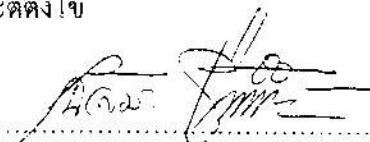


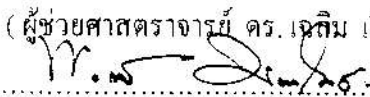
ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยก การทำให้บริสุทธิ์ และการประยุกต์ของไซโคโรฟอรในการหาปริมาณ
ของเหล็ก

ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์ นายสมหมาย ประดิษฐ์

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจตุม เรืองวิริยะชัย)

.....กรรมการ

(อาจารย์ พลทัศน์ มหาจันทร์)

บทคัดย่อ

เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ *Ps. aeruginosa* และสายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดเลือกไว้ ในอาหารเหลว SA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังเติมแอมโมเนียมซัลเฟตแยกเอาโปรตีนและเซลล์ออกจาก culture media โดยวิธีหมุนเหวี่ยงแล้วแยกไซโคโรฟอรด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบดูดซับ โดยใช้เรซินแบบ Amberlite XAD-4 แล้วชะด้วยเมทานอล : น้ำ ในอัตราส่วน 9:1 จากนั้นนำมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน ที่ใช้เจลแบบ Bio-Gel P-2 ชะด้วยฟิรีดิน-อะซีเตตบัฟเฟอร์ (pH 6.04) ทำให้แห้งโดยวิธีแช่แข็ง ตรวจวัดความบริสุทธิ์ของไซโคโรฟอรด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์ μ Bondapak C-18 ขนาด 3.9 x 300 mm. และใช้เมทานอล 8 % โดยปริมาตรใน 0.005 M อะซีเตต บัฟเฟอร์ (pH 6.02) เป็นเฟสเคลื่อนที่ พบว่า ไซโคโรฟอรที่เป็นผลิตภัณฑ์หลัก (หลังจากผ่านคอลัมน์ Bio-Gel P-2) จะมีความบริสุทธิ์มากขึ้น

การศึกษาปัจจัยบางประการที่อาจมีผลต่อการดูดกลืนแสงของไซโคโรฟอร อาทิ pH อุณหภูมิ และ แสง โดยเทคนิค ยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมทรี พบว่า pH มีผลต่อค่า λ_{max} ของไซโคโรฟอรบริสุทธิ์ (ผลิตภัณฑ์หลักจาก *Ps. aeruginosa*) กล่าวคือ pH ที่ต่ำกว่า 7 ค่า λ_{max} จะเกิดที่ 380 nm และปรากฏ shoulder ที่ 365 nm ส่วน pH ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 7 ค่า λ_{max} จะปรากฏที่ 395 nm แต่ pH ช่วง 2-12 จะไม่มีผลต่อค่า λ_{max} ของสารประกอบเชิงซ้อนเหล็ก-ไซโคโรฟอร ส่วนอุณหภูมิมีผลต่อค่า λ_{max} ของไซโคโรฟอรบริสุทธิ์ โดยปรากฏที่ 400 nm แต่อุณหภูมิไม่มีผลต่อค่า λ_{max} ของสารประกอบเชิงซ้อนเหล็ก-ไซโคโรฟอร กล่าวคือ λ_{max} ยังคงปรากฏที่ 400 nm ส่วนแสงจากหลอด daylight ไม่มีผลต่อค่า λ_{max} ของทั้งไซโคโรฟอรบริสุทธิ์ และ สารประกอบเชิงซ้อนเหล็ก-ไซโคโรฟอร จากนั้นได้ทดสอบประเภทของไซโคโรฟอรที่ผลิตได้จากหลายสายพันธุ์ ทั้งในรูปลิแกนด์อิสระ และสารประกอบเชิงซ้อน โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีต่างๆ กล่าวคือ ศึกษาประเภทไฮดรอกซามาต โดยวิธี Triphenyltetrazolium Chloride test, Berg & Becker test,

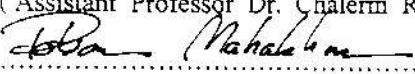
Csaky test และ ศึกษาประเภทแคลิโคเลทโดยวิธี Arnow test พบว่าไซเดอโรฟอร์ที่ผลิตได้ให้ผลที่เป็นบวกกับการทดสอบด้วยวิธี Triphenyltetrazolium Chloride test ได้แก่ ไซเดอโรฟอร์ที่ผ่าน Amberlite XAD-4 เรซิน ไซเดอโรฟอร์บริสุทธิ์ (F_1 , F_3) สารประกอบเชิงซ้อนเหล็ก-ไซเดอโรฟอร์ (F_1 , F_2 , F_3) สารประกอบเชิงซ้อนของ AE_{12} (F_2) สารประกอบเชิงซ้อนของ AE_{14} (F_1) รวมทั้งสารประกอบเชิงซ้อนของ S_2E_3 (F_2) และที่ให้ผลเป็นบวกกับวิธี Berg & Becker test ได้แก่ ไซเดอโรฟอร์ที่ผ่าน Amberlite XAD-4 เรซิน ไซเดอโรฟอร์บริสุทธิ์ (F_1) สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก-ไซเดอโรฟอร์ (F_1) สารประกอบเชิงซ้อนของ AE_{12} (F_2) จึงสรุปได้ว่าไซเดอโรฟอร์ที่ผลิตได้เป็นชนิดไฮดรอกซามาเท

ได้นำไซเดอโรฟอร์บริสุทธิ์ที่เป็นผลิตภัณฑ์หลักจาก *Ps. aeruginosa* ไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณของเหล็กในน้ำตัวอย่างโดยวิธีสร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้ความเข้มข้นของเหล็กในช่วง 0.10-1.00 ppm ใช้ปริมาตรของน้ำตัวอย่าง 5.00 cm³ โดยไม่ต้องย่อย จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไซเดอโรฟอร์ที่มากเกินไปจนกวาดเร็ว และใช้กรดซิดริก บัฟเฟอร์ pH 5.00 แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 nm ได้ค่าโมลาร์แอบซอร์ปติวิตี 12,031 L mol⁻¹ cm⁻¹ และ percent recovery เท่ากับ 108.52 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.0024 %

THESIS TITLE : ISOLATION, PURIFICATION AND APPLICATION OF SIDEROPHORE
FOR IRON DETERMINATION

AUTHOR : SOMMAI PATITUNGKHO

THESIS ADVISORY COMMITTEE :


.....Chairman
(Assistant Professor Dr. Chalerm Ruangviriyachai)

.....Member
(Polson Mahakhan)

ABSTRACT

The strains of *Ps. aeruginosa* and others were cultured in liquid SA medium for 24 hours. After adding ammonium sulphate, the protein and cell were removed by centrifugation. The siderophores were separated by adsorption chromatography using Amberlite XAD-4 resin. The methanol : water (9:1) was used as an eluent. The cruded siderophore were purified by gel filtration chromatography using Bio-Gel P-2, obtaining pyridine-acetate buffer (pH 6.04) as an eluent and then lyophilization. The siderophore was analysed by HPLC using μ Bondapak C-18 column and 8% methanol in 0.005 M acetate buffer (pH 6.02) as mobile phase. The result showed that the siderophore passing through Bio-Gel P-2 column had higher purity than others.

The effects of pH , temperature and daylight exposure on absorption of siderophore were investigated using Ultraviolet-visible spectrophotometry. The results indicated that pH value < 7 shows a maximum absorbance at 380 nm and a shoulder absorption at 365 nm but pH value ≥ 7 , there is only one peak at 395 nm. At high temperature, $\lambda_{\max}$ of siderophores are at 400 nm (adjust pH = 5.00 by citric acid buffer). pH and temperature had no effect on ferric-siderophore complexes. It is interesting to note that daylight can be also effected on the absorption character of siderophore and ferric-siderophore complexes. The classification of siderophores were carried out by Csaky test , Triphenyltetrazolium Chloride test , and Berg & Becker test to determine hydroxamate and Arnow test for catechol. Most of the siderophores gave positive test to Triphenyltetrazolium Chloride test and Berg & Becker test which indicated that the siderophores are hydroxamate .

The possibility of using siderophore from *Ps. aeruginosa* as an chelating agent for iron determination was conducted. The results revealed that the optimum conditions for complexation is pH 5.00 (citric acid buffer), the range of iron concentration is from 0.10-10.00 ppm. The ferric-siderophore complex showed absorption maxima at 400 nm with molar absorptivity of $12,031 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The percentage recovery of this method was found to be 108.52 with 0.0024 % RSD.