บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

1. อุปกรณ์

- เครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring Tensiometer) รุ่น K6 ของบริษัท Kruss, ประเทศเยอรมัน
- เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) รุ่น Pro star ของบริษัท Varian, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- คอลัมน์ C18- AR Cosmosil 5 µm, 120 ^{o}A ขนาด 4.6 x 150 มม. ของบริษัท Water
- กล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา (Biocular compound microscope) รุ่น BH-2 ของบริษัท Olympus, ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (High - performance centrifuge) รุ่น Avanti® J-30I ของบริษัท Beckman Coulter, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) รุ่น KUBOTA 3700 ของบริษัท Kubota Corporation, ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) รุ่น KUBOTA 6500 ของบริษัท Kubota Corporation, ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) รุ่น N-N ของบริษัท Eyela, ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Centrifuge evaporator) รุ่น R-300 ของบริษัท BUCHI, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Centrifuge evaporator) รุ่น eppendorf concentrator 5301 ของบริษัท Modotech ,ประเทศเยอรมัน
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ตู้นึ่งความดันไอฆ่าเชื้อแบบอัตโนมัติ (Autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tomy, ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น Innova™ 4300 ของบริษัท New Brunswick Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา

- ตู้อบ (Hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, ประเทศเยอรมัน
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น BE 800 ของบริษัท Memmert, ประเทศเยอรมัน
- เครื่องชั่งหยาบ รุ่น PG 2002-S ของบริษัท Metler Toledo, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 285 ของบริษัท Metler Toledo, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 1000 ของบริษัท Eutech Cybernatics, ประเทศสิงคโปร์
- ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar flow cabinet) รุ่น 25 Manometer ของบริษัท Dwyer Instrument, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น K-550 GE ของบริษัท Scientific Industries, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องอุ่นสารละลาย (Dry-block heater) รุ่น TDB-120 ของบริษัท Biosan, ประเทศเกาหลี
- ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น P10, P20, P100, P200, P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, ประเทศฝรั่งเศส
- Iatroscan MK-6s ของบริษัท Mitsubishi Kagaku Itron, ประเทศญี่ปุ่น
- Chromarod - S III ของบริษัท Mitsubishi Kagaku Itron, ประเทศญี่ปุ่น
- Chromarod holder ของบริษัท Mitsubishi Kagaku Itron, ประเทศญี่ปุ่น
- Microdispenser ของบริษัท The Drummond Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Spotting guide ของบริษัท Mitsubishi Kagaku Itron, ประเทศญี่ปุ่น
- Development tank ของบริษัท Mitsubishi Kagaku Itron, ประเทศญี่ปุ่น
- Pre-cut filter paper ขนาด 140x195 มม. ของบริษัท Mitsubishi Kagaku Itron, ประเทศญี่ปุ่น
- Chromarod dryer ของบริษัท Mitsubishi Kagaku Itron, ประเทศญี่ปุ่น

2. **เคมีภัณฑ์**

- สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- สารสกัดจากข้าวมอลต์ (Malt extract) ของบริษัท Difco Laboratories, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- แบคโตเปปโตน (Bactopeptone) บริษัท Difco Laboratories, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- กลูโคส ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน
- กาแลคโตส ของบริษัท Difco Laboratories, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- น้ำตาลทราย (ซูโครส) ของบริษัทน้ำตาลทรายมิตรผล จำกัด
- แบคโตอะการ์ (Bacto agar) บริษัท Difco Laboratories, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ไทรทอน เอ็กซ์-100 (Triton X-100) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน
- สารเคมีขจัดคราบน้ำมันเคมเทค 307 (Chemtec 307 dispersant) ของกรมวิทยาศาสตร์ทหารเรือ กองทัพเรือ ประเทศไทย
- น้ำมันดิบเมอร์บานชนิดเบา (Murban light crude-oil) จากบริษัทไทยออยส์จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันถั่วเหลือง บริษัทมรกตอินดัสตรีส์ จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันปาล์ม บริษัทมรกตอินดัสตรีส์ จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันรำข้าว บริษัทอมรไชย จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันมะกอก บริษัทอิโฮส เด อิบาร์รา เอส เอ ประเทศสเปน
- น้ำมันดอกคำฝอย บริษัทเซซาฮาล เอช เอ กัวดาลาจารา ฮาล ประเทศเมกซิโก
- น้ำมันคาโนลา บริษัทไซม์ดาร์บี้ เอดิเบิ้ล โปรดักส์ ลิมิเต็ด ประเทศสิงคโปร์
- น้ำมันงา ตรากล้วยไม้ จังหวัดแม่ฮ่องสอน ประเทศไทย
- น้ำมันเมล็ดฝ้าย บริษัทอุตสาหกรรมวิวัฒน์ จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันสลัด บริษัทอุตสาหกรรมวิวัฒน์ จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันโจโจ้บา ประเทศไทย
- พาราฟินออยุ (Paraffin oil) ของบริษัท Carlo Erba, ประเทศอิตาลี
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท BDH Laboratory Supplies, ประเทศอังกฤษ
- แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน
- โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน
- โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ของบริษัท Ajax Finechem, ประเทศออสเตรเลีย

- โซเดียมอะซิเตท (CH_3COONa) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน
- ทริสมาเบส (Trisma base; Tris[hydroxymethl] aminomethane)($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris HCl) ของบริษัท Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- คลอโรฟอร์ม (Chloroform) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน
- เมทานอล (Methanol) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน
- เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน
- เฮกเซน (Hexane) (C_6H_{14}) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน
- กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Concentration HCl) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน
- แอลฟา-แนฟทอล (α-naphtol) ของบริษัท Fluka, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- กรดอะซิติก (acetic acid) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน
- กรดซัลฟูริก (sulfuric acid) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน
- เบนซีน (benzene) ของบริษัท J.T.Baker, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- กรดบอริค (Boric acid) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน
- โดดีเคน (Dodecane) ของบริษัท Acros Organics, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ไซโคลเฮกเซน (Cyclohexane) ของบริษัท May & Baker, ประเทศอังกฤษ
- ไซลีน (Xylene) ของบริษัท Mallinckrodt Chemical Works, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เฮกซาเดกเคน (n-hexadecane) ของบริษัท Acros Organics, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ฟีนอล (Phenol) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน
- SDS (Sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3Na$) ของบริษัท Nacalai tesque, ประเทศญี่ปุ่น
- เอทิล อะซิเตต (Ethyl acetate) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน
- อะซิโตรไนไตรท์ (Acetronitrile) HPLC grade ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน
- น้ำ HPLC grade ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน
- กรดไตรฟลูออโรอะซีติก (Trifluoroacetic acid) HPLC grade ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน
- เฮปเทน (Heptane) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน
- เอทิล โอเลเอท (Ethyl oleate) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน

- ไอโซโพรพิล ไมรีสเตท (Isopropyl myristate) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน
- ดีคานอล (Decanol) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน
- ไอโอดีนชนิดเกล็ด ของบริษัท Univar, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- กระดาษกรองขนาด (Nylon membrane) ขนาด 47 มม. 0.45 ไมครอน ของบริษัท Whatman, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- กระดาษกรองขนาด (Cellulose acetate membrane) ขนาด 47 มม. 0.45 ไมครอน ของบริษัท Whatman, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- แผ่นซิลิกาเจล 60 ขนาด 20x20 ซม.,หนา 0.2 มม. (TLC silica gel 60, 0.2mm.) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน
- แผ่นซิลิกาเจล 60 ขนาด 20x20 ซม., หนา 2 มม. (PLC silica gel 60, 2mm.) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน

3. วิธีดำเนินการทดลอง

Pichia anomala สายพันธุ์ PY1 คัดแยกได้จากจากอาหารพื้นบ้าน (ข้าวหมาก) ที่ อำเภอพนัสนิคม จังหวัดชลบุรี มีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาวครีม ผิวด้าน กลางโคโลนีมีผิวย่นเล็กน้อย การย้อมสีติดแกรมบวก รูปร่างเชื้อยีสต์เป็นทรงกลมรี ขนาดกว้าง 2.0 - 4.8 ไมครอน ยาว 2.6 - 5.2 ไมครอน มีการสร้างสปอร์ที่มีรูปทรงคล้ายหมวก และมีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีบนอาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน โดยให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด 63.64 ตารางเซนติเมตร และมีค่าแรงตึงผิวต่ำสุด 29-30 mN/m และให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 0.26 กรัมต่อลิตร (ธนัสถา เชียงอุทัย, 2549)

3.1 การหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pichia anomala* สายพันธุ์ PY1

3.1.1 การหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำร่วมกับน้ำมันถั่วเหลืองในอัตราส่วน 1:1 ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพระดับขวดเขย่า

โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวกำหนดสูตร (ปรับ pH 5.5) (ธนัสถา เชียงอุทัย, 2549) ที่ได้ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ ได้แก่ กลูโคส ซูโครส และกาแลคโทส โดยใช้ความเข้มข้น 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลือง 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในสัดส่วนความเข้มข้นทั้งน้ำตาลและน้ำมันถั่วเหลืองที่เท่ากันหรือในอัตราส่วน 1:1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน และติดตามการเจริญของยีสต์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Ring tensiometer K6, Kruss, ประเทศเยอรมัน) และค่าการกระจายน้ำมันตามวิธีของ Morikawa และคณะ (1993) ในแต่ละชนิดของแหล่งคาร์บอน

การติดตามประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่า

1) การวัดค่าแรงตึงผิว

นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาวัดค่าแรงตึงผิวโดยวิธี Du Nuoy ring method ด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Ring tensiometer K6, Kruss, ประเทศเยอรมัน) แสดงหลักการและวิธีการใช้ในภาคผนวก ค

2) การวัดการกระจายตัวของน้ำมัน (Oil displacement test)

ตามวิธีของ Morikawa และคณะ, 1993

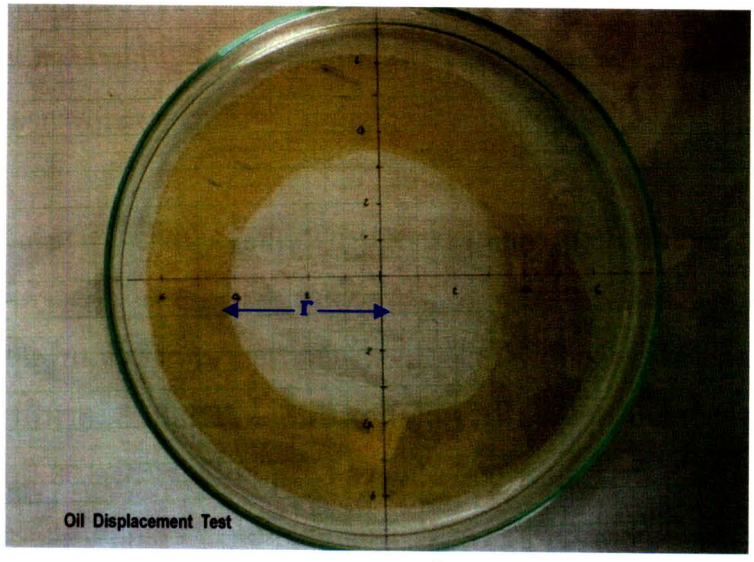
ตวงน้ำ 40 มิลลิลิตร ลงในจานแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตร ที่มีกระดาษกราฟรองอยู่เป็นมาตรวัดความกว้างของบริเวณใส (โดย 1 ช่องใหญ่ของกราฟมีค่าเท่ากับ 1 เซนติเมตร) หยดน้ำมันดิบ (crude oil) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าของน้ำจะเกิดเป็นแผ่นฟิล์มแผ่ทั่วผิวน้ำ จากนั้นหยดตัวอย่างที่เป็นส่วนน้ำใส หรือสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกึ่งบริสุทธิ์ที่ได้จากการสกัด (crude extract) มาทำการเจือจางด้วย 50 มิลลิโมลาร์ของทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นฟิล์มของน้ำมันดิบ สังเกตบริเวณใสของการกระจายตัวของน้ำมันดิบดังรูปที่ 3.1 และคำนวณหาพื้นที่ของการกระจายน้ำมัน

พื้นที่บริเวณใสของการกระจายน้ำมัน = πr^2

เมื่อ r เท่ากับรัศมีความกว้างของบริเวณใส (เซนติเมตร)

กำหนด 1 ตารางเซนติเมตรของการกระจายตัวของน้ำมันมีค่าเท่ากับ 1 หน่วย

วิธีการวัดค่าการกระจายตัวของน้ำมันนี้จะใช้ได้กับสารที่มีความเข้มข้นอย่างน้อย 10 µg หรือ 10 nmol ขึ้นไป



รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะการกระจายตัวของน้ำมัน (Morikawa และคณะ, 1993)

3) การวัดการเจริญของเชื้อโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ออกโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ทำการล้างเซลล์ด้วยเฮกเซน

และน้ำกลั่นตามลำดับ จากนั้นนำเซลล์ไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แล้วนำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.1.2 การหาอัตราส่วนของน้ำมันถั่วเหลืองต่อแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำในระดับขวดเขย่า

แปรผันปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 3.1.1 ในอัตราส่วนปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองต่อน้ำตาลเป็น 1:2 1:3 1:6 1:9 2:1 3:1 6:1 และ 9:1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน และติดตามการเจริญของยีสต์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน

3.1.3 การหาความเข้มข้นของสารสกัดยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่ได้จากข้อ 3.1.2 ในระดับขวดเขย่า

แปรผันความเข้มข้นของสารสกัดยีสต์คือ 0.1 0.2 0.3 0.4 0.6 0.8 1.0 และ 1.2 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่ได้จากข้อ 3.1.2 แล้วทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน และติดตามการเจริญของยีสต์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน

3.1.4 การหาอายุหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่ได้จากข้อ 3.1.3 ในระดับขวดเขย่า

โดยเตรียมหัวเชื้อในอาหารเหลว YM (pH 4.5) ที่อายุแตกต่างกัน คือ 8 12 16 18 20 และ 24 ชั่วโมง ปริมาตร 8 เปอร์เซ็นต์ เติมในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่ได้จากข้อ 3.1.3 แล้วทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน และติดตามการเจริญของยีสต์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน

3.1.5 การหาค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่ได้จากข้อ 3.1.3 ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่า

โดยเติมหัวเชื้อที่มีอายุที่เหมาะสมตามข้อ 3.1.4 ในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่แปรผันค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 และ 6.5 แล้วทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ

30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน และติดตามการเจริญของยีสต์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน

3.1.6 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

โดยใช้อาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมจากข้อ 3.1.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และติดตามการเจริญของยีสต์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการวัดค่าแรงตึงผิวและค่าการกระจายน้ำมัน ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 14 วัน

3.1.7 การติดตามการเจริญและการใช้แหล่งคาร์บอนของยีสต์

โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่ได้จากข้อ 3.1.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ติดตามการการเจริญและการใช้แหล่งคาร์บอนของยีสต์ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนเซลล์มาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลอัตราส่วน 3:1 (Matsumiya และคณะ, 2007) แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสชั้นล่างมาตรวจหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เปลี่ยนแปลงโดยวิธี phenol - sulfuric acid (Dubois และคณะ, 1956) และนำน้ำใสส่วนบนมาตรวจหาปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่เปลี่ยนแปลงโดยวิธี Thin-layer chromatography-flame-ionization detection (TLC/FID) ทดสอบด้วยเครื่อง Iatroscan MK-6s (ของบริษัท Mitsubishi Kagaku Itron, ประเทศญี่ปุ่น) โดยใช้ Chromarod-S III ที่อิ่มตัวด้วยกรดบอริคเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเฟสคงที่ และใช้สารละลายเบนซีนต่อคลอโรฟอร์มต่อกรดอะซิติกในอัตราส่วน 50:20:0.7 เป็นเฟสเคลื่อนที่

3.2 การผลิตและสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.2.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่า

โดยเตรียมหัวเชื้อในอาหารเหลว YM จนมีอายุ 18 ชั่วโมง ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลวปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมจากข้อ 3.1.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ตามระยะเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 3.1.6

3.2.2 การสกัดแยกและตรวจสอบชนิดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.2.1 มาปั่นแยกเซลล์ออก ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำน้ำส่วนใสมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ปริมาตร 1 เท่า นำส่วนล่างมาแยกสกัด 3 ครั้ง แล้วนำส่วนบนมาระเหยเอทิลอะซิเตตออกด้วยเครื่อง evaporator ภายใต้สภาวะสุญญากาศ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาละลายด้วยเมทานอลและล้างด้วยเฮกเซน 2 รอบ เพื่อกำจัดน้ำมันส่วนเกินออกไป (Kitamoto และคณะ, 1990: Thanomsub และคณะ, 2004) นำสารที่ได้มาทดสอบการกระจายน้ำมันและหาน้ำหนักเซลล์แห้งของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากนั้นตรวจสอบชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้เบื้องต้นด้วยวิธีโครมาโตกราฟี (Ito และ Inoue, 1982)

3.3 ลักษณะสมบัติทางชีวเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

3.3.1 ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2 มาละลายด้วย 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 2-6 และ 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 7-12 ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจาง 100 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์และทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่าง 2-12 แล้วนำมาวัดค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิว (Sarubbo และคณะ, 2006) ในเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.2 ผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อความเสถียรของทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2 มาละลายด้วย 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 2-6 และ 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 7-12 ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจาง 100 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์และทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่าง 2-12 แล้วนำมาวัดค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิว ทุกๆ 10 วัน เป็นเวลา 30 วัน

3.3.3 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2 มาละลายด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 และ 100 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 15 ชั่วโมง และที่ 121 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 15 นาที เป็นเวลา 5 รอบ นำมาวัดค่าการกระจายน้ำมันและค่าแรงตึงผิว โดยเจือจาง 100 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8

3.3.4 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2 มาละลายด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ซึ่งแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0.5-5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาทดสอบค่าการกระจายน้ำมัน และค่าแรงตึงผิวโดยเจือจาง 100 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ซึ่งแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0.5-5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เช่นกัน ในเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.5 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อความเสถียรของทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2 มาละลายด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ซึ่งแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0.5-5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจาง 100 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัพเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ซึ่งแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0.5-5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เช่นกัน แล้วนำมาทดสอบค่าการกระจายน้ำมัน และค่าแรงตึงผิว ทุก 10 วันเป็นเวลา 30 วัน

3.3.6 วัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index)

โดยเปรียบเทียบกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและน้ำมันชนิดต่างๆ เช่น เฮกซาเดกเคน ไซโคลเฮกเซน น้ำมันพาราฟิน (paraffin oil) น้ำมันปาล์ม น้ำมันสลัด น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันงา เป็นต้น โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2 มาละลายด้วย

50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและน้ำมันแต่ละชนิด ในอัตราส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือน้ำมันเท่ากับ 60:40 (โดยน้ำหนัก) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเจือจาง 2 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรทันที เพื่อหาค่าการก่ออิมัลชัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 3 5 และ 7 วัน จากนั้นดูดสารละลายส่วนล่างมาเจือจาง 2 เท่าด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เพื่อคำนวนเปอร์เซ็นความเสถียรในการก่ออิมัลชันหรือค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Shepherd และคณะ, 1995)

3.3.7 เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ (Critical micelle concentration; CMC)

เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้กับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ เช่น เคมเทค 307 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate;SDS) ไทรทอน เอกซ์ 100 (TritonX-100) เป็นต้น โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้กับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ มาเจือจางด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ที่ความเข้มข้นต่างๆ มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตร แล้ววัดค่าแรงตึงผิว หาค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ เขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวและความเข้มข้น ดังแสดงในรูปที่ 3.2 ตามวิธีของ Sheppard และ Mulligan (1987)

การหาค่า CMC ได้จากการคำนวณหาเส้นสัมผัส AB, BC และหาค่าจุดตัด B ด้วยสมการการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) เมื่อกำหนดให้

$$\text{เส้นสัมผัส AB}: \quad y_1 = b_1x_1 + a_1$$

$$\text{เส้นสัมผัส BC}: \quad y_2 = b_2x_2 + a_2$$

เมื่อเกิดจุดตัด B จะได้

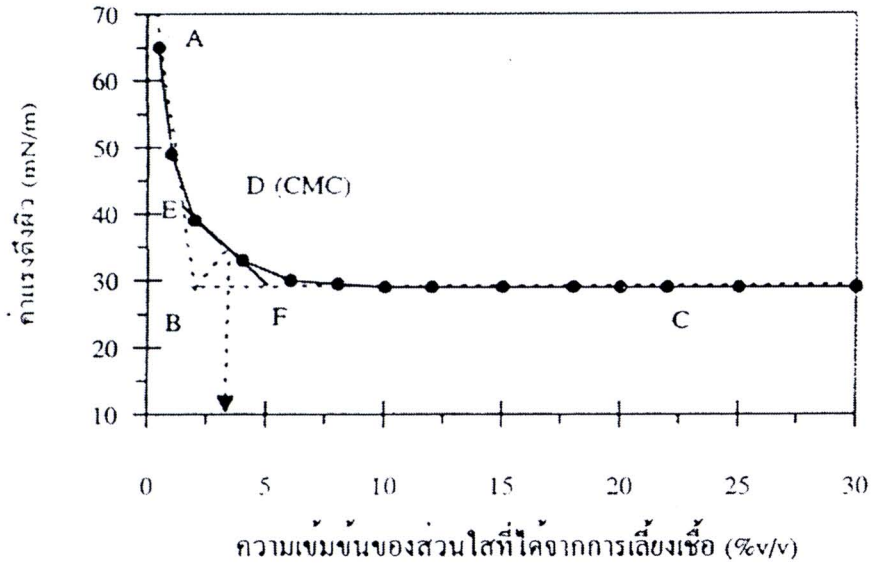
$$b_1x_1 + a_1 = b_2x_2 + a_2 \qquad \text{เมื่อ } y_1 = y_2$$

$$b_1x_1 - b_2x_2 = a_2 - a_1$$

$$x(b_1 - b_2) = a_2 - a_1 \qquad \text{เมื่อ } x_1 = x_2$$

$$x = (a_2 - a_1)/(b_1 - b_2)$$

เพราะฉะนั้น จุดตัด B เท่ากับ $(a_2 - a_1)/(b_1 - b_2)$



รูปที่ 3.2 วิธีการหาค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ โดยการวัดค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

เมื่อลากเส้นตรง BD ผ่านจุด B ให้ตั้งฉากกับเส้นสัมผัส EF ที่จุด D แล้วลากมาตัดแกน X ค่าที่ได้คือค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ [Critical Micelle Concentration (CMC)] และเมื่อลากมาตัดแกน Y ค่าที่ได้คือค่าแรงตึงผิว ณ จุดของการเกิดไมเซลล์ (γCMC) และความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (CMC^{-1}) คือส่วนกลับของค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ (100/CMC)

3.4 การทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีโครมาโตกราฟี

3.4.1 การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย analytical Thin-Layer Chromatography

โดยใช้เฟสคงที่เป็นแผ่นซิลิกาเจล 60 ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, ประเทศเยอรมัน ขนาด 20 x 20 ซม. หนา 0.2 มม. และมีสารละลายคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลต่อน้ำ ในอัตราส่วน 65:25:4 เป็นเฟสเคลื่อนที่ นำสารลดแรงตึงผิวที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2 มาละลายด้วยเอทิลอะซิเตตที่ความเข้มข้น 10-20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาจุดบนแผ่น TLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปใส่ภาชนะปิดที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่สูงประมาณ 1 เซนติเมตร ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 ชั่วโมง จนเฟสเคลื่อนที่ไปเกือบสุดแผ่นหรือเหลือขอบประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่น TLC ออกมาทิ้งไว้จนแห้ง นำมาตรวจผลหากรดไขมันด้วยการไปอบด้วยไอของไอโอดีนในภาชนะ

ปิดสนิท ทิ้งไว้ประมาณ 15-20 นาที เปิดภาชนะทำเครื่องหมายบริเวณที่เกิดสีน้ำตาลเข้ม และทิ้งข้ามคืนให้ไอโอดีนระเหยจนหมด

จากนั้นขูดซิลิกาเจล 60 บริเวณที่ทำเครื่องหมายไว้มาสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเอทิลอะซิเตต เพื่อนำมาตรวจผลหาคาร์โบไฮเดรทด้วยมอรีส รีเอเจนท์ โดยเจือจางสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นประมาณ 1-2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมมอรีส รีเอเจนท์ (แอลฟา-แนฟทอล 0.5 กรัม ละลายใน 95% เอทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) จำนวน 2 หยด ผสมให้เข้ากันดี แล้วค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร โดยห้ามเขย่าและตั้งทิ้งไว้สังเกตสีที่เกิดขึ้น ซึ่งถ้าผลเป็นบวกจะเกิดสีม่วงตรงกลางระหว่างชั้นของสารละลายและชั้นของกรด (Koch และ Hanke, 1953) และวัดค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนที่สกัดได้

3.4.2 การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย preparative Thin-Layer Chromatography

โดยทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.4.1 แต่ใช้แผ่นซิลิกาเจล 60 ที่มีความหนา 2 มม. และใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพละลายในเอทิลอะซิเตตที่ความเข้มข้น 10-20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จุดเป็นเส้นตรงบนแผ่น TLC โดยสูงจากขอบแผ่นซิลิกาเจล 60 ประมาณ 1.5 เซนติเมตร และสารบริสุทธิ์บางส่วน 1 ตัวอย่าง จะใช้แผ่น TLC 1 แผ่น สกัดแยกสารลดแรงตึงผิวออกจากซิลิกาเจล 60 ด้วยเอทิลอะซิเตต แล้วนำไประเหยแห้งโดยเครื่อง evaporator ระเหยแห้งภายใต้ภาวะสุญญากาศ ทดสอบการกระจายน้ำมัน เก็บสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้นี้ ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น Pro star ของบริษัท Varian, ประเทศสหรัฐอเมริกา และแมสสเปกโตรเมทรี (Liquid chromatography-mass spectrometry: LC-MS) เพื่อหาน้ำหนักมวลโมเลกุลต่อไป

3.4.3 การวิเคราะห์สารบริสุทธิ์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์บางส่วนที่สกัดได้จากข้อ 3.4.2 มาละลายในสารละลายอะซิโตไนไตรท์ 100 % แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC รุ่น Pro star ของบริษัท Varian, ประเทศสหรัฐอเมริกา ใช้คอลัมน์ C18- AR Cosmosil 5 μm, 120 ^{o}A ขนาด 4.6 x 150 มม. ของบริษัท Water มีลิเนียร์เกรเดียนท์ 0-100% ของตัวทำละลาย B ใน A โดยตัวพา A คือ 10% อะซิโตรไนไตรท์ + 0.1% กรดไตรฟลูออโรอะซีติก (TFA) และตัวพา B คือ 100% อะซิโตรไนไตรท์ + 0.1% กรดไตรฟลูออโรอะซีติก (TFA) โดยมีโปรแกรมของลิเนียร์เกรเดียนท์ดังนี้

เวลา (นาที)	% ของตัวพา A	% ของตัวพา B
0	70	30
5	30	70
20	10	90
35	0	100
45	0	100

ซึ่งมีอัตราการชะของตัวพาเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจผลด้วย UV-Detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร

3.4.4 จากนั้นเก็บตัวอย่างแต่ละพีกที่ปรากฏ แล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Centrifuge evaporator ละลายตัวอย่างที่เก็บได้ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 และนำไปทดสอบสมบัติการกระจายน้ำมัน จากนั้นนำลำดับส่วนที่มีค่าการกระจายน้ำมันมากไปทดสอบด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี (Liquid chromatography-mass spectrometry: LC-MS) เพื่อหาน้ำหนักมวลโมเลกุลและวิธีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) เพื่อหาโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

3.5 วิเคราะห์โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

3.5.1 การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี (Liquid chromatography-mass spectrometry: LC-MS)

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC โดยเลือกลำดับส่วนตัวอย่าง ณ RT ที่มีค่าการกระจายน้ำมันมาก และมีปริมาณมากพอ มาวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.2 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC โดยเลือกลำดับส่วนตัวอย่าง ณ RT ที่มีค่าการกระจายน้ำมันมาก และมีปริมาณมากพอ มาวิเคราะห์ ^{1}H-NMR

ด้วยวิธี NMR โดยใช้เครื่อง Varience Model YH400 Spectrometer ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย