctica*. *Agric. Biol. Chem.* **54(1)**: 31-36.
- Kitamoto, D., T. Fuzishiro, H. Yanagishita, T. Nakane, and T. Nakahara. 1992. Production of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by resting cells of *Candida Antarctica*. *Biotechnol. Lett.* **14**: 305-310.

- Kitamoto, D., H. Isoda, and T. Nakahara. 2002. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants from energy-saving materials to gene delivery carriers. *J. Biosci. Bioeng.* **94**:187–201.
- Klekner, V., N. Kosaric, and Q.H. Zhou. 1991. Sophorose lipids produced from sucrose. *Biotechnol. Lett.* **13**: 345-348.
- Konishi, M., T. Fukuoka, T. Morita, T. Imura, and D. Kitamoto. 2008. Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*. *J. Oleo Sci.* **57**: 359-369.
- Kosaric, N., W.L. Cairns, N.C.C. Gray, D. Stechey, and J. Wood. 1984. The role of nitrogen in multiorganism strategies for biosurfactant production. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **61**: 1735-1743.
- Kosaric, N., W.L. Cairns, N.C. C. Gray. 1987. Microbial de-emulsifiers, p. 247-321. In Kosaric, N., W.L. Cairns, and N.C.C. Gray (ed.), *Biosurfactants and biotechnology*. Marcel Dekker, New York.
- Kosaric, N. 1992. Biosurfactants in industry. *Pure Appl. Chem.* **64**: 1731-1737.
- Kosaric, N. 1993. Biosurfactants Production Applications. Surfactant Science Series: vol 48. Mercel Dekker, Inc. New York.
- Kosaric, N. 2001. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technol. Biotechnol.* **39**: 295-304.
- Kretschmer, A., H. Bock, and F. Wagner. 1982. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 864-870.
- Koch, F.C. and M.E. Hanke. 1953. Practical methods in biochemistry 6<sup>th</sup> Ed, p. 537. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Lang, S. and D. Wullbrandt. 1999. Rhamnose lipid-biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 22-32.
- Lee, K.H. and J.H. Kim. 1993. Distribution of substrates carbon in sophorose lipid production by *Torulopsis bombicola*. *Biotechnol. Lett.* **15**: 263-266.
- Lin, S.C., K.S. Carswell, M.M. Sharma, and G. Georgiou. 1994. Continuous production of the lipopeptide biosuefactant of *Bacillus licheniformis* JF-2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 281-285.

- Lindum, P. W., U. Anthoni, C. Christoffersen, L. Eberl, S. Molin and M. Givskov. 1998. N-acyl-l-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular surface active lipopeptide required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* **180**: 6384-6388.
- Linton, J.D. 1991. Metabolite production and growth efficiency. *Ant. Van Leeuw.* **60**: 293-321.
- Maget-Dana, R. and F. Peypoux. 1994. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology.* **87**: 151-174.
- Mager, H., R. Rothlisberger, and F. Wagner. 1987. Use of sophorose-lipid lactone for the treatment of dandruffs and body odour. *European patent EP02909783*.
- Makkar, R.S. and S.S. Cameotra. 1999. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources – a review. *J. Surf. Det.* **2**: 237-241.
- Mann, R.M. and M.R. Boddy. 2000. Biodegradation of a nonylphenol ethoxylate by the autochthonous microflora in lake water with observations on the influence of light. *Chemosphere.* **41**: 1361-1369.
- Mann, R.M. and J.R. Bidwell. 2001. The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and two exotic frogs. *Environ. Pollut.* **114**: 195-205.
- Matsumiya, Y., D. Wakita, A. Kimura, S. Sanpa, and M. Kubo. 2007. Isolation and characterization of a lipid-degrading bacterium and its application to lipid-containing wastewater treatment. *J. Biosci. Bioeng.* **103**: 325-330.
- Matsuyama, T., K. Kaneda, I. Ishizuma, T. Toida, and I. Yano. 1990. Surface-active novel glycolipid and linked 3-hydroxyl fatty acids produced by *Serratia rubidaed.* *J. Bacteriol.* **172**: 3015-3022.
- Mercade, M.E., M.E. Manresa, M. Robert, M.J. Espuny, C. De Andres, and J. Guinea. 1993. Olive mill effluent (OOME) new substrate for biosurfactant production. *Bioresour. Technol.* **43**: 1-6.
- Morikawa, M., H. Daido, T. Takao, S. Murata, Y. Shimonishi, and T. Imanaka. 1993. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. Strain MIS 38. *J. Bacteriol.* **175**: 6459-6466.



- Mulligan, C.N. and B.F. Gibbs. 1989. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 3016-3019.
- Mulligan, C.N., R.N. Yong, and B.F. Gibbs. 2001. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. *J. Hazard Mater.* **85**: 111-125.
- Navonvenezia, S., Z. Zosim, A. Gottlieb, R. Legmann, S. Carmeli, E.Z. Ron, and E. Rosenberge. 1995. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3240-3244.
- Nitschke, M. and G.M. Pastor. 2006. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Biores. Technol.* **97**: 336-341.
- Nunez, A., R. Ashby, T.A. Foglia, and D.K.Y. Solaiman. 2004. LC/MS analysis and lipase modification of the sophorolipids produced by *Rhodotorula bogoriensis*. *Biotechnol. Lett.* **26**: 1087-1093.
- Otto, R.T., H.J. Daniel, G. Pekin, K. Muller-Decker, G. Furstenberge, M. Reuss, and C. Syldatk. 1999. Production of sophorolipids from whey. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 495-501.
- Patel, R. M. and A.J. Desai. 1997. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Lett. Appl. Microbiol.* **25**: 91- 94.
- Persson, A., E. Oesterberg, and M. Dostalek. 1988. Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* 378: growth and product characteristics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 1-4.
- Persson, A., G. Molin, and C. Weibull. 1990. physiological and morphological changes induced by nutrient limitation of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 686-692.
- Pesce, L. 2002. A biotechnological method for the regeneration of hydrocarbons from dregs and muds, on the base of biosurfactants. *World patent 02/062495*.
- Pierce, D. and T.J. Heilman. 1998. Germicidal composition. *World patent 98/16192*.
- Plaza, G.A., I. Zjawiony, and I.M. Banat. 2006. Use of defferent methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *J. Petrol. Sci. Eng.* **50**: 71-77.

- Pornsunthorntawe, O., P. Wongpanit, S. Chavadej, M. Abe, and R. Rujiravanit. 2008. Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminate soil. *Biores. Technol.* **99**: 1589-1595.
- Ramana. K.V. and N.G. Karanth.1989. Production of biosurfactants by the resting cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6. *Biotechnol. Lett.* **11**: 437-442.
- Rau, U., C. Manzke, and F. Wagner. 1996. Influence of substrate supply on the production of sophorose lipids by *Candida bombicola* ATCC 22214. *Biotechnol. Lett.* **18**: 149-154.
- Rau, U., S. Hammen, R. Heckmann, V. Wray, and S. Lang. 2001. Sophorolipids: a source for novel compounds. *Ind. Crops Products.* **13**: 85-92.
- Rau, U., L.A. Nguyen, S. Schulz, V. Wray, M. Nimtz, H. Roeper, H. Koch, and S. Lang. 2005. Formation and analysis of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**: 551-559.
- Reiling, H.E., U.T. Wyasa, L.H. Guerra-Santos, R. Hirt, O.Kappeli, and A. Fiechter. 1986. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 985-989.
- Robert, M., M.E. Mercade, M.P. Bosch, J.L. Perra, M.J. Espuny, M.A. Manresa, and J. Guinea. 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T. *Biotechnol. Lett.* **11**: 871-874.
- Rosenberg, E. 1986. Microbial surfactants. *Crit. Rev. Biotechnol.* **3**: 109-132.
- Rosenberg, E. and E. Z. Ron. 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**:154-162.
- Sarubbo, L.A., J.M. de Luna, and G.M. de Campos-Takaki. 2006. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. [Online]. <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol9/issue4/full/6/>.
- Sarubbo, L.A., C.B.B. Farias, and G.M.C. Takaki. 2007. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Curr. Microbiol.* **54**: 68-73.

- Shah, V., G.F. Doncel, T. Seyoum, K.M. Eaton, I. Zalenskaya, R. Hagver, A. Azim, and R. Gross. 2005. Sophorolipids, microbial glycolipids with anti-human immunodeficiency virus and sperm-immobilizing activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 4093-4100.
- Sheppard, J. D. and C.N. Mulligan. 1987. The production of surfactant by *Bacillus subtilis* grow on peat hydrolysate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 110- 116.
- Shepherd, R., J. Rockey, I.W. Sutherland, and S. Roller. 1995. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. *J. Biotechnol.* **40**: 207-217.
- Singh, M., V. Saini, D.K. Adhikari, J.D. Desai, and V.R. Sista. 1990. Production of bioemulsifier by SCP producing strain of *Candida tropicalis* during hydrocarbon fermentation. *Biotechnol. Lett.* **12**: 743-746.
- Solaiman, D.K.Y., R.D. Ashby, A. Nunez, and T.A. Forlia. 2004. Production of sophorolipids by *Candida bombicola* grown on soy molasses as substrate. *Biotechnol. Lett.* **26**: 1241-1245.
- Solaiman, D.K.Y., R.D. Ashby, J.A. Zerkowski, and T.A. Foglia. 2007. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. *Biotechnol Lett.* **29**: 1341-1347.
- Spencer, J.F.T., P.A.J. Gorin, and A.P. Tulloch. 1970. *Torulopsis bombicola* sp. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **36**: 129-133.
- Stuwer, O., R. Hommel, D. Haferburg, and H.P. Kleber. 1987. Production of crystalline surface-active glycolipids by a strain of *Torulopsis apicola*. *J. Biotechnol.* **6**: 259-269.
- Thanomsub, B., T. Watcharachaipong, K. Chotelersak, P. Arunrattiyakorn, T. Nitoda, and H. Hanzaki. 2004. Monoacylglycerols: glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast, *Candida ishiwadae*. *J. Appl. Microbiol.* **96**: 588-592.
- Tulloch, A.P., J.F.T. Spencer, and P.A.J. Gorin. 1962. The fermentation of long-chain compounds by *Torulopsis magnoliae*. *Can. J. Chem.* **40**: 1326-1338.
- Tulloch, A.P. and J.F.T. Spencer. 1968. Fermentation of long-chain compounds by *Torulopsis apicola*. IV. Products from esters and hydrocarbons with 14 and 15 carbon atoms and from methyl palmitoleate. *Can. J. Chem.* **46**: 1523-1528.

- Tulloch, A.P., J.F.T. Spencer, and M.H. Deinema. 1968a. A new hydroxyl fatty acid sophoroside from *Candida bogoriensis*. *Can. J. Chem.* **46**: 345-348.
- Van Bogaert, I.N.T., K. Saerens, C. De Muynck, D. Develter, W. Soetaert, and E.J. Vandamme. 2007. Microbial production and application of sophorolipids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 23-34.
- Wicken, A. J. and K.W. Knox. 1970. Surface active compounds from microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* **26**: 229-256.
- Wu, J. and L.K. Ju. 1998. Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biotechnol.* **59**: 193-202.
- Yamane, T. 1987. Enzyme technology for the lipid industry. An engineering overview. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **64**: 1657-1662.
- Yakimov, M. M., K. N. Timmis, V. Wray, and H. L. Fredrickson. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* **61(5)**: 1706-1713.
- Yakimov, M.M., H.L. Fredrickson, and K.N. Timmis. 1996. Effect of heterogeneity of hydrophobic moieties on surface activity of lichenysin A, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus licheniformis* BAS50. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **23**: 13-18.
- Yeh, M.S., Y.H. Wei, and J.S. Chang. 2006. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Process Biochem.* **41**: 1779-1805.
- Yoo, D.S., B.S. Lee, and E.K. Kim. 2005. Characteristics of microbial biosurfactant as an antifungal agent against plant pathogenic fungus. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 1164-1169.
- Zhang, L., P. Somasundaran, S.K. Singh, A.P. Felse, and R. Gross. 2004. Synthesis and interfacial properties of sophorolipid derivatives. *Colloid Surf.* **240**: 75-82.
- Zhou, Q.H., V. Klekner, and N. Kosaric. 1992. Short communications: production of sophorose lipids by *Torulopsis bombicola* from safflower oil and glucose. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**: 89-91.



Zhou, Q.H. and N. Kosaric. 1993. Effect of lactose and olive oil on intra- and extracellular lipids of *Torulopsis bombicola*. *Biotechnol. Lett.* **15**: 477-482.

Zhou, Q.H. and N. Kosaric. 1995. Utilization of canola oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **72**: 67-71.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

## สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. YM medium

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัม
สารสกัดมอลต์ (Malt extract)	3.0	กรัม
เพปโตเน (Peptone)	5.0	กรัม
กลูโคส	10.0	กรัม
วุ้นผง (Agar)	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 4.5 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 2. อาหารเหลวกำหนดสูตร (ธันสตา เชียงอุทัย, 2549)

โซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ )	0.4	%
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.02	%
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.02	%
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	0.1	%
น้ำมันถั่วเหลือง	4.0	%(v/v)
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 3. อาหารเหลวปรับปรุงสูตร

โซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ )	0.4	%
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.02	%
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.02	%
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	0.3	%
น้ำมันถั่วเหลือง	10.67	%(v/v)
กลูโคส	5.33	%
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



## ภาคผนวก ข

## สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

## 1. มอริส รีเอเจนท์ (Molish reagent)

แอลฟา-แนฟทอล ( $\alpha$ -naphthol)	0.5	กรัม
เอทานอล (Ethanol)	10.0	มล.

ละลายแอลฟา-แนฟทอลในเอทานอลแล้วเติมในตัวอย่างที่จะทำการทดสอบปริมาตร 0.2 มล. จากนั้นเติมกรดซัลฟูริก (sulfuric acid) 0.5 มล. ตั้งทิ้งไว้โดยห้ามเขย่า

## 2. สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6 (50 mM Acetate buffer pH 6)

โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate)	0.41	กรัม
น้ำกลั่น	80	มล.

ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6 ด้วยกรดอะซิติก แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น ถ้าหาต้องการอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดต่างอื่นๆ ก็ใช้กรดอะซิติกเข้มข้นปรับให้มีค่าความเป็นกรดต่างนั้นๆ

## 3. สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 (50 mM Tris-HCl buffer pH 8)

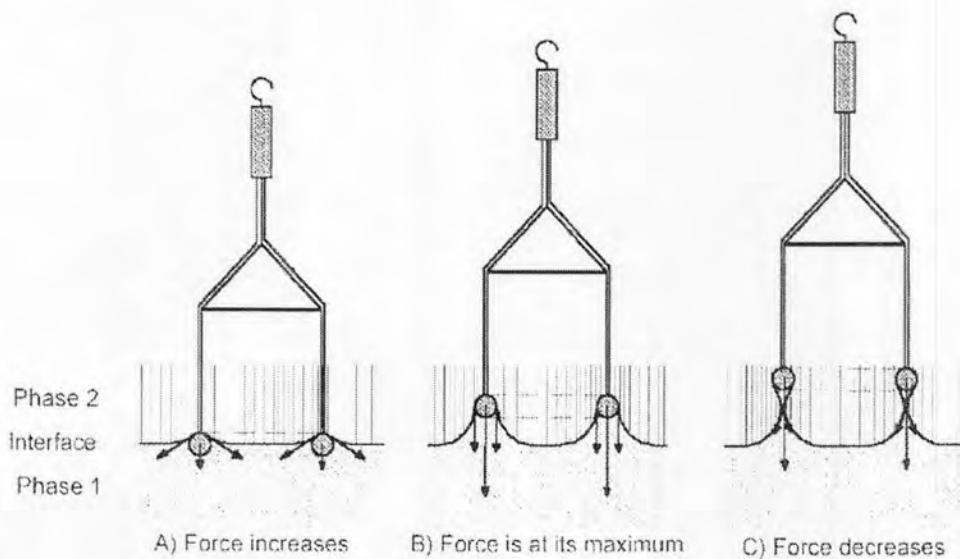
ทริส เบส (Tris base)	0.61	กรัม
น้ำกลั่น	80	มล.

ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น ถ้าหาต้องการทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดต่างอื่นๆ ก็ใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปรับให้มีค่าความเป็นกรดต่างนั้นๆ

## ภาคผนวก ค

### หลักการการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring

การวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี ring method หรือ Du Nouy Ring method ค้นคิดโดย Lecomte Du Nouy ในปี 1919 ซึ่งวิธีนี้จะพิจารณาวงแหวนทองคำขาว (platinum ring) ในแนวระนาบโดยวงแหวนทองคำขาวจะจมในของเหลว และถูกยกขึ้น แรงสูงสุดที่ใช้ในการดึงวงแหวนทองคำขาวของเหลว คือ ค่าแรงตึงผิว (surface tension) คุณสมบัติของวงแหวนทองคำขาวก็คือความยาวที่ถูกทำให้เปียก (wetted length) ซึ่งรวมทั้งรัศมีด้านในและด้านนอกของวงแหวนทองคำขาวที่ทำให้เปียกโดยของเหลว



ภาพแสดงขั้นตอนการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring

วัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring เป็นวิธีวัดสารละลายที่มีสารลดแรงตึงผิว ดังนั้นถ้าพื้นผิวใหม่ถูกสร้างขึ้นขณะทำการวัดค่าแรงตึงผิว เช่นเมื่อวงแหวนยกตัวขึ้นทำให้ไม่รู้พื้นผิวอย่างแน่นอน และค่าแรงตึงผิวที่วัดได้ก็เปลี่ยนไป

### อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าแรงตึงผิว

ลักษณะและองค์ประกอบของเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Tensiometer) รุ่น K6 ของบริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน เครื่องวัดค่าแรงตึงผิวนี้ทำการวัดที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  °C ตลอดทำการทดลอง

ขั้นตอนการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว มีดังนี้

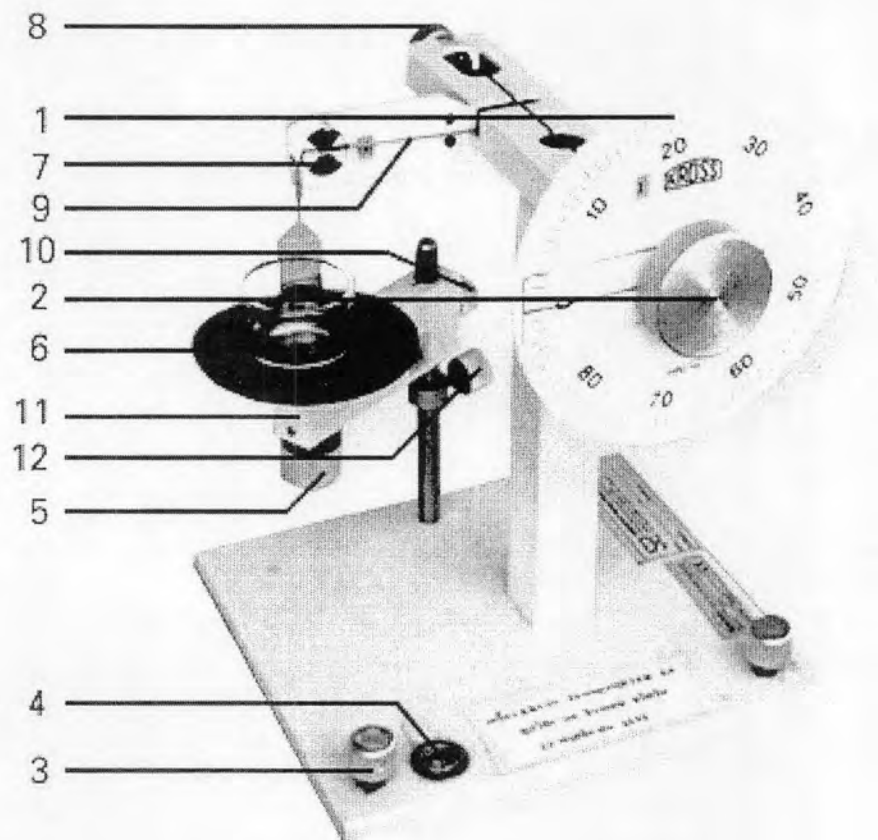
1. ปรับ handwheel with point (2) ให้สเกลมีค่าศูนย์
2. ปรับ zero adjustment (8) โดยหมุนทวนเข็มนาฬิกาให้ balance beam (9) อยู่ในตำแหน่งสมดุลกึ่งกลางของ mask (7)
3. ปรับระดับที่วางสารตัวอย่างโดยหมุน (10) แล้วยกขึ้นให้อยู่ในระดับที่ต้องการ
4. แขนง ring ลงใน balance beam(9) ปรับให้อยู่ในตำแหน่งสมดุลโดยหมุน zero adjustment (8) ตามเข็มนาฬิกา
5. ใส่สารตัวอย่างในที่ใส่สารตัวอย่างประมาณ 10-15 มล. วางลงบน sample table (6) แล้วหมุน micrometer screw (5) ตามเข็มนาฬิกาเพื่อยกที่ใส่สารตัวอย่างขึ้นให้สัมผัสกับ ring โดยให้ ring จมอยู่ในตัวอย่างไม่น้อยกว่า 5 มม.
6. เมื่อ ring สัมผัสกับตัวอย่างแล้วอาจต้องปรับ balance (9) อยู่ในตำแหน่งสมดุลอีกครั้ง โดยหมุน zero adjustment (8) ทวนเข็มนาฬิกา
7. เริ่มวัดค่าแรงตึงผิวโดยหมุน micrometer screw (5) ทวนเข็มนาฬิกาอย่างช้าๆ ในขณะเดียวกันก็หมุน pointer (2) ตามเข็มนาฬิกาอย่างช้าๆ โดยรักษาให้ balance beam (9) อยู่ในตำแหน่งสมดุล
8. เมื่อ ring หลุดออกจากตัวอย่างอ่านค่าแรงตึงผิวตามสเกล (1) มีหน่วยเป็น mN/m
9. เมื่อเสร็จการทดลองล้าง ring ด้วยน้ำกลั่น สะบัดให้แห้ง (หรือผ่านเปลวไฟ) เก็บเข้ากล่องไม้ ส่วน vessel ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น(หรือ acetone) ซับให้แห้งหรือผ่านเปลวไฟ
10. การเก็บเครื่องจะต้องปรับ zero adjustment(8) ให้ balance beam(9) ยกขึ้น เพื่อป้องกันการแกว่งของ balance beam ปรับที่วางสารตัวอย่างให้อยู่ในระดับเดิม แล้วหมุนเข้าหาตัวเครื่อง

### ข้อควรระวัง

1. ห้ามกดปุ่มที่อยู่ด้านหลังของ zero adjustment (8) เด็ดขาด เพราะจะทำให้ wire หลุดได้
2. ห้ามหมุน zero adjustment (8) เกิน 1 รอบเด็ดขาด
3. การใช้ ring ต้องใช้ด้วยความระมัดระวังอย่าให้บิดเบี้ยว เพราะถ้า ring เสียรูปจะทำให้การวัดค่าผิดไปได้
4. การใช้ vessel ต้องใช้ด้วยความระมัดระวังเช่นกัน

### ข้อแนะนำ

1. ขณะวัดค่าแรงตึงผิวตามข้อ 7 ถ้าทำการหมุน micrometer screw(5) และ pointer (2) อย่างช้าๆ จะทำให้เกิดความผิดพลาดน้อย
2. ring, vessel มีคุณสมบัติทนไฟ สามารถผ่านเปลวไฟได้ ในกรณีที่จำเป็น
3. ขณะแขวน ring ลงบน balance beam(9) อาจต้องใช้มือช่วยเล็กน้อย

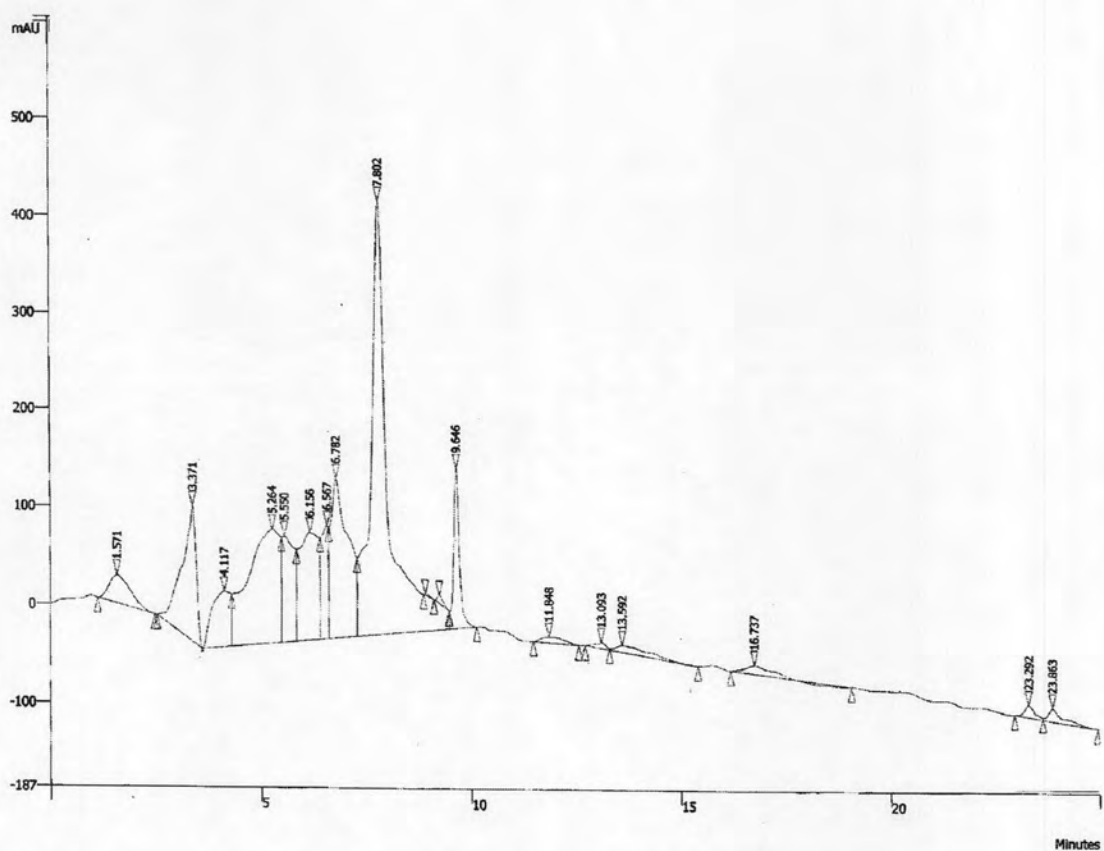


แสดงองค์ประกอบของเครื่องวัดค่าแรงตึงผิวรุ่น K6 บริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน

- |                                       |                                       |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 1. Scale in mN/m                      | 7. Mark                               |
| 2. Handwheel with pointer             | 8. Handwheel for zero-adjustment      |
| 3. Screws for regulation of the level | 9. Balance-beam                       |
| 4. Box level                          | 10. Handwheel for fixing the crossbar |
| 5. Micrometer screw                   | 11. Carrier of sample-table           |
| 6. Sample table                       | 12. Handwheel for fixing the crossbar |

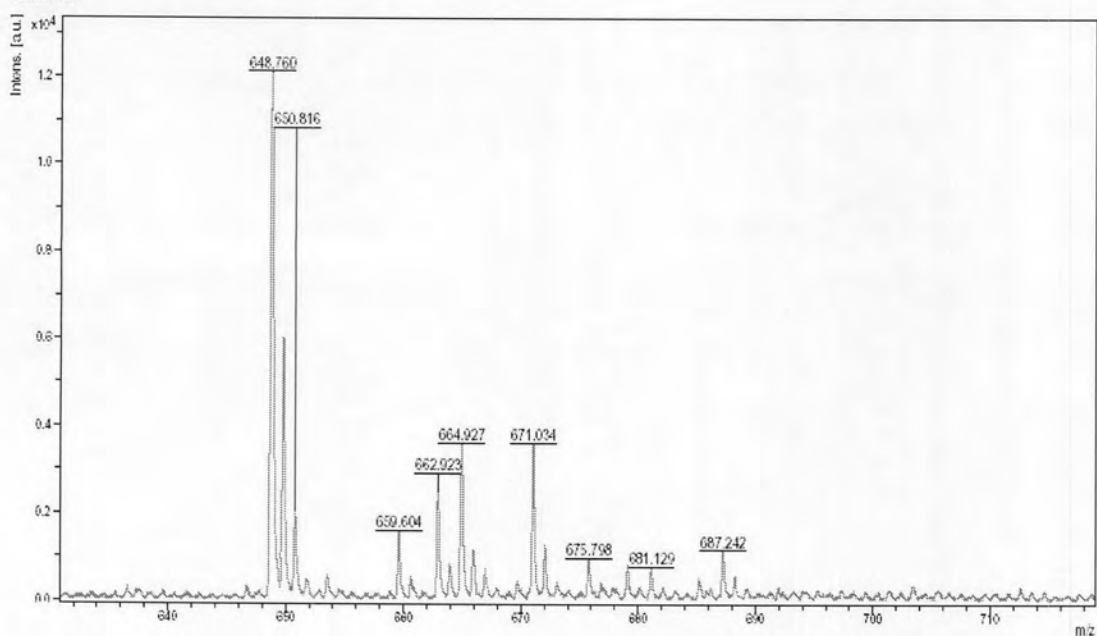


## ภาคผนวก ง

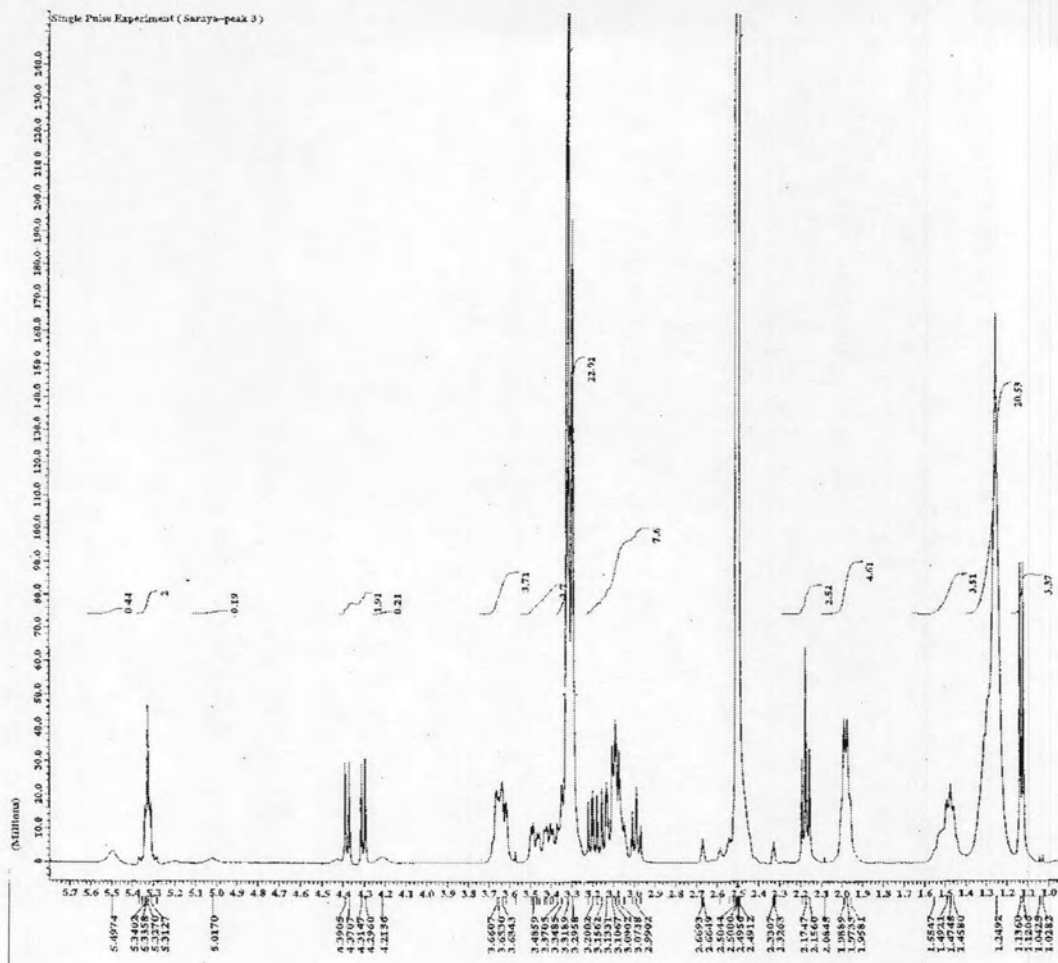


รูปที่ 1 โครมาโตแกรมของ HPLC จากสารไซไฟโรลิติดที่ใช้เป็นสารเปรียบเทียบ

Comment 1 Sorpholonicacid1  
 Comment 2



รูปที่ 2 โครมาโตแกรมของ LC-MS ของสารไซไฟโรลิติดที่ใช้เป็นสารเปรียบเทียบ



รูปที่ 3 <sup>1</sup>H-NMR spectrum ของสารไซไฟโรลิดิตที่ใช้เป็นสารเปรียบเทียบ

## ภาคผนวก จ

### 1. หลักการของไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี จะอาศัยหลักการพื้นฐานเดียวกับลิกวิด โครมาโตกราฟี คือ คุณสมบัติของสารแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการดูดซับและถูกทำให้หลุดออกจากการดูดซับต่อสารซึ่งเป็นเฟสคงที่ไม่เท่ากัน และเมื่อพัฒนาวิธีการโดยใช้เฟสคงที่ และคอลัมน์ที่มีขนาดเล็กมากทั่วไป ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฟสคงที่ประมาณ 5-10  $\mu\text{m}$  และคอลัมน์มีขนาดประมาณ 2-6 mm ดังนั้นเพื่อที่จะให้สารละลายชะตัวอย่างที่จะแยกออกจากคอลัมน์ จึงเกิดความดันสูงมากคือประมาณ 100-200 atm (ขึ้นกับชนิดของคอลัมน์) ข้อดีของไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟีคือ ประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นกว่าลิกวิด โครมาโตกราฟี เป็น 10-100 เท่า และใช้เวลาในการแยกที่สั้นกว่า

ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโตกราฟี แบ่งเป็น 2 ประเภทตามเทคนิค ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาพขั้วสัมพัทธ์ คือ

1. Normal-Phase Bonded Phase Chromatography คือเฟสคงที่มีสภาพมีขั้วมากกว่าเฟสเคลื่อนที่ โดยทั่วไปจะใช้ silica gel บรรจุในคอลัมน์ ถ้าในตัวอย่างที่ใช้แยกเป็นสารประกอบที่ไม่มีขั้วและชอบละลายในเฟสเคลื่อนที่มากกว่า ดูดซับกับเฟสคงที่ จึงเป็นสารประกอบที่ออกมาก่อน เทคนิค Normal-Phase Bonded Phase Chromatography เหมาะสำหรับการแยกสารประเภท alkane, lipid, saccharide, steroids และวิตามินที่ละลายได้ในไขมัน เช่น A, D และ E นอกจากนี้ยังเหมาะกับสารประกอบที่ไม่เสถียรเมื่อละลายอยู่ในน้ำ

2. Reverse - Phase Bonded Phase Chromatography คือ เฟสคงที่เป็นพวกไม่มีขั้ว โดยทั่วไปจะเป็นหมู่ octadecyl หรือ octyl silane functional group และเฟสเคลื่อนที่เป็นพวกมีขั้ว เช่น น้ำผสมกับตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ เช่น เมทานอล หรืออะซิโตรไนโตรลส์ ลำดับการชะล้างตัวถูกละลายจะมีลักษณะตรงข้ามกับที่เกิดขึ้นใน Normal-Phase Bonded Phase Chromatography ดังนั้นสารประกอบที่มีจะถูกชะล้างออกมาก่อน เนื่องจากตัวอย่างที่แยกชอบที่จะละลายในเฟสเคลื่อนที่ และสารประกอบที่ไม่มีขั้วจะถูกยึดอยู่ในคอลัมน์ทำให้ถูกชะล้างออกมาทีหลัง ซึ่งเทคนิคนี้จะเหมาะสมอย่างมากกับสารประกอบที่ไม่ละลาย หรือละลายได้เล็กน้อยในน้ำ แต่สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์หรือตัวทำละลายอินทรีย์ตัวอื่นๆ ที่ละลายน้ำได้ดี Reverse-Phase Bonded Phase Chromatography จึงเป็นที่นิยมใช้อย่างมากใน HPLC

ความนิยมของ Reverse-Phase Bonded Phase Chromatography เนื่องจาก

1. สามารถนำมาใช้แยกพวก nonionic, ionic และสารประกอบที่แตกตัวเป็นไอออนได้ บางครั้งสามารถแยก สารประกอบประเภทนี้พร้อมๆ กัน โดยใช้คอลัมน์และเฟสเคลื่อนที่อย่าง เดียวกัน
2. bonded- phase คอลัมน์ค่อนข้างเสถียร แต่ควรจะต้องระวังเกี่ยวกับการควบคุม pH ของเฟสเคลื่อนที่
3. เฟสเคลื่อนที่ที่นิยมใช้ เช่น น้ำ ซึ่งมีราคาถูกและหาง่าย และตัวทำละลายอินทรีย์ที่ ค่อนข้างนิยมใช้กันมาก คือ เมทานอล ซึ่งมีราคาไม่แพงนักและมีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง
4. สามารถทำนายลำดับของการที่สารถูกชะออกมาจากคอลัมน์ เพราะว่า Retention time จะเพิ่มขึ้นตามสมบัติของสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำ
5. สมดุลที่เกิดขึ้นในคอลัมน์เกิดขึ้นเร็ว ทำให้เหมาะแก่การนำไปใช้ใน gradient elution

องค์ประกอบของเครื่อง HPLC มีดังนี้

1. ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase reservoir) ขวดที่ใส่เฟสเคลื่อนที่ จะมี อุปกรณ์ที่ใช้ไล่อากาศที่ละลายอยู่ เพื่อกำจัดก๊าซออกซิเจนซึ่งอาจจะทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่ บางชนิด หรือเฟสคงที่ที่อยู่ในคอลัมน์ และยังลดโอกาสที่จะทำให้เกิดฟองอากาศในเครื่องตรวจหา (detector) ขณะทำการทดลองอยู่
2. ระบบของปั๊ม (pump system) ใน HPLC มีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่ จะไหลผ่านคอลัมน์ซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กบรรจุอยู่ ความต้านทานการไหลดังกล่าวจะมาก เมื่อใช้ อนุภาคเล็กๆ และคอลัมน์มีขนาดเล็กอีกด้วย จึงจำเป็นที่จะต้องใช้ความดันสูงดันเฟสเคลื่อนที่ให้ ไหลไป ปั๊มที่ใช้แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ
  - 1) mechanical pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่
  - 2) pneumatic pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้ความดันของการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่
3. อุปกรณ์ที่ใช้ตรวจวัดความดัน (pressure monitoring devices) โดยจะบอกความดัน ของเฟสเคลื่อนที่ ก่อนเข้าสู่คอลัมน์ ค่าความดันจะบอกได้ว่ามีสิ่งอุดตันหรือไม่ และปั๊มยังทำงาน ได้ดีหรือไม่ นอกจากนั้นการทราบความดันของเครื่องจะช่วยทำให้การปรับพารามิเตอร์ต่างๆ เป็นไปอย่างเหมาะสมที่สุด
4. อุปกรณ์สำหรับทำ Gradient Elution เนื่องจากสารประกอบบางชนิดไม่สามารถแยก ได้ เมื่อใช้ isocratic elution การเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ระหว่างที่ทำ gradient

elution นั้นสามารถทำได้ โดยการตั้งโปรแกรมเป็นแบบเส้นตรง (linear) เส้นโค้ง หรือแบบเป็นขั้น (stepwise) สามารถแบ่งอุปกรณ์สำหรับทำ Gradient Elution เป็น 2 แบบ

1) แบบ low pressure gradient เป็นแบบที่ใช้วิธีการผสมตัวทำละลายที่ความดันของบรรยากาศและต่อจากนั้นจะถูกบีบต่อไปด้วยความดันสูงเข้าสู่คอลัมน์

2) แบบ high pressure gradient เป็นแบบที่ตัวทำละลายที่ใช้ใน gradient elution จะถูกบีบผ่าน high pressure pump เข้าสู่ low volume mixing chamber ก่อนจะเข้าสู่คอลัมน์

5. Sample Introduction Devices เพื่อให้ตัวอย่างที่เข้าสู่คอลัมน์ควรอยู่ในลักษณะที่เป็นแถบที่แคบมากที่สุดเท่าที่จะทำได้ ดังนั้นจึงใช้ microsampling valve หรือใช้การฉีดสารตัวอย่างผ่าน septum ด้วย microsyringe และควรต้องระมัดระวังเนื่องจากความดันภายในสูง

6. Microsampling Valve สารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปจะอยู่ภายในที่ต่อเข้ากับ valve ปัจจุบัน micro valve สามารถนำมาใช้ได้กับสารตัวอย่างที่มีขนาดตั้งแต่ 0.5  $\mu\text{l}$  ถึงหลายมิลลิลิตร (แล้วแต่ขนาดของ loop ภายใน) valve ซึ่งมีท่ออยู่ภายนอกยอมให้ฉีดสารตัวอย่างเข้าไปได้ในปริมาณมาก นอกจากนั้น valve ประเภทนี้ยังสามารถใช้งานได้ที่ความดันสูงถึง 5,000-6,000 psi โดยที่ไม่เกิดการรั่วไหล

7. เครื่องตรวจวัด (Detector) มีหลายชนิดขึ้นอยู่กับตัวอย่างสารที่แยก เช่น

1) ยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ (UV-VIS Detectors) คือ อาศัยการดูดกลืนแสงยูวีของสารตัวอย่าง เป็นเครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้กับ HPLC เพราะไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหลและอุณหภูมิ แต่จะไวกับสารประกอบอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่

2) เครื่องดิฟเฟอเรนเชียลรีแฟรกโตมิเตอร์ (Differential Refractometers) โดยให้ตรวจสอบดรรชนีหักเห (refractive index, IR) อย่างต่อเนื่อง ระหว่างเฟลเคลื่อนที่กับเฟลเคลื่อนที่ที่มีสารประกอบของตัวถูกละลายอยู่ขณะผ่านออกจากคอลัมน์ เนื่องจากดีเทคเตอร์ชนิดนี้จัดอยู่ในแบบ bulk property หรือ general detector ดังนั้นมันจึงให้สัญญาณกับตัวทำละลายได้ทั้งหมด ตรงที่ตัวถูกละลายมีค่าดรรชนีหักเหต่างจากเฟลเคลื่อนที่

## 2. หลักการของแมสสเปกโทรเมตรี (Mass spectrometry)

แมสสเปกโทรเมตรีเป็นเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ที่ใช้หาข้อมูลของโครงสร้างและมวลโมเลกุลของสาร เมื่อทำให้โมเลกุลแตกตัวเป็นไอออนด้วยการให้โมเลกุลรับพลังงานที่มากพอจนทำให้โมเลกุลนั้นเกิดการแตกตัวเป็นไอออน ซึ่งพลังงานที่ใช้จะอยู่ในช่วง 5-70 eV (1 eV = 23.6 Kcal/mole) จากนั้นทำการแยกและตรวจสอบไอออนที่เกิดขึ้นนั้นอีกครั้งหนึ่ง แมสสเปกตรัม จะบ่งบอกถึงลักษณะการแตกตัวของโมเลกุลไอออน หรือรวมรูปแบบของการแตกตัวของแต่ละไอออน



ทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้ว ก็จะได้รูปแบบการแตกตัว (fragmentation pattern) ของโมเลกุลขึ้นกับ สารแต่ละชนิด พลังงานที่ใช้ โครงสร้างของโมเลกุล เวลาระหว่างเกิด และการตรวจพบไอออน จึงกล่าวได้ว่าแมสสเปกตรัมเป็นรูปแบบของการแตกตัวของสารที่อยู่ในสภาวะมีพลังงานและ ช่วงเวลาที่กำหนด

### 3. หลักการของนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)

NMR เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการวัดรับพลังงานที่แตกต่างกับของนิวเคลียสที่อยู่ภายใต้ อิทธิพลของสนามแม่เหล็ก ซึ่งเป็นประโยชน์มากในการหาสูตรโครงสร้างของทั้งสารอินทรีย์และ สารอนินทรีย์ นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณสารได้ด้วย สามารถวิเคราะห์สารที่อยู่ใน สถานะของก๊าซ ของแข็ง หรือของเหลวซึ่งนิยมมากที่สุดโดยทำให้อยู่ในรูปสารละลาย หลักการ วิเคราะห์ของนิวเคลียสแมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี คือ นิวคลีโอ (nuclei) ของธาตุบางชนิด มีสมบัติของแม่เหล็ก เนื่องจากมีประจุและประพัตติตัวเหมือนกับหมุนอยู่ตลอดเวลา จึงสามารถ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางแม่เหล็กของนิวคลีโอได้เมื่อนำนิวคลีโอไปวางในสนามแม่เหล็ก ตัวอย่างนิวคลีโอที่มีสมบัติแม่เหล็ก  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$  เป็นต้น ที่นิยมใช้ในการ วิเคราะห์คือ  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  ถ้าหากนำตัวอย่างที่มีนิวคลีโอ  $^1\text{H}$  ไปวางในสนามแม่เหล็กแล้วให้ พลังงานในช่วงความถี่ของคลื่นวิทยุที่เหมาะสม จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอ โดยนิวคลีโอ ในระดับพลังงานต่ำจะดูดกลืนพลังงานแล้วขึ้นไปอยู่ในระดับพลังงานสูง (จัดตัวในทิศทางตรงข้าม กับสนามแม่เหล็ก) นิวคลีโอในระดับพลังงานสูงบางตัวจะถูกกระตุ้นให้คายพลังงานออกมาแล้วลง ไปอยู่ในระดับพลังงานที่ต่ำ (จัดตัวในทิศทางเดียวกับสนามแม่เหล็ก) การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ เรียกว่า เรโซแนนซ์ เนื่องจากนิวคลีโอของ  $^1\text{H}$  แต่ละตัว  $^1\text{H}$  ในสารตัวอย่างอยู่ในสภาวะแวดล้อม ต่างกัน (อยู่ในตำแหน่งที่ต่างกัน โครงสร้าง) จึงทำให้มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนแตกต่างกัน การเกิดเรโซแนนซ์ของโปรตรอนแต่ละตัวจึงแตกต่างออกไปที่ความถี่วิทยุหนึ่งๆ เรียกปรากฏการณ์ นี้ว่า chemical shift ซึ่งเป็นค่าใช้จำแนกตำแหน่งและชนิดของโปรตรอน

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวณภามาศ ราชมนตรี เกิดเมื่อวันที่ 10 ธันวาคม พ.ศ. 2524 ที่จังหวัดขอนแก่น สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2546 และเข้ารับการศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548 และได้ไปเผยแพร่ผลงานวิจัยในระดับนานาชาติแบบโปสเตอร์ ที่การประชุม JSPS-NRTC Core University Program (1998-2008) จังหวัดนครศรีธรรมราช