



# โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** การประยุกต์ใช้นิวภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จากวิธีการทางชีวภาพเพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสีย้อม (An Application of Biosynthesized Gold Nanoparticle as a Catalyst for Dye Degradation)

**ชื่อนิสิต** นางสาวศิริประภา เหล่ามูล รหัสประจำตัวนิสิต 6032349023

**ภาควิชา** จุลชีววิทยา  
**ปีการศึกษา** 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



# โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

## ชื่อโครงการ

การประยุกต์ใช้นาโนทองคำที่สังเคราะห์ได้จากวิธีการทางชีวภาพเพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย

สี้อม

(An Application of Biosynthesized Gold Nanoparticle as a Catalyst for Dye Degradation)

อาจารย์ที่ปรึกษาในโครงการ

อาจารย์ ดร. สรียา ณ ป้อมเพ็ชร

นิสิตในโครงการ

นางสาว ศิริประภา เหล่ามุล เลขประจำตัวนิสิต 6032349023

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

**ชื่อโครงการ:** การประยุกต์ใช้อุณหภูมิทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จากวิธีการทางชีวภาพเพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสีย้อม

**นิสิตในโครงการ:** นางสาว ศิริประภา เหล่ามุล  
เลขประจำตัวนิสิต 6032349023

**อาจารย์ที่ปรึกษา:** อาจารย์ ดร. สิริสา ญ ป้อมเพ็ชร

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2563

### บทคัดย่อ

การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน (gold nanoparticles: AuNPs) ด้วยจุลินทรีย์หรือสารสกัดของจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย เห็ด ยีสต์และรา ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจากเชื้อรา เนื่องจากเชื้อราสามารถทนความเข้มข้นของโลหะได้มากกว่าเมื่อเทียบกับแบคทีเรียสามารถหลั่งเอนไซม์ออกนอกเซลล์และผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมาก ซึ่งสารชีวโมเลกุลเหล่านี้มีความสามารถรีดิวซ์ไอออนอนุภาคทองประจุบวก ( $Au^{3+}$ ) ไปเป็นอนุภาคทองคำนาโน ( $Au^0$ : AuNP) ได้ อีกทั้งกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจากวิธีการทางชีวภาพเหล่านี้ใช้ต้นทุนน้อย ความเป็นพิษต่ำและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม จากงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้สังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจากเชื้อรา *Aspergillus niger* MSCU 0361 และศึกษาประสิทธิภาพในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลู โดยผลการวิเคราะห์โดยใช้ UV-visible spectrophotometer พบว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้ มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ 558 นาโนเมตร และเมื่อทำการวิเคราะห์ผลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope: TEM) พบว่าอนุภาคทองคำนาโนมีหลายรูปร่าง เช่น ทรงกลม ทรงกระบอก และมีการกระจายตัวของขนาดที่หลากหลาย เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค dynamic light scattering (DLS) พบว่าขนาดของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเฉลี่ย 60.74 นาโนเมตร และมีค่าศักย์ซีตา (zeta potential) เท่ากับ -17.4 มิลลิโวลต์ แสดงให้เห็นว่าบนพื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโนมีประจุเป็นลบ เมื่อศึกษาถึงความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของอนุภาคทองคำนาโนในการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลู โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ช่วงความยาวคลื่น 664 นาโนเมตร พบว่าชุดควบคุมที่ใส่ ascorbic acid เป็นตัวรีดิวซ์เพียงอย่างเดียวมีประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาย่อยสลายสีย้อมได้ดีกว่าเมื่อใส่ ascorbic acid และอนุภาคทองคำนาโน ทั้งนี้กลไกการใช้อุณหภูมิทองคำนาโนเพื่อย่อยสลายสีย้อมยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

**คำสำคัญ:** อนุภาคทองคำนาโน, วิธีการสังเคราะห์ทางชีวภาพ, ตัวเร่งปฏิกิริยา, *Aspergillus niger*

**Project title:** An application of biosynthesized gold nanoparticles as a catalyst for dye degradation

**Investigation:** Miss Siraprapha Laomoon

Student ID 6032349023

**Advisor:** Sarisa Na Pombejra, Ph.D.

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University Academic Year 2020

---

## Abstract

The synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) using microorganisms such as bacteria, mushrooms, yeasts, fungi as well as their cell-free extracts has been trending in recent years. Fungi have gained popularity as sources for the biosynthesis because they can tolerate higher metal concentrations compared to bacteria do. Moreover, fungi generally secrete abundant extracellular enzymes and proteins that can reduce gold ion ( $\text{Au}^{3+}$ ) to gold nanoparticle ( $\text{Au}^0$ : AuNP). The biosynthesis of AuNP is a low-cost process with less toxicity and great environmental friendliness. In this study, we synthesized AuNP from *Aspergillus niger* MSCU 0361 and evaluated its efficiency as a catalyst for dye degradation of methylene blue. The UV-visible spectroscopy result showed the maximum absorbance at 558 nm. The transmission electron microscope (TEM) micrograph displayed various shapes of AuNP such as sphere and cylinder, and a broad size distribution of AuNP was observed. The average size of AuNP reported by dynamic light scattering (DLS) was 60.74 nm. The zeta potential was -17.4 mV, indicating negative charge on the surface of AuNP. The catalytic activity of AuNP for methylene blue degradation was investigated by measuring maximum absorbance at 664 nm. The result showed that the control, which contained only ascorbic acid as a reducing agent, had better dye degradation efficiency than the reaction mixed with ascorbic acid and AuNP. However, to understand the mechanism behind the dye degradation using AuNP, further study is needed.

**Keywords:** gold nanoparticles, biosynthesis, catalyst, *Aspergillus niger*

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความอนุเคราะห์และความช่วยเหลือเป็นอย่างดีจาก อาจารย์ ดร. สริสา ฌ ป้อมเพ็ชร เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ซึ่งท่านกรุณามอบความรู้ คำแนะนำ ความคิดเห็น วิธีการปฏิบัติและการใช้อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ การกำหนดกรอบเวลาในการเสนอความคืบหน้าของงาน ช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นตลอดการทำงานวิจัย อีกทั้งยังคอยเป็นกำลังใจที่ดีในการทำงานวิจัยครั้งนี้ตลอดมา ซึ่งถือเป็นแรงกระตุ้นให้แก่ผู้วิจัยได้ดียิ่งในการดำเนินงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วง ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งใจในพระคุณของท่านอาจารย์เป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณด้วยความเคารพอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้และคำแนะนำต่างๆอันเป็นประโยชน์สำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้และตัวผู้วิจัยในอนาคต

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี ในการดำเนินงานวิจัยและตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ผู้เขียนขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จากงบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้อนุเคราะห์และสนับสนุนเงินทุนวิจัยตลอดระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย

ผู้เขียนขอขอบคุณเพื่อนร่วมห้องปฏิบัติการ 1804/13 นางสาววิธิตา จันยะมิตรี และนายอัมริน อะโน ที่คอยช่วยเหลือ รับฟังปัญหาที่เกิดขึ้น คอยให้กำลังใจในทุกด้านไม่ว่าจะเป็นการเรียนและการทำงานวิจัย อีกทั้งช่วยกันดูแลห้องปฏิบัติการ

ผู้เขียนขอขอบคุณเพื่อนกรุ๊ปที่ 44 รวมทั้งพี่และน้อง ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคนที่คอยช่วยเหลือ ให้กำลังใจ และพร้อมช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ทำงานวิจัย จนผู้วิจัยดำเนินงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ญาติพี่น้อง ที่คอยสนับสนุนในด้านต่างๆ ช่วยเหลือและให้กำลังใจเสมอมา จนผู้วิจัยสามารถทำโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ศิริประภา เหล่ามุล

## สารบัญ

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตารางและกราฟ	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1	1
1. เชื้อรา <i>Aspergillus niger</i>	1
2. อนุภาคทองคำนาโน (Gold nanoparticles)	3
3. การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจากเชื้อรา	9
4. ความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของอนุภาคทองคำนาโน	11
บทที่ 2	13
บทที่ 3	16
บทที่ 4	22
บทที่ 5	37
อ้างอิง	44
ภาคผนวก	51
ภาคผนวก ก	52
ภาคผนวก ข	55
ภาคผนวก ค	56
ภาคผนวก ง	57

## สารบัญตารางและกราฟ

ตารางที่ 1.1	ตัวอย่างการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนทางชีวภาพจากจุลินทรีย์	8
ตารางที่ 1.2	ตัวอย่างการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจากเชื้อราชนิดต่างๆ	10
ตารางที่ 4.2	แสดงให้เห็นถึงการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่ระยะเวลาตั้งแต่ 0-70 นาที	24
ตารางที่ 4.3	แสดงค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงของสีเมทิลีนบลูที่เปลี่ยนแปลงไป	34



## สารบัญรูปลูกภาพ

รูปที่ 1.1	แสดงโครงสร้างของ <i>Aspergillus</i>	2
รูปที่ 1.2	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อรา <i>A.niger</i>	2
รูปที่ 1.3	พื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโนมีการจับกับลิแกนด์หลายชนิด	4
รูปที่ 1.4	การสั่นของอิเล็กตรอนที่อยู่บนพื้นผิวของอนุภาคโลหะนาโน	4
รูปที่ 1.5	วิธีการสังเคราะห์อนุภาคโลหะนาโน Bottom-up และ Top-down	6
รูปที่ 1.6	แนวทางและวิธีการในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่แตกต่างกัน	7
รูปที่ 1.7	กระบวนการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนทางชีวภาพ	7
รูปที่ 1.8	แสดงกลไกการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่เกิดขึ้นภายในเซลล์และภายนอกเซลล์	11
รูปที่ 3.1.	วิธีการนับสปอร์ของรา <i>A. niger</i> ด้วย Hemocytometer	17
รูปที่ 4.1	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>A. niger</i> MSCU 0361 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA	22
รูปที่ 4.2	แสดงลักษณะ fungal biomass ของ <i>A. niger</i> MSCU 0361 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB	23
รูปที่ 4.3	แสดงลักษณะ fungal filtrate ของ <i>A. niger</i> MSCU 0361	23
รูปที่ 4.4	แสดงให้เห็นถึงกราฟค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุภาคทองคำนาโนในหลอดทดลอง	26
รูปที่ 4.5	ภาพที่แสดงผล TEM ของอนุภาคทองคำนาโน	27
รูปที่ 4.6	แสดงถึงกราฟการกระจายตัวของขนาดอนุภาคทองคำนาโน	29
รูปที่ 4.7	แสดงถึงกราฟการวิเคราะห์ค่า Zeta potential	31
รูปที่ 4.8	แสดงให้เห็นอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ตกตะกอนที่ก้นหลอดหลังจากทำการปั่นเหวี่ยง	32
รูปที่ 4.9	แสดงให้เห็นอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้หลังจากทำการระเหยแห้งเอาน้ำออก	33
รูปที่ 4.10	แสดงให้เห็นถึงเปอร์เซ็นต์ของการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลู	36

## บทที่ 1

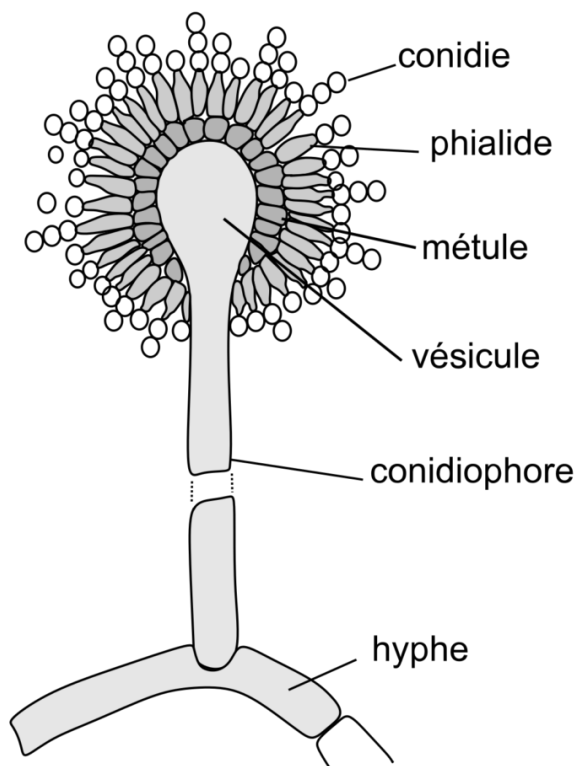
### บทนำ

#### 1. เชื้อรา *Aspergillus niger*

เชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* เป็นเชื้อราสายใยที่พบได้ทั้งในรูปแบบของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorph) และการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (telomorph) ซึ่งจัดเป็นราในกลุ่มของ Ascomycetes เชื้อรา *Aspergillus* มีเส้นใยที่แตกแขนงและมีผนังกัน เส้นใยของเชื้อรานั้นไม่มีสี ก้านชูสปอร์ของเชื้อรา (conidiophore) นั้นเกิดจากส่วนของฟุตเซลล์ (foot cell) ซึ่งก้านชูสปอร์อาจจะมีผนังกันหรือไม่มีผนังกันก็ได้ ส่วนปลายของก้านชูสปอร์นั้นจะมีลักษณะโป่งออก ซึ่งเรียกส่วนนี้ว่า เวสซิเคิล (vesicle) และมีส่วนที่ยื่นออกมาจากเวสซิเคิล เรียกว่า สเตอริกมา (sterigma) ซึ่งจะมีชั้นเดียวหรือสองชั้นก็ได้ อีกทั้งจะมีส่วนของโคนิเดีย (conidia) ถูกสร้างขึ้นมาภายในของสเตอริกมา ซึ่งจะมีการดันโคนิเดียใหม่ออกมาเรื่อยๆ จึงแสดงให้เห็นเป็นสายของโคนิเดีย ดังรูปที่ 1.1 โดย Raper and Funnell (1965) ได้ทำการจัดกลุ่มของ *Aspergillus* ออกเป็น 18 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะของ conidial head และสีของโคโลนี (Klich, 2002)

เชื้อรา *A. niger* มีลักษณะของ conidial head ที่มีสีดำหรือสีน้ำตาลเข้ม จึงถูกเรียกว่า ราดำ ดังรูปที่ 1.2 โดยที่โคนิเดียจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ที่ 7-10 ไมโครเมตร สำหรับการเจริญเติบโตเชื้อรา *A. niger* อุณหภูมิที่ต่ำที่สุดที่เชื้อราเจริญเติบโต คือ 6-8 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่สูงที่สุดที่สามารถเจริญได้ คือ 45-47 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต คือ 35-37 องศาเซลเซียส เชื้อรานี้จัดเป็นเชื้อราที่ชอบเจริญในสภาวะแวดล้อมที่มีปริมาณน้ำน้อย (xerophilic mold) สามารถงอกสายใยไปได้ในสภาวะที่มีค่าความชื้นที่มีผลต่ออัตราการเจริญของจุลินทรีย์ ( $a_w$ ) 0.77 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ซึ่ง *A. niger* สามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่มีค่า pH 2 และอุณหภูมิสูงได้ (Hocking, 2006)

ความสำคัญของเชื้อ *A. niger* จัดว่าเป็นสิ่งมีชีวิตที่สำคัญสำหรับกระบวนการหมักในอุตสาหกรรม อีกทั้งยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์เพื่อเตรียมกรดซิตริก ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา นอกจากนี้เชื้อรา *A. niger* ยังเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยเอนไซม์ เช่น แอลฟา-อะไมเลส, เซลลูเลส และ เพคติเนส โดย *A. niger* ได้รับการพิจารณาว่าไม่มีความเป็นพิษภายใต้สภาวะอุตสาหกรรม จึงถือว่าเป็นสิ่งมีชีวิตที่ปลอดภัยที่ใช้สำหรับการผลิต (generally recognized as safe; GRAS) จากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Nielson et al., 2009)



รูปที่ 1.1 แสดงโครงสร้างของ *Aspergillus*

ที่มา: <https://microbenotes.com/aspergillus-niger/>

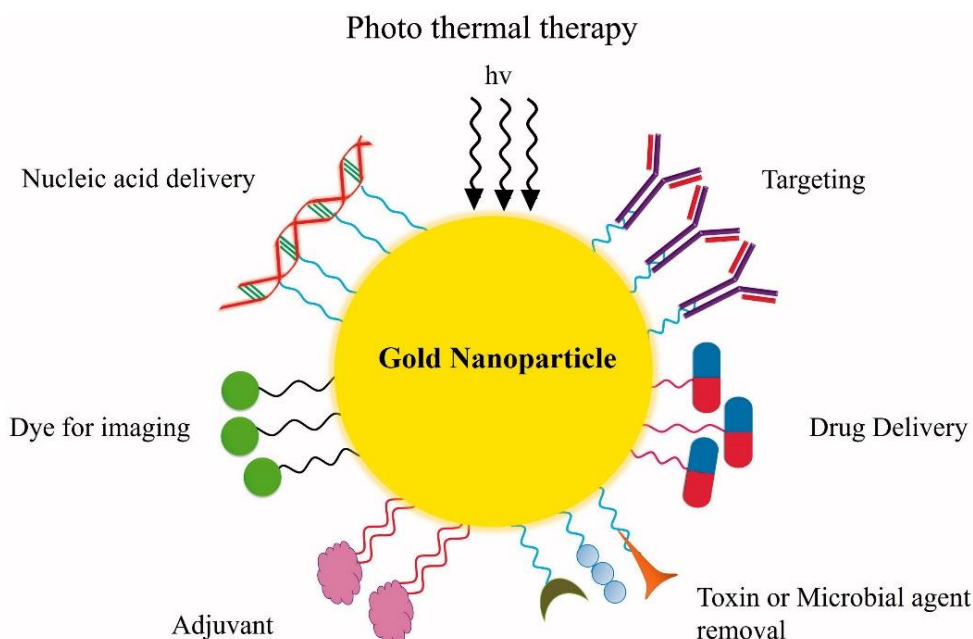


รูปที่ 1.2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *A. niger*

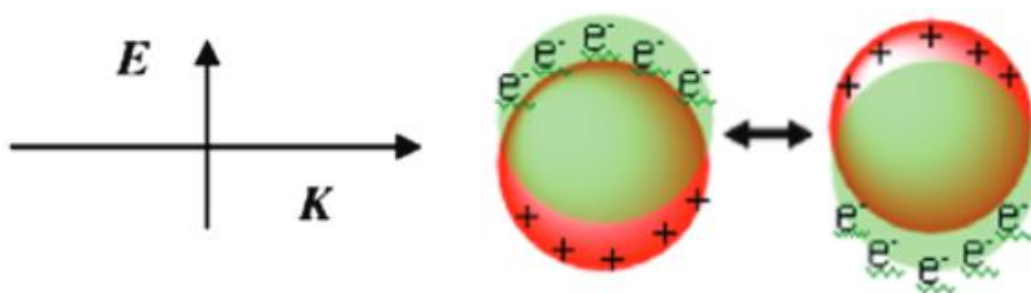
ที่มา: <https://microbenotes.com/aspergillus-niger/>

## 2. อนุภาคทองคำนาโน (Gold Nanoparticles)

อนุภาคทองคำนาโน (gold nanoparticles หรือ AuNPs) เป็นอนุภาคทองคำนาโนที่มีขนาดเล็กในระดับของนาโนเมตร การที่อนุภาคทองคำนาโนมีขนาดเล็กมากเช่นนี้ จึงส่งผลทำให้อนุภาคทองคำนาโนมีคุณสมบัติทางกายภาพบางประการแตกต่างออกไปจากอนุภาคทองคำที่มีขนาดใหญ่ทั่วไป กล่าวคือ อนุภาคทองคำนาโนนั้นมีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตรจึงสามารถที่จะกระจายแขวนลอยอยู่ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ หรือตัวทำละลายชนิดอื่นได้ง่าย เมื่อมีสารที่ช่วยทำให้เสถียรที่เหมาะสมอยู่ล้อมรอบพื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโนด้วย ซึ่งการกระจายตัวในน้ำจะทำให้อนุภาคทองคำนาโนมีคุณสมบัติในการเป็นคอลลอยด์ นอกจากนี้อนุภาคทองคำนาโนที่เล็กในระดับนาโนเมตรจึงทำให้สามารถแทรกตัวผ่านช่องว่างของเซลล์ได้ง่าย (Turkevitch et al., 1951) เนื่องจากอนุภาคทองคำนาโนมีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร จึงทำให้มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรที่สูง ซึ่งส่งผลให้อนุภาคทองคำนาโนมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันและออกซิเดชันได้ ทำให้สามารถทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนได้เป็นจำนวนมาก (Sen et al., 2013) อีกทั้งยังสามารถเกิดปฏิกิริยาทางเคมีที่บริเวณพื้นผิวได้ดี ทั้งนี้บริเวณพื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโนยังสามารถที่จะจับกับลิแกนด์ได้หลายชนิดอีกด้วย (Bagheri et al., 2018) **ดังรูปที่ 1.3** (Bagheri et al., 2018) และคุณสมบัติอีกหนึ่งประการของอนุภาคทองคำนาโนคือสมบัติเชิงแสง ที่แสดงให้เห็นถึงความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคทองคำนาโนที่แตกต่างกัน เนื่องมาจากการตอบสนองจากแสงฟิสิกส์พื้นฐานที่มีต่ออนุภาคโลหะนาโน กล่าวคือ เมื่ออนุภาคโลหะนาโนมีการสัมผัสกับแสงและสนามแม่เหล็กไฟฟ้าของแสง จะทำให้เกิดการสั่นของอิเล็กตรอนอิสระโดยรวม (conduction band electrons) ของอนุภาคโลหะนาโน ซึ่งการสั่นของอิเล็กตรอนที่อยู่โดยรอบพื้นผิวของอนุภาคโลหะนาโนนี้จะทำให้เกิดการกระตุ้นอิเล็กตรอนที่พื้นผิวอนุภาคโลหะนาโนให้มีระดับชั้นพลังงานที่สูงขึ้น เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า พลาสมอนเรโซแนนซ์ที่พื้นผิว (surface plasmon resonance) **ดังรูปที่ 1.4** (Huang et al., 2010) เมื่ออนุภาคโลหะนาโนดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นหนึ่งๆ จะทำให้แสงที่ผ่านออกมาปรากฏเป็นสีที่แตกต่างกัน จึงสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้โดยใช้ UV-visible spectrophotometer โดยที่ค่าความยาวคลื่นสูงสุดของอนุภาคโลหะนาโนจะขึ้นอยู่กับปัจจัยที่มีผลต่อความหนาแน่นของประจุที่อยู่บนพื้นผิวของอนุภาคโลหะนาโน เช่น ชนิดของโลหะ ขนาดและรูปร่างของอนุภาคโลหะนาโน (Huang et al., 2010)



รูปที่ 1.3 พื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโนมีการจับกับลิแกนด์หลายชนิด (Bagheri et al., 2018)



รูปที่ 1.4 การสั่นของอิเล็กตรอนที่อยู่บนพื้นผิวของอนุภาคโลหะนาโน (Huang et al., 2010)

ในอดีตการสังเคราะห์อนุภาคโลหะนาโนจะสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทหลักๆ ได้แก่ (1) Bottom-up approach เป็นวิธีการที่เริ่มต้นมาจากโมเลกุลที่ใหญ่กว่ามีการย่อยสลายเป็นหน่วยย่อยเล็กๆ จากนั้นหน่วยย่อยเล็กๆ เหล่านี้จะเปลี่ยนแปลงไปเป็น อนุภาคโลหะนาโน ซึ่งตัวอย่างของวิธีการ Bottom-up approach ได้แก่ การบดและเทคนิคการสลายตัวอื่นๆ และ (2) Top-down approach เป็นวิธีการที่สังเคราะห์อนุภาคโลหะนาโนจากสิ่งที่มีเล็กกว่าระดับนาโน ซึ่งตัวอย่างของวิธีการ Top-down approach ได้แก่ การตกตะกอน, การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารเคมี (chemical reduction) และการสังเคราะห์ด้วยวิธีการชีวภาพ ซึ่งเป็นวิธีการสังเคราะห์ด้วยกระบวนการทางชีวเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ ดังรูปที่ 1.5 (Khan et al., 2019)

สำหรับในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนมีได้หลากหลายวิธี ซึ่งวิธีการทั่วไปสำหรับใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนมี 3 วิธี ได้แก่ วิธีการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical

method) วิธีการสังเคราะห์ทางกายภาพ (physical method) และวิธีการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (biological method) ดังรูปที่ 1.6 ดังนี้

### 2.1. วิธีการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical method)

วิธีการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางเคมี เป็นวิธีการที่สามารถสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนได้ในปริมาณมาก สามารถควบคุมขนาดและรูปร่างของอนุภาคทองคำนาโนให้มีขนาดที่สม่ำเสมอ อีกทั้งยังสามารถออกแบบส่วนที่ล้อมรอบพื้นผิวอนุภาคทองคำนาโนได้อย่างแม่นยำ โดยขั้นตอนในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางเคมี เริ่มจากสารละลายตั้งต้นที่เป็นไอออนอนุภาคทองที่มีประจุบวก ( $\text{Au}^{3+}$ ) เกิดปฏิกิริยาการรีดักชัน ไอออนอนุภาคทองที่มีประจุบวกกับอิเล็กตรอนเกิดการสังเคราะห์เป็นอนุภาคทองคำนาโน ( $\text{Au}^0$ ) โดยมีสารละลายที่ทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ (reducing agent) เช่น  $\text{NaBET}_3\text{H}$  (sodium triethylborohydride)  $\text{LiBET}_3\text{H}$  (lithium triethylborohydried) และ  $\text{NaBH}_4$  (sodium borohydride) ซึ่งเป็นสารละลายที่ทำหน้าที่ในการรับอิเล็กตรอนจากไอออนอนุภาคทองประจุบวก แต่มีความเป็นพิษ (Kim et al., 2006) ตัวอย่างวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี เช่น การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนเกิดจากการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ  $\text{HAuCl}_4$  โดยใช้ thiolated chitosan (QTDT) ทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ แล้วนำมาประยุกต์ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาสำหรับปฏิกิริยารีดักชันสีย้อมเมทิลีนบลู (Khan et al., 2014)

### 2.2. วิธีการสังเคราะห์ทางกายภาพ (physical method)

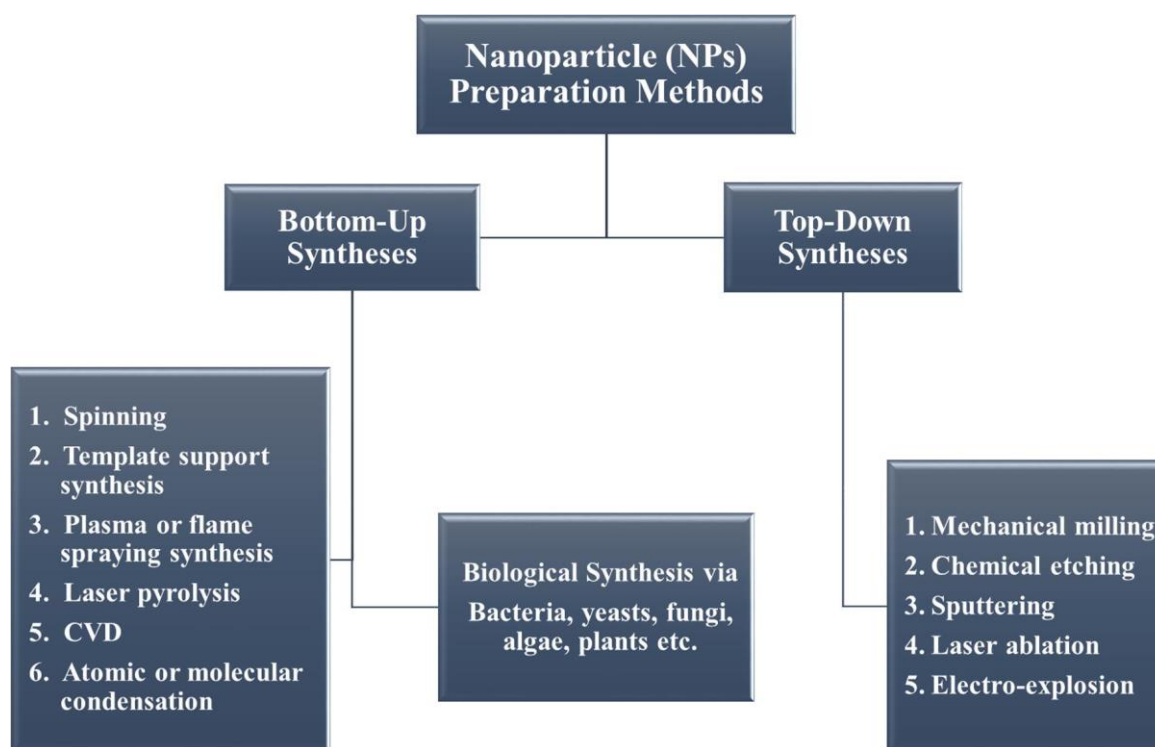
วิธีการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางกายภาพ เป็นวิธีการที่สามารถควบคุมขนาดของอนุภาคทองคำนาโน อีกทั้งเมื่อกระบวนการสังเคราะห์เสร็จสิ้นจะทำให้อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นนั้นมีความบริสุทธิ์สูง ตัวอย่างวิธีการสังเคราะห์ทางกายภาพ เช่น การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจากการฉายด้วยรังสีแกมมา เพื่อทำให้อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้มีขนาดเฉลี่ย 2-7 นาโนเมตร โดยใช้โปรตีนอัลบูมินในซีรัมของวัวเป็นสารที่ทำให้อนุภาคทองคำนาโนมีความเสถียร (Khan et al., 2014)

ซึ่งวิธีการทั้งสองที่ได้กล่าวมาข้างต้น แม้ว่าจะเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมในการใช้สังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน เนื่องจากว่าเป็นวิธีการที่สังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนได้ในปริมาณมาก สามารถควบคุมขนาดและรูปร่างของอนุภาคทองคำนาโนได้ในระยะเวลาอันสั้น แต่วิธีการในการสังเคราะห์ก็ยังคงมีความซับซ้อนค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งการใช้สารเคมีที่เป็นพิษไม่เพียงแต่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเท่านั้น แต่ยังส่งผลกระทบต่อชีวิตของมนุษย์อีกด้วย การใช้สารเคมีในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนยังถือว่าเป็นข้อจำกัด สำหรับงาน

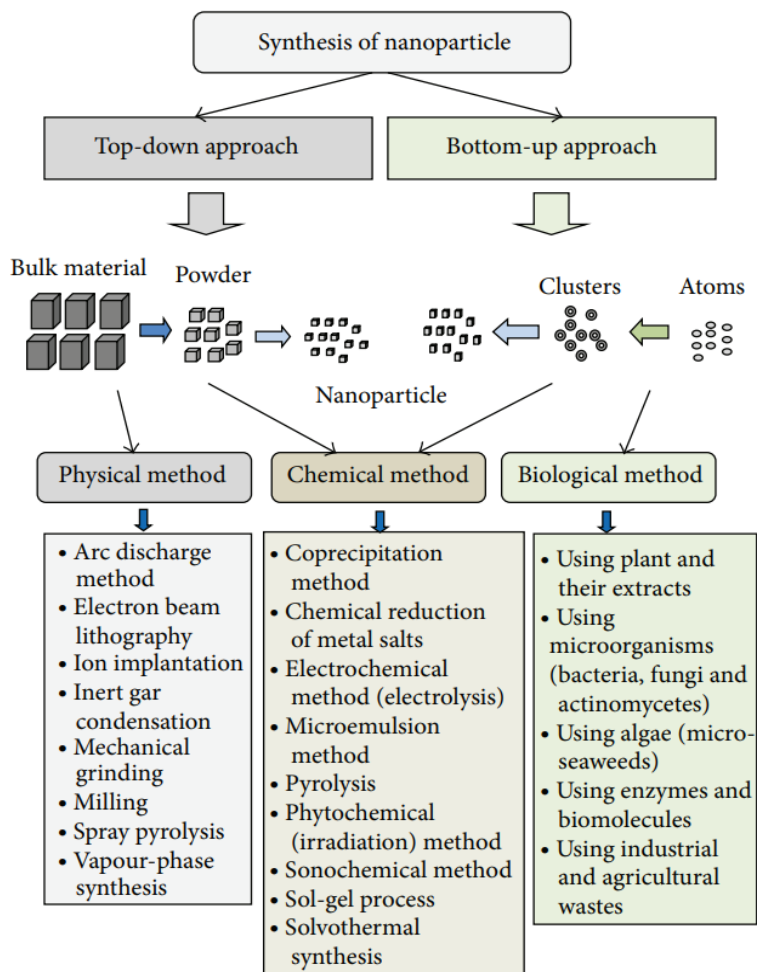
ทางด้านชีวการแพทย์โดยเฉพาะในด้านการแพทย์โดยตรง ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีการที่ปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากกว่าในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน (Li et al., 2011)

### 2.3. วิธีการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (biological method)

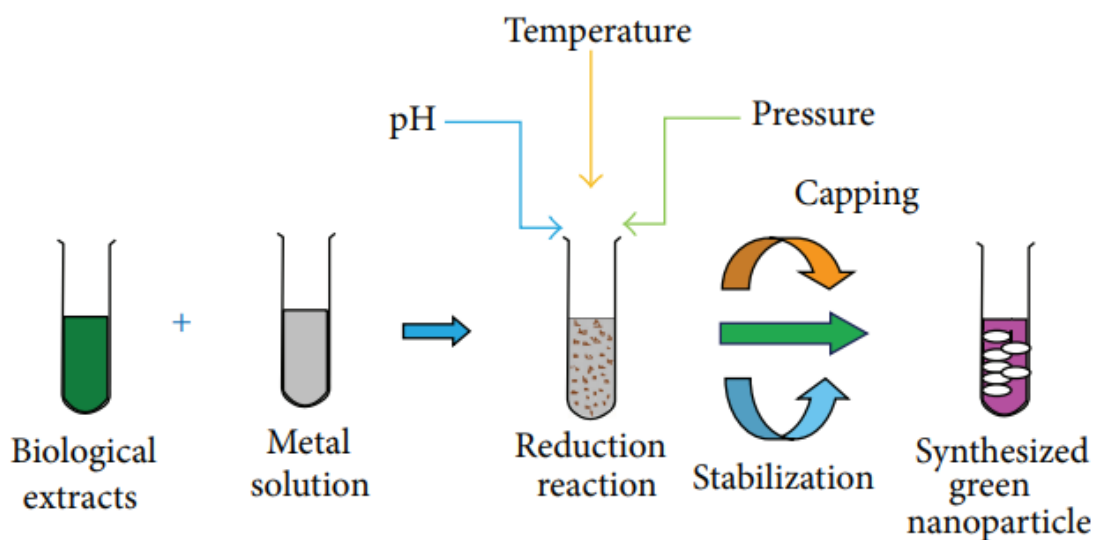
การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพเป็นวิธีการที่ได้รับการยอมรับมากในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นวิธีการที่ไม่ต้องใช้พลังงานมากเท่ากับวิธีการทางเคมี อีกทั้งยังเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากกว่า ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้จากเนื้อเยื่อพืช หรือจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย ยีสต์ และรา) ดังตารางที่ 1.1 ตัวอย่างวิธีการสังเคราะห์ทางชีวภาพ เช่น การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนโดยใช้ส่วนเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียจะต้องอาศัยอุณหภูมิ ความดันและค่า pH ที่เหมาะสม ซึ่งอนุภาคทองคำนาโนที่เกิดขึ้นจะมีความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สูง มีพื้นที่ผิวที่จำเพาะ สามารถเกิดการสัมผัสระหว่างเอนไซม์ของจุลินทรีย์และไอออนอนุภาคทองได้ดี โดยที่เอนไซม์ของจุลินทรีย์จะจับไอออนอนุภาคทองและเปลี่ยนไอออนอนุภาคทองไปเป็นอนุภาคทองคำนาโน ดังรูปที่ 1.7 (Li et al., 2011)



รูปที่ 1.5 วิธีการสังเคราะห์อนุภาคโลหะนาโน Bottom-up และ Top-down (Khan et al., 2019)



รูปที่ 1.6 แนวทางและวิธีการในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่แตกต่างกัน (Li et al., 2011)



รูปที่ 1.7 กระบวนการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนทางชีวภาพ (Li et al., 2011)



ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนทางชีวภาพจากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์	ขนาด (nm) และ รูปร่าง	ตำแหน่ง	อ้างอิง
<b>1. แบคทีเรีย</b> - <i>Escherichia coli</i> - <i>Shewanella oneidensis</i>	20–30 nm และ สามเหลี่ยม, หกเหลี่ยม 12 ± 5 nm และ ทรงกลม	เอนไซม์ที่หลัง ออกมานอกเซลล์ เอนไซม์ที่หลัง ออกมานอกเซลล์	(Du et al., 2007) (Wu et al., 2017)
<b>2. ยีสต์</b> - <i>Yarrowia lipolytica</i>	15 nm และ สามเหลี่ยม	เอนไซม์ที่หลัง ออกมานอกเซลล์	(Mourato et al., 2011)
<b>3. เชื้อรา</b> - <i>Aspergillus clavatus</i> - <i>Verticillium sp.</i>	24.4 ± 11 nm และ สามเหลี่ยม, ทรงกลม, หกเหลี่ยม 20 ± 8 nm และ ทรงกลม	เอนไซม์ที่หลัง ออกมานอกเซลล์ ผนังเซลล์และเยื่อ หุ้มไซโตพลาสซึม	(Verma et al., 2011) (Mukherjee et al., 2002)
<b>4. สาหร่าย</b> - <i>Plectonema Boryanum</i> - <i>Sargassum wightii</i>	<10–25 nm และ ทรงลูกบาศก์ 8–12 nm และ ทรงระนาบ	เอนไซม์ภายใน เซลล์ เอนไซม์ที่หลัง ออกมานอกเซลล์	(Lengke et al., 2006) (Singaravelu et al., 2007)
<b>5. พืช</b> - <i>Stevia rebaudiana</i>	5-20 nm และ ทรงกลม	สารสกัดจากส่วน ใบ	(Sadeghia et al., 2015)

### 3. การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจากเชื้อรา

การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนทางชีวภาพด้วยจุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์ได้ทั้งจากเอนไซม์ที่หลั่งออกมาจากนอกเซลล์ (extracellular enzymes) และเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ (intracellular enzymes) ซึ่งวิธีการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจากเอนไซม์ที่หลั่งออกมาจากนอกเซลล์ จุลินทรีย์เป็นที่ได้รับความนิยมมากที่สุด การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนทางชีวภาพจากจุลินทรีย์นี้เป็นวิธีการที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และใช้ระยะเวลาสั้นๆ ในการเปลี่ยนไอออนอนุภาคทองประจุบวกไปเป็นอนุภาคทองคำนาโน (Ahmed et al., 2016)

เชื้อราจัดเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอต (eukaryotic organisms) โดยดำรงชีพด้วยการใช้สารอินทรีย์จากสิ่งมีชีวิตอื่น (heterotrophic) ดังนั้น เชื้อราจึงมีความสามารถที่จะปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ (extracellular enzymes) เพื่อทำการย่อยสลายอาหารที่อยู่ด้านนอกเซลล์ จากเดิมที่มีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนให้กลายเป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก เพื่อนำเอาโมเลกุลขนาดเล็กและไม่ซับซ้อนเหล่านี้มาใช้เป็นแหล่งพลังงานให้กับเชื้อรา และนอกจากนี้เอนไซม์ที่หลั่งออกมาจากนอกเซลล์ของเชื้อราทั้งหมดก็ยังมีหน้าที่ที่หลากหลาย ซึ่งเรียกเอนไซม์ทั้งหมดเหล่านี้ว่า secretome แต่อย่างไรก็ตามความรู้ที่เกี่ยวข้องกับ secretome ยังอยู่ในช่วงเริ่มต้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาความรู้เพิ่มเติมเพื่อทราบบทบาทและหน้าที่ของเอนไซม์ใน secretome ที่ทำให้เกิดการรีดักชันของไอออนอนุภาคทองประจุบวกให้ชัดเจนเพิ่มมากขึ้น (Kitching et al., 2015)

ในปัจจุบันนี้เชื้อราหลากหลายชนิด ดังตารางที่ 1.2 ได้รับความสนใจสำหรับนำมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนทางชีวภาพ เนื่องจากว่าเชื้อรามีความทนทานต่อโลหะ สามารถที่จะผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง จึงส่งผลทำให้อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์มีความเสถียร สามารถขยายส่วนออกไปได้ง่ายกว่าซึ่งเป็นประโยชน์ต่อกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในทางชีวภาพ เช่น solid substrate fermentation technique เป็นต้น อีกทั้งเชื้อราหลายสปีชีส์สามารถเพาะเลี้ยงเติบโตได้อย่างรวดเร็ว สามารถเก็บรักษาในห้องปฏิบัติการได้ (Moghaddam et al., 2015) มีความคุ้มค่า ความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้จะมีขนาดเล็กกว่าเมื่อเทียบกับการสังเคราะห์ด้วยแบคทีเรีย

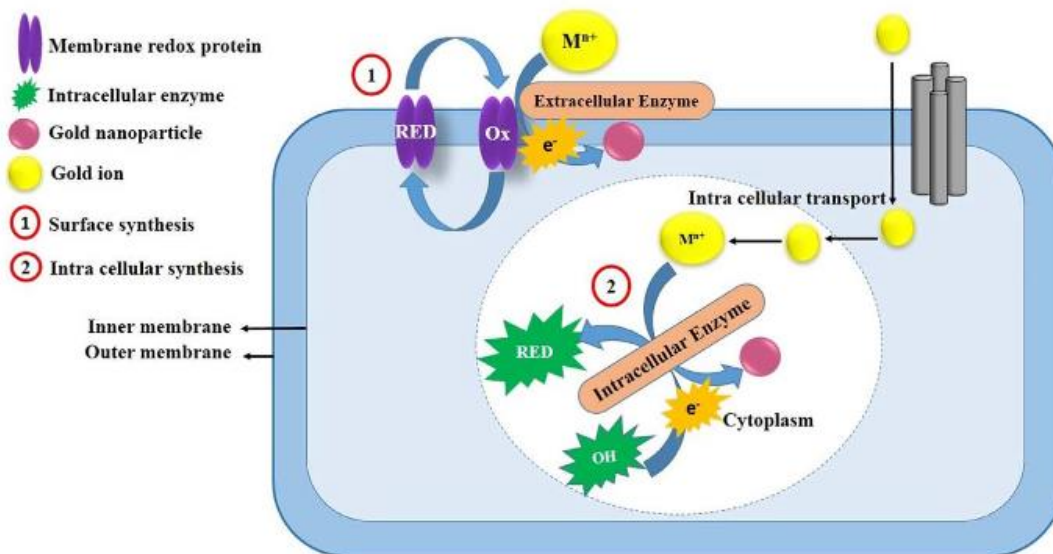
กระบวนการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนทางชีวภาพจากเชื้อรา เกิดขึ้นจากการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของไอออนอนุภาคทองที่มีประจุบวก ( $Au^{3+}$ ) เปลี่ยนแปลงไปเป็นอนุภาคทองคำนาโน ( $Au^0$ ) ดังรูปที่ 1.8 (Kitching et al., 2015) โดยอาศัยตัวรีดิวซ์ ที่เป็นเอนไซม์จากราที่หลั่งออกมานอกเซลล์ เช่น  $\alpha$ -NADPH-dependent sulfite reductase, hydrolases, amylases, cellulase และ proteases อีกทั้งสารทุติยภูมิ

ที่มาจากเชื้อรา เช่น alkaloids, terpenoids, phenolic compound และ co-enzymes ซึ่งสารทั้งสองประเภทนี้มีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันไอออนอนุภาคทองที่มีประจุบวกได้ (Sengani et al., 2017)

**ตารางที่ 1.2** ตัวอย่างการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจากเชื้อราชนิดต่างๆ

สปีชีส์ของเชื้อรา	ตำแหน่ง	ขนาด (nm)	รูปร่าง	อ้างอิง
<i>Aspergillus niger</i>	เอนไซม์ที่หลัง ออกมานอกเซลล์	10-20	รูปร่างหลากหลาย	(Xie et al., 2007)
<i>Rhizopus oryzae</i>	ผิวเซลล์	10	ผลึกระดับนาโน	(Das et al., 2009)
<i>Fusarium oxysporum</i>	เอนไซม์ที่หลัง ออกมานอก	8-40	ทรงกลม และ สามเหลี่ยม	(Mukherjee et al., 2002)
<i>Candida albicans</i>	-	20-60, 40- 80	ทรงกลม และ ไม่ เป็นทรงกลม	(Chuhan et al., 2011)

นอกจากนี้ยังพบว่ายังมีปัจจัยหลายประการที่ส่งผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ เพื่อควบคุมให้การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนมีขนาดและรูปร่างที่ใกล้เคียงกัน ดังนี้ ความเข้มข้นของ  $\text{HAuCl}_4$  pH อุณหภูมิ ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ ความเข้มข้นของเกลือไอออนอนุภาคทอง การให้อากาศ สภาวะรีดอกซ์ (redox conditions) และอัตราส่วนสารต่างๆ ที่ใช้ในการสังเคราะห์ เป็นต้น (Singh et al., 2016)



รูปที่ 1.8 แสดงกลไกการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่เกิดขึ้นภายในเซลล์และภายนอกเซลล์

(Sengani et al., 2017)

#### 4. ความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของอนุภาคทองคำนาโน

อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลายด้าน เนื่องจากว่าอนุภาคทองคำนาโนมีคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่เป็นเอกลักษณ์ โดยที่อนุภาคทองคำนาโนมีคุณสมบัติที่เฉพาะคือ สามารถเร่งปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง กล่าวคือ เร่งปฏิกิริยาได้ในอุณหภูมิปกติ อีกทั้งอนุภาคทองคำนาโนที่มีขนาดเล็ก ส่งผลทำให้มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูงและมีพลังงานบริเวณพื้นที่ผิวสูง จึงส่งผลให้อนุภาคทองคำนาโนมีความว่องไวและนำมาประยุกต์ใช้ในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ (Du et al, 2013) ซึ่งอนุภาคทองคำนาโนขนาดเล็กเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ดีกว่าอนุภาคทองคำนาโนที่มีขนาดใหญ่ (David, 2007) อีกทั้งกระบวนการเร่งปฏิกิริยา บนพื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโน โดยจะเกี่ยวข้องกับการถ่ายเทอิเล็กตรอนระหว่างโมเลกุลที่ดูดซับและพื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโน อย่างเช่น การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) (Bond, 2010), การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสีย้อมอะโซ (azo dye) (Cavuslar et al, 2020) เป็นต้น

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยต้องการที่จะศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนทางชีวภาพ โดยใช้จุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อรา *A. niger* ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการหลั่งเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ (extracellular enzymes) และอุดมไปด้วยแหล่งเอนไซม์ต่าง ๆ มากมาย งานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* บนที่อุณหภูมิที่เหมาะสม 30 องศาเซลเซียส ทำการปั่นตกตะกอนเซลล์และเก็บส่วนใส การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจะเกิดขึ้นจากปฏิกิริยารีดักชันของไอออนอนุภาคทองคำที่มีประจุบวก ( $Au^{3+}$  หรือ  $HAuCl_4$ ) เปลี่ยนแปลงไปเป็นอนุภาคทองคำนาโน (Au<sup>0</sup> หรือ AuNPs) ซึ่งการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจะเห็นการเปลี่ยนแปลงสีไปเป็นสารละลายสีม่วงแดง จากนั้นจะนำเอาอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มาวิเคราะห์ค่าความขุ่นของสารละลายอนุภาคทองคำนาโนที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่อง UV-visible spectrophotometer เพื่อดูรูปร่าง และการกระจายตัวของอนุภาคทองคำนาโนภายในสารละลาย นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์ผลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy; TEM) Dynamic Light Scattering (DLS) และ Zeta potential เพื่อดูความเสถียร และประจุที่อยู่บนพื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้นำเอาอนุภาคทองคำนาโนไปประยุกต์ใช้ โดยทดสอบการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลูว่าสามารถเร่งปฏิกิริยาได้หรือไม่ เนื่องจากว่าสีย้อมเมทิลีนบลูเป็นสีย้อมในกลุ่มของอะโซ ซึ่งอนุภาคทองคำนาโนสามารถเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเกิดรีดักชันได้ โดยนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับชุดทดลอง วัตถุประสงค์โดยคำนวณเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ในการย่อยสลายสีย้อม

### วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้รา *Aspergillus niger*
2. เพื่อนำเอาอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้จากกระบวนการทางชีวภาพมาประยุกต์ใช้ในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการกำจัดสีย้อมเมทิลีนบลู

## บทที่ 2

### เครื่องมือ วัสดุ เคมีภัณฑ์

#### 2.1. เครื่องมือ วัสดุ และเคมีภัณฑ์

##### เครื่องมือ

1. กรวยกรองแก้ว
2. กระบอกตวงปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ 500 มิลลิลิตร
3. แท่งแก้ว spreader
4. ขวด Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ของบริษัท ISO Laborgerate GmbH ประเทศเยอรมัน
5. ขวดใส่สารเคมี ขนาด 100, 500 และ 1000 มิลลิลิตร ของบริษัท DWK Life Science ประเทศเยอรมัน
6. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น INNOVA 4330 ของบริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. เครื่องชั่งหยاب แบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น PG 2002-s ของบริษัท Melter Toledo ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
8. เครื่องชั่งหยابขนาดเล็ก ของบริษัท Camry
9. เครื่องอบฆ่าเชื้อขนาดเล็ก (Autoclave) รุ่น ES-215 ของบริษัท TOMY Seiko ประเทศญี่ปุ่น
10. เครื่องอบฆ่าเชื้อขนาดใหญ่ (Autoclave) รุ่น ES-315 ของบริษัท TOMY Seiko ประเทศญี่ปุ่น
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารตกตะกอนขนาดเล็ก microcentrifuge (spin down) รุ่น KUBOTA 3700 ของบริษัท KUBOTA ประเทศญี่ปุ่น
12. เครื่องทำความร้อนชนิดตั้งโต๊ะ (heat plate) รุ่น MS-H280-Pro ของบริษัท Scilogex ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. เครื่องนับจำนวนเซลล์ (Hemocytometer) ของบริษัท LW Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscopy) รุ่น CH30RF200 ของบริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น

15. เครื่องนาโนดรอป (NanoDrop spectrophotometer) รุ่น Nanodrop 2000c ของบริษัท Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
16. ตู้ชีวนิรภัย (Biosafety cabinet) ของบริษัท LabMicrotech ประเทศไทย
17. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U71V ของบริษัท Sanyo Electric Co. ประเทศญี่ปุ่น
18. ตู้อบแห้ง (Hot air oven) ของบริษัท Contherm Digital Series
19. ไมโครปิเปตต์ ปริมาตร 10 100 และ 1000 ไมโครลิตร ของบริษัท Capp Bravo ประเทศเยอรมัน
20. อุปกรณ์นับจำนวนเซลล์ (Hand tally counter) ของบริษัท GOGO for digital ประเทศจีน
21. Automatic pipette ของบริษัท DLAB Levo plus
22. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น K-550 GE ของบริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
23. เครื่องเขย่าสารใช้ความถี่สูง (Ultrasonic sonicator) ของบริษัท Elma ประเทศเยอรมัน

#### วัสดุ

1. จานเพาะเชื้อพลาสติก (plastic plate) ของบริษัท Bioscan
2. ทิปขนาดเล็ก (pipette tip) ปริมาตร 10 100 และ 1000 ไมโครลิตร ของบริษัท Kirgen
3. หลอดปั่นเหวี่ยง (conical tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร ของบริษัท Thermo Scientific
4. Microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ของบริษัท Kirgen
5. กระดาษกรอง เบอร์ 1 (Whatman No.1) ของบริษัท GE Healthcare
6. ผ้าก๊อซ
7. ปิเปตพลาสติก (plastic pipette) ของบริษัท Volac
8. ฟิวเตอร์ขนาด 0.2 ไมครอน (filter) ของบริษัท GE Healthcare
9. หลอดฉีดยา 5 มิลลิลิตร (syring) ของบริษัท Nipro ประเทศไทย

#### เคมีภัณฑ์

1. 85% กลีเซอรอล (85% glycerol) ของบริษัท Himedia
2. ผงอาหารเลี้ยงเชื้อราสำเร็จรูปโปเตโต้เดร็กซ์โตส (potato dextrose agar) ของบริษัท Himedia

3. ผงวุ้น (agar) ของบริษัท Himedia
4. Tween-20 ของบริษัท Life science
5. โกลคโลไรด์ (Gold chloride, H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>)
6. สีย้อมเมทิลีนบลู (Methylene blue dye)
7. กรดแอสซิติค (Acetic acid)

## น้ำ

1. น้ำสำหรับเตรียม cell free filtrate คือ น้ำบริสุทธิ์ชนิดที่ 1 (purified water type I)
2. น้ำสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ น้ำบริสุทธิ์ชนิดที่ 2 (purified water type II)

## อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ขนาดและรูปร่าง

1. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy) รุ่น JEM-2100 ของบริษัท Jeol ประเทศญี่ปุ่น เครื่องมือจากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. เครื่องมือวัดขนาดด้วยแสงตกกระทบ (Dynamic light scatter) ของบริษัท Malvern Instruments ประเทศอังกฤษ เครื่องมือจากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## เชื้อรา

เชื้อราที่ใช้ในการทดลองนี้ได้รับจาก MSCU Microbial Culture Collection ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นเชื้อราที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน ได้แก่

1. *Aspergillus niger* MSCU 0361  
 Kingdom Fungi  
 Division Ascomycota  
 Class Eurotiomycetes  
 Order Trichocomaceae  
 Genus *Aspergillus*  
 Species *Aspergillus niger*



## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการทดลอง

#### วิธีการดำเนินงาน

#### 3.1. การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน

##### 3.1.1. การเตรียมหัวเชื้อสำหรับสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน

นำเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์ MSCU0361 ที่ถูกเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำมาเพาะเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 72-96 ชั่วโมง หรือเป็นเวลา 3-4 วัน เมื่อเชื้อเจริญเติบโตเต็มที่จะมีลักษณะของโคโลนีเป็นสีเขียวขี้ม้าและมีการสร้างสปอร์สีดำ

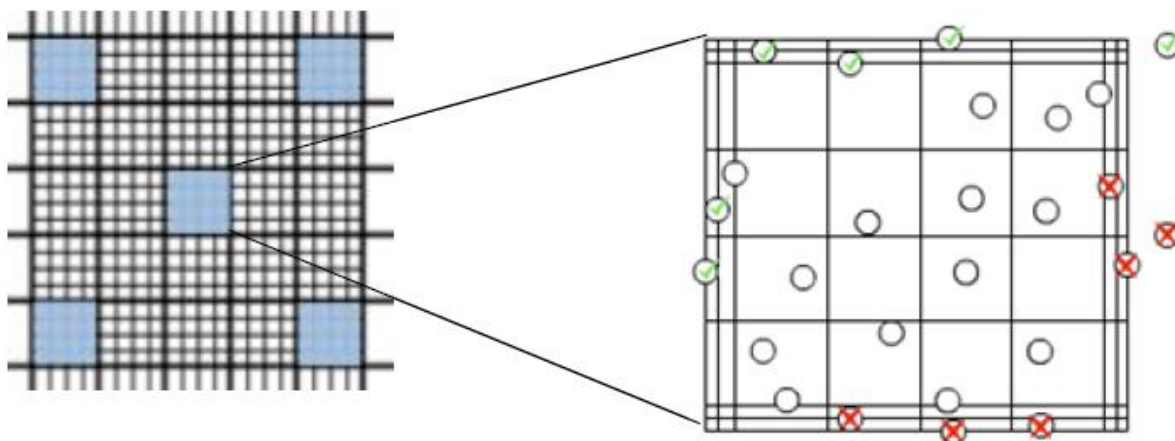
##### 3.1.2. การเก็บสปอร์และนับจำนวนสปอร์

หลังจากเชื้อรา *A. niger* เจริญเติบโตเต็มทีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วทำการดูด 0.2% Tween20 ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร 5 ครั้ง ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีราเจริญอยู่และต้องทำการเปลี่ยน pipette tips ทุกครั้ง จากนั้นใช้แท่ง spreader ที่ทำการฆ่าเชื้อด้วย 95% ethanol เกือบๆ เพื่อขูดเอาสปอร์ของราให้หลุดออกและผสมกับ 0.2% Tween20 แล้วดูดเอาสารละลายส่วนนี้กรองผ่านผ้าก๊อชที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วพับ 2 ทบ วางบนหลอดกันแหลม ทำการกรองสปอร์ของ *A. niger* โดยส่วนเส้นใยของราจะติดอยู่บริเวณผ้าก๊อชและส่วนของสปอร์ราจะถูกกรองผ่านผ้าก๊อชลงไป จากนั้นทำการชะด้วย 0.2% Tween20 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เพื่อล้างสปอร์ที่อาจจะติดอยู่บนผ้าก๊อชลงไป ทำการเจือจางสปอร์ด้วย 0.2% Tween20 ในอัตราส่วนของ spore: 0.2% Tween20 เป็น 1:5 ใส่ในหลอด microcentrifuge จากนั้นจะนำไปนับจำนวนสปอร์โดยใช้ hemocytometer โดยดูดสารละลายจาก microcentrifuge ปริมาตร 10 ไมโครลิตรในแต่ละฝั่ง ปล่อยให้สารละลายไหลผ่านเข้าไปในช่องว่างที่มีเส้นตารางอยู่โดยที่มีกระจกปิดสไลด์ปิดอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเข้าไปด้านในเพราะอาจจะส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในการนับได้ การนับสปอร์จะมองผ่านกล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยาย 400 เท่า จะทำการนับ 5 ช่องใหญ่จากทั้งหมด 25 ช่องเท่านั้น ดังรูปที่ 3.1 และทำซ้ำเดิมกับอีกด้านหนึ่งแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{จำนวนสปอร์ (spores/ml)} = df \times n \times 5 \times 10^4$$

โดยที่ df หมายถึง ค่า dilution factor

n หมายถึง จำนวนค่าเฉลี่ยสปอร์ที่ทำการนับได้



รูปที่ 3.1. วิธีการนับสปอร์ของรา *A. niger* ด้วย Hemocytometer

ที่มา : The Methods and Math of Yeast Counting - Colorado Brewers Guild (coloradobeer.org)

หมายเหตุ: ขั้นตอนในการทำ stock culture ของรา *A. niger*

เมื่อได้สปอร์ของรา *A. niger* จากการกรองด้วยการทำขั้นตอนที่ 3.1.1. และ 3.1.2. จนเสร็จสิ้น จะทำการดูสปอร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับ 20% กลีเซอรอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด cryotube และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อทำเป็น stock culture

### 3.1.3. ขั้นตอนการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อรา (fungal filtrate)

ดูสปอร์จากหลอดกั้นแหลมที่ทำการกรองไว้ ปริมาตรที่คำนวณได้ โดยให้มีจำนวนสปอร์อยู่เป็น  $10^6$  สปอร์ ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตรที่มี potato dextrose broth (PDB) อยู่ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการบ่มในเครื่องบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รอบเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 4 วัน หลังจากนั้นจะได้ส่วนของชีวมวลเชื้อรา (fungal biomass) นำมากรองโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อทำการแยกส่วนของชีวมวลเชื้อราออกจาก อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB จากนั้นทำการชะล้างส่วนของชีวมวลเชื้อราด้วยน้ำปราศจากเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 3 ครั้ง เพื่อชะล้างส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อาจจะติดอยู่กับชีวมวลเชื้อราออกจนน้ำถูกกรองลงไปหมด จากนั้นทำการชั่งชีวมวลเชื้อรา 30 กรัม ใส่ลงไปขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำปราศจากเชื้ออยู่ 60 มิลลิลิตร โดนมียอดตราส่วนของชีวมวลเชื้อรา กับ น้ำปราศจากเชื้อเป็น 1:2 ทำการบ่มในเครื่องบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รอบเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 4 วัน ซึ่งหลังจากครบระยะเวลา 4 วันแล้วจะนำชีวมวลเชื้อรา มากรองออกโดยใช้กระดาษ Whatman No.1 เพื่อเก็บเอาส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อรา ซึ่งเป็นส่วนที่รามีการหลั่งสาร

ต่างๆที่สำคัญในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนออกมา เก็บส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อเอาไว้เพื่อทำการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนต่อไป

### 3.1.4. ขั้นตอนในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน

จะแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ชุดควบคุมที่ 1 (control 1) ชุดควบคุมที่ 2 (control 2) และ ส่วนชุดการทดลอง (experiment) ซึ่งเป็นส่วนที่เกิดการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน โดยที่

3.1.4.1. ชุดควบคุมที่ 1 มีการเติมสารละลายต่างๆ ดังนี้ acetate buffer pH 4.7 ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตร, น้ำปราศจากเชื้อ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และน้ำเลี้ยงเชื้อรา ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตร ผสมกันในหลอดทดลอง

3.1.4.2. ชุดควบคุมที่ 2 มีสารละลายต่างๆ ดังนี้ acetate buffer pH 4.7 ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตร,  $\text{HAuCl}_4$  ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และ น้ำปราศจากเชื้อ ปริมาตร 2.25 ไมโครลิตร ผสมกันในหลอดทดลอง

3.1.4.3. ชุดการทดลองมีสารละลายต่างๆ ดังนี้  $\text{HAuCl}_4$  ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร, acetate buffer pH 4.7 ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตร และน้ำเลี้ยงเชื้อรา ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตร ผสมกันลงในหลอดทดลอง ซึ่งปริมาตรทั้งหมดของทั้ง 3 หลอด มีปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำทั้ง 3 หลอดเก็บไว้ในที่มืดโดยใช้กระดาษฟอยล์ห่อหุ้มส่วนหลอดทดลองเอาไว้ สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเป็นระยะเวลา 60-90 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ทั้ง 3 หลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง UV-visible spectrophotometer และทำการเตรียมตัวอย่างอนุภาคทองคำนาโนเพื่อนำไปทำ Zeta sizer, Zeta potential และ Transmission electron microscopy (TEM)

### 3.1.5. ขั้นตอนการแยกอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา

นำอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้จาก 3.1.4.3. มาใส่ลงในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที ทำซ้ำจนกว่าสารละลายจะใสและอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้จะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด microtube จนหมด จากนั้นค่อยๆทำการดูดสารละลายส่วนใสที่อยู่ด้านบนออกให้ได้มากที่สุดและทำอย่างระมัดระวังเพื่อไม่ให้ตะกอนของอนุภาคทองคำนาโนที่อยู่ก้นหลอด microtube เกิดการฟุ้งกระจาย จากนั้นทำการระเหยในส่วนของน้ำที่หลงเหลืออยู่โดยมีการเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ จากนั้นนำอนุภาคทองคำนาโนไปชั่งใน

เครื่องชั่งละเอียดเพื่อวัดน้ำหนักในหน่วยมิลลิกรัม และจากนั้นทำการเติมน้ำที่ปราศจากเชื้อเพื่อปรับให้มีความเข้มข้น

### 3.2. การวิเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน

#### 3.2.1. การวัดค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำนาโนด้วย UV-visible spectrophotometry

นำสารละลายอนุภาคทองคำนาโนที่ทำการสังเคราะห์ขึ้นได้จากข้อที่ 3.1.4.1.-3.1.4.3. มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-visible spectrometry ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 200-800 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง NanoDrop2000 ซึ่งเป็นวิธีพื้นฐานในการยืนยันว่าภายในสารละลายมีการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนเกิดขึ้น โดยอนุภาคทองคำนาโนจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ช่วงความยาวคลื่น 520-560 นาโนเมตร โดยขั้นตอนในการวัดค่าการดูดกลืนแสงจะใช้ Blank เป็นน้ำกลั่น จากนั้นจึงทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้จากข้อที่ 3.1.4.1.-3.1.4.3. นำมาเปรียบเทียบกับ

#### 3.2.2. การเตรียมตัวอย่างอนุภาคทองคำนาโนเพื่อทำ Dynamic Light Scattering (DLS) และ Zeta Potential

นำอนุภาคทองคำนาโนที่ทำการสังเคราะห์ขึ้นได้เสร็จสิ้นแล้ว มาเจือจางโดยใช้อัตราส่วนของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้ต่อน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็น 1:9 (อนุภาคทองคำนาโนปริมาตร 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร) จากนั้นทำการผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) และส่งตัวอย่างที่ทำการเตรียมได้ไปวัดผล dynamic light scattering (DLS) และ zeta potential ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 3.2.3. การเตรียมตัวอย่างอนุภาคทองคำนาโนเพื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy: TEM)

นำอนุภาคทองคำนาโนที่ทำการสังเคราะห์ขึ้นได้เสร็จสิ้นแล้ว มาเจือจางโดยใช้อัตราส่วนของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้ต่อน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเป็น 1:1 (อนุภาคทองคำนาโน ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร) จากนั้นทำการผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) และส่งตัวอย่างที่ทำการเตรียมได้ไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.3. การศึกษาการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลูของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้จากกระบวนการทางชีวภาพโดยใช้ *A. niger*

#### 3.3.1. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทำการทดลอง

- เตรียมสารละลายอนุภาคทองคำนาโน ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- เตรียมสารละลาย ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์
- เตรียมสารละลายสีเมทิลีนบลู ที่ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์

#### 3.3.2. การย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลูโดยใช้อนุภาคทองคำนาโนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ชุดควบคุม (control) และชุดการทดลอง (experiment) ซึ่งเป็นส่วนที่ทดสอบการย่อยสลายสีย้อม (dye degradation) ในหลอดทดลอง ดังนี้

ชุดควบคุมทำการเตรียมชุดควบคุมโดยทำการผสมสีย้อมเมทิลีนบลู ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร สารละลาย ascorbic acid ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

ชุดการทดลอง จะนำสารละลายอนุภาคทองคำนาโน ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกับสารละลายสีย้อมเมทิลีนบลู ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และสารละลาย ascorbic acid ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยจะมีปริมาตรรวมทั้งหมดเป็น 430 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

#### 3.3.3. การตรวจติดตามการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลูโดยอาศัย UV-visible spectrophotometry

นำสารละลายที่ได้ไปตรวจติดตามผลการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลูของอนุภาคทองคำนาโน โดยใช้ UV-visible spectrophotometer ซึ่งจะนำสารละลายที่ได้จากทั้ง 2 หลอด คือ ชุดควบคุม และชุดทดลอง มาวัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสง โดยที่สีเมทิลีนบลูจะมีช่วงความยาวคลื่นที่จำเพาะอยู่ที่ประมาณ 664 นาโนเมตร ซึ่งขั้นตอนในการวัดค่าการดูดกลืนแสงจะใช้ blank เป็นน้ำที่ปราศจากเชื้อ ทำการจับเวลาวัดผลทุกๆ 10 นาที ดังนี้ 0, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที ตามลำดับ และทำการจดบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดผล จากนั้นนำมาเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลอง โดยทำการสร้างตารางเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลู โดยค่าที่

ได้นี้สามารถคำนวณได้จากค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมเมทิลีนบลูที่ระยะเวลาเริ่มต้นและที่ระยะเวลาต่างๆ  
จากสูตร ดังนี้

$$\% \text{ Degradation} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง MB (เริ่มต้น)} - \text{ค่าการดูดกลืนแสง MB (ระยะเวลา t)}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสง MB (เริ่มต้น)}} \times 100$$

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1. การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

จากการที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. niger* MSCU 0361 ที่ได้จาก Microbial Culture Collection ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง potato dextrose agar (PDA) และทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 4 วัน โดยผู้วิจัยได้ทำการสังเกตลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่า ลักษณะโคโลนีของ *A. niger* MSCU 0361 มีการสร้างสปอร์เกิดขึ้น โดยมีลักษณะเป็นสีดำ หลังจากที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง PDA ครบ 4 วัน ดังแสดงใน รูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *A. niger* MSCU 0361 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA

#### 4.2. ชีวมวลเชื้อรา (fungal biomass) และน้ำเลี้ยงเชื้อรา(fungal filtrate)

จากการที่ได้ทำการเก็บสปอร์และนำสปอร์ราที่ได้เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว potato dextrose broth (PDB) และทำการบ่มในเครื่องบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รอบเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 4 วัน จะพบว่าลักษณะชีวมวลเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 มีลักษณะเป็นก้อนกลมสีเหลืองในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ดังแสดงใน รูปที่ 4.2 และจากนั้นจะนำเอาชีวมวลเชื้อราที่ได้ไปกรองออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB และเปลี่ยนเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทน โดยจะทำการบ่มในเครื่องบ่มเขย่าที่

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รอบเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 4 วัน เช่นเดิม ซึ่งจะได้ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อออกมา โดยส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อรานี้จะมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลแดงเล็กน้อย ดังแสดงใน รูปที่ 4.3



รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะชีวมวลเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB







รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361







### 4.3. ผลการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน

จากการที่ผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจากหัวข้อที่ 3.1.4.1.-3.1.4.3. พบว่าชุดควบคุมที่ 1 (control 1) และชุดควบคุมที่ 2 (control 2) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเมื่อระยะเวลาผ่านไป 60 นาที ในขณะที่ชุดการทดลอง (experiment) คือ หลอดที่มีการใส่ในส่วนองน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ผสมด้วยสารละลาย acetate buffer ที่ pH 4.7 และสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  ที่ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ โดยทำการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในสภาวะที่เป็นอนุกรมห้อง และเป็นที่มีด จากนั้นทำการสังเกตผลการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายและจับระยะเวลาในการเกิดการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน ผลการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย พบว่า สารละลายมีการเปลี่ยนสีจากสารละลายสีเหลืองใสไปเป็นสารละลายสีม่วงอ่อนเมื่อระยะเวลาผ่านไป 50 นาที และจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสีม่วงที่เข้มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน เมื่อระยะเวลาผ่านไป 70 นาที ดังตารางที่ 4.2 ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นถึงการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของไอออนอนุภาคทองประจุบวก ซึ่งมีการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนเกิดขึ้นภายในสารละลาย

ตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นถึงการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่ระยะเวลาตั้งแต่ 0-70 นาที ตามลำดับ โดยหลอดทดลองที่ 1 (ซ้าย) เป็นชุดควบคุมที่ 1 หลอดทดลองที่ 2 (กลาง) เป็นชุดควบคุมที่ 2 และหลอดทดลองที่ 3 (ขวา) เป็นชุดการทดลองที่มีการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนเกิดขึ้นภายในสารละลาย

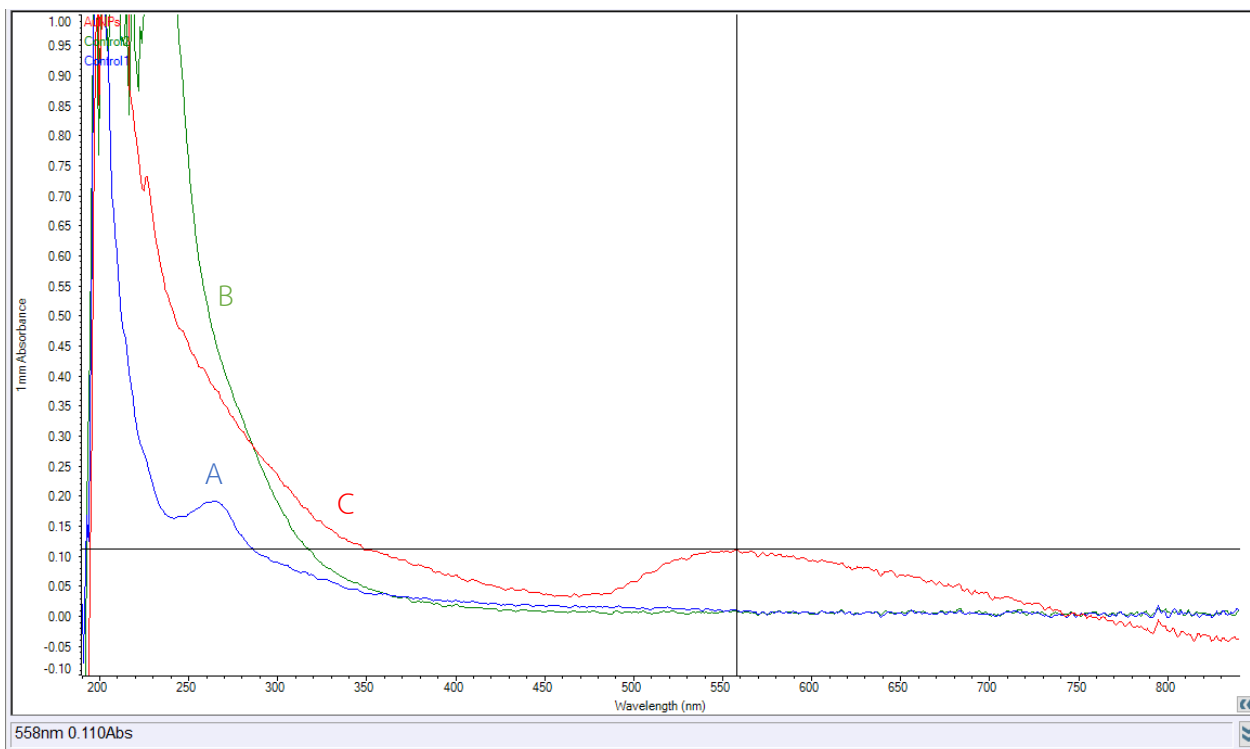
ระยะเวลา (นาที)	0	10	20	30
การเปลี่ยนแปลงสารละลาย				

ระยะเวลา (นาที)	40	50	60	70
การ เปลี่ยนแปลง สารละลาย				

#### 4.4. ผลของค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำนาโน

การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่เกิดขึ้นนอกเหนือจากการสังเคราะห์สารละลายของอนุภาคทองคำนาโนที่เปลี่ยนแปลงแล้วนั้น ยังสามารถทำการวิเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่เกิดขึ้นได้ด้วยการวิเคราะห์จากค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำนาโน โดยจะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำนาโนในช่วงความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer โดยผลการทดลองพบว่าหลอดทดลองทั้งสองที่ใช้เป็นชุดควบคุม ได้แก่ ชุดควบคุมที่ 1 ที่ผสม acetate buffer pH 4.7 น้ำปราศจากเชื้อ และน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 และชุดควบคุมที่ 2 ที่ผสม acetate buffer pH 4.7  $\text{HAuCl}_4$  ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ และน้ำปราศจากเชื้อ ผลการทดลองพบว่า ไม่พบค่าการดูดกลืนแสงในช่วงของการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำนาโน กล่าวคือ ช่วง 520-560 นาโนเมตร โดยในส่วนหลอดทดลองที่เป็นชุดการทดลองที่ผสม  $\text{HAuCl}_4$  ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ acetate buffer pH 4.7 และน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ซึ่งพบการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนเกิดขึ้นในสารละลาย ผลการทดลองพบว่า อนุภาคทองคำนาโนมีช่วงความยาวคลื่นสูงสุดอยู่ที่ 558 นาโนเมตร และมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ 0.110 ดังรูปที่

4.4

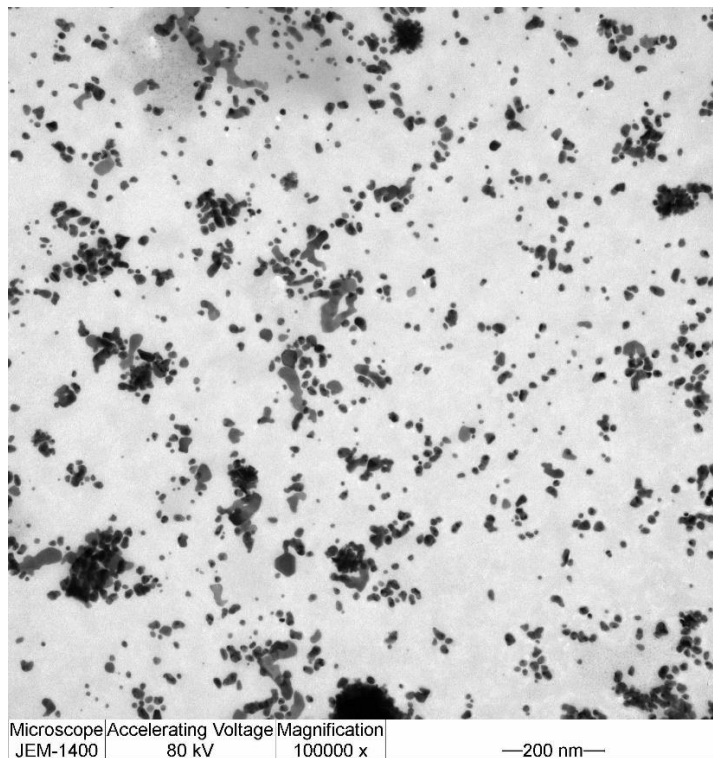


**รูปที่ 4.4** แสดงให้เห็นถึงกราฟค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในหลอดทดลองชุดควบคุมที่ 1 (A), สารละลายในหลอดทดลองชุดควบคุมที่ 2 (B) และ หลอดทดลองชุดการทดลองที่เกิดการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนขึ้นภายในสารละลาย (C)

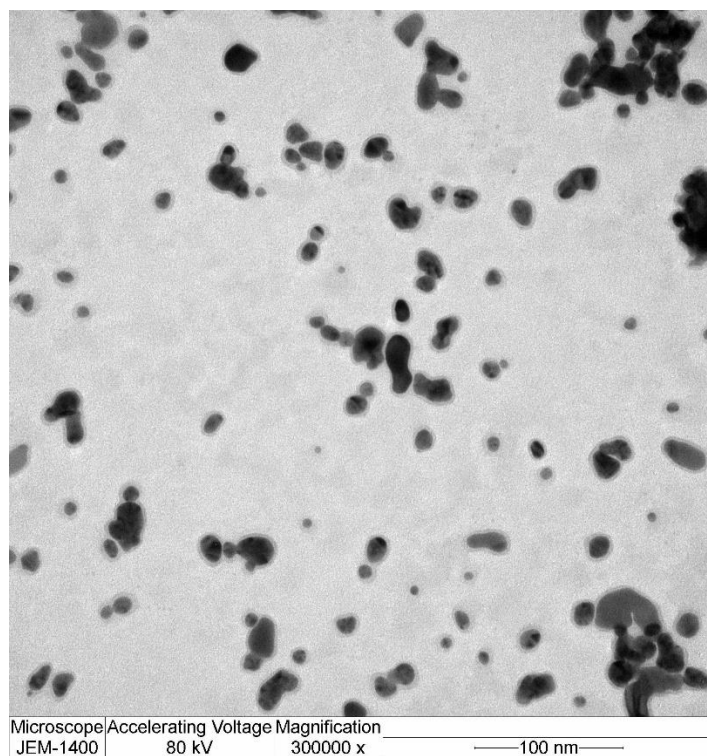
#### 4.5. ผลของการวิเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM)

ผลจากการวิเคราะห์รูปร่างและการกระจายตัวของอนุภาคทองคำนาโนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ที่สังเคราะห์ขึ้นได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ผสมกับ  $\text{HAuCl}_4$  ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ และ acetate buffer pH 4.7 พบว่า ขนาดของอนุภาคทองคำนาโนสารละลายมีการกระจายตัวของขนาดที่หลากหลาย รูปร่างของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้นั้นก็มีรูปร่างที่แตกต่างกันออกไป อย่างเช่น ทรงกลม ทรงกระบอก เป็นต้น อีกทั้งอนุภาคทองคำนาโนเริ่มมีการเกาะกลุ่มกันเป็นบางส่วน ดังรูปที่ 4.5

(A)



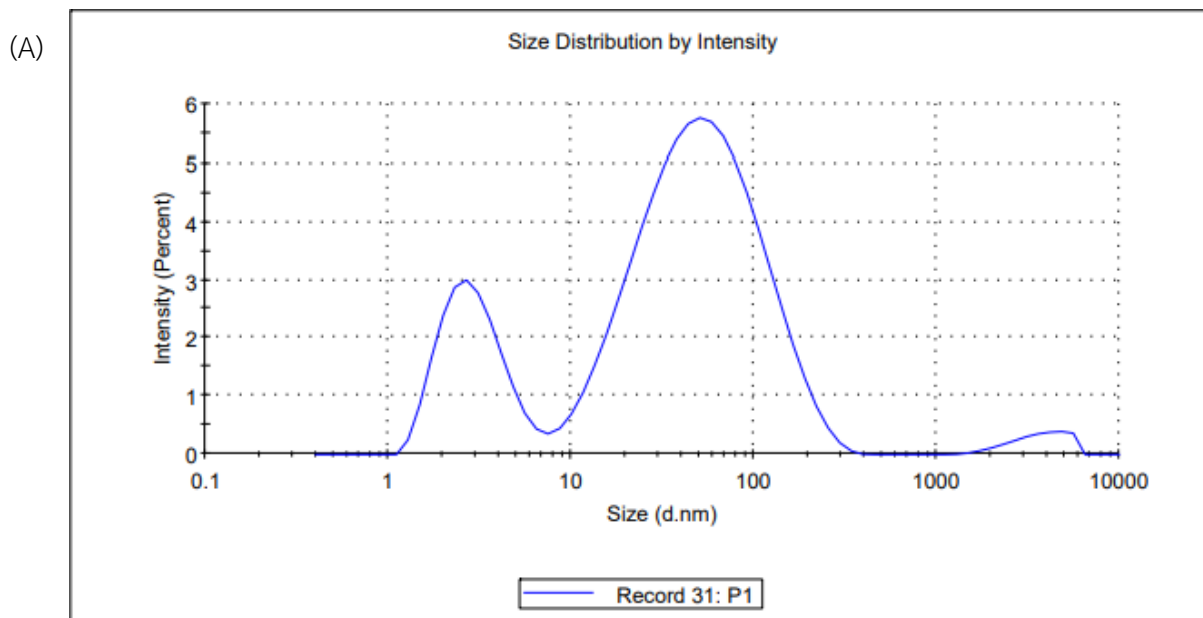
(B)

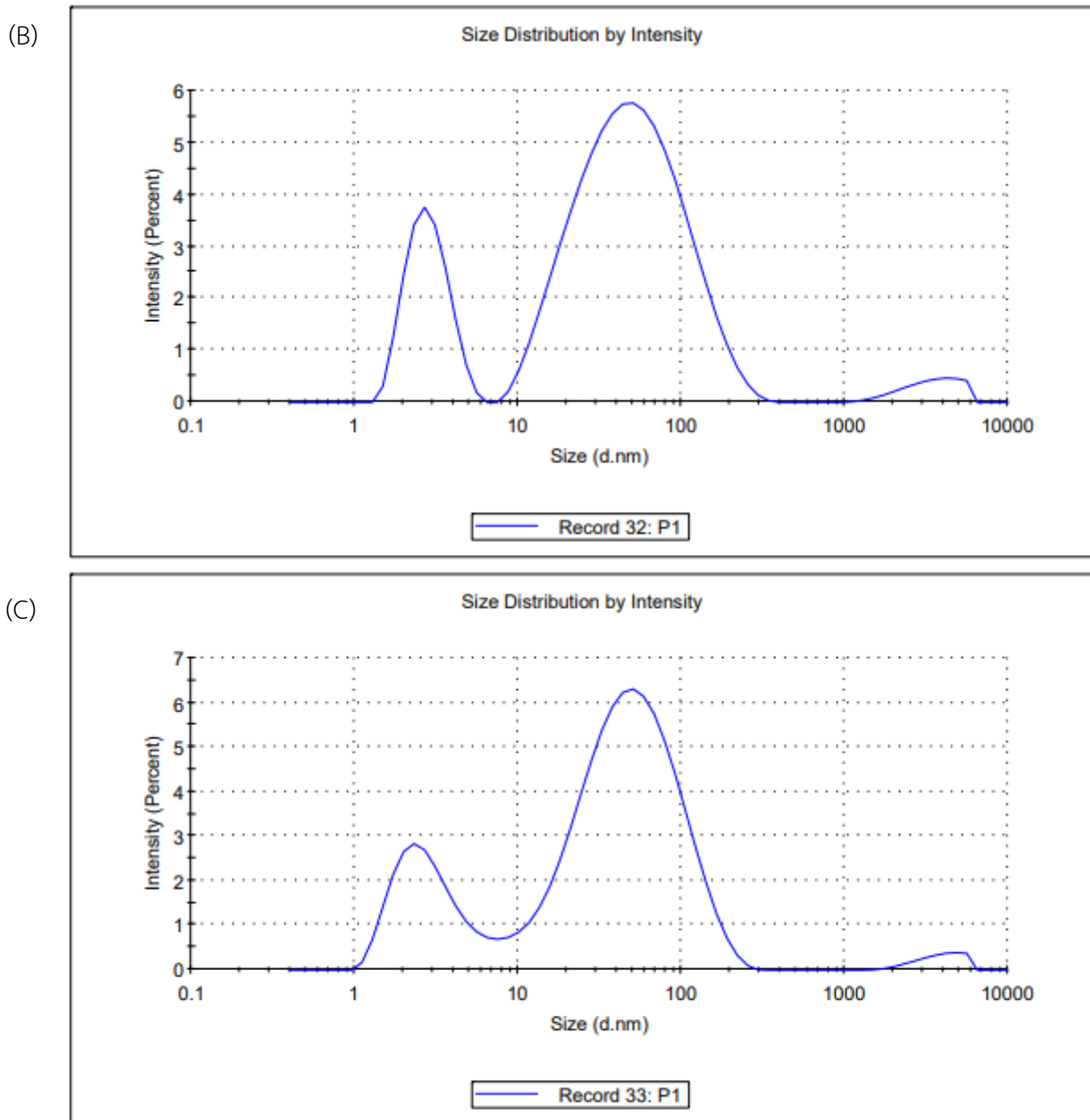


รูปที่ 4.5 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแสดงอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นภายในสารละลายที่กำลังขยาย 100,000X (A) และ ที่กำลังขยาย 300,000X (B)

#### 4.6. ผลการวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี Dynamic Light Scattering (DLS)

ผลการวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคทองคำนาโนที่ได้จากการวิเคราะห์ผลด้วย dynamic light scattering (DLS) ซึ่งเป็นเทคนิคที่วัดการกระเพื่อมของความเข้มแสง เพื่อใช้ในการวัดขนาดของสารตัวอย่างในระดับนาโนเมตร ซึ่งตัวอย่างสารที่มีขนาดระดับนาโนเมตรนี้จะมีการเคลื่อนที่ของอนุภาคตลอดเวลาแบบบราวเนียน (brownian) โดยจากการทดลองนี้ได้นำเอาอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ผสมกับ  $\text{HAuCl}_4$  ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ และ acetate buffer pH 4.7 ที่เตรียมจากขั้นตอนที่ 3.1.1.4.3. มาวิเคราะห์ขนาดด้วยเทคนิค DLS พบว่าขนาดของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีขนาดของอนุภาคทองคำนาโนส่วนมากเฉลี่ยเป็น 60.74 นาโนเมตร และมีค่า polydispersity index (PDI) เฉลี่ยเป็น 0.703 ดังรูปที่ 4.6



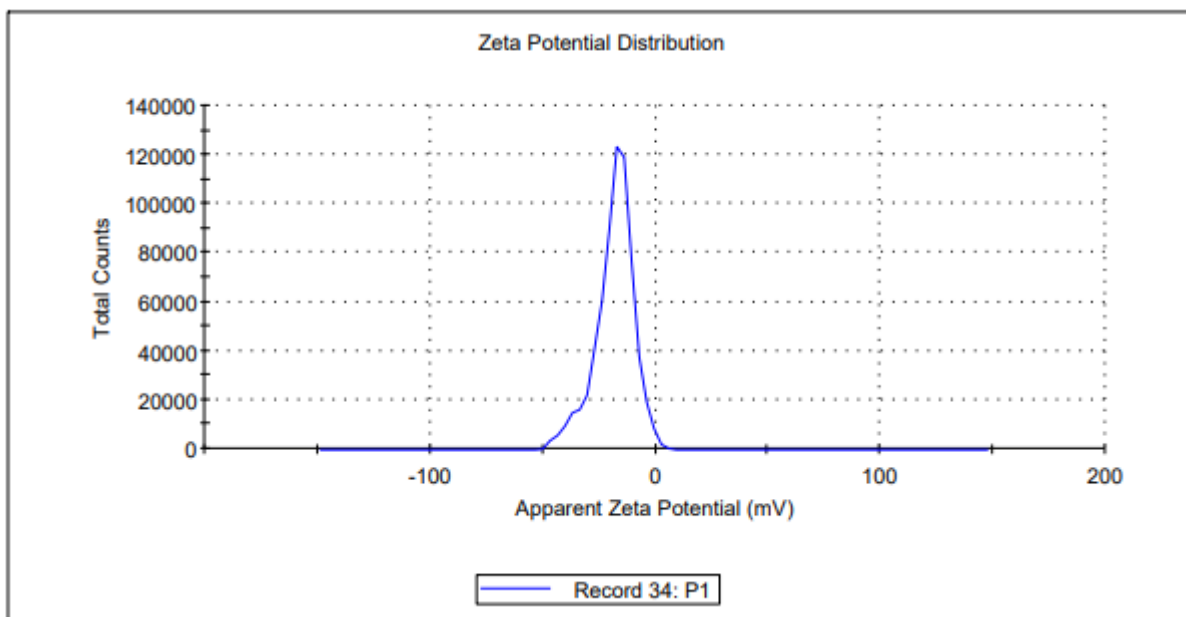


รูปที่ 4.6 แสดงถึงกราฟการกระจายตัวของขนาดอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นโดยทำการวิเคราะห์ผล 3  
ซ้ำ (A) วัดผลรอบที่ 1 (B) วัดผลรอบที่ 2 และ (C) วัดผลรอบที่ 3 และนำค่าที่ได้มาเฉลี่ย

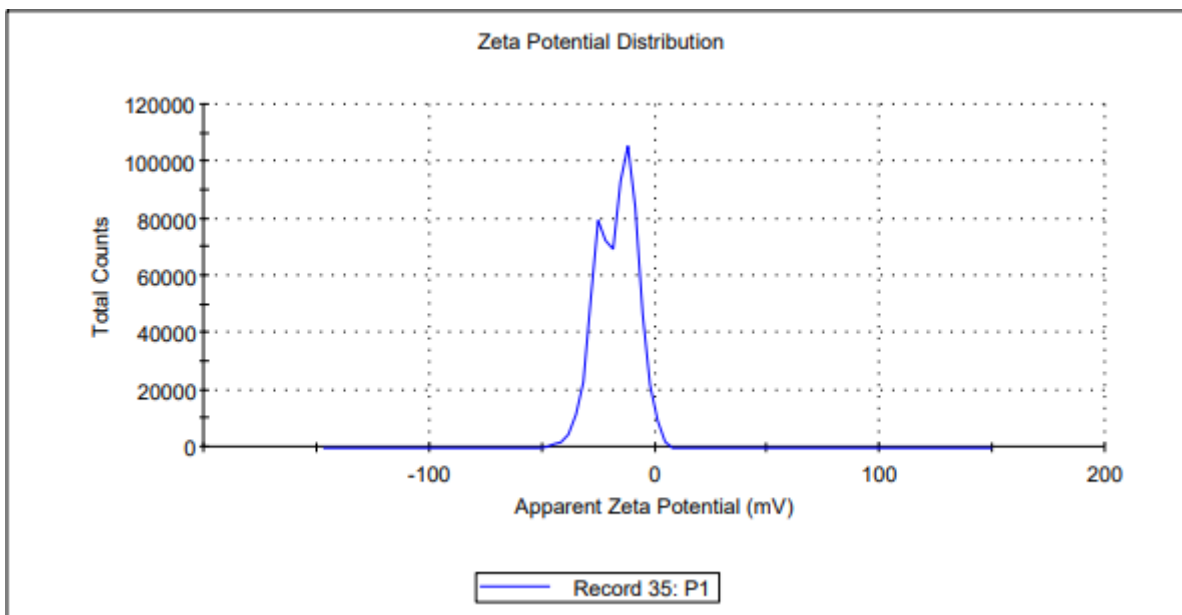
#### 4.7. ผลของการวิเคราะห์ค่าความเสถียรของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ด้วยค่าศักย์ซีต้า (Zeta Potential)

ผลจากการวิเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยค่าศักย์ซีต้า ซึ่งเป็นสิ่งที่บอกถึงความแตกต่างของประจุไฟฟ้าระหว่างชั้นความหนาแน่นของไอออนที่อยู่รอบๆอนุภาคและประจุในของเหลวที่อยู่ล้อมรอบ (มีหน่วยเป็นมิลลิโวลต์) ใช้เพื่อบอกแนวโน้มของการเกาะตัวกันของอนุภาค โดยปกติอนุภาคทองคำนาโนจะมีความเสถียรก็ต่อเมื่อค่าศักย์ซีต้ามีค่าเป็นบวกมากกว่า +20 มิลลิโวลต์ หรือมีค่าที่เป็นลบมากกว่า -20 มิลลิโวลต์ จากผลการทดลองที่ทำการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจากการทดลองนี้ พบว่า อนุภาคทองคำนาโนมีค่าศักย์ซีต้าเฉลี่ยเท่ากับ -17.4 มิลลิโวลต์ ดังรูปที่ 4.7 ซึ่งค่าศักย์ซีต้าที่ได้มีค่าเป็นลบน้อยกว่า -20 มิลลิโวลต์ จากการวิเคราะห์ผลนี้จึงสามารถแปรผลได้ว่า อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้นั้น มีการเกิดการเกาะกลุ่มกันระหว่างอนุภาคทองคำนาโน

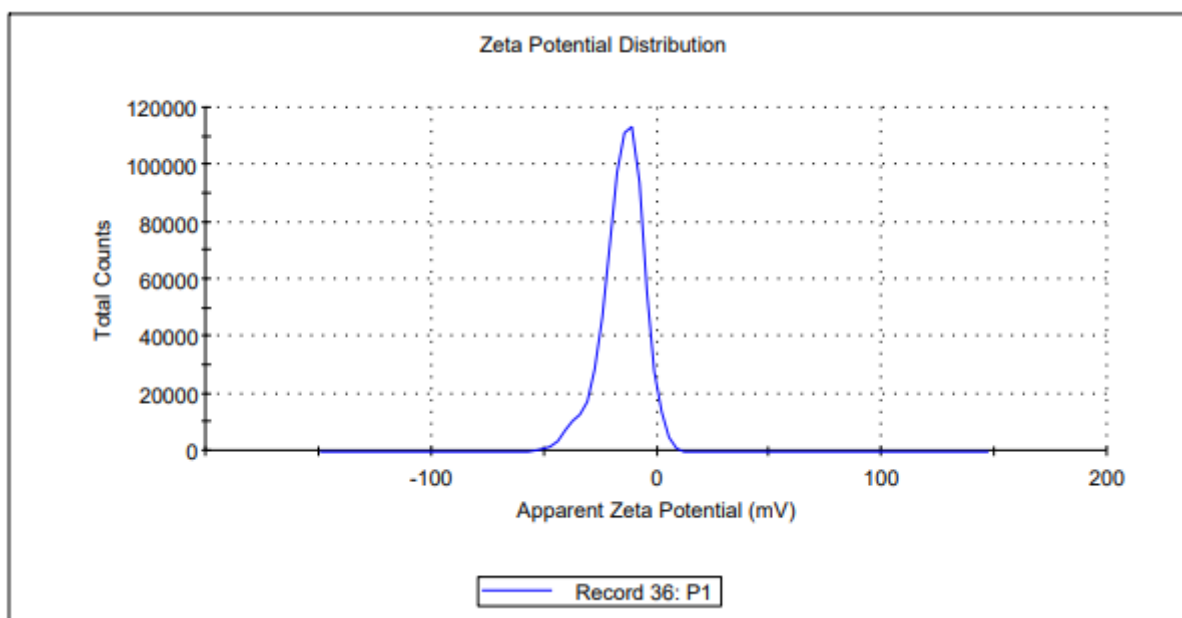
(A)



(B)



(C)



รูปที่ 4.7 แสดงถึงกราฟการวิเคราะห์ค่าความเสถียรของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ด้วยค่าศักย์ซีต้า โดยทำการวิเคราะห์ผล 3 ซ้ำ (A) วัดผลรอบที่ 1 (B) วัดผลรอบที่ 2 และ (C) วัดผลรอบที่ 3 และนำค่าที่ได้มาเฉลี่ย

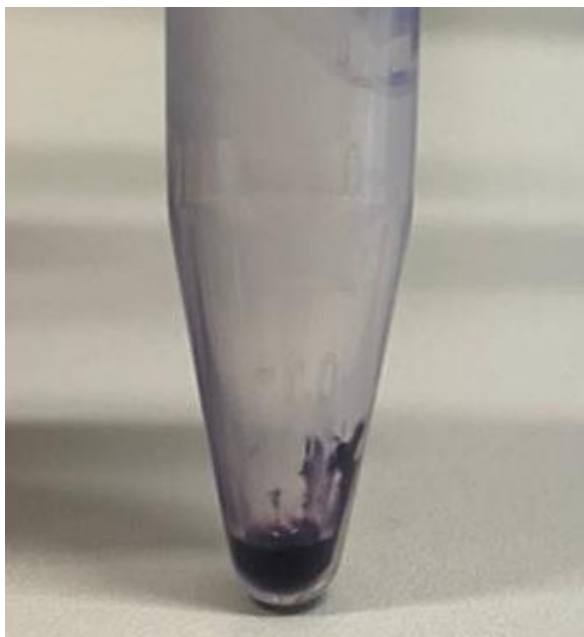


#### 4.8. การปั่นแยกอนุภาคทองคำนาโน

ขั้นตอนของการปั่นแยกอนุภาคทองคำนาโนออกจากส่วนของเหลวที่เป็นน้ำเลี้ยงเชื้อรา โดยในการทดลองนี้จะเริ่มทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที ซึ่งจะสังเกตเห็นตะกอนเล็กๆที่ก้นหลอด มีลักษณะเป็นสีม่วงเข้ม ดังแสดงในรูปที่ 4.8 โดยที่ตะกอนที่แสดงให้เห็นเหล่านี้เป็นตะกอนของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้จากการทดลอง เมื่อทำการดูดส่วนใสที่เป็นส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อราออก จะนำเอาอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้ไปประหยให้แห้ง ในตู้ชีวนิรภัย (biosafety cabinet) เพื่อที่จะทำให้ของเหลวใสที่ดูไม่หมดและเหลืออยู่ในหลอดออกหมด เป็นระยะเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.9 จากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของอนุภาคทองคำนาโนให้เป็นความเข้มข้น 50, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.8 แสดงให้เห็นอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ตกตะกอนที่ก้นหลอดหลังจากทำการปั่นเหวี่ยง



รูปที่ 4.9 แสดงให้เห็นอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้หลังจากทำการระเหยแห้งเอาน้ำออก

#### 4.10. ผลการเร่งปฏิกิริยาการรีดักชันในการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลูด้วยอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จาก *A. niger* MSCU 0361

จากผลการศึกษาการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้จาก *A. niger* MSCU 0361 สำหรับการนำมาประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลู ซึ่งตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยการสังเกตสารละลายสีย้อมเมทิลีนบลูที่เปลี่ยนแปลงไป และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 664 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer เป็นระยะเวลาทั้งหมด 60 นาที ดังตารางที่ 4.3 เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 664 นาโนเมตร เป็นค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมเมทิลีนบลู จากนั้นนำเอาค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละช่วงเวลามาคำนวณเปอร์เซ็นต์ในการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลู และนำมาสร้างกราฟเปอร์เซ็นต์ในการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลูเปรียบเทียบกับระหว่างชุดควบคุมที่ไม่ใส่อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้กับชุดทดลองที่มีการใส่อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ลงไปในการละลายเพื่อเร่งให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายสีย้อม โดยผลการทดลองเมื่อใช้อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์ในการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลูเป็น 34.21, 49.21, 62.04, 70.06, 73.82, 76.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีอนุภาคทองคำนาโน พบว่าเปอร์เซ็นต์ในการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลูเป็น 33.06, 55.22, 67.74, 77.44, 82.15, 85.39 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 60 นาที จากนั้นเมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นเป็นความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์ในการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลูเป็น 18.14, 36.55, 46.86, 54.60, 57.61, 60.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีอนุภาคทองคำนาโน

พบว่าเปอร์เซ็นต์ในการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลูเป็น 28.62, 42.33, 58.43, 63.97, 68.06, 69.34 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 60 นาที ซึ่งจากผลการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำนาโนที่แตกต่างกัน ได้แก่ ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำนาโนเป็น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าในชุดทดลองสามารถเกิดการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลูได้จริง แต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนั้นไม่ได้ทำให้เกิดการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลูได้รวดเร็วขึ้น เมื่อทำการเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่อนุภาคทองคำนาโน ที่พบว่าเกิดปฏิกิริยาในการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลูได้ดีกว่า เมื่อดูจากเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายสีย้อม ดังรูปที่ 4.10

**ตารางที่ 4.3** แสดงค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงของสีย้อมเมทิลีนบลูที่เปลี่ยนแปลงไปเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลอง ภายในระยะเวลา 60 นาที โดยที่ (A) อนุภาคทองคำนาโนความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (B) อนุภาคทองคำนาโนความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

(A)

ค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 664 nm

(ค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงของสีย้อมเมทิลีนบลู)

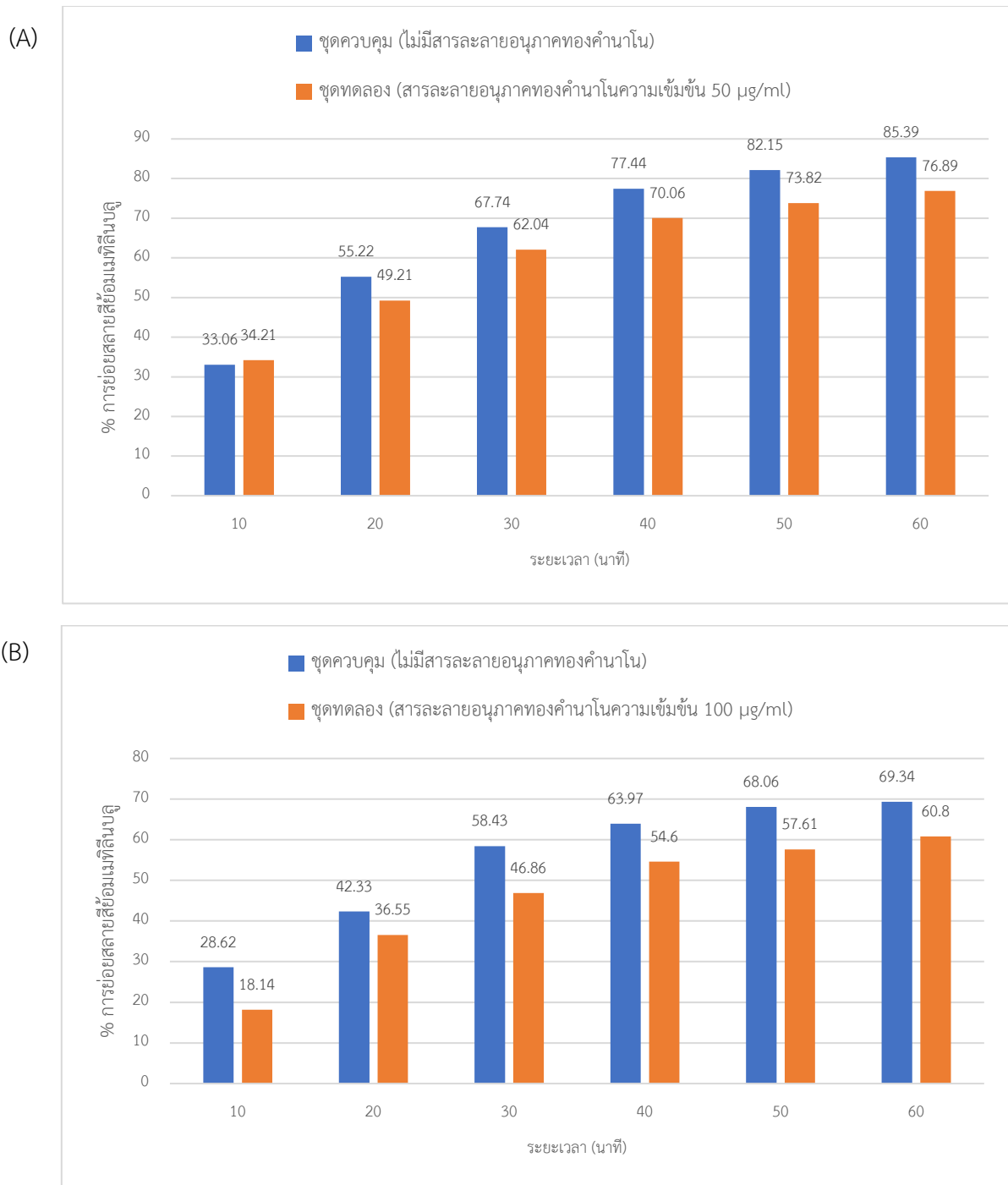
เวลา (นาที)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
0	1.485	1.333
10	0.967	0.871
20	0.665	0.677
30	0.479	0.506
40	0.335	0.399
50	0.265	0.349
60	0.217	0.308

(B)

ค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 664 nm

(ค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงของสีย้อมเมทิลีนบลู)

เวลา (นาที)	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
0	1.174	1.097
10	0.838	0.898
20	0.677	0.696
30	0.488	0.583
40	0.423	0.498
50	0.375	0.465
60	0.360	0.430



รูปที่ 4.10 แสดงให้เห็นถึงเปอร์เซ็นต์ของการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลูในสภาวะที่มีอนุภาคทองคำนาโนภายในระยะเวลา 60 นาที โดยที่ (A) อนุภาคทองคำนาโนความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (B) อนุภาคทองคำนาโนความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

## บทที่ 5

### สรุป วิเคราะห์ผลการทดลอง และแผนการทดลองในอนาคต

ในงานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการทำการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน (AuNPs) ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (biosynthesis) จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ซึ่งได้มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ว่าการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนนั้น เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ที่หลั่งออกมาจากนอกเซลล์และสารทุติยภูมิที่มาจากเชื้อรา ซึ่งสารต่างๆเหล่านี้มีความสามารถเป็นสารที่ทำให้อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้มีความเสถียร อีกทั้งยังเป็นตัวรีดิวซ์ที่ทำให้เกิดกระบวนการรีดักชัน โดยการเปลี่ยนไอออนอนุภาคทองประจุบวก ( $Au^{3+}$ : gold ion) ภายในสารละลายเกลือโกลด์คลอไรด์ (gold chloride,  $HAuCl_4$ ) ให้กลายเป็นอนุภาคทองคำนาโน ( $Au^0$ : AuNPs) ได้ ซึ่งจากงานวิจัยนี้เป็นวิจัยโดยทำการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพจากเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 เมื่อกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนเสร็จสิ้นแล้วนั้น จึงนำอนุภาคทองคำนาโนมาศึกษารูปร่าง ลักษณะ ขนาด ความเสถียร และความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลู จากผลทดลองพบว่างานวิจัยนี้ สามารถสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนได้ โดยเมื่อทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 และ acetate buffer pH 4.7 เมื่อมีการเติมสารละลาย  $HAuCl_4$  ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ลงไป ในสารละลาย ผลจากการสังเกตพบว่า จากเดิมที่สารละลายมีสีเหลืองใสจะถูกเปลี่ยนเป็นสารละลายที่มีสีม่วงเข้ม และจากนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายของอนุภาคทองคำนาโนที่ทำการสังเคราะห์ขึ้นได้ด้วย UV-visible spectrophotometer โดยอนุภาคทองคำนาโนจะมีช่วงความยาวคลื่นอยู่ที่ 520-560 นาโนเมตร ในสารละลาย (Shi et al, 2015) สาเหตุที่อนุภาคทองคำนาโนมีความสามารถในการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นดังที่กล่าวมานี้ เนื่องจากว่าอนุภาคทองคำนาโนมีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร จึงส่งผลทำให้อนุภาคทองคำนาโนมีคุณสมบัติในการเป็น surface plasmon resonance ซึ่งเป็นคุณสมบัติเชิงแสง เมื่ออนุภาคทองคำนาโนสามารถดูดกลืนแสงได้โดยพลังงานแสงดังกล่าวจะทำให้เกิดการกระตุ้นอิเล็กตรอนที่อยู่บนพื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโน ซึ่งเมื่ออนุภาคทองคำนาโนดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นหนึ่งๆ จะทำให้แสงที่ปรากฏออกมาเป็นสีที่แตกต่างกัน (Otto, 1968) โดยพลังงานแสงหรือความยาวของคลื่นแสงที่อนุภาคทองคำนาโนดูดกลืนไปนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของโลหะ รูปร่างและขนาดของอนุภาคทองคำนาโน (Srinath et al, 2015) จากการทดลองพบว่า เมื่อมีการเติมสารละลาย  $HAuCl_4$  ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ลงไป ในสารละลายน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 และ acetate buffer pH 4.7 จะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายไปเป็นสีม่วงเข้มภายในระยะเวลา 70 นาที และมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ 0.110 ที่ช่วงความยาวคลื่น 558 นาโนเมตร ซึ่งเป็นการยืนยันว่า ภายในสารละลายเกิดการก่อตัวของอนุภาคทองคำนาโนเกิดขึ้น โดยอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้นี้มีช่วงความยาวคลื่นอยู่ที่ 558 นาโนเมตร เนื่องจากว่า ภายใน

สารละลายอนุภาคทองคำนาโนเกิดการดูดกลืนแสงสีเหลืองจึงทำให้มองเห็นสารละลายอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้นั้นเป็นสารละลายสีม่วงเข้ม

สำหรับการวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope;TEM) dynamic light scattering (DLS) และค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) พบว่าขนาดและรูปร่างของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้มีความแตกต่างกันไป อีกทั้งยังเกิดการเกาะกลุ่มกันเล็กน้อย

โดยผลการทดลองจาก TEM แสดงให้เห็นถึงรูปร่างของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้ภายในสารละลาย มีการกระจายตัวกันของรูปร่างของอนุภาคทองคำนาโนที่หลากหลายขนาด (polydisperse) โดยอนุภาคทองคำนาโนที่พบมีรูปร่างที่สังเคราะห์ขึ้นได้เป็นทรงกลม (รูปทรงหลัก) และทรงกระบอก เป็นต้น ซึ่งการควบคุมขนาดและอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์จากกระบวนการทางชีวภาพนั้นเป็นขั้นตอนที่ควบคุมได้ยาก ดังนั้น จึงต้องทำการทดลองเพื่อศึกษาถึงปัจจัยเกี่ยวข้องที่ส่งผลทำให้ขนาดและรูปร่างของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้จากกระบวนการทางชีวภาพมีความแตกต่างกัน ได้แก่ ความเข้มข้นของ  $\text{HAuCl}_4$  ต้องมีความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์จุลินทรีย์ในแต่ละตัว ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดนั้นจะมีค่าความเข้มข้นของ  $\text{HAuCl}_4$  ที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่แตกต่างกัน และการที่ทำให้อนุภาคทองคำนาโนมีขนาดใหญ่ขึ้น เกิดมาจากสารชีวโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นตัวล้อมรอบและทำให้อนุภาคทองคำนาโนมีความเสถียรนั้น ไม่มีคุณสมบัติในการล้อมรอบอนุภาคทองคำนาโนได้ จึงส่งผลทำให้อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้เกิดการเกาะกลุ่มกัน (Kumari et al, 2015) นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารชีวโมเลกุลที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนยังส่งผลให้อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นมีรูปร่างที่แตกต่างกัน เช่น ทรงกลม สามเหลี่ยม และหกเหลี่ยม (Kreibig et al,1985, Sujitha et al, 2013) และการที่มีความเข้มข้นของสารชีวโมเลกุลสูงขึ้น หมายความว่า จะมีปริมาณของสารชีวโมเลกุลที่สามารถเกิดการรัดกั้นของไอออนอนุภาคทองประจุบวกได้มากขึ้น ทำให้การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนเกิดได้เร็ว และอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จะมีขนาดเล็ก โดยปัจจัยเหล่านี้จะส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำนาโนจากการมีคุณสมบัติเชิงแสง surface plasmon resonance (Haiss et al, 2007) และผลของ pH ที่เกี่ยวข้องกับขนาด รูปร่างและความเสถียรในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน โดย pH จะต้องมีความเหมาะสมกับอัตราส่วนความเข้มข้นของ  $\text{HAuCl}_4$  ที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน โดยมีงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจากจุลินทรีย์จะมีค่า pH อยู่ในช่วง 2-6 (Joerger et al, 2000) ซึ่งถ้ามีการเปลี่ยนแปลงค่า pH ไป จะส่งผลต่อขนาดและรูปร่างของอนุภาคทองคำนาโนได้ (Mukherjee et al, 2001) โดยช่วง pH ที่เหมาะสมที่ทำให้เอนไซม์ของ *A. niger* ทำงานได้ดีจะอยู่ในช่วง pH ที่ 4-6.5 (Zia et al, 2007) จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ใช้ acetate buffer pH 4.7 มาใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในการทดลอง

ทั้งนี้ สภาวะของจุลินทรีย์แต่ละชนิด อัตราส่วนความเข้มข้นของ  $\text{HAuCl}_4$  และความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้จากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะต้องมีความเหมาะสม เนื่องจากว่าจุลินทรีย์ในแต่ละชนิดจะมีสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่แตกต่างกัน จึงเป็นปัจจัยที่จำเป็นสำหรับการทดลองเพื่อควบคุมปัจจัยต่างๆ เพื่อส่งผลให้การทำการทดลองสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในขนาดมีขนาดและรูปร่างของอนุภาคทองคำนาโนที่คงที่

เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย dynamic light scattering (DLS) โดยเป็นการตรวจวัดขนาดเฉลี่ยของอนุภาคทองคำนาโน ซึ่งถือว่าเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมสำหรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์ลักษณะของสารคอลลอยด์ สารแขวนลอย ซึ่ง DLS จะวัดความผันผวนของแสงกระเจิงพร้อมกับช่วงเวลาที่เกิดขึ้นจากแสงผ่านดัชนีหักเหของสารประกอบเชิงซ้อนที่นำมาวิเคราะห์ เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่สำคัญสำหรับการหาการกระจายตัวของอนุภาคในของเหลว การกระเจิงแสงแบบไดนามิกส์เป็นเทคนิคที่วัดได้อย่างรวดเร็ว ใช้สารตัวอย่างในปริมาณน้อย และค่าความคาดเคลื่อนมีค่าต่ำ ซึ่งใช้ในการวัดการกระเจิงแสงของอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า 5 ไมโครเมตร ที่มีการเคลื่อนที่อย่างอิสระ (randomly diffuse) ไปทั่วทั้งตัวกลาง (Li et al, 2014) ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้ด้วยเทคนิค DLS พบว่า อนุภาคทองคำนาโนมีขนาดเฉลี่ยส่วนมากอยู่ที่ 60.47 นาโนเมตร นอกจากนี้วิธีนี้บอกถึงขนาดของอนุภาคทองคำนาโนแล้วนั้น ยังสามารถบอกการกระจายตัวของอนุภาคทองคำนาโนได้จากค่าของ polydispersity index (PDI) ซึ่งค่านี้ใช้เพื่ออธิบายถึงระดับความไม่สม่ำเสมอของการกระจายตัวของขนาดอนุภาคทองคำนาโน โดยที่ถ้ามีค่า PDI ที่น้อยกว่า 0.05 แสดงให้เห็นว่ามีความเป็น monodisperse สูง ในขณะที่ถ้ามีค่า PDI มากกว่า 0.7 แสดงให้เห็นว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้มีการกระจายตัวของขนาดที่กว้างมาก (polydisperse) (Danaei et al, 2018) โดยที่จากการทดลองนี้พบว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้มีค่า PDI เท่ากับ 0.703 ซึ่งมีค่า PDI มากกว่า 0.7 แสดงให้เห็นว่า อนุภาคทองคำนาโนมีการกระจายตัวของขนาดที่ไม่สม่ำเสมอ

จากการทำการวิเคราะห์ด้วยค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงความต่างศักย์ระหว่างศักย์ไฟฟ้าบริเวณผิวของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นกับค่าศักย์ไฟฟ้าของสารละลาย โดยค่า ศักย์ซีต่านี้เป็นค่าที่บ่งบอกถึงประจุบนพื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการมีปฏิสัมพันธ์กันระหว่างสารชีวโมเลกุลของเชื้อรากับอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้ ดังนั้น ประจุที่อยู่บนพื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโนจึงเป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญในการเป็นตัวบ่งบอกถึงความเสถียรและการทำงานของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้ (Wanga et al, 2016) โดยที่ค่าศักย์ซีต้าที่บ่งบอกถึงอนุภาคทองคำนาโนมีความเสถียรจะต้องอยู่ในช่วงเป็นบวกมากกว่า +20 มิลลิโวลต์ และเป็นลบมากกว่า -20 มิลลิโวลต์ (Thilagam et al, 2020) โดยที่จากการทดลองนี้พบว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้มีค่าศักย์ซีต้าเป็น -17.4 มิลลิโวลต์ ซึ่งค่าศักย์ซีต้าของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้นั้นมีค่าเป็นลบน้อยกว่า -20 มิลลิโวลต์ แสดงให้เห็น



ว่า อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้นั้นจะเกิดการเกาะกลุ่มกันและตกตะกอนภายในสารละลายได้ สาเหตุที่เป็นเช่นนี้ เนื่องมาจากว่าภายในสารละลายน้ำเลี้ยงเชื้อราจะมีสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน และสารชีวโมเลกุลที่เป็นโพลิเมอร์ มีความสามารถในการเป็นตัวล่อรอบอนุภาคทองคำนาโนและทำให้อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้มีความเสถียร แต่ในขณะที่สารชีวโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น เปปไทด์ กรดอะมิโน โมโนแซ็กคาไรด์ พอลิแซ็กคาไรด์ และสารเมแทบอลิท์ปฐมภูมิ ก็มีความสามารถล่อรอบอนุภาคทองคำนาโนได้ เช่นเดียวกับกับสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ แต่สารชีวโมเลกุลขนาดเล็กที่ล่อรอบนั้นไม่ส่งผลทำให้อนุภาคทองคำนาโนมีความเสถียร (Molnár et al, 2018) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าภายในสารละลายน้ำเลี้ยงเชื้อราจากงานวิจัยนี้ประกอบไปด้วยสารชีวโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่และเล็กปนกันอยู่ โดยที่สารชีวโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก อาจจะเป็นส่วนที่ไปเป็นตัวล่อรอบอนุภาคทองคำนาโนมากกว่าสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ ส่งผลให้อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้มีค่าศักย์ซีต้าที่ไม่เสถียรมากนัก และนอกจากนี้ก็ยังมียีกหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อค่าศักย์ซีต้าของอนุภาคทองคำนาโน อย่างเช่น แรงทางประจุไฟฟ้า และ pH ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในปฏิบัติการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน เป็นต้น (Zhang et al, 2012) โดยวิธีที่แก้ไขปัญหาคือ ทำการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนแล้วนำมาใช้ในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลูทันที เพื่อป้องกันปัญหาการเกิดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคทองคำนาโนเพิ่มมากขึ้นไปอีก และจากค่าศักย์ซีต่านี้ แสดงให้เห็นว่าพื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโนมีประจุเป็นลบ เกิดขึ้นจากกระบวนการรีดักชันของไอออนอนุภาคทองประจุบวก ( $Au^{3+}$ : gold ion) เพื่อสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน ( $Au^0$ : AuNPs) ซึ่งในขณะนั้นเองจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของหมู่ไฮดรอกซิลด้วย โดยหมู่ไฮดรอกซิลนี้เป็นหมู่ที่พบมากในสารโพลีแซ็กคาไรด์ที่อยู่ในโปรตีนและเอนไซม์ที่มาจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา โดยที่การออกซิเดชันจะเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลไปเป็นหมู่คาร์บอนิลที่มีประจุเป็นลบ (Mata et al, 2009) จากนั้นโปรตีนจะสามารถเกิดการจับกับอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้ จากการที่โปรตีนมีหมู่ฟังก์ชันเอมีนอิสระหรืออนุพันธ์ของซิสเตอีนที่มีประจุลบและจับกับไอออนอนุภาคทองคำประจุบวกด้วยแรงประจุทางไฟฟ้าซึ่งเป็นแรงกระทำระหว่างโมเลกุลที่มีขั้ว (dipole-dipole force) (Sanghi et al, 2010; Binupriya et al, 2010) แสดงให้เห็นว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นเมื่อถูกล้อมรอบด้วยโปรตีนที่ได้จากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อราจะมีประจุเป็นลบ

จากนั้นผู้วิจัยได้นำเอาอนุภาคทองคำนาโนที่ทำการสังเคราะห์ได้ไปประยุกต์ใช้ในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสำหรับการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลู สาเหตุที่เลือกสีย้อมเมทิลีนบลูมาทำการศึกษา เนื่องมาจาก สีย้อมเมทิลีนบลูเป็นสารประกอบอะโรมาติกเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic aromatic) ซึ่งเป็นสีย้อมที่มีประจุบวกในกลุ่มของอะโซ (Azo dye) มีโครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อน (Nadaf et al, 2019) โดยที่อนุภาคทองคำนาโนมีความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลูได้ โดยมีการนำเอาสารรีดิวซ์ ascorbic acid มาเป็นตัวให้อิเล็กตรอนเพื่อเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสีย้อมเมทิลีนบลู (León et al, 2016) โดยมีกลไกที่คาดว่าจะเกิดขึ้น ดังนี้ ascorbic acid สามารถที่จะให้อิเล็กตรอนกับสีย้อมเมทิลีนบลูได้ อนุภาค

ทองคำนาโนจึงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการรับอิเล็กตรอนจาก ascorbic acid ส่งให้กับสี่ย้อมเมทิลินบลู โดยผู้วิจัยได้ทำการทดลองนำเอาชุดควบคุมมาเปรียบเทียบกับชุดทดลอง ซึ่งชุดทดลองเป็นการนำเอาอนุภาคทองคำนาโนมาใส่เพิ่มเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสำหรับการย่อยสลายสี่ย้อมเมทิลินบลู ในขณะที่ชุดควบคุมโดยจะใส่เพียงสารรีดิวซ์ ascorbic acid ที่ทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนกับอนุภาคทองคำนาโนเท่านั้น จากนั้นทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี่ย้อมเมทิลินบลูและวัดค่าการดูดกลืนแสงของสี่ย้อมเมทิลินบลูในช่วงความยาวคลื่น 664 นาโนเมตร ด้วย UV-visible spectrophotometer (Rabeea et al, 2020) จักระยะเวลาทุกๆ 10 นาที เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง คำนวณค่าที่ได้ออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ในการย่อยสลายสี่ย้อมเมทิลินบลูทำการเปรียบเทียบผลระหว่างชุดทดลองและชุดควบคุม ซึ่งผลจากการทดลองพบว่า เมื่อใช้อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์ในการย่อยสลายสี่ย้อมเมทิลินบลูเป็น 18.14, 36.55, 46.86, 54.60, 57.61, 60.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีอนุภาคทองคำนาโน พบว่าเปอร์เซ็นต์ในการย่อยสลายสี่ย้อมเมทิลินบลูเป็น 33.06, 55.22, 67.74, 77.44, 82.15, 85.39 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 60 นาที และเมื่อใช้อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีเปอร์เซ็นต์ในการย่อยสลายสี่ย้อมเมทิลินบลูเป็น 34.21, 49.21, 62.04, 70.06, 73.82, 76.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีอนุภาคทองคำนาโน พบว่าเปอร์เซ็นต์ในการย่อยสลายสี่ย้อมเมทิลินบลูเป็น 28.62, 42.33, 58.43, 63.97, 68.06, 69.34 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 60 นาที ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เปอร์เซ็นต์ในการย่อยสลายสี่ย้อมเมทิลินบลูในชุดทดลองที่มีอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้นั้นมีเปอร์เซ็นต์ในการย่อยสลายสี่ย้อมเมทิลินบลูที่ต่ำกว่าชุดควบคุมที่มีเพียง ascorbic acid อย่างเดียว ที่ผลการทดลองเป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากในสถานะที่มีสารรีดิวซ์เป็น ascorbic acid อยู่ในสารละลายที่มีอนุภาคทองคำนาโน ascorbic acid นั้นมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันกับพันธะไดซัลไฟด์ (disulfides) ในโปรตีน (Landino et al, 2006) ที่ประกอบขึ้นจากกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine) โดยอนุพันธ์ของกรดอะมิโนซิสเตอีนเป็นส่วนที่พบในโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวล่อรอบอนุภาคทองคำนาโน เมื่อพันธะไดซัลไฟด์ที่เชื่อมระหว่างกรดอะมิโนซิสเตอีนเกิดปฏิกิริยารีดักชันเปลี่ยนไปเป็นหมู่ซัลไฟไฮดริล (sulfhydryl) (1) (Birwe et al, 1991) จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้อนุภาคทองคำนาโนสูญเสียคุณสมบัติในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสี่ย้อมเมทิลินบลูไป



นอกจากนี้ สิ่งที่ส่งผลทำให้เปอร์เซ็นต์ในการย่อยสลายสี่ย้อมเมทิลินบลูในชุดทดลองมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม เนื่องมาจากว่า ascorbic acid เกิดปฏิกิริยารีดักชันได้ทั้งกับสารละลายสี่ย้อมเมทิลินบลู และอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นมาได้ จึงทำให้ประสิทธิภาพในการเกิดการรีดักชันกับสี่ย้อมเมทิลินบลูต่ำลง โดยสิ่งที่ได้กล่าวมาข้างต้นนั้น สอดคล้องกับเมื่อทำการทดลองโดยเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคทองคำนาโนเป็น 100

ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร จะมีเปอร์เซ็นต์ในการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลูที่ต่ำกว่า การทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำนาโนเป็น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร เพราะที่ความเข้มข้นของ ascorbic acid เท่าเดิมจะต้องเกิดปฏิกิริยาการรีดักชันกับสารละลายสีย้อมเมทิลีนบลูและอนุภาคทองคำนาโนที่มีความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นจากเดิม จึงส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ในการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลูมีค่าที่น้อยลงกว่าเดิม

จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 มีความสามารถในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีการต่างๆ พบว่า อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้นั้น มีขนาดและรูปร่างที่ได้มีความแตกต่างกันออกไป ซึ่งขนาดและรูปร่างที่แตกต่างกันนั้นจะส่งผลทำให้อนุภาคทองคำนาโนมีคุณสมบัติและหน้าที่ที่แตกต่างกันออกไปด้วย ที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจากกระบวนการทางชีวภาพค่อนข้างที่จะมีความซับซ้อน ซึ่งอาจจะมีปัจจัยหลากหลายอย่างที่ส่งผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน เช่น ความเข้มข้นของ  $\text{HAuCl}_4$  ความเข้มข้นของชีวมวล pH บัฟเฟอร์ของสารละลายที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน เป็นต้น นอกเหนือจากปัจจัยเหล่านี้แล้วนั้นยังมีปัจจัยอื่นๆนอกเหนือจากที่กล่าวมาข้างต้นที่ส่งผลต่อรูปร่างและขนาดของอนุภาคทองคำนาโน ซึ่งเป็นสิ่งที่จะต้องทำการศึกษาต่อไป เพื่อที่จะทำให้การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจากวิธีการทางชีวภาพมีขนาดและรูปร่างของอนุภาคทองคำนาโนที่คงที่ และมีความเสถียร ส่งผลให้อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้นั้น มีประสิทธิภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆได้ ในส่วนของการทดลองที่ทำการนำเอาอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้มาประยุกต์ใช้ในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสำหรับการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลู ผลการทดลองพบว่า อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้นั้น ไม่มีประสิทธิภาพที่จะเร่งปฏิกิริยาการรีดักชันได้ในสภาวะที่มีตัวรีดิวซ์เป็น ascorbic acid เนื่องมาจากว่า ascorbic acid สามารถที่จะเกิดปฏิกิริยาการรีดักชันได้กับทั้งสารละลายสีย้อมเมทิลีนบลูและโปรตีนบนพื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโน เมื่อผลการทดลองที่ได้กล่าวไปข้างต้นนี้ ไม่บรรลุวัตถุประสงค์ของงานวิจัย ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้ ในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลูซึ่งเป็นแผนในการทำการทดลองต่อไป

แผนการทดลองต่อไปที่คาดว่าจะทำ คือ การนำเอาอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้นั้นมาทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสำหรับการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลู ในสภาวะที่ไม่มีตัวรีดิวซ์หรือ ascorbic acid ทำการสังเกตสารละลายสีย้อมเมทิลีนบลูที่เปลี่ยนแปลงไปและวัดผลการทดลองโดยใช้ UV-visible spectrophotometer โดยสีย้อมเมทิลีนบลูจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่น 664 นาโนเมตร โดยทำการตรวจวัดผลทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาทั้งหมด 4 ชั่วโมง โดยกลไกที่คาดว่าจะเกิดขึ้นจากการทดลองนี้ คือ บนพื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโนเมื่อถูกล้อมรอบด้วยสารชีวโมเลกุลที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อราที่เป็นส่วนทำให้อนุภาคทองคำนาโนมีความเสถียร จะมีประจุเป็นลบ ซึ่งสามารถยึดประจุบนพื้นผิว

ของอนุภาคทองคำนาโนได้จากค่าศักย์ซีต้าที่ได้ทำการวิเคราะห์ไปข้างต้น โดยที่เมื่ออนุภาคทองคำนาโนเจอกับ สีย้อมเมทิลีนบลูที่มีประจุเป็นบวก จะทำให้อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้เกิดการดูดซับสีย้อม เมทิลีนบลูไว้ด้วยแรงประจุทางไฟฟ้า นอกจากนี้ บนพื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโนมีสารชีวโมเลกุลที่มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับสีย้อมเมทิลีนบลูได้ ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาการรีดักชันของสีย้อมเมทิลีนบลู ได้อีกด้วย (Rabeea, 2020) ซึ่งจากที่กล่าวมาข้างต้นนี้ จะต้องมีการวิเคราะห์ผลการทดลองเพิ่มเติมโดยการ วิเคราะห์ด้วย Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์จำแนก ประเภทของสารอินทรีย์ เพื่อเป็นการยืนยันการมีอยู่ของสารต่างๆที่อยู่บนพื้นที่ผิวของอนุภาคทองคำนาโน ซึ่ง การที่ทราบว่ามีการมีสารใดอยู่บนพื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโนจะทำให้ทราบกลไกที่แน่ชัดของอนุภาคทองคำนา โนในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสำหรับการย่อยสลายสีย้อมได้เพิ่มมากขึ้นไปอีก ซึ่งเมื่อทราบกลไกที่แน่ชัดของ อนุภาคทองคำนาโนแล้ว ในอนาคตจะสามารถนำอนุภาคทองคำนาโนไปประยุกต์ใช้ในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สำหรับการย่อยสลายสีย้อมเคมีประเภทอื่นๆ ที่พบมากในแหล่งน้ำเสียที่ปล่อยออกมาจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตต่างและสิ่งแวดล้อมได้

## อ้างอิง

- Ahmed, S., Annua, Ikrama, S., Yudha S.S., (2016). Biosynthesis of gold nanoparticles: A green approach. *J. Photochem. Photobiol. B.* 161, 141-153. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.04.034>.
- Annur, S., Santosa, S.J., Aprilita, H.N., (2018). pH Dependence of Size Control in Gold Nanoparticles Synthesized at Room Temperature. *Oriental journal of chemistry.* 34(5): 2305-2312. doi: <http://dx.doi.org/10.13005/ojc/340510>
- Bagheri, S., Yasemi, M., Safaie-Qamsari, E., Rashidiani, J., Abkar, M., Hassani, M., Mirhosseini, S.A., Kooshki H., (2018). Using gold nanoparticles in diagnosis and treatment of melanoma cancer. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology.* 46, 462-471. doi: <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1430585>.
- Binupriya, A.R., Sathishkumar, M., Vijayaraghavan, K., Yun, S.I., (2010). Bioreduction of trivalent aurum to nano-crystalline gold particles by active and inactive cells and cell-free extract of *Aspergillus oryzae* var. *viridis*. *Journal of Hazardous Materials.* 177(3): 539-545. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.066>.
- Birwe, H., Schneeberger, W., Hesse, A., (1991). Investigations on the efficacy of ascorbic acid therapy in cystinuria. *Urol Res.* 19:199-201.
- Bond, G., (2010). Source of the catalytic activity of gold nanoparticles. *Gold Bulletin.* 43(2).
- Cavuslar, O., Nakay, E., Kazakoglu, U., Abkenar, S.K., Ow-Yang, C.W., Acar, H.Y., (2020). Synthesis of stable gold nanoparticles using linear polyethyleneimines and catalysis of both anionic and cationic azo dye degradation. *Mater. Adv.* 1, 2407-2417. doi: <https://doi.org/10.1039/D0MA00404A>.
- Chandran, K., Song, S., Yun, S., (2019). Effect of size and shape controlled biogenic synthesis of gold nanoparticles and their mode of interactions against food borne bacterial pathogens. *Arabian Journal of Chemistry.* 12(8): 1994-2006. doi: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.041>

- Chuhan, A., Zubair, S., Tufail, S., Sherwani, A., Sajid, M., Raman, S.C., Azam, A., Owais, M., (2011). Fungus-mediated biological synthesis of gold nanoparticles: Potential in detection of liver cancer. *Int. J. Nanomed.* 6, 2305–2319. doi: <https://doi.org/10.2147/IJN.S23195>.
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Davarani, F.H., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani S., Mozafari M.R., (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics.* 10, 57.
- Das, S.K., Das, A.R., Guha, A.K., (2009). Gold Nanoparticles: Microbial Synthesis and Application in Water Hygiene Management. *Langmuir.* 25, 8192–8199. doi: <https://doi.org/10.1021/la900585p>.
- David, T.T., (2007). Using gold nanoparticles for catalysis. *Nanotoday.* 2(4): 40-43, doi: [https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(07\)70116-0](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(07)70116-0).
- Du, L., Jiang, H., Liu, X., Wang, E., (2007). Biosynthesis of gold nanoparticles assisted by *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  and its application on direct electrochemistry of hemoglobin. *Electrochemistry Communications.* 9(5), 1165– 1170. doi: <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2007.01.007>.
- Dua, J., Xia, Z., (2013). Measurement of the catalytic activity of gold nanoparticles synthesized by a microwave-assisted heating method through time-dependent UV spectra. *Analytical method.* 5, 1991-1995. doi: <https://doi.org/10.1039/c3ay26222g>.
- Haiss, W., Thanh, N.T.K., Aveyard, J., Fernig, D.G., (2007). Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Anal. Chem.* 79: 4215-4221.
- Hocking, A.D., (2006). Food spoilage microorganisms. *Woodhead Publishing Series in Food Science. Technology and nutrition.* p.451-487.
- Huang, X., El-Sayed, M.A., (2010). Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research.* 1, 13-28. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.002>.
- Joerger, R.T., Klaus, C.G., (2000). Biologically produced silver-carbon composite materials for optically functional thin film coatings. *Adv. Mater.* 12:407-409.

- Khalil, M.H., Sabry, D.Y., Khidr, S.A., (2014). Biosynthesis of gold nanoparticles using *Salvia Officinalis* leaf extract and its microbiological activity. *IJGHC*. 3(4): 1668-1678.
- Khan, A.K., Rashid, R., Murtaza, G., Zahra A., (2014). Gold Nanoparticles: Synthesis and Applications in Drug Delivery. *Trop J Pharm Res*. 13(7), 1169-1177. doi: <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i7.23>.
- Khan, I., Saeed, K., Khan I., (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*. 12(7), 908-931. doi: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>.
- Kim, K., Choi, S., Cha, J.H., Yeon, S.H., Huen, L., (2006). Facile one-pot synthesis of gold nanoparticles using alcohol ionic liquids. *J. Mater. Chem*. 16, 1315-1317. doi: <https://doi.org/10.1039/B601478J>.
- Kitching, M., Ramani, M., Marsili, E., (2015). Fungal biosynthesis of gold nanoparticles: mechanism and scale up. *Microb Biotechnol*. 8(6), 904-917. doi: <https://doi.org/10.1111/Moghaddam.1751-7915.12151>.
- Klich, M.A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Utrecht. The Netherlands. p.116.
- Kreibig, U., Genzel, L., (1985). Optical absorption of small metallic particles. *Surface science*. 156(2): 678-700. doi: [https://doi.org/10.1016/0039-6028\(85\)90239-0](https://doi.org/10.1016/0039-6028(85)90239-0)
- Kumari, M.M., Philip, D., (2015). Degradation of environment pollutant dyes using phytosynthesized metal nanocatalysts. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 135:632-638. doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.07.037>
- Landino, L.M., Koumas, M.T., Mason, C.E., Alston, J.A., (2006). Ascorbic acid reduction of microtubule protein disulfides and its relevance to protein S-nitrosylation assay. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 340(2): 347-352. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.013>.

- Lengke, M.F., Fleet, M.E., Southam, G., (2006). Morphology of Gold Nanoparticles Synthesized by Filamentous Cyanobacteria from Gold(I)-Thiosulfate and Gold (III)-Chloride Complexes. *Langmuir*. 22, 2780-2787. doi: <https://doi/pdf/10.1021/la052652c>.
- León, E.R., Rodríguez, E.L., Beas, C.R., Villa, G.P., Palomares R.A., (2016). Study of Methylene Blue Degradation by Gold Nanoparticles Synthesized within Natural Zeolites. *Journal of nanomaterials*. 9541683. doi: <https://doi.org/10.1155/2016/9541683>.
- Li, X., Xu, H., Chen, Z.S., Chen, G., (2011). Biosynthesis of Nanoparticles by Microorganisms and Their Applications. *Journal of Nanomaterials*. 270974. doi: <https://doi.org/10.1155/2011/270974>.
- Li, Z., Wang, Y., Shen, J., Liu, W., & Sun, X., (2014). The measurement system of nanoparticle size distribution from dynamic light scattering data. *Optics and Lasers in Engineering*. 56(1), 94-98.
- Mata, Y.N., Torres, E., Blázquez, M.L., Ballester, A., González, F., Muñoz, J.A., (2009). Gold (III) biosorption and bioreduction with the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Journal of Hazardous Materials*. 166(3): 612-618. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.11.064>.
- Moghaddam, A.B., Namvar, F., Moniri, M., Tahir, P.M., Azizi, S., Mohamad, R., (2015). Nanoparticles Biosynthesized by Fungi and Yeast: A Review of Their Preparation, Properties, and Medical Applications. *Molecules*. 20, 16540-16565. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules200916540>.
- Molnár, Z., Bódai, V., Szakacs, G., Erdélyi, B., Fogarassy, Z., Sáfrán, G., Varga, T., Kónya, Z., Szeles, E.T., Lagz, I., (2018). Green synthesis of gold nanoparticles by thermophilic filamentous fungi. *Scientific reports*. 8: 3943. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22112-3>.
- Mourato, A., Gadanho, M., Lino, A.R., Tenreiro, R., (2011). Biosynthesis of Crystalline Silver and Gold Nanoparticles by Extremophilic Yeasts. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 546074. doi: <https://doi.org/10.1155/2011/546074>.
- Mukherjee, P., (2001). Bioreduction of  $AuCl_4^-$  Ions by the Fungus, *Verticillium* sp. and Surface Trapping of the Gold Nanoparticles Formed. *Chem. Int. Edn.* 40:3585.



- Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Ahmad, A., Khan, M.I., Kumar, R., Sastry, M., (2002). Extracellular Synthesis of Gold Nanoparticles by the Fungus *Fusarium oxysporum*. *ChemBioChem*. 3, 461–463.
- Nadaf, N.Y., Kanase, S.S., (2019). Biosynthesis of gold nanoparticles by *Bacillus marisflavi* and its potential in catalytic dye degradation. *Arabian Journal of Chemistry*. 12(8): 4806-4814. doi: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.09.020>.
- Nielsen, K.F., Mogensen, M.J., Johansen, M., Larsen, T.O., Frisvad, J.C. (2009). Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Anal Bioanal Chem*. 395(5), 1225-42. doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3081-5>.
- Otto, A., (1968). Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Zeitschrift fur Physik*. 216(4): 398-410.
- Rabeea, M.A., Owaid, M.A., Aziz, A.A., Jameel, M.S., Dheyab, M.A., (2020). Mycosynthesis of gold nanoparticles using the extract of *Flammulina velutipes*, *Physalacriaceae*, and their efficacy for decolorization of methylene blue, *J Environ Chem Eng*. 8: 103841.
- Raghuvanshi, S.P., Singh, R., Kaushik, C.P., (2004). Kinetics study of methylene blue dye bioadsorption on baggase. *Applied ecology and environmental research*. 2(2): 35-43.
- Sadeghia, B., Mohammadzadeh, M., Babakhani B., (2015). Green synthesis of gold nanoparticles using *Stevia rebaudiana* leaf extracts: Characterization and their stability. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 148, 101–106. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.03.025>.
- Sanghi, R., Verma, P., (2010). pH dependant fungal proteins in the ‘green’ synthesis of gold nanoparticles. *Adv. Mat. Lett.* 1(3): 193-199. doi: <https://doi.org/10.5185/amlett.2010.5124>.
- Sen, I.K., Maity, K., Islam S.S., (2013). Green synthesis of gold nanoparticles using a glucan of an edible mushroom and study of catalytic activity. *Carbohydrate Polymers*. 9(2), 518-528. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.058>.

- Sengani, M., Grumezescu, A. M., & Rajeswari, V. D., (2017). Recent trends and methodologies in gold nanoparticle synthesis–Aprospective review on drug delivery aspect. *OpenNano*, 37-46. doi: <https://doi.org/10.1016/j.onano.2017.07.001>
- Shi, C., Zhu, N., Cao, Y., Wu, P., (2015). Biosynthesis of gold nanoparticles assisted by the intracellular protein extract of *Pycnoporus sanguineus* and its catalysis in degradation of 4-nitroaniline. *Nanoscale Research Letters*, 10(1), 147. doi: <https://doi.org/10.1186/s11671-015-0856-9>.
- Singaravelu, G., Arockiamary, J.S., Kumar, V.G., Govin-daraju, K., (2007). A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga, *Sargassum wightii* Greville. *Colloids and Surfaces*. 57(1), 97–101. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.01.010>.
- Singh, P., Kim, Y.J., Zhang, D., Yang, D.C., (2016). Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends in Biotechnology*. 34(7), 588-599. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.006>.
- Srinath, B.S., Rai V.R., (2015). Biosynthesis of highly monodispersed, spherical gold nanoparticles of size 4–10 nm from spent cultures of *Klebsiella pneumoniae*. 3 *Biotech*. 5(5): 671-676. doi: <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0265-2>
- Sujitha, M.V., Kannan, S., (2013). Green synthesis of gold nanoparticles using Citrus fruits (*Citrus limon*, *Citrus reticulata* and *Citrus sinensis*) aqueous extract and its characterization. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 102: 15-23. doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.09.042>.
- Thilagam, R., Gnanamani, A., (2020). Preparation, characterization and stability assessment of keratin and albumin functionalized gold nanoparticles for biomedical applications. *Applied Nanoscience*. 10, 1879-1892.
- Turkevich, J., Stevenson, P.C., Hillier J., (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday soc*. 11, 55-75.

- Verma, V.C., Singh, S.K., Solanki, R., Prakash S., (2011). Biofabrication of Anisotropic Gold Nanotriangles Using Extract of Endophytic *Aspergillus clavatus* as a Dual Functional Reductant and Stabilizer. *Nanoscale Res Lett.* 6, 16. doi: <https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-261>.
- Wanga, W., Ding, X., Xua, Q., Wang, J., Wang, L., Lou, X., (2016). Zeta-potential data reliability of gold nanoparticle biomolecular conjugates and its application in sensitive quantification of surface absorbed protein. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 148(1): 541-548. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.09.021>.
- Wu, J.W., Ng, I.S., (2017). Biofabrication of gold nanoparticles by *Shewanella* species. *Bioresour. Bioprocess.* 4, 50. doi: <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0181>.
- Xie, J., Lee, J.Y., Wang, D.I.C., Ting, Y.P., (2007). High-yield synthesis of complex gold nanostructures in a fungal system. *J. Phys. Chem C.* 111, 16858–16865. doi: <https://doi.org/10.1021/jp0752668>.
- Zhang, X., Servos, M. R., & Liu, J., (2012). Instantaneous and Quantitative Functionalization of Gold Nanoparticles with Thiolated DNA Using a pH-Assisted and Surfactant-Free Route. *Journal of the American Chemical Society*, 134(17), 7266–7269. <https://doi.org/10.1021/ja3014055>
- Zia, M.A., Rahman, K.U., Saeed, M.K., Andaleeb, F., Rajoka, M.I., Sheikh, M.A., Khan, I.A., Khan, A.I., (2007). Thermal Characterization of Purified Glucose Oxidase from A Newly Isolated *Aspergillus Niger* UAF-1. *J Clin Biochem Nutr.* 41(2): 132-138.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

## สูตรการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

## 1. สูตรอาหารสำหรับการวิเคราะห์

## 1.1. อาหารเลี้ยงเชื้อราเหลว Potato dextrose broth (PDB) ผงอาหารสำเร็จรูป

Potato dextrose	24.0 กรัม
-----------------	-----------

ค่าความเป็นกรด-ด่าง (25 องศาเซลเซียส)	5.1 ± 0.2
---------------------------------------	-----------

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ลงในน้ำกลั่นที่มีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

## 1.2. อาหารเลี้ยงเชื้อราแข็ง Potato dextrose agar (PDA)

Potato dextrose	24.0 กรัม
-----------------	-----------

ผงวุ้น	15.0 กรัม
--------	-----------

ค่าความเป็นกรด-ด่าง (25 องศาเซลเซียส)	5.1 ± 0.2
---------------------------------------	-----------

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ลงในน้ำกลั่นที่มีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

## 2. การเตรียมสารเคมี

## 2.1. การเตรียมสารละลาย 0.02 M Chloroauric acid solution 5 มิลลิลิตร

Gold (III) chloride	0.034 กรัม
---------------------	------------

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วใช้กระดาษฟอยล์ปิดรอบหลอดทดลองที่ใส่สารละลาย เมื่อเตรียมเสร็จนำไปเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 2.2. การเตรียมสารละลาย Acetate buffer (pH 4.70) 1 ลิตร

น้ำกลั่น	800 มิลลิลิตร
----------	---------------

Sodium Acetate trihydrate	6.80 กรัม
---------------------------	-----------

Acetic acid	2.87 มิลลิลิตร
-------------	----------------

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วทำการปรับ pH ด้วยเครื่องวัด pH meter เพื่อให้ได้ pH เป็น 4.70 จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

### 2.3. การเตรียมสารละลายของอนุภาคทองคำนาโน ความเข้มข้น 50, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียม stock สารละลายอนุภาคทองคำนาโน 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

น้ำกลั่น	1 มิลลิลิตร
อนุภาคทองคำนาโน	0.40 มิลลิกรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ใส่ในหลอด microcentrifuge จากนั้นดูดสารละลายอนุภาคทองคำนาโน ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น เพื่อให้ได้สารละลายอนุภาคทองคำนาโน มีความเข้มข้นเป็น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

### 2.4. การเตรียมสารละลาย 0.01 M Ascorbic acid

เตรียม stock สารละลาย 0.1 M Ascorbic acid

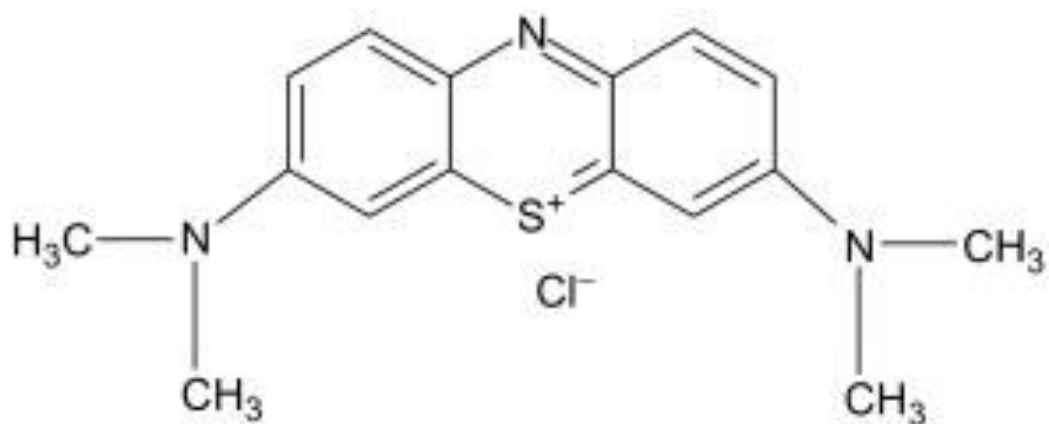
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร
Ascorbic acid	0.18 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ใส่ลงในขวดใส่สารเคมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลาย 0.1 M Ascorbic acid ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย 0.01 M Ascorbic acid แล้วใช้กระดาษฟอยล์ปิดครอบขวดใส่สารเคมี

### 2.5. การเตรียมสารละลาย 0.01 M Methylene blue

น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร
Methylene blue	0.32 กรัม














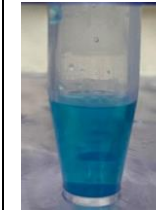
ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ใส่ลงในขวดใส่สารเคมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วใช้กระดาษฟอยล์ปิดครอบขวดใส่สารเคมี













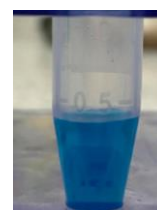



รูปที่ ก-1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสีย้อมเมทิลีนบลูที่ใช้ในการศึกษา ( Raghuvanshi et al, 2004)

## ภาคผนวก ข

## ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลู

ระยะเวลา	0	10	20	30	40	50	60
ชุดควบคุม							
การทดลอง							

รูปที่ ข-1 แสดงถึงสารละลายสีย้อมเมทิลีนบลูที่เกิดการย่อยสลายเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลอง เมื่อใช้อนุภาคทองคำนาโน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 60 นาที

ระยะเวลา	0	10	20	30	40	50	60
ชุดควบคุม							
การทดลอง							

รูปที่ ข-2 แสดงถึงสารละลายสีย้อมเมทิลีนบลูที่เกิดการย่อยสลายเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลอง เมื่อใช้อนุภาคทองคำนาโน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 60 นาที



## ภาคผนวก ค

## เปอร์เซ็นต์ของการย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลู

ระยะเวลา (นาที)	% การย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลู	
	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
10	28.62	18.14
20	42.33	36.55
30	58.43	46.86
40	63.97	54.6
50	68.06	57.61
60	69.34	60.8

ตารางที่ ค-1 แสดงถึงเปอร์เซ็นต์การสลายสีย้อมเมทิลีนบลูเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลอง เมื่อใช้นุภาคทองคำนาโน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 60 นาที

ระยะเวลา (นาที)	% การย่อยสลายสีย้อมเมทิลีนบลู	
	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
10	33.06	34.21
20	55.22	49.21
30	67.74	62.04
40	77.44	70.06
50	82.15	73.82
60	85.39	76.89

ตารางที่ ค-2 แสดงถึงเปอร์เซ็นต์การสลายสีย้อมเมทิลีนบลูเปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลอง เมื่อใช้นุภาคทองคำนาโน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 60 นาที

## ภาคผนวก ง

### อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง

#### เครื่องนาโนดรอป (NanoDrop2000)

ลักษณะและองค์ประกอบของเครื่องนาโนดรอป (NanoDrop2000) ของบริษัท Thermo Scientific ประเทศ สหรัฐอเมริกา เครื่องนาโนดรอปที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงนี้จะทำการวิเคราะห์ผลที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง



#### ขั้นตอนการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องนาโนดรอป (NanoDrop2000) มีดังนี้

1. ตรวจสอบว่ามีการเชื่อมต่อเครื่อง Nanodrop กับคอมพิวเตอร์ก่อนทำการเปิดเครื่อง
2. เปิด program และเลือก application ที่ต้องการจาก main menu โดยทำการเลือก UV-vis
3. เริ่มต้นทำการวัด blank โดยหยดตัวอย่าง blank ที่ต้องการปริมาตร 2 ไมโครลิตร บนช่องวัดที่อยู่บนฐานด้านล่าง แล้วปิด sample arm ลง และคลิกปุ่ม blank บนหน้าจอ เมื่อทำการวัดเสร็จสิ้น ให้เช็ด blank บนช่องวัดทั้งด้านบนและด้านล่าง ด้วยวัสดุที่ไม่เกิดขุย
4. ขั้นตอนในการวัดตัวอย่าง
  - 4.1. ใส่ชื่อสารตัวอย่าง ลงใน sample ID บนหน้าจอที่ทำการแสดงข้อมูล
  - 4.2. หยดตัวอย่างที่ต้องการวัดลงไปบนช่องวัดที่อยู่บริเวณฐานด้านล่าง และปิด sample arm ลง และคลิกปุ่ม measure ที่แสดงบนหน้าจอ เมื่อทำการวัดเสร็จสิ้นให้เช็ดตัวอย่าง บนช่องวัดทั้งด้านบนและด้านล่าง ด้วยวัสดุที่ไม่เกิดขุย

### คำแนะนำในการใช้เครื่องนาโนดรอป (NanoDrop2000)

1. ควรทำการวัด Blank ใหม่ทุก 30 นาที
2. ทำความสะอาดช่องวัดด้วยน้ำกลั่นทุกครั้ง เมื่อมีการเปลี่ยนตัวอย่างในการวิเคราะห์
3. ห้ามเอาวัสดุที่มีลักษณะแข็งไปจุดบริเวณแท่นวัด