รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จันทรนาถ พลชำนิ. 2548. ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยไลเปสจากแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Arima, K., Kakinuma, A., and Tamura, G. 1968. Surfactin, Acrystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. Biochem. Biophysi. Res. Comm. 31: 488- 494.

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

Banat, I. M. 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. Bioresource technol. 51: 1- 12.

Banat, I. M., and Jitendra, J. D. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol Mol Biol Reviews. Mar: 47- 64.

Banat, I. M., Makkar, R. S., and Cmetra, S. S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. Appl. Microbial. Biotecnol. 53, 495 -508.

Belsky, I., Gutnick, D. L., and Rosenberg, E. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG- 1: Determination of emulsifier bound fatty acids. FEBS Lett. 101: 175- 178.

Bemheimer, A. W. and Avigad, L. S. 1970. J. Gen. Microbiol. 61: 361- 369. In Cooper, D. G. and Zajic, J. E. 1980. Surface active compounds from microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 26: 229- 256.

Bloomberg, G. 1991. Designing proteins as emulsifiers. Lebensmitteltechnologie. 24: 130- 131.

Brown, M. J. 1991. Biosurfactants for cosmetic applications. Int. J. Cosmet. Sci. 13: 61-64.

Brundish, D.E., Shaw, N. and Baddiley, J. 1967. Biochem. Biophysi. Acta. 120. 148- 155. In Cooper, D. G. and Zajic, J. E. 1980. Surface active compounds from microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 26: 229- 256.

Bunster, L., Fokkema, N. J., and Schippers, B. 1989. Effect of surface- active *Pseudomonas* spp. on leaf wetability. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1340- 1345.

Burd, G. and Ward, O. P. 1997. Energy- dependent accumulation of particulate biosurfactant by *Pseudomonas marginalis*. Can. J. Microbiol. 43: 391- 394.

Cameotra, S. S. and Makkar, R. S. 1998. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. Appl. Miocrobiol. Biotechnol. 50: 520- 529.

Cameron, D. R., Cooper, D. G., and Neufeld, R. J. 1988. The monoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1420- 1425.

Cappello, M.S., Bleve, G., Grieco, F., Dellaglio, F., and Zacheo, G. 2004. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. Journal of Applied Microbiology. 97: 1274–1280.

Cavalero D. A., Cooper D. G., 2003. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida biombicola* ATCC 22214. J. Biotechnol., 103, 31-41.

Cirigliano, M. C. and Carman, G. M. 1985. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Appl. Environ. Microbiol. 50: 846- 850.

Cook, A. H. 1958. The Chemistry and Biology of Yeasts. New York. 63: 251.

Cooper, D. G., and Paddock, D. A. 1983. *Torulopsis petrophilum* and surface activity. Appl. Environ. Microbiol. 46: 1426- 1429.

Cooper, D. G., and Paddock, D. A. 1984. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. Appl. Environ.Microbiol. Jan. 173-176.

Cooper, D. G., and Zajic, J. E. 1980. Surface active compounds from microorganism. Adv. Appl. Microbiol. 16: 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.

Culter, A. J. and Light, R. J. 1979. Regulatio 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. In Desai, J. D., and Banet, I. M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbio. Mol. Bio. Rev. 61: 47-64.

Daniel, H. J. , Otto, R. T., Binder, M., and Syldatk, C. 1998. Sophorolipid production with high yields on whey concentrated and rape seed oil without consumption of lactose. Biotechnol. Lett. 20: 805–807.

Davila, A. M., Marchal, R., and Vandecasteele, J. P. 1997. Sophorose lipid fermentation with differentiated substrate supply for growth and production phase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47: 496- 501.

Desai, A. J., Patel, K. M., and Desai, J. D. 1988. Emulsifier production by *Pseudomonas fluorescens* during the growth on hydrocarbon. Curr. Sci. 57: 500- 501.

Desai, J. D., and Banet, I. M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbio. Mol. Bio. Rev. 61: 47-64.

Deshande M., Daniels L. 1995. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by. *Candida bombicola* using animal fat. Biores. Technol. 54, 143-150.

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., and Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8s rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. International Journal of Systematic Bacteriology. 49: 329–337.

Fiechter, A. 1992. Biosurfactants: moving towards industrial application. Trends. Biotechnol. 10: 208 –217.

Frautz, B., Lang, S., and Wagner, F. 1986. Formation of cellobiose lipids by growing and resting cells of *Ustilago maydis*. Biotechnol. Lett. 8: 757- 762.

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.

Gillman, L. B. 1993. A review of instruments for static and dynamic surface and interfacial tension measurement. Present at the seminar by Kruss Gmbtt and Scientific promotion Co., Ltd., at Indra Regent Hotel, BK. Thailand, October 30, 1997.

Granchi, L., Bosco, M., Messini, A., and Vincenzini, M. 1999. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. J Appl Microbiol. 87: 949–956.

Guerra- Santos, L., Kappeli, O., and Fiechter, A. 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Appl. Environ. Microbiol. 24: 443- 448.

Hisatsuka, K., Nakahara, T., and Yamada, K. 1972. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeroginosa* S7B1. Agric. Biol. Chem. 36.: 1361- 1369.

Hommel, R. K. and Huse, K. 1993. Regulation of sophorose lipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*. Biotechnol. Lett. 15: 853- 858.

Hommel, R. K., Weber, L., Weiss, A., Himmelreich, U., Rilke, O., and Kleber, H. P. 1994. Production of sophorose lipid by *Candida* (*Torulopsis*) *apicola* grown on glucose. J. Biotechnol. 33: 147- 155.

Horowitz, S., Gilbert, J. N., and Griffin, W. M. 1990. Isolation and characterization of surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. J. Ind. Microbiol.. 6: 243- 248.

Hua, Z., Chen, Y., Du, G., and Chen, J. 2003. Effects of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on the biodegradation of petroleum compounds. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 20: 25–29.

Inoue, S. and Itoh, S. 1982. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola* as microbial surfactants in alkane fermentation. Biotechnol. Lett. 4: 3- 8.

Ishigami, Y., Gama, Y., Nagahora, 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., Gama, Y., Uji, Y., Nasui, K., and Shibayama, Y. 1988. Japaese Patent Kokai. 63- 77, 535.

Ishigami, Y. and Suzuki, S. 1997. Development of biochemicals- funtionalization of biosurfactants and nutural dyes. Prog. Org. Coat. 31: 51- 61.

Itoh, S., Honda, H., Tomita, F., and Suzuki, T. 1971. Rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin. J. Antibiot., 24: 855- 859.

Jeffcoat, R., and Willis, B. J. 1988. A manufacturing process for hexadecanolide. Dev. Food Sci. 18: 743-751.

Jenny, K. , Deltrieu, V. and Kappeli, O. 1993. Lipopeptide production by *Bacillus licheniformis*. In N. Kosaric (ed.), Biosurfactants: production, properties, applications. pp. 135- 156. New York: Mercel Dekker.

Kappeli, O. and Fiechter, A. 1977. Component from the cell surface of the hydrocarbon-utilizing yeast *Candida tropicalis* with possible relation to hydrocarbon transport. J. Bacteriol. 133: 952- 958.

Kappeli, O. and Finnerty, W. R. 1979. Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane- grown *Acinetobacter*. J. Bacteriol. 140: 707- 712.

Kim, H. S., Yoon, B. D., Choung, D. H., Oh, H. M., Katsuragi, T., and Tani, Y. 1999. Characterization of a biosurfactant, monosylerythritol lipid produced from *Candida* sp. SY 16. Appl.Microbial Biotechnol. 52: 713-721.

Kitahata, S. 1989. Synthesis of oligosaccharides by microbial enzymes. Kagaku to Kogyo. 63: 161- 169.

Kitamoto, D., Akiba, S., Hioki, C., and Tabuchi, T. 1990. Extracellular accumulation of mannosylerythritol lipids by a strain of *Candida antarctica*. Agric. Biol. Chem. 54(1): 31-36.

Kitamoto, D., Akiba, S., Hioki, C., and Tabuchi, T. 1990. Production of mannosylerythritol lipids by *Candida antarctica* from vegetable oils. Agric. Biol. Chem. 54(1): 37-40.

Kitamoto, D., Fuzishiro, T., Yanagishita, H., and Nakahara, T. 1992. Production of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by resting cells of *Candida antarctica*. Biotechnol. Lett. 14:305- 310.

Kitamoto, D., Haneishi, K., Nakahara, T., and Tabuchi, T. 1990b. Production of mannosylerythritol lipids by *Candida antarctica* from vegetable oils. Agric. Biol. Chem. 54: 37–40.

Kitamoto , D., Hiroshi Yanagishita, Toshio, S., Takashi, N., Chiyoshi, K., and Tadaatsu, N. 1993. Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipid as biosurfactants produced by *Canndida antractica*. J Biotech. 29: 91-96.

Kitamoto , D., Ikegami, T., Suzuki, T., Sasaki, A., Takeyama, Y., Idemoto, Y., Koura, N., and Yanagishita, H. 2001. Microbial conversion of n- alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma* (*Candida antractica*). Biotechnol. Lett. 23: 1709- 1714.

Kitamoto, D., Isoda, H., and Nakahara, T. 2002. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants from energy-saving materials to gene delivery carriers. J Biosci Bioeng. 94:187–201.

Knoche, H. W. and Shively, J. M. 1972. The structure of an ornithine containing lipid from *Thiobacillus thiooxidans*. J. Biol. Chem. 247: 170- 178.

Koronelli, T. V., Komarova, T. I., and Denisov, Y. V. 1983. Chemical composition and role of peptidoglycolipid of *Pseudomonas aeruginosa*. Mikrobiologiya. 52: 767- 770. In Desai, J. D. and Banat, I. M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 47- 64.

Kosaric, N., Cairns, W. L., Gray, N. C. C., Stechey, D., and Wood, J. 1984. The role of nitrogen in multiorganism strategies for biosurfactant production. J. Am Oil Chem. Soc. 61: 1735–1743.

Kosaric, N. 1993. Biosurfactants Production Applications. Surfactnt Science Series: vol 48. Mercel Dekker, Inc. New York.

Kretschmer, A., Bock, H., and Wagner, F. 1982. Chemical and physical characterization of interfacial- active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n- alkane. Appl. Environ. Microbiol. 44: 864- 870.

Lang, S. and Wullbrandt, D. 1999. Rhamnose lipids biosynthesis microbial production and application potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 22- 32.

Lang, S. and Philp, J. C. 1998. Surface- active lipid in Rhodococci. Antonie van Leeuwenhoek, 74: 59- 70.

Lee, K. H. and Kim, J. H. 1993. Distribution of substrates carbon in sophorose lipid production by *Torulopsis bombicola*. Biotecnol. Lett. 15(3): 263- 266.

Lodder, J., J., and Kreger-van Rij, N. J. W. 1952. The Yeasts, a Taxonomic Study. London. 381.

Maier, M. and Soberon-Chavez, R. & G. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 625-633.

McCaffrey W. C., Cooper D. G., 1995. Sophorolipids production by *Candida bombicola* using self - cycling fermentation. J. Ferment. Bioeng. 79 (2), 146-151.

McInerney, M. J., Javaheri, M. and Nagle, D. P. 1990. Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. *J. Ind. Microbiol.* 5:95–102.

Matsuyama, T., Kaneda, K. , Ishizuma, I., Toida, T., and Yano, I. 1990. Surface- active novel glycolipid and linked 3- hydroxyl fatty acids produced by *Serratia rubidaed.* J. Bacteriol. 172: 3015- 3022.

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.

Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y., and Imanaka, T. 1993. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. Strain MIS 38. J. Bacteriol. 175: 6459–6466.

Mulligan, C. N., and B. F. Gibbs. 1993. Factors influencing the economics of biosurfactants, p. 329–371. *In* Kosaric, N. 1993. Biosurfactants: production, properties, applications. Marcel Dekker, Inc., New York.

Novonvenezia, S., Zosim, Z, Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E. Z., and Rosenberg, E. 1995. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3240- 3244.

Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., and Marc, I. 2002. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58: 308- 312.

Patel, R. M. and Desai, A. J. 1997. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. Letter in Appl. Microbial. 25: 91- 94.

Ramana, K. V. and Karanth, N. G. 1989. Production of biosurfactants by the resting cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6. Biotechnol. Lett. 11:(6): 437- 442.

Ristau, E. and Wagner, F. 1993. Formation of novel anionic trehalosetetraesters from *Rhodococcus erythropolis* under growth limiting conditions. Biotechnol. Lett. 5: 95- 100.

Robert, M., Mercade, M. E., Bosch, M. P., Perra, J. L., Espuny, M. J., Manresa, M. A., and Guinea, J. 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T. Biotechnol. Lett. 11: 871- 874.

Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C., and GUTNICK, D. L. 1979. Emulsifier *Arthrobacter* RAG- 1: isolation and emulsifying properties. Appl. Environ. Microbiol. 37: 402- 408.

Rau, U., Hammen, S., Heckmann, R. Wray, V., and Lang, S. 2001. Sophorolipids: a source for novel compounds. Industrial Crops and Products. 13: 85-92.

Shaw, N. 1974. Adv. Appl. Microbiol. 17: 63- 108. In Cooper, D. G. and Zajic, J. E. 1980. Surface active compounds from microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 26: 229- 256.

Sheppard, J. D. and Mulligan, C. N. 1987. The production of surfactant by *Baciilus subtilis* grow on peat hydrolysate. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27: 110- 116.

Shigeta, A. and Yamashita, A. 1986. Japanese Patent. 61- 205, 449.

Sim, L., Ward, O. P., and Li, Z. Y. 1997. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW- 1. J. Ind. Microbiol.& biotechnol. 19:232- 238.

Spoeckner, S., Wray, V., Nimtz, M., and Lang, S. 1999. Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 33- 39.

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.

Sudhakar, B. P., Vaidya, A. N., Bal, A. S., Kapur, R., Juwarkar, A., and Khanna, P. 1996. Kinetic of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. Biotechnol. Lett. 18(3): 263- 268.

Thanomsub, B., Watcharachaipong, T., Chotelersak, K., Arunrattiyakorn, P., Nitoda, T.,

and Kanzaki, H. 2004. Monoacylglycerols: glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast, *Candida ishiwadae*. J Appl. Microbiol. 96: 588-592.

Tulloch, A. P., Spencer, J. F. T., and Gorin, P. A. J. 1962. The fermentation of long-chain compounds by *Torulopsis magnoliae*. Structures of the hydroxyl fatty acids obtained by fermentation of fatty acids and hydrocarbons. Can. J. Chem. 40:1326–1338.

Tulloch, P., Hill, A., and Spencer, J. F. T. 1967. A new type of macrocyclic lactone from *Torulopsis apicola*. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 584- 586.

Uchida, Y., Misawa, S., Nakahara, T., and Tabuchi, T. 1989. factors affecting the production of succinoyl trehalose lipids by *Rhodococcus erythropolis* SD- 74 grown on n- alkanes. Agric. Biol. Chem. 53: 765- 769.

Van Dyke, M. I., Couture, P., Brauer, M., Lee, H., and Trevors, J. T. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactant: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. Can. J. Microbiol. 39: 1071-1078.

Vollbrecht, E., Rau, U., and Lang, S. 1999. Microbial conversion of vegetable oil into surface- active di-, tri-, and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by the bacteria strain *Tsukamurella* spec. Fett/ Lipid. 101: 389- 394.

Wichken, A. J. and Knox, K. W. 1970. J. Gen. Microbiol. 60: 293- 301. In Cooper, D. G. and Zajic, J. E. 1980. Surface active compounds from microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 26: 229- 256.

Yaminov, M. M., Timmis, K. N., Wray, V., and Fredrickson, H. L. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. Appl. Environ. Microbiol. 61(5): 1706-1713.

Zhou, Q. H., and Kosaric, N. 1995. Utilization of canola oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*. Journal of American Oil Chemists Society. 72(1): 67-71.

Zukerberg, A., Diver, A., Peeri, Z., Gutnick, D. L., and Rosenberg, E. 1979. Emulsifier of Arthrobacter RAG- 1: chemical and physical properties. Appl. Environ. Microbiol. 37: 414- 420.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. YM medium

Yeast extract (สารสกัดยีสต์)	3.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

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

2. PDA medium

มันฝรั่งสดหั่น	200.0	กรัม
กลูโคส	20.0	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น		

นำน้ำมันฝรั่งต้มสุกมาปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น (distilled water) ผสมกลูโคสและวุ้นผงให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. **อาหารแข็งไตรบูไทริน (Tributyrin agar) / อาหารแข็งน้ำมันมะกอก (Olive oil agar)**
ตามสูตรอาหารดัดแปลงของจันทรนาถ (2548)

$(NH_4)_2SO_4$	5.0	กรัม
KH_2PO_4	5.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	1.0	กรัม
Soytone peptone	5.0	กรัม
สารสกัดยีสต์	1.0	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 จากนั้นเติมไตรบูไทริน / น้ำมันมะกอก 10 มิลลิลิตร และวุ้นผง 20 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารลี้ยงเชื้อกำหนดสูตรที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

4. **อาหารกำหนดสูตร**

(Hua, Z., และคณะ, 2003)

$NaNO_3$	0.2	%
KH_2PO_4	0.02	%
$MgSO_4.7H_2O$	0.02	%
สารสกัดยีสต์	0.1	%
Hydrocarbon	80.0	มิลลิลิตร (v/v)
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารเหลวปรับปรุงสูตร

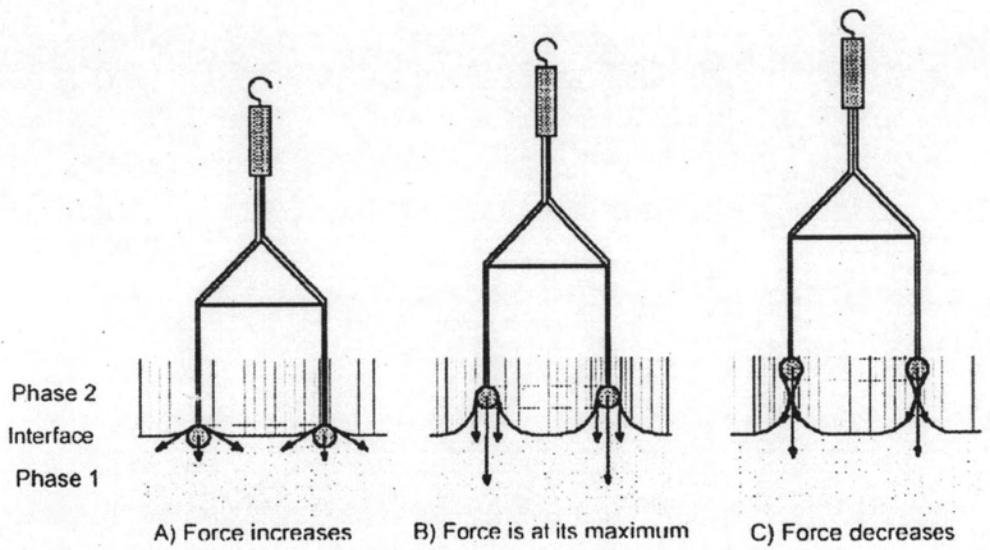
$NaNO_3$	0.4	%
KH_2PO_4	0.02	%
$MgSO_4.7H_2O$	0.02	%
สารสกัดยีสต์	0.1	%
น้ำมันถั่วเหลือง	4.0	%
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

หลักการการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี Du Nouy Ring

การวัดค่าแรงตึงผิวด้วยวิธี ring method หรือ Du Nouy Ring method ค้นคิดโดย Lecomte Du Nouy ในปี 1919 ซึ่งวิธีนี้จะพิจารณาวงแหวนทองคำขาว (platinum ring) ในแนวระนาบโดยวงแหวนทองคำขาวจะจมในของเหลว และถูกยกขึ้น แรงสูงสุดที่ใช้ในการดึงวงแหวนทองคำพ้นของเหลว คือ ค่าแรงตึงผิว (surface tension) คุณลักษณะของวงแหวนทองคำขาวก็คือความยาวที่ถูกทำให้เปียก (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±2 ^{o}ซ 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. แขวน 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) อยู่ในตำแหน่งสมดุลอีกครั้งโดยหมุน 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 ปรับที่ว่างสารตัวอย่างให้อยู่ในระดับเดิม แล้วหมุนเข้าหาตัวเครื่อง

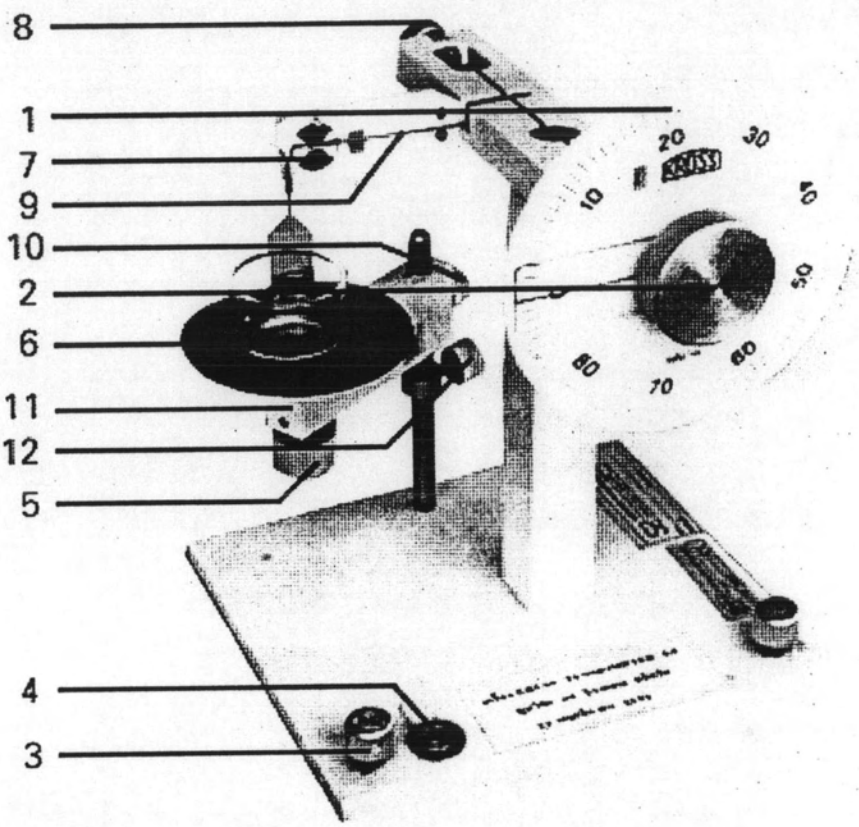
<u>ข้อควรระวัง</u>

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

<u>ข้อแนะนำ</u>

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

ภาคผนวก ค

หลักการของไฮ เพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิด โครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

ไฮ เพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิด โครมาโทกราฟี จะอาศัยหลักการพื้นฐานเดียวกับ ลิควิด โครมาโทกราฟี คือ คุณสมบัติของสารแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการดูดซับและถูกทำให้หลุดออกจากการดูดซับต่อสารซึ่งเป็นเฟสคงที่ไม่เท่ากัน และเมื่อพัฒนาวิธีการโดยใช้เฟสคงที่ และคอลัมน์ที่มีขนาดเล็กมากทั่วไป ไฮ เพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิด โครมาโทกราฟี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฟสคงที่ประมาณ 5-10 μm และคอลัมน์มีขนาดประมาณ 2-6 mm ดังนั้นเพื่อที่จะให้สารละลายชะตัวอย่างที่จะแยกออกจากคอลัมน์ จึงเกิดความดันสูงมากคือประมาณ 100-200 atm (ขึ้นกับชนิดของคอลัมน์) ข้อดีของไฮ เพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิด โครมาโทกราฟีคือ ประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นกว่าลิควิด โครมาโทกราฟี เป็น 10-100 เท่า และใช้เวลาในการแยกที่สั้นกว่า

ไฮ เพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิด โครมาโทกราฟี 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 เฟสคงที่เป็นพวกไม่มีขั้วโดยทั่วไปจะเป็นหมู่ octadecyl หรือ octyl silane functional group และเฟสเคลื่อนที่เป็นพวกมีขั้ว เช่น น้ำผสมกับตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ เช่น เมทานอล หรืออะซิโตรไนไทรล์ 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 โดยใช้คอลัมน์และเฟสเคลื่อนที่อย่างเดียวกัน

2. bonded- phase คอลัมน์ค่อนข้างเสถียร แต่ควรจะต้องระวังเกี่ยวกับการควบคุม pH ของเฟสเคลื่อนที่

3. เฟสเคลื่อนที่ที่นิยมใช้ เช่น น้ำ ซึ่งมีราคาถูกและหาง่าย และตัวทำละลายอินทรีย์ที่ค่อนข้างนิยมใช้กันมาก คือ เมทานอล ซึ่งมีราคาไม่แพงนักและมีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง

4. สามารถทำนายลำดับของการที่สารถูกชะออกมาจากคอลัมน์ เพราะว่า Retention time จะเพิ่มขึ้นตามสมบัติของสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำ

5. สมดุลที่เกิดขึ้นในคอลัมน์เกิดขึ้นเร็ว ทำให้เหมาะแก่การนำเอาไปใช้ใน gradient elution

องค์ประกอบของเครื่อง HPLC มีดังนี้

1. ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase reservoir) ขวดที่ใส่เฟสเคลื่อนที่จะมีอุปกรณ์ที่ใช้ไล่อากาศที่ละลายอยู่ เพื่อกำจัดก๊าซออกซิเจนซึ่งอาจจะทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิด หรือเฟสคงที่ที่อยู่ในคอลัมน์ และยังลดโอกาสที่จะทำให้เกิดฟองอากาศในเครื่องตรวจหา (detector) ขณะทำการทดลองอยู่

2. ระบบของปั๊ม (pump system) ใน HPLC มีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่จะไหลผ่านคอลัมน์ซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กบรรจุอยู่ ความต้านทานการไหลดังกล่าวจะมาก เมื่อใช้อนุภาคเล็กๆ และคอลัมน์มีขนาดเล็กอีกด้วย จึงจำเป็นที่จะต้องใช้ความดันสูงดันเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลไป ปั๊มที่ใช้แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

1) mechanical pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่

2) pneumatic pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้ความดันของการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่

3. อุปกรณ์ที่ใช้ตรวจวัดความดัน (pressure monitoring devices) โดยจะบอกความดันของเฟสเคลื่อนที่ ก่อนเข้าสู่คอลัมน์ ค่าความดันจะบอกได้ว่ามีสิ่งอุดตันหรือไม่ และปั๊มยังทำงานได้ดีหรือไม่ นอกจากนั้นการทราบความดันของเครื่องจะช่วยทำให้การปรับพารามิเตอร์ต่างๆ เป็นไปอย่างเหมาะสมที่สุด

4. อุปกรณ์สำหรับทำ Gradient Elution เนื่องจากสารประกอบบางชนิดไม่สามารถแยกได้เมื่อใช้ isocratic elution การเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ระหว่างที่ทำ gradient

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

1) แบบ low pressure gradient เป็นแบบที่ใช้วิธีการผสมตัวทำละลายที่ความดันของบรรยากาศและต่อจากนั้นจึงถูกปั๊มต่อไปด้วยความดันสูงเข้าสู่คอลัมน์

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

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

6. Microsampling Valve สารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปจะอยู่ภายในที่ต่อเข้ากับ valve ปัจจุบัน micro valve สามารถนำมาใช้ได้กับสารตัวอย่างที่มีขนาดตั้งแต่ 0.5 µl 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) โดยใช้ตรวจสอบดรรชนีหักเห (refractive index, IR) อย่างต่อเนื่อง ระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสเคลื่อนที่ที่มีสารประกอบของตัวถูกละลายอยู่ขณะผ่านออกจากคอลัมน์ เนื่องจากดีเทคเตอร์ชนิดนี้จัดอยู่ในแบบ bulk property หรือ general detector ดังนั้นมันจงให้สัญญาณกับตัวทำละลายได้ทั้งหมด ตราบที่ตัวถูกละลายมีค่าดรรชนีหักเหต่างจากเฟสเคลื่อนที่

หลักการของแมสสเปกโทรเมตรี (Mass spectrometry)

แมสสเปกโทรเมตรีเป็นเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ที่ใช้หาข้อมูลของโครงสร้างและมวลโมเลกุลของสาร เมื่อทำให้โมเลกุลแตกตัวเป็นไอออนด้วยการให้โมเลกุลรับพลังงานที่มากพอจนทำให้โมเลกุลนั้นเกิดการแตกตัวเป็นไอออน ซึ่งพลังงานที่ใช้จะอยู่ในช่วง 5-70 eV (1 eV = 23.6 Kcal/mole) จากนั้นทำการแยกและตรวจสอบไอออนที่เกิดขึ้นนั้นอีกครั้งหนึ่ง แมสสเปกตรัม จะบ่งบอกถึงลักษณะการแตกตัวของโมเลกุลไอออน หรือรวมรูปแบบของการแตกตัวของแต่ละไอออนทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้ว ก็จะได้รูปแบบการแตกตัว (fragmentation pattern) ของโมเลกุลขึ้นกับสารแต่ละชนิด พลังงานที่ใช้ โครงสร้างของโมเลกุล เวลาระหว่างเกิด และการตรวจพบไอออน จึงกล่าวได้ว่าแมสสเปกตรัมเป็นรูปแบบของการแตกตัวของสารที่อยู่ในสภาวะมีพลังงานและช่วงเวลาที่กำหนด

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวธนัสถา เชียงอุทัย เกิดเมื่อวันที่ 18 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2545 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2546