



รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

นิรันดร์ รุ่งสว่าง. 2542. การผลิตและสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* BBK-

1. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
แม่่น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. 2534. หลักการและเครื่องมือวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ.

กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อารีย์ กังฉิน. 2542. การแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Abalos, A., Pinazo, A., Infante, M.R., Casals, M., Garcia, F. and Manresa, A. 2001.

Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. Langmuir. 17: 1367-1371

Al-Tahhan, R.A., Sandrin, T.R., Bodour, A.A. and Maier, R.M. 2000. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3262-3268

Arino, S., Marchal, R. and Vandecasteele, J.P. 1996. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45: 162-168

Baath, E. 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations. Water Air Soil Pollut. 47: 335 - 379

Babu, P.S., Vaidya, A.N., Bal, A.S., Kapur, R., Juwarkar, A. and Khanna, P. 1996. Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial waste. Biotechnol Lett. 18: 263 – 268

Bai, G., Brusseau, M.L. and Miller, R.M. 1997. Influence of a rhamnolipid biosurfactant on the transport of bacteria through a sandy soil. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1866-1873

- Bergstrom, S., Theorell, H. and Davide, H. 1946. On a metabolic product of *Ps. Pyocyanea*, pyolipic acid, active against *Myobact. tuberculosis*. Ark Kem Mineral Geol 23A: 1-12
- Borgman, U. and Norwood, W.P. 1995. EDTA toxicity and background concentrations of copper and zinc in Hyalella-Azteca. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52: 875 - 881
- Burger, M.M., Glaser, L. and Burton, R.M. 1963. The enzymatic synthesis of a rhamnose-containing glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 238: 2595 – 2601
- Bunster, L., Fokkema, N.J. and Schippers, B. 1989. Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaf wetability. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1340-1345
- Campos-Garcia, J., Caro, A.D., Najera, R., Miller-Maier, R.M., Al-Tahhan, R.A. and Soberon-Chavez, G. 1998. The *Pseudomonas aeruginosa rhl G* gene encodes an NADPH-dependent β -ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. J. Bacteriol. 160: 4442-4451
- Churchill, S.A., Griffin, R.A., Jones, L.P. and Churchill, P.F. 1995. Biodegradation rate enhancement of hydrocarbons by an oleophilic fertilizer and a rhamnolipid biosurfactant. J. Environ. Qual. 24: 19 - 28
- Clint, J.H. 1992 Micelle formation. Surfactant aggregation, pp. 82-129. New york : Chapman and Hall.
- Cooper, D.G. and Zajic, J.E. 1980. Surface-active compounds from microorganism. Adv. Appl. Microbiol. 26: 229-256
- Cooper, D.G., Macdonald, R., Duff, S.J.B. and Kosaric, N. 1981. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation addition. Appl Microbiol 26: 229 - 256
- Cooper, D.G. 1986. Biosurfactants. Microbiol. Sci. 3: 145-1459
- Coyne, M.J. Jr., Russell, K.S., Coyle, C.L. and Goldberg, J.B. 1994. The *Pseudomonas aeruginosa* algC gene encodes phosphoglucomutase, required for the synthesis of complete lipopolysaccharide core. J. Bacteriol. 176: 3500 – 3507
- Daniels, L., Linhardt, R.J., Bryan, B.A., Mayerl, F. and Pickenhagen, w. 1988. Method for producing rhamnose. European patent. 0 282 942

- Daniel, H.J., Otto, R.T., Binder, M. and Sylđatk, C. 1998. Sophorolipid production with high yields on whey concentrated and rape seed oil without consumption of lactose. Biotechnol Lett. 20: 805 – 807
- Desai, J.D. and Desai, A.J. 1993. Production of biosurfactants. In N. Kosaric (ed), Biosurfactant : production, properties, applications, pp. 65 - 98. New York : Marcel Dekker.
- Desai, J.D., Desai, A.J. and Patel, M.R. 1994. Advances in the production of biosurfactants and their commercial applications. J.SCI.IND.RES. 53: 619 – 629
- Desai, J.D. and Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 47-64
- Deziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lepine F. and Bisailon, J.G. 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1908-1912
- Deziel, E., Lepine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O.A. and Villemur, R. 1999. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. Biochemica. et Biophysica. Acta. 1440: 244-25
- Deziel, E., Lepine, F., Milot, S. and Villemur, R. 2000. Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. Biochemica. et Biophysica. Acta. 1485: 145-152
- Dische, Z. and Shettles, L.B. 1948. A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. J. Biol. Chem. 595-603
- Duxbury, T. 1981. Toxicity of heavy metals to soil bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 11: 217 – 220
- Edwards, J.R. and Hayashi, J.A. 1965. Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. Arch. Biochem. Biophys. 111: 415-421
- Falbe, J. 1987. Biosurfactant. Surfactant in Consumer Products. pp. 118 – 117 Springer-Verlag. Heidelberg. Germany.
- Fiechter, A. 1992. Biosurfactants: moving towards industrial application. Trends. Biotechnol. 10: 208-217
- Gerson, D.F. 1993. The biophysics of microbial surfactants : growth on insoluble

- substrates. In N. Kosaric (ed), Biosurfactant : production, properties, applications, pp. 169 – 286. New York : Marcel Dekker.
- Giani, C., Wullbrandt, D., Rothert, R. and Meiwes, J. 1997. *Pseudomonas aeruginosa* and its use in a process for the biotechnological preparation of L-rhamnose. US patent 5.658.793 (Hoechst AG, Frankfurt)
- Guerra-Santos, L., Kappeli, O. and Fiechter, A. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with gulcose as carbon source. Appl. Environ. Microbiol. 48: 301-305
- Guerra-Santos, L., Kappeli, O. and Fiechter, A. 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24: 443-448
- Haba, E., Espuny, M.J., Busquets, M. and Manresa, A. 2000. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. J. Appl. Microbiol. 88: 379-387
- Haferburg, D., Hommel, R., Kleber, H-P., Kluge, S., Schuster, G. and Zschiegner, H-J.1987. Antiphytovirale Aktivitat von rhamnolipid aus *Pseudomonas aeruginosa*. Acta. Bio. technol. 7: 353 - 356
- Hauser, G. and Karnovsky, M.L. 1954. Studies on the production of glycolipids by *Pseudonomas aeruginosa*. J. Bacteriol. 68: 645 - 654
- Hauser, G. and Karnovsky, M.L. 1957. Rhamnose and rhamnolipide biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 224: 91-105
- Hauser, G. and Karnovsky, M.L. 1958. Studies on biosynthesis of L-rhamnose. J. Biol. Chem. 233: 287 – 291
- Herman, D.C., Artiola, J.F. and Miller, R.M. 1995. Removal of cadmium, lead and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant. Environ. Sci. Technol. 29: 2280 - 2285
- Herman, D.C., Lenhard, R.J. and Miller, R.M. 1997a. Formation and removal of hydrocarbon residual in porous media: effect of bacterial biomass and biosurfactants. Environ. Sci. Technol. 31: 1290 - 1294
- Herman, D.C., Zhang, Y. and Miller, R.M. 1997b. Rhamnolipid (biosurfactant) effects on cell aggregation and biodegradation of residual hexadecane under saturated flow conditions. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3622-3627

- Hirayama, T. and Kato, I. 1982. Novel methyl rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa*. FEBS. Lett. 139: 81-85
- Hisatuska, K., Nakahara, T., Sano, N. and Yamada, K. 1971. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and function in hydrocarbon fermentation. Agr. Biol. Chem. 35: 686-692
- Hisatuska, K., Nakahara, T. and Yamada, K. 1972. Protein-like activator for n-alkane oxidation by *Pseudomonas aeruginosa* S₇B₁. Agr. Biol. Chem. 36: 1361-1369
- Hommel, R., Stiwer, O., Stuber, W., Haferburg, D. and Kleber, H.P. 1987. Production of water-soluble surface-active exolipids by *Torulopsis apicola*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26: 199 – 205
- Hughes, M.N. and Poole, R.K. 1989. Metal mimicry and metal limitations in studies of metal-microbe interactions In Poole R.K. and Gadd G.M. (eds) Metal-microbe interactions. Society for General Microbiology. IRL. Oxford.
- Ishigami, Y., Gama, Y., Nakahara, H., Yamaguchi, M., Nakahara, H. and Kamata, T. 1987. The pH-sensitive conversion of molecular Aggregates of rhamnolipid biosurfactant. Chem. Lett. 763-766
- Ishigami, Y. and Suzuki, S. 1997. Development of biochemicals-functionlization of biosurfactants and natural dyes. Prog. Org. Coat. 31: 51-61
- Itoh, S., Honda, H., Tomita, F. and Suzuki, T. 1971. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin. (mixture of C₁₂, C₁₃ and C₁₄ fractions) J. Antibio. 24: 855-859
- Itoh, S. and Suzuki, T. 1972. Effect of rhamnolipids on growth of *Pseudomonas aeruginosa* mutant deficient in n-paraffin-utilizing ability. Agr. Biol. Chem. 36: 2233-2235
- Jain, D.K., Lee, H. and Trevors, J.T. 1992. Effect of addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil. J. Ind. Microbiol. 10: 87 - 93
- Javis, F.G. and Johnson, M.J. 1949. A glyco-lipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Am. Chem. Soc. 71 : 4124 – 4126
- Jeneil biosurfactant Co., LLC. Data product. [Online]. 400N Dekora Woods Blvd. Saukville. WI. USA: 2001. Available from: <http://www.biosurfactant.com> [2002, august 26]
- Kim, H.S., Yoon, B.D., Lee, C.H., Suh, H.H., Oh, H.M., Katsuragi, T. and Taki, Y. 1997a.

- Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. J. Ferment. Bioeng. 84: 41 – 46
- Klein, J. and Wagner, F. 1987. Different strategies to optimize the production phase of immobilized cells. Ann. NY. Acad. Sci. 501: 306 - 316
- Knoche, H.W. and Shiveley, J.M. 1972. The structure of an ornithine-containing lipids from *Thiobacillus thiooxidans*. J. Biol. Chem. 247: 170-178
- Koch, A.K., Kappeli, O., Fiechter, A. and Reiser, J. 1991. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. J. Bacteriol. 173: 4212-4219
- Kosaric, N., Caimr, W.L., Gray, N.C.C., Stechey, D. and Wood, J. 1984. The role of nitrogen in multiorganism strategies for biosurfactant production. JAOCS. 61: 1735 – 1743
- Kosaric, N. 1993. Biosurfactant *Production *Property *Application. Surfactant Science Series: vol 48 Marcel Dekker, Inc. New York.
- Kovalick, W. 1991. Perspective on health and environmental risks of soil pollution and experiences with innovative remediation technologies. In Abstracts of the 4th world Congress of Chemical Engineering, abstract 3.3-1. Karlsruhe, Germany.
- Lafrance, P. and Lapointe, M. 1998. Mobilization and co-transport of pyrene in the presence of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants in sandy soil columns. Ground Water Monit Rev. 18: 139 - 147
- Lang, S., Katsiwela, E. and Wagner, F. 1989. Antimicrobial effects of biosurfactants. Fat. Sci. Technol. 91: 363 - 366
- Lang, S. and Wagner, F. 1993. Biological activities of biosurfactants. In Kosaric N. (ed) Biosurfactants. Dekker. New York. Basel. Hong Kong. pp. 251 - 268
- Lang, S. and Wullbrandt, D. 1999. Rhamnolipid-biosynthesis, microbial production and application potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 22-32.
- Lin, S.C. Biosurfactants: recent advances. 1996. J. Chem. Tech. Biotechnol. 66: 109-120
- Linhardt, R.J., Bakhit, R., Daniels, L., Mayerl, F. and Pickenhagen, W. 1989. Microbially produce rhamnolipid as a source of rhamnose. Biotechnol. Bioeng. 33: 365 - 368
- Maier, R.M. and Soberon-Chavez, G. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 625-633
- Manresa, M.A., Bastida, J., Mercade, M.E., Robert, M., Andres J. de., Espuny, M.J. and

- Guinea, J. 1991. Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. J. Ind. Microbiol. 8: 133 – 136
- Martell, A.E. and Smith, R.M. 1976. Critical stability constants, vol 1 and 3. Plenum. New York.
- Mata-Sandoval, J.C., Karns, J. and Torrets, A. 1999. High-performance liquid chromatography method for the characterization of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. J.C hromato. A 864: 211-220
- Matsufuji, M., Nakata, K. and Yoshimoto, A. 1997. High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol. Biotechnol.Lett. 19: 1213-1215
- Matsuyama, T., Kaneda, K., Ishizuka, I., Toida, T. and Yano, I. 1990. Surface-active novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and independent spreading growth of *Serratia marcescens*. J.Bacteriol. 174 : 1769 – 1776
- Mercade, M.E., Manresa, A., Robert, M., Espuny, M.J., de Andres, C. and Guinea, J. 1993. Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. Bioresource Technol. 43: 1 – 6
- Mercade, M.E. and Manresa, M.A. 1994. The use of agroindustrial by products for biosurfactant production. J. AM. Oil. Chem. Soc. 71: 61 – 64
- Miller, R.M. 1995. Surfactant-enhanced bioavailability of slightly soluble organic compounds. In Skopper H. and Turco R. (eds) Bioremediation-science and applications. Soil Science Society of America special publication. Madison. Wis. pp. 33 -54
- Morikawa, M. and Imanaka, T. 1993. Isolation of new mixotrophic bacterium which can fix CO₂ and assimilate aliphatic and aromatic hydrocarbons anaerobically. J. Ferment. Bioeng. 76: 280 - 283
- Morikawa, M. Hirata, Y. and Imanaka, T. 2000. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. Biochimica et Biophysica Acta 1488: 211-218
- Mulligan, C.N., Yong, R.N. and Gibbs, B.F. 1999. On the use of biosurfactants for the removal of the removal of heavy metals from oil-contaminated soil. Environ. Prog. 18: 50 - 54
- Noordman, W.M., Ji, W., Brusseau, M.L. and Janssen, D.B. 1998. Effect of rhamnolipid

- biosurfactants on removal of phenanthrene from soil. Environ. Sci. Technol. 32: 1806 - 1812
- Novon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmell, S., Ron, E.Z. and Rosenberg, E. 1995. Alasan, a new bioemulsification from *Acinetobacter radioresistens*. Appl. Environ. Biotechnol. 32 : 518 – 520
- Oberberman, A., Muller-Hurtig, R. and Wagner, F. 1990. Effect of addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 485 – 489
- Ochoa-Loza, F. 1998. Physico-chemical factor affecting rhamnolipid biosurfactant application for removal of metal contaminants from soil. Ph.D. dissertation. University of Arizona. Tucson.
- Ochsner, U.S, Fiechter, A. and Reiser, J. 1994a. Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa rhlAB* gene encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. J. Biol. Chem. 269: 19787 - 19795
- Ochsner, U.S., Koch, A.K., Fiechter, A. and Reiser, J. 1994b. Isolation and Characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 176: 2044-2054
- Ochsner, U.A. and Reiser, J. 1995. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 6424-6428
- Ochsner, U.S., Reiser, J. Fiechter, A. and Witholt, B. 1995. Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3503 - 3506
- Ochser, U.A., Hembach, T. and Fiechter, A. 1996. Production of rhamnolipid biosurfactant. In Fiechter A. (ed) Advances in biochemical engineering biotechnology, vol 53. Springer, Berlin Heidelberg. New York. pp. 89 – 118
- Olvera, C., Goldberg, J.B., Sanchez, R. and Soberon-Chavez, G. 1999. The *Pseudomonas aeruginosa algC* gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. FEMS Lett. 179: 85-90

- Osman, M., Ishigami, Y., Someya, J. and Jensen, H.B. 1996. The bioconversion of ethanol to biosurfactants and dye by a novel coproduction technique. J. Am. Oil. Chem. Soc. 73: 851 – 856
- Parra, J.L., Pastor, J., Comelles, F., Manresa, M.A. and Bosch, M.P. 1990. Studies of biosurfactants obtained from olive oil. Tenside. Surf. Det. 27: 302 - 306
- Patel, R.M. and Desai, A.J. 1997. Surface-active properties of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* GS3. J. Basic. Microbiol. 37: 281-286
- Persson, A. Osterberg, E, and Dostalek, M. 1988. Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* 378: growth and product characteristics. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29: 1-4
- Providenti, M.A., Flemming, C.A., Lee, J. and Trevors, J.T. 1995. Effect of addition of rhamnolipid biosurfactants on phenanthrene mineralization in soil slurries. FEMS Microbiol. Eco. 17: 15 - 26
- Rahim, R., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Ochsner, U.A. Lam, J.S. and Soberon-Chavez, G. 2001. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhIC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for dirhamnolipid biosynthesis. Mol. Microbiol. 40: 708 - 718
- Rahim, R., Burrows, L.L., Monteriro, M.A., Perry, M.B. and Lam, J. 2000. Involvement of rml locus in core oligosaccharide and o polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol. 146: 2803-2814
- Reiling, H.E., Thanei-Wyss, U., Guerra-santos, L.H., Hirt, R., Kappeli, O. and Fiechter, A. 1986. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 51: 985-989
- Rehm, B.H.A., Mitsky, T.A. and Steinbochel, A. 2000. Role of fatty acid de novo biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by *Pseudomonas*: establishment of the transacylase (PhaG) –mediated pathway for PHA biosynthesis in *Escherichia coli*. Appl. Envi. Microbiol. 67: 3102-3109
- Rendell, N.B., Taylor, G.W., Somerville, M., Todd, H., Wilson, R. and Cole, P.J. 1990. Characterisation of *Pseudomonas* rhamnolipids. Biochemica et Biophysica Acta. 1045: 189-193
- Robert, M., Mercade, M.E., Bosch, M.P., Parra, J.L., Espuny, M.J., Manresa, M.A. Guinea,

- J. 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. Biotechnol Lett. 11: 871 - 874
- Rosenberg, E. 1986. Microbial surfactants. CRC Crit Rev. Biotechnol. 3: 109-132
- Rosenberg, E. and Ron, E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. 1999. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52: 154-162
- Sandrin, T.D., Chech, A.M. and Maier, R.M. 2000. A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4585-4588
- Scheiberbogen, K., Zytner, R.G., Lee, H. and Trevors, J.T. 1994. Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactant and some chemical surfactants. J. Chem. Tech. Biotechnol. 59: 53 - 59
- Schenk, T., Schuphan, I. and Schmidt, B. 1995. High-performance lipids chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J.Chromatogr. A. 693: 7 – 13
- Sen, R. 1997. Response surface optimization of the critical media components for the production of surfactant. J. Chem. Tech. Biotechnol. 68: 263 – 270
- Shreve, G.S., Inguva, S. and Gunnam, S. 1995. Rhamnolipid biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 4: 331 - 337
- Siegmund, I. And Wagner, F. 1991. New meyhod for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. Biotechnol. Technol 5: 265 – 268
- Siemann, M. and Wagner, F. 1993. Prospects and limits for the production of biosurfactants using immobilized biocatalysts. In Kosaric N. (ed) Biosurfactant. Dekker. New York. Basel. Hong Kong. pp. 99 – 133
- Sim, L., Ward, O.P. and Li, Z.Y. 1997. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. J. Indus. Microbiol. Biotechnol. 19: 232-238
- Sheppard, J.D. and Mulligan, C.N. 1987. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27: 110 - 116
- Stanghellini, M.E., Rasmussen, S.L., Kim, D.H. and Rorabaugh, P.A. 1996. Efficacy of

- nonionic surfactants in the control of zoospore spread of *Pythium aphanidermatum* in a recirculating hydroponic system. Plant. Dis. 80: 422 - 428
- Stanghellini, M.E. and Miller, R.M. 1997. Biosurfactants-their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. Plant. Dis. 81: 4 - 12
- Suzuki, T. and Itoh, S. 1972. Verfahren zur biotechnischen Herstellung rhamnosehaltiger Glycolipide. Deutsches Patent 2 150 375 (Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd, Tokyo)
- Suzuki, T., Hayashi, K., Fujikawa, K. and Tsukamoto, K. 1965. The chemical structure of polymyxin E. The identities of polymyxin E₁ with colistin A and polymyxin E₂ with colistin B. J. Biol. Chem. 57: 226 - 227
- Syldatk, C., Lang, S., Wagner, F., Wray, V. and Witte, L. 1985a. Chemical and physical Characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* spec. DSM 2874 grown on n-alkane. Z Naturforsch. 40 : 51 – 60
- Syldatk, C., Lang, S., Matulovic, U. and Wagner, F. 1985b. Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkane or glycerol by resting cell of *Pseudomonas* species DSM 2874. Z Naturforsch. 40 : 61 – 67
- Syldatk, C. and Wagner, F. 1987. Production of biosurfactants. In Kosaric N., Cairns W.L. and Gray N.C.C. (eds) Biosurfactants and biotechnology. Dekker. New York. Basel. pp. 89 - 120
- Tahara, Y., Yamada, Y., and Kondo, K. 1976a. A new lipids; the ornithine and taurine-containing 'cerilipin'. Agric. Biol. Chem. 40: 243-244
- Tahara, Y., Yamada, Y., and Kondo, K. 1976b. A new lysin containing lipids isolated from *Agrobacterium tumefaciens*. Agric. Biol. Chem. 40: 1440-1450
- Tan, H., Champion, J.T., Artiola, J.F., Brusseau, M.L. and Miller, R.M. 1994. Complexation of cadmium by a rhamnolipid biosurfactant. Environ Sci Technol. 28: 2402 - 2406
- Thai, L.T. and Maier, W.J. 1992. Solubilization and biodegradation of octadecane in the presence of two commercial surfactants. Proceedings of the 47th Annual Purdue University Industrial waste Conference. Ann. Arbor Press. Chelsea. Mich
- Thangamani, S. and Shreve, G.S. 1994. Effect of anionic biosurfactant on hexadecane partitioning in multiphase systems. Environ. Sci. Technol. 28: 1993 – 2000
- Torrens, J.L., Herman, D.C. and Miller-Maier, R.M. 1998. Biosurfactant (rhamnolipid)

- sorption and the impact on rhamnolipid-facilitated removal of cadmium from various soils. Environ. Sci. Technol. 32: 776 - 781
- Van Dam, R.A., Barry, M.J., Ahokas, J.T. and Holdway, D.A. 1999. Investigating mechanisms of diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) toxicity to the cladoceran, *Daphnia carinata*. Aqua Toxicol. 46: 191 - 210
- Van Dyke, M.I., Couture, P., Brauer, M., Lee, H. and Trevors, J.T. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. Can. J. Microbiol. 39: 1071-1078
- Wagner, F., Behrendt, U., Bock, H., Kreschmer, A., Lang, S. and Syltatk, C. 1983. Production and chemical characterization of surfactants from *Rhodococcus erythropolis* and *Pseudomonas* sp. MUB grown on hydrocarbons. In Zajic J.E., Cooper D.G., Jack T.R. and Kosaric N. (eds) Microbial enhanced oil recovery. Penn Well Books. Tulsa. Okla. pp. 55 – 60
- Wagner, F., Kim, J-S., Lang, S., Li, Z-Y., Marwede, G., Matulovic, U., Ristau, E. and Syltatk, C. 1984. Production of surface active anionic glycolipids by resting and immobilized microbial cell. In Proceedings of the 3 rd European Congress on Biotechnology, vol 1 VCH. Weinheim. pp. 3 – 8
- Williams, A.G. and Wimpenny, J.W.T. 1978. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB11264 grown in continuous culture. J. Gener. Microbiol. 104: 47- 57
- Wullbrandt, D., Giain, C., Mixich, J., Kunz, M., Rapp, M.N. and Vogel, M. 1994. L-Rhamnose durch fermentation pflanzlicher ole. In DECHEMA (ed) Kurzfassungen der 12. Jahrestagung der Biotechnology. Frankfurt. DECHEMA. Frankfurt.
- Wullbrandt, D., Giain, C., Kunz, M. and Rapp, M.N. 1995. L-Rhamnoseein zuckerbaustein mit hohem anwendungspotential. In DECHEMA (ed) Kurzfassungen der DECHEMA /GVC jagung "Verfahren und Verfahrensschritte zur biotechnischen Produktion von Wertstoffen". Iresse. DECHEMA . Frankfurt. Vortrag 1
- Wullbrandt, D. 1998. Biotechnische Herstellung von L-rhamnose. In Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (ed) Biokonversion nachwachsender Rohstoffe. Tagungsband. L.V. Druck. Landwirtschaftsverlag. Munster. pp. 164 - 172

- Yamaguchi, M. Sato, A. and Yukuyama, A. 1976. Microbial production of sugar-lipids. Chem. Ind. 4 : 741 - 742
- Yamane, T. 1987. Enzyme technology for the lipid industry: an engineering overview. J. Am. Oil. Chem Soc. 64: 1657-1662
- Zhang, Y. and Miller, R.M. 1992. Enhanced Octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipids surfactant (Biosurfactant). Appl. Environ. Microbiol. 58: 3276-3282
- Zhang, Y. and Miller, R.M. 1994. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2101 - 2106
- Zhang, Y. and Miller, R.M. 1995. Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2247-2251
- Zhang, Y., Maier, W.J. and Miller, R.M. 1997. Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability and biodegradation of phenanthrene. Environ. Sci. Technol. 31: 2211 - 2217

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็งนิวเทรียนท์ (Nutrient Agar)

เนื้อสกัด (beef extract)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตเน (bacto peptone)	5.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

2. อาหารเหลวกำหนดสูตร (Define medium)

น้ำมันปาล์ม	20.0	มล.
แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)	4.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.4	กรัม
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม
กรดฟอสเฟอริก (H_3PO_4)	0.5	มล.
กรดบอริก (H_3BO_3)	1.53	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.284	มิลลิกรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1.71	มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.7	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.9	มิลลิกรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	4.3	มิลลิกรัม
โคบอลคลอไรด์ ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.1	มิลลิกรัม
อีดีทีเอ (EDTA)	200.0	มิลลิกรัม
แคลเซียม-แพนโททีเนต (Calcium Pantothenate)	1.176	มิลลิกรัม
ไบโอติน (Biotin)	5.88	ไมโครกรัม
กรดโฟลิก (Folic acid)	5.88	ไมโครกรัม
อินโนซิทอล (Inositol)	0.588	ไมโครกรัม
ไนอาซิน (Niacin)	1.176	ไมโครกรัม
กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (<i>p</i> -Aminobenzoic acid)	0.588	มิลลิกรัม

ไพโรดอกซิน-ไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxine-HCl)	1.176	มิลลิกรัม
ไรโบฟลาวิน (Riboflavin)	0.588	มิลลิกรัม
ไทอามีน-ไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine-HCl)	1.176	มิลลิกรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	14.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้ได้ 7.0 แล้วจึงฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน สำหรับสารละลายวิตามินได้แก่ แคลเซียม-แพนโททีเนต ไบโอติน กรดโฟลิก อินโนซิทอล ไนอาซิน กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก ไพโรดอกซิน-ไฮโดรคลอไรด์ ไรโบฟลาวิน ไทอามีน-ไฮโดรคลอไรด์ ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรอง

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. มอลิช รีเอเจนท์ (Molish reagent)

แอลฟา-แนฟทอล (α -naphthol)	1.575	กรัม
เอทานอล (ethanol)	51.0	มล.
กรดซัลฟูริก (sulphuric acid)	6.5	มล.
น้ำกลั่น	4.0	มล.

ละลายแอลฟา-แนฟทอลในเอทานอล แล้วเติมน้ำกลั่น และ กรดซัลฟูริกตามลำดับ

2. สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 1 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 (1 M Tris-HCl buffer pH 8)

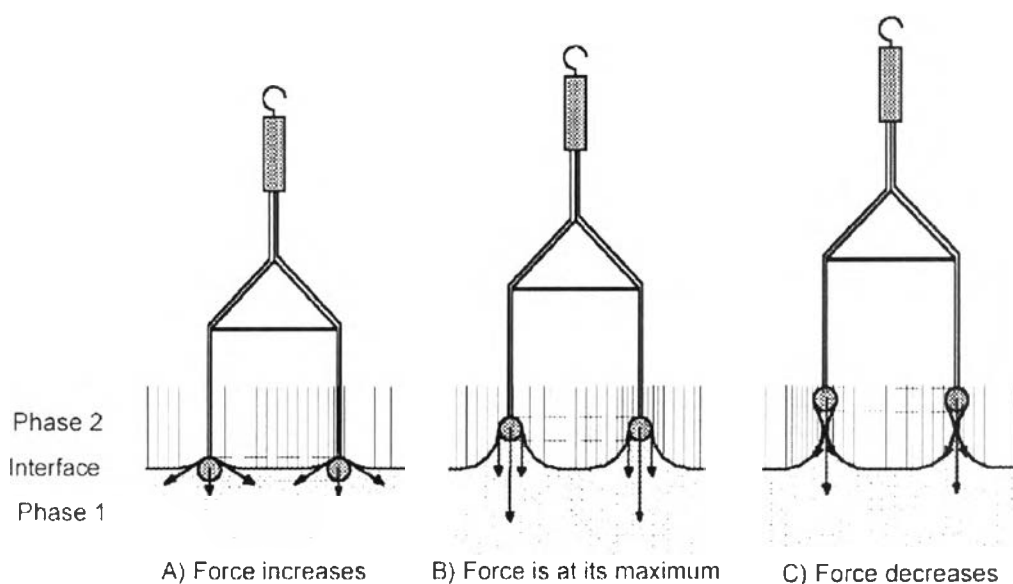
ทริสมา เบส	12.11	กรัม
น้ำกลั่น	80	ลิตร

ปรับความเป็นกรดเป็นด่างให้เป็น 8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ถ้าหากต้องการทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างอื่นๆ ก็ให้ใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปรับให้มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างนั้นๆ

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 แรงสูงสุดที่ใช้ในการดึงวงแหวนทองคำขาวพ้นของเหลวคือ ค่าแรงตึงผิว (surface tension) คุณลักษณะของวงแหวนทองคำขาวก็คือ ความยาวที่ถูกทำให้เปียก (wetted length) ซึ่งรวมทั้งรัศมีด้านในและด้านนอกของวงแหวนทองคำขาวที่ทำให้เปียกโดยของเหลว



ภาพแสดงขั้นตอนการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring

วัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring เป็นวิธีวัดสารละลายที่มีสารลดแรงตึงผิว ดังนั้นถ้าพื้นผิวใหม่ถูกสร้างขึ้นขณะทำการวัดค่าแรงตึงผิว เช่นเมื่อวงแหวนยกตัวขึ้นทำให้ไม่รู้พื้นผิวอย่างแน่นอน และค่าแรงตึงผิวที่วัดได้ก็เปลี่ยนไป

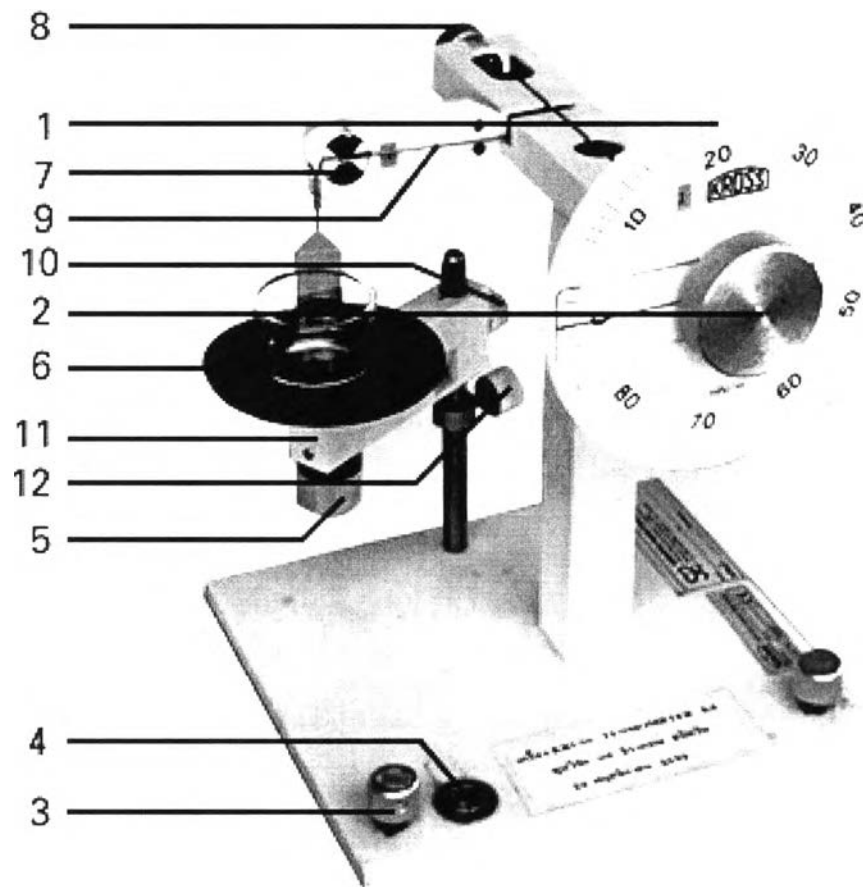
อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าแรงตึงผิว

ลักษณะและองค์ประกอบของเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Tensiometer) รุ่น K6 ของบริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน แสดงดังรูป เครื่องวัดค่าแรงตึงผิวนี้ทำการวัดที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ตลอดทำการทดลอง

ขั้นตอนการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว มีดังนี้

1. ปรับ handwheel with point (2) ให้สเกลมีค่าศูนย์

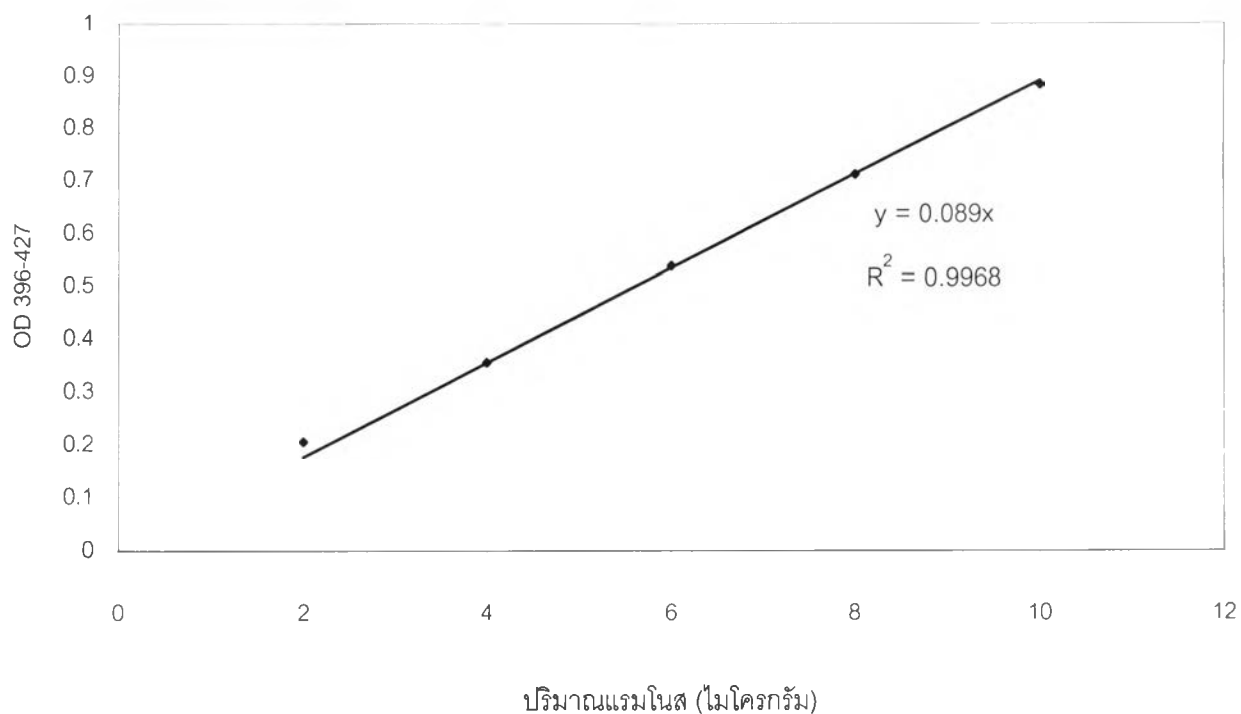
2. ปรับ zero adjustment (8) โดยหมุนทวนเข็มนาฬิกาให้ balance beam (9) อยู่ในตำแหน่งสมดุลกึ่งกลางของ mark (7)
3. ปรับระดับที่วางสารตัวอย่างโดยหมุน (10) แล้วยกขึ้นให้อยู่ในระดับที่ต้องการ
4. แขนง ring ลงใน balance beam (9) ปรับให้อยู่ในตำแหน่งสมดุลโดยหมุน zero adjustment (8) ตามเข็มนาฬิกา
5. ใส่สารตัวอย่างในที่ใส่สารตัวอย่างประมาณ 10 – 15 มล. วางลงบน sample table (6) แล้วหมุน micrometer screw (5) ตามเข็มนาฬิกาเพื่อยกที่ใส่สารตัวอย่างขึ้นให้สัมผัสกับ ring โดยให้ ring จมอยู่ในตัวอย่างไม่น้อยกว่า 5 มม.
6. เมื่อ ring สัมผัสกับตัวอย่างแล้วอาจต้องปรับ balance beam (9) ให้อยู่ในตำแหน่งสมดุลอีกครั้งโดยหมุน zero adjustment (8) ทวนเข็มนาฬิกา
7. เริ่มวัดค่าแรงตึงผิวโดยหมุน micrometer screw (5) ทวนเข็มนาฬิกาอย่างช้าๆ ในขณะที่เดียวกันก็หมุน pointer (2) ตามเข็มนาฬิกาอย่างช้าๆ โดยรักษาให้ balance beam (9) อยู่ในตำแหน่งสมดุล
8. เมื่อ ring หลุดออกจากตัวอย่างอ่านค่าแรงตึงผิวตามสเกล (1) มีหน่วยเป็น mN/m



แสดงองค์ประกอบของเครื่องวัดค่าแรงตึงผิวรุ่น K6 บริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน

- | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 1. Scale in mN/m | 7. Mark |
| 2. Handwheel with pointer | 8. Handwheel for zero-adjust |
| 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



กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์น้ำตาลแรมโนส

จากกราฟมาตรฐานมี slope = 0.089

ปริมาณน้ำตาลแรมโนส (ไมโครกรัม) = O.D. 396 - 427 / slope

แล้วจึงคิดย้อนกลับว่าในหลอดทดลองมีปริมาตรตัวอย่างกี่มล. และถ้า 1 มล. ของตัวอย่างมีน้ำตาลแรมโนสกี่ไมโครกรัม ตัวอย่างเช่น

$$\begin{aligned}
 \text{ปริมาณน้ำตาลแรมโนส} &= \text{O.D. 396} - 427 / 0.089 \\
 &= 0.363 / 0.089 \\
 &= 4.079 \text{ } \mu\text{g} \text{ เมื่อมีตัวอย่างปริมาตร 0.2 ml.}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{ตัวอย่างปริมาตร 1 มล. มีน้ำตาลแรมโนส} &= 4.079 \text{ } \mu\text{g} / 0.2 \text{ ml.} \\
 &= 20.395 \text{ } \mu\text{g/ml}
 \end{aligned}$$

ภาคผนวก จ

1. หลักการของไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโทกราฟี จะอาศัยหลักการพื้นฐานเดียวกับลิควิดโครมาโทกราฟีคือ คุณสมบัติของสารแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการดูดซับและถูกทำให้หลุดออกจากการดูดซับต่อสารซึ่งเป็นเฟสคงที่ไม่เท่ากัน และเมื่อพัฒนาวิธีการโดยใช้เฟสคงที่ และคอลัมน์ที่มีขนาดเล็กมากทั่วไป ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโทกราฟี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฟสคงที่ประมาณ 5 – 10 μm และคอลัมน์มีขนาดประมาณ 2 – 6 mm ดังนั้นเพื่อให้สารละลายชะตัวอย่างที่จะแยกออกจากคอลัมน์ จึงเกิดความดันสูงมากคือประมาณ 100 – 200 atm (ขึ้นกับชนิดของคอลัมน์) ข้อดีของไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโทกราฟีคือ ประสิทธิภาพของคอลัมน์เพิ่มขึ้นกว่าลิควิด โครมาโทกราฟีเป็น 10 – 100 เท่า และใช้เวลาในการแยกที่สั้นกว่า

ไฮ เพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโทกราฟีแบ่งเป็น 2 ประเภทตามเทคนิค ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาพขั้วสัมพัทธ์ คือ

1. Normal-Phase Bonded Phase Chromatography คือเฟสคงที่มีสภาพมีขั้วมากกว่าเฟสเคลื่อนที่ โดยทั่วไปจะใช้ silica gel บรรจุในคอลัมน์ ถ้าในตัวอย่างที่ใช้แยกเป็นสารประกอบที่ไม่มีขั้วและชอบละลายในเฟสเคลื่อนที่มากกว่าดูดซับกับเฟสคงที่คงที่มีขั้ว จึงเป็นสารประกอบที่ออกมาก่อน เทคนิค Normal-Phase Bonded Phase Chromatography เหมาะสำหรับการแยกสารประเภท alkane, lipids, saccharide, steroids, วิตามินที่ละลายได้ในไขมัน เช่น A, D และ E นอกจากนั้นยังเหมาะกับสารประกอบที่ไม่เสถียรเมื่อละลายอยู่ในน้ำ

2. Reverse-Phase Bonded Phase Chromatography คือ เมื่อเฟสคงที่เป็นพวกไม่มีขั้วโดยทั่วไปจะเป็นหมู่ octadecyl หรือ octyl silane functional group และเฟสเคลื่อนที่เป็นพวกมีขั้ว เช่น น้ำผสมกับตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ เช่น เมทานอล หรืออะซิโตไนโตรล์ ลำดับการชะล้างตัวถูกละลายจะมีลักษณะตรงข้ามกับที่เกิดขึ้นใน Normal –Phase Bonded Phase Chromatography ดังนั้นสารประกอบที่มีขั้วจะถูกชะล้างออกมาก่อน เนื่องจากตัวอย่างที่แยกชอบที่จะละลายในเฟสเคลื่อนที่ และสารประกอบที่ไม่มีขั้วจะถูกยึดอยู่ในคอลัมน์ทำให้ถูกชะล้างออกมาทีหลัง ซึ่งเทคนิคนี้จะเหมาะสมอย่างมากกับสารประกอบที่ไม่ละลาย หรือละลายได้เล็กน้อยในน้ำ แต่สามารถละลายได้ใน แอลกอฮอล์หรือตัวทำละลายอินทรีย์ตัวอื่นๆ ที่ละลายน้ำได้ดี เนื่องจากสารประกอบอินทรีย์เป็นจำนวนมากมีพฤติกรรมของการละลายในลักษณะนี้ ดังนั้น Reverse-Phase Bonded Phase Chromatography จึงเป็นที่นิยมใช้อย่างมากใน HPLC

ความนิยมของ Reverse-Phase Bonded Phase Chromatography เนื่องจาก

1. สามารถนำมาใช้แยกพวก nonionic, ionic และสารประกอบที่แตกตัวเป็นไอออนได้ บางครั้งสามารถแยกสารประกอบประเภทนี้พร้อมๆ กันโดยใช้คอลัมน์และเฟสเคลื่อนที่อย่างเดียวกัน
2. bonded – phase คอลัมน์ค่อนข้างเสถียร แต่ควรจะต้องระวังเกี่ยวกับการควบคุม pH ของเฟสเคลื่อนที่
3. เฟสเคลื่อนที่ที่นิยมใช้ เช่น น้ำซึ่งมีราคาถูกและหาง่ายและ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ค่อนข้างนิยมใช้กันมาก คือ เมทานอล ซึ่งมีราคาไม่แพงนักและ มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง
4. สามารถทำนายลำดับของการที่สารถูกชะออกมาจากคอลัมน์ เพราะว่า retention time จะเพิ่มขึ้นตามสมบัติของสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำ
5. สมดุลที่เกิดขึ้นในคอลัมน์เกิดขึ้นเร็ว ทำให้เหมาะแก่การนำไปใช้ใน gradient elution

องค์ประกอบของเครื่อง HPLC มีดังนี้

1. ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (mobil phase reservoir) ขวดที่ใส่เฟสเคลื่อนที่จะมีอุปกรณ์ที่ใช้ไล่อากาศที่ละลายอยู่ เพื่อกำจัดก๊าซออกซิเจนซึ่งอาจจะทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิด หรือเฟสคงที่ที่อยู่ในคอลัมน์และยังลดโอกาสที่จะทำให้เกิดฟองอากาศในเครื่องตรวจหา (detector) ขณะทำการทดลองอยู่
2. ระบบของปั๊ม (pumping system) ใน HPLC มีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่จะไหลผ่านคอลัมน์ซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กบรรจุอยู่ ความต้านทานการไหลที่วุ่นนี้จะมากเมื่อใช้อนุภาคเล็กๆ และคอลัมน์มีขนาดเล็กอีกด้วย จึงจำเป็นที่จะต้องใช้ความดันสูงดันเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลไป ปั๊มที่ใช้แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ

- 1) mechanical pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่
- 2) pneumatic pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้ความดันของการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่

3. อุปกรณ์ที่ใช้ตรวจวัดความดันที่ใช้ตรวจวัดความดัน (Pressure Monitoring Devices) โดยจะบอกความดันของเฟสเคลื่อนที่ก่อนเข้าสู่คอลัมน์ ค่าความดันจะบอกได้ว่ามีสิ่งอุดตันหรือไม่ และปั๊มยังทำงานได้ดีหรือไม่ นอกจากนั้นการทราบความดันของเครื่องจะช่วยให้การปรับพารามิเตอร์ต่างๆ เป็นไปอย่างเหมาะสมที่สุด

4. อุปกรณ์สำหรับทำ Gradient Elution เนื่องจากสารประกอบบางชนิดไม่สามารถแยกได้เมื่อใช้ isocratic elution การเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ระหว่างที่ทำ gradient elution นั้นสามารถทำได้โดยการตั้งโปรแกรมเป็นแบบเส้นตรง (linear) เส้นโค้ง หรือแบบเป็นขั้น (stepwise) สามารถแบ่งอุปกรณ์สำหรับทำ Gradient Elution เป็น 2 แบบ

- 1) แบบ low pressure gradient เป็นแบบที่ใช้วิธีการผสมตัวทำละลายที่ความดันของบรรยากาศ และต่อจากนั้นก็จะถูกปั๊มต่อไปด้วยความดันสูงเข้าสู่คอลัมน์

- 2) แบบ high pressure gradient เป็นแบบที่ตัวทำละลายที่ใช้ใน gradient elution จะถูกปั๊มผ่าน high pressure pump เข้าสู่ low volume mixing chamber ก่อนจะเข้าสู่คอลัมน์
5. Sample Introduction Devices เพื่อให้ตัวอย่างที่ผ่านเข้าสู่คอลัมน์ควรอยู่ในลักษณะที่เป็นแถบที่แคบมากที่สุดเท่าที่ทำได้ ดังนั้นจึงใช้ microsampling valve หรือใช้การฉีดสารตัวอย่างผ่าน septum ด้วย microsyringe และควรต้องระมัดระวังเนื่องจากความดันภายในสูง
6. Microsampling Valve สารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปจะอยู่ภายนอกที่ต่อเข้ากับ valve ปัจจุบัน micro valve สามารถนำมาใช้ได้กับสารตัวอย่างที่มีขนาดตั้งแต่ 0.5 μl ถึงหลายมิลลิลิตร (แล้วแต่ขนาดของ loop ภายใน) valve ซึ่งมีท่ออยู่ภายนอกยอมให้ฉีกสารตัวอย่างเข้าไปได้ในปริมาณมาก นอกจากนั้น valve ประเภทนี้ยังสามารถใช้งานได้ที่ความดันสูงถึง 5,000-6,000 psi โดยที่ไม่เกิดการรั่วไหล
7. เครื่องตรวจวัด (Detector) มีหลายชนิดขึ้นกับตัวอย่างสารที่แยก เช่น

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

2) เครื่องดิฟเฟอเรนเชียลรีแฟรกโตมิเตอร์ (Differential Refractometers) โดยใช้ตรวจสอบดรรชนีหักเห (refractive index, IR) อย่างต่อเนื่อง ระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสเคลื่อนที่ที่มีสารประกอบของตัวถูกละลายอยู่ขณะผ่านออกจากคอลัมน์ เนื่องจากดีเทคเตอร์ชนิดนี้จัดอยู่ในแบบ bulk property หรือ general detector ดังนั้นมันจึงให้สัญญาณกับตัวทำละลายได้ทั้งหมด ตรงที่ตัวถูกละลายมีค่าดรรชนีหักเหต่างจากเฟสเคลื่อนที่

2. หลักการของแมสสเปกโตรเมตรี (Mass Spectrometry)

แมสสเปกโตรเมตรีเป็นเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ที่ใช้หาข้อมูลของโครงสร้างและมวลโมเลกุลของสาร เมื่อทำให้โมเลกุลแตกตัวเป็นไอออนด้วยการให้โมเลกุลรับพลังงานที่มากพอจนทำให้โมเลกุลนั้นเกิดการแตกตัวเป็นไอออน ซึ่งพลังงานที่ใช้จะอยู่ในช่วง 5-70 eV (1 eV = 23.06 Kcal/mole) จากนั้นทำการแยกและตรวจสอบไอออนที่เกิดขึ้นนั้นอีกครั้งหนึ่ง แมสสเปกโตรมิเตอร์จะบ่งบอกถึงลักษณะการแตกตัวของโมเลกุลไอออน หรือรวมรูปแบบของการแตกตัวของแต่ละไอออนทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้ว ก็จะได้รูปแบบการแตกตัว (fragmentation pattern) ของโมเลกุล ขึ้นกับสารแต่ละชนิด พลังงานที่ใช้ โครงสร้างของโมเลกุล เวลาระหว่างเกิด และการตรวจพบไอออนจึงกล่าวได้ว่าแมสสเปกโตรมิเตอร์เป็นรูปแบบของการแตกตัวของสารที่อยู่ในสภาวะมีพลังงานและช่วงเวลาที่กำหนด

3. หลักการของอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Infrared Spectroscopy)

อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์โมเลกุลของสารโดยอาศัยการสั่น (vibration) และการหมุน (rotation) เมื่อโมเลกุลสารดูดกลืนรังสีอินฟราเรด อินฟราเรดเป็นช่วงหนึ่ง

ของสเปกตรัมของการแผ่รังสีแม่เหล็กไฟฟ้าซึ่งมี wave number อยู่ในช่วง $12,800 - 10 \text{ cm}^{-1}$ หรือมีช่วงความยาวคลื่น $0.78 - 1,000 \text{ }\mu\text{m}$ เพื่อง่ายและสะดวกจะแบ่งอินฟราเรดสเปกตรัมเป็น 3 ช่วงคือ

1. ช่วงใกล้อินฟราเรด (near IR region) หรือ over region มีความยาวคลื่น $0.78 - 2.5 \text{ }\mu\text{m}$ มี wave number ตั้งแต่ $12,800 - 4,000 \text{ cm}^{-1}$ เป็นช่วงที่อยู่ใกล้ช่วงวิสิเบิล ซึ่งเกิดจากการรวมกันของ IR ที่อยู่ในช่วงกลาง หรือช่วงที่ต่ำกว่า $2.5 \text{ }\mu\text{m}$ และมักจะพบว่า absorption band ที่ได้ค่อนข้างต่ำ (weak overtone absorption) มีประโยชน์ในการวิเคราะห์สารพวก aromatic compounds หรือพวก aromatic substitution

2. ช่วงกลางอินฟราเรด (middle IR region) หรือ fundamental region และยังแบ่งเป็น

1) group – frequency region มี wave number $4,000 - 13,000 \text{ cm}^{-1}$ หรือ $2.5 - 8 \text{ }\mu\text{m}$ ซึ่งสเปกตรัมที่ได้ในช่วงนี้ส่วนใหญ่ได้จากพวก functional groups แต่ไม่ทำให้ complete structure

2) finger print region เป็นช่วงที่อยู่ระหว่าง $13,000 - 650 \text{ cm}^{-1}$ สเปกตรัมที่ได้ในช่วงนี้ส่วนใหญ่เกิดจากโครงสร้างของโมเลกุลที่สมบูรณ์ ดังนั้นสเปกตรัมที่ได้ค่อนข้างยุ่งยาก การวิเคราะห์จึงต้องใช้วิธีเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสารที่ทราบโครงสร้างแล้ว

ช่วง IR ที่ใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์นั้นเป็นช่วงกลางอินฟราเรดเป็นส่วนใหญ่ คือ $4,000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ หรือ $2.5 - 25 \text{ }\mu\text{m}$

3. ช่วงไกลอินฟราเรด (far IR region) ช่วงนี้ไม่ค่อยจะใช้ในการวิเคราะห์เนื่องจากสเปกตรัมช่วงนี้มักเกิดจากการสั่นของโครงสร้าง (molecular structure) หรือเกิดจากการหมุนของโมเลกุล

เทคนิคทางอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีสามารถวิเคราะห์สารได้ทั้งที่เป็น ก๊าซ ของแข็ง หรือของเหลว คือ

1. การวิเคราะห์สารตัวอย่างที่เป็นก๊าซ (Gaseous Sample) ต้องมีเซลล์สำหรับใส่ก๊าซโดยที่ไปกว้างประมาณ 10 ซม. ความดันของก๊าซภายในเซลล์อาจเป็น 2 มม. ถึงหลายบรรยากาศก็ได้ ขึ้นอยู่กับก๊าซนั้นดูดกลืนอินฟราเรดดี หรือไม่ สำหรับเซลล์มาตรฐานจะมีขนาดเป็นปริมาตรของสารตัวอย่างต่อความหนาของสารตัวอย่างเป็น 20:1 (ในหน่วยเซนติเมตร) ในกรณีที่ต้องการให้ระยะทางที่แสงผ่านมาก ๆ อาจใช้ multireflection cell แทน

2. การวิเคราะห์สารตัวอย่างที่เป็นของเหลว (Liquid and Solution Sample) หากตัวอย่างเป็นเซลล์หรือสารละลายอยู่แล้วสามารถนำมาใส่เซลล์ได้เลย ซึ่งเซลล์ที่ใช้สำหรับของเหลวมี 3 ชนิด

1) sealed cell ที่มีความหนาคงที่

2) demountable cell ซึ่งสามารถปรับความหนาของสารตัวอย่างได้ โดยใช้ spacers ระหว่าง windows ทั้งสอง

3) variable thickness cell สามารถปรับความหนาของสารตัวอย่างได้

ในกรณีที่ต้องการทำเพียงคุณภาพวิเคราะห์ หรือสารตัวอย่างเป็นของเหลวชั้น อาจทำได้ง่ายๆ โดยหยดของเหลวลงไปบนแผ่น window แล้วประกบแผ่น window อีกแผ่นลงไปแล้วไปใส่เซลล์ holder นำไปวัดในเครื่องอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ สามารถหาสเปกตรัมได้เลยซึ่งสะดวก แต่ถ้าต้องการหาปริมาณด้วย จำเป็นต้องใช้เซลล์อย่างใดอย่างหนึ่งใน 3 ชนิดข้างบน โดยทั่วไปความหนาของเซลล์ที่ใช้วิเคราะห์จะน้อยกว่า 1 มม. หรือถ้าสารบริสุทธิ์มักจะทำให้ความหนา 0.01 – 0.025 มม.

3. การวิเคราะห์สารตัวอย่างที่เป็นของแข็ง (Solid Sample) สามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งเลือกใช้วิธีใดขึ้นกับสมบัติทางกายภาพของสารนั้นด้วย

1) วิธีอัดและรีดให้เป็นแผ่นบางๆ ด้วยโลหะบนแผ่นโลหะเรียบ แผ่นพลาสติก หรือแผ่นโลหะที่ฉาบด้วยพอลิเมอร์ที่ทนความร้อน เมื่อนำสารตัวอย่างไปอัดและรีดจนได้แผ่นบางๆ หรืออาจให้ความร้อนในขณะที่อัดและรีดด้วยก็ได้ เทคนิคนี้เหมาะกับสารตัวอย่างที่เป็นพลาสติก ถ้าสารตัวอย่างไม่แข็งมากนักอาจใช้ windows 2 แผ่น รีดสารตัวอย่างก็ได้ แต่ต้องระวัง windows แตกด้วย

2) วิธีหลอม นำสารตัวอย่างที่หลอมเหลวเทลงบนแผ่นโลหะเรียบ หรือระหว่าง window แผ่นประกบกัน แล้วทิ้งไว้ให้เย็น

3) วิธีตัดให้เป็นแผ่นบางๆ ด้วยไมโครทอม ใช้วิธีนี้กับพวกสารชีวภาพ พลาสติก หรือขี้ผึ้ง โดยทำให้อยู่ในรูปก้อน หรือแท่ง แล้วตัดให้เป็นแผ่นบางๆ ด้วยไมโครทอม

4) วิธีทำให้เป็นสารละลาย โดยให้สารตัวอย่างละลายในตัวทำละลายที่ระเหยได้ง่ายๆ แล้วนำสารละลายนั้นเทลงบนแผ่นกระจก แผ่นโลหะที่ขัดมัน หรือแผ่นพลาสติก หลังจากตัวทำละลายระเหยออกไปแล้ว ใช้มีดตัดแผ่นฟิล์มออกมา ถ้าสารนั้นไม่ละลายน้ำ ให้นำแผ่นฟิล์มจุ่มลงไป在水里 หลังจากนั้นทำให้แห้งแล้วสังเกตเห็นว่าแผ่นฟิล์มตรงกลางจะบางกว่าที่ขอบ เนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยใช้สารละลายให้มีความเข้มข้นมากที่สุดเท่าที่จะทำได้ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังคงมีตัวทำละลายหลงเหลืออยู่อีกบ้างเล็กน้อย

5) วิธี mull technique เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากสำหรับตัวอย่างที่เป็นของแข็ง อุปกรณ์ที่ใช้ คือ โกร่งอะเกต (agate mortar) ที่สะอาด และ mineral oil หรือ nujol หรือพาราฟินเหลว หรือ hexachlorobutadiene หรือ fluorolube เป็นต้น วิธีเตรียมตัวอย่างทำโดยใช้สารตัวอย่าง 2 – 3 มก. บดละเอียดด้วยโกร่งอะเกต แล้วหยด nujol ลงไป 2-3 หยด แล้วบดเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำสารตัวอย่างที่บดได้ใส่ลงบน NaCl windows หรือ windows อย่างอื่นเพียงเล็กน้อยแล้วประกบอีกแผ่น ฎไปมาจนทั่ว นำไปใส่ sample holder เพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ nujol ที่ใช้ดูดกลืนแสงอินฟราเรดมากที่สุดที่ $3,000 - 2,800 \text{ cm}^{-1}$ ดูดกลืนปานกลางที่ $1,460 \text{ cm}^{-1}$ และดูดกลืนเล็กน้อยที่ 720 cm^{-1}

6) วิธี KBr-pellet technique คือ ใช้สารพวกอัลคาไลด์ เช่น KBr ที่เป็นของแข็งผสมกับสารตัวอย่าง บดให้เข้ากันในโถงจะเกิดแล้วนำไปอัดจะได้สารเป็นแผ่นใส สามารถนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ได้เลย

ตารางแสดงรายการของ wave number และ ฟังก์ชันนอลกรุปที่ดูดกลืนแสงอินฟราเรตได้ปานกลางและดีมาก

Wave number range (cm ⁻¹)	Functional group
3700 – 3600	OH (H ₂ O, ROH, PhOH) (dilution solution)
3530 – 3400	NH ₂ (2 bands), NH (1 band) (dilution solution)
3500 – 3250	OH (polymers) (solids and liquid)
3500 – 3060	NH (amine, amides)
3320 – 3250	-C≡C-H (sharp)
3300 – 2400	COOH (broad)
3110 – 3000	C-H (C=C-H, Ph-H, CH ₃ -X, CH ₂ -X)
3000 – 2800	C-H (-CH ₂ -, -CH ₃)
2835 – 2815	OCH ₃
2750 – 2700	CHO
2260 – 2100	-C≡C-
2190 – 2130	CNS, C≡N
2000 – 1650	C-H (phenyl)
1980 – 1950	-C=C=C-
1950 – 1600	C=O
1715 – 1630	RCONH ₂ , RCONHR
1710 – 1530	-COO- (broad)
1680 – 1630	C=C (nonconjugated, noncyclic), C=N
1680 – 1560	C=C (cyclic, conjugated)
1650 – 1590	RONO, RONO ₂
1650 – 1475	RCONH ₂ , RCONHR
1615 – 1590	Phenyl
1615 – 1565	Pyridines (doublet)
1610 – 1560	COO M ⁻ M : Metal
1550 – 1490	PhNO ₂

Wave number range (cm ⁻¹)	Functional group
1515 – 1485	Phenyl
1475 – 1450	CH ₂ ,CH ₃
1440 – 1400	COOH
1430 – 1400	CO-CH ₂
1420 – 1400	CO-NH ₂
1400 – 1360	(CH ₃) ₃ C (2 band)
1400 – 1310	COO M ⁺ (abroad) M : Metal
1380 – 1370	CH ₃
1380 – 1360	CH(CH ₃) ₂ (2 band)
1370 – 1300	C-NO ₂
1330 – 1310	Ph-CH ₃
1300 – 1000	CF
1280 – 1250	SiCH ₃
1280 – 1180	C-N- (aromatic)
1280 – 1150	-C-O-C-
1255 – 1240	(CH ₃) ₃ C-
1275 – 1070	-C-O-C-
1230 – 1100	-C-N-
1160 – 1100	C=S
1200 – 1000	COH
1120 – 1030	C-NH ₂
1095 – 1015	Si-O-Si, Si-O-C
1000 – 970	CH=CH ₂
980 – 690	C=C-H
870 – 670	Aromatic ring
860 – 760	R-NH ₂ (broad)
835 – 800	CH=C (out of plane)
760 – 510	CCl
730 – 675	CH=CH (cis isomer)
700 - 550	CBr

4. หลักการของนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)

NMR เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการวัดระดับพลังงานที่แตกต่างกับของนิวเคลียสที่อยู่ภายใต้อิทธิพลของสนามแม่เหล็ก ซึ่งเป็นประโยชน์มากในการหาสูตรโครงสร้างของสารทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์ นอกจากนี้ใช้หาสูตรโครงสร้างแล้วยังใช้วิเคราะห์ปริมาณสาร สามารถวิเคราะห์ที่อยู่ในรูปของก๊าซ ของแข็ง หรือของเหลวซึ่งนิยมมากที่สุดโดยทำให้อยู่ในรูปของสารละลาย หลักการวิเคราะห์ของนิวเคลียสแมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี คือ นิวคลีไอ (nuclei) ของธาตุบางชนิดมีสมบัติของแม่เหล็ก เนื่องจากมีประจุและประพจน์ตัวเหมือนกับหมุนอยู่ตลอดเวลา จึงสามารถศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางแม่เหล็กของนิวคลีไอได้เมื่อนำนิวคลีไอไปวางในสนามแม่เหล็ก ตัวอย่างนิวคลีไอที่มีสมบัติแม่เหล็ก ^1H , ^{13}C , ^{14}N , ^{15}N , ^{17}O , ^{19}F , ^{31}P เป็นต้น ที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์คือ ^1H และ ^{13}C ถ้าหากนำตัวอย่างที่มีนิวคลีไอ ^1H ไปวางในสนามแม่เหล็กแล้วให้พลังงานในช่วงความถี่ของคลื่นวิทยุที่เหมาะสม จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีไอ โดยนิวคลีไอในระดับพลังงานต่ำจะดูดกลืนพลังงานแล้วขึ้นไปอยู่ในระดับพลังงานสูง (จัดตัวในทิศทางตรงข้ามกับสนามแม่เหล็ก) นิวคลีไอในระดับพลังงานสูงบางตัวจะถูกกระตุ้นให้คายพลังงานออกมาแล้วลงไปอยู่ในระดับพลังงานที่ต่ำ (จัดเรียงตัวในทิศทางเดียวกับสนามแม่เหล็ก) การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้เรียกว่า เรโซแนนซ์ เนื่องจากนิวคลีไอของ ^1H แต่ละตัว ^1H ในสารตัวอย่างอยู่ในสภาวะแวดล้อมแตกต่างกัน (อยู่ในตำแหน่งที่ต่างกัน โครงสร้าง) จึงทำให้มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนแตกต่างกัน การเกิดเรโซแนนซ์ของโปรตรอนแต่ละตัวจึงแตกต่างกันออกไปที่ความถี่วิทยุหนึ่งๆ เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า chemical shift ซึ่งเป็นค่าที่ใช้จำแนกตำแหน่งและชนิดของโปรตรอน



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว นพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ เกิดวันที่ 15 พฤศจิกายน พ.ศ. 2519 จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2541 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2542