



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์อนุภาคทองคำด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้ เชื้อรา *Aspergillus niger*
(Biosynthesis of Gold Nanoparticle using *Aspergillus niger*)

ชื่อนิสิต ฉัตรวรเชษฐ์ แซ่โก้ว รหัสนิสิต 5932307223

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562



โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้ เชื้อรา *Aspergillus niger*
(Biosynthesis of Gold Nanoparticle using *Aspergillus niger*)

ชื่อนิสิต นาย ฉัตรวรเชษฐ์ แซ่โกว **เลขประจำตัว** 5932307223

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงการ

การสังเคราะห์อนุภาคทองคำโนด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้
เชื้อรา *Aspergillus niger*

โดย

นายฉัตรพรเชษฐ์ แซ่โก้ว เลขประจำตัวนสิต 5932307223

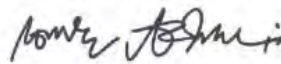
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

อาจารย์ ดร.สรริสา ณ ป้อมเพ็ชร

ปีการศึกษา

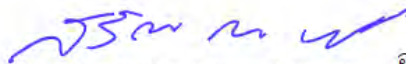
2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

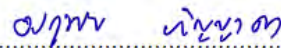


.....หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงการ



.....อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(อาจารย์ ดร.สรริสา ณ ป้อมเพ็ชร)



.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อรอุทัย ภิญญาคง)



.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้
เชื้อรา *Aspergillus niger*

(Biosynthesis of Gold Nanoparticle using *Aspergillus niger*)

โดย

นาย ฉัตรวรเชษฐ์ แซ่โกว
เลขประจำตัวนิสิต 5932307223

อาจารย์ที่ปรึกษาในโครงการ
อาจารย์ ดร.สรिसา ณ ป้อมเพ็ชร

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562

ชื่อโครงการ: การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้ เชื้อรา *Aspergillus niger*
นิสิตหัวหน้าโครงการ: นาย ฉัตรวรรเชษฐ์ แซ่โกว รหัสนิสิต 5932307223
อาจารย์ที่ปรึกษา: อาจารย์ ดร.สรริสา ณ ป้อมเพ็ชร

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

อนุภาคทองคำนาโน (gold nanoparticle ; AuNP) คือ อนุภาคของทองคำที่มีขนาดตั้งแต่ 1-100 นาโนเมตร และในปัจจุบันพบว่าการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนทางชีวภาพเป็นที่นิยมอย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนโดยใช้เอนไซม์และเมทาบอลิต์ของสิ่งมีชีวิตไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย ราหรือพืช ทำให้ในกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนไม่มีการปนเปื้อนหรือตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมและในอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ ดังนั้นอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จึงมีความเป็นพิษน้อยและปลอดภัยสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิต ซึ่งในงานวิจัยนี้ผู้ทำงานวิจัยมีจุดประสงค์เพื่อสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจากเชื้อรา *Aspergillus niger* MSCU 0361 และศึกษาผลของสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกันในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในสารละลาย acetate buffer และในน้ำ โดยผลการศึกษาพบการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 530-560 นาโนเมตร ของสารละลายซึ่งเป็นผลมาจากคุณสมบัติการดูดกลืนแสงที่จำเพาะของอนุภาคทองคำนาโนและผลจากการตรวจวิเคราะห์รูปร่างและการกระจายตัวของอนุภาคทองคำนาโนด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (TEM) พบว่าอนุภาคทองคำนาโนที่ได้จากการสังเคราะห์ในน้ำมีรูปร่างทรงกลมสามเหลี่ยมและรูปร่างไม่แน่นอน และมีการกระจายตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ ซึ่งแตกต่างกับอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จากสารละลาย acetate buffer ที่พบรูปร่างส่วนใหญ่เป็นทรงกลมและมีการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคทองคำนาโน ส่วนการวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธี DLS (Dynamic Light Scattering) พบว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ในสารละลาย acetate buffer และในน้ำ มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 63.13 นาโนเมตร และ 90.07 นาโนเมตร ตามลำดับ ในส่วนการทดลองเพื่อศึกษาความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยารีดักชัน resazurin ให้เป็น resorufin ของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จาก *A. niger* MSCU 0361 พบว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีแนวโน้มที่จะสามารถเร่งปฏิกิริยารีดักชัน resazurin ให้กลายเป็น resorufin ได้ จากการตรวจสอบปริมาณ resorufin ที่เพิ่มขึ้นภายในสารละลายด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ resorufin ที่ 570 นาโนเมตร ด้วยเทคนิค UV-visible spectrometry ผลการทดลองทั้งหมดในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 สามารถสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนได้และอนุภาคทองคำนาโนที่ได้จากการสังเคราะห์ในสารละลาย acetate buffer และในน้ำมีความแตกต่างกัน อีกทั้งอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ยังมีแนวโน้มที่จะสามารถนำไปใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการรีดักชันได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามเพื่อยืนยันความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและทราบถึงกลไกการเร่งปฏิกิริยาของอนุภาคทองคำนาโนควรมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

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

Project title: Biosynthesis of Gold Nanoparticle using *Aspergillus niger*
Name of student: Mr. Chatworachet Sae-kow Student ID: 5932307223
Project Advisor: Dr. Sarisa Na Pombejra

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University Academic Year 2019

Abstract

Gold nanoparticles (AuNPs) are gold particles that range in size from 1-100 nm. Currently, biosynthesis of gold nanoparticle has gained increasing interest due to its environmental friendliness and less toxicity. In this method, enzymes and metabolites from organisms such as bacteria, fungi, yeasts, algae and plants play an important role in the nanoparticle production. In this study, we aimed to biosynthesize AuNPs from *Aspergillus niger* MSCU 0361 and study the effects of different pH conditions on the synthesis of nanoparticles (pH 7 : water , pH 4.6 : acetate buffer). The absorbance result showed unique optical characteristics of AuNPs between 530-560 nm. The transmission electron microscopy (TEM) displayed the difference in shapes of synthesized AuNPs in water and acetate buffer. Most of AuNPs in acetate buffer were in spherical shapes, while the synthesized particles in water solution were found in spherical, triangular and uncertain shapes. Hydrodynamic diameters and size distributions of AuNPs were observed by dynamic light scattering (DLS) technique. The average size measured by DLS were 63.13 nm in acetate buffer and 90.01 nm in water solution. The catalytic activity of synthesized AuNPs was tested using resazurin reduction method, and found that the synthesized AuNPs tended to be able to catalyze resazurin giving resorufin products that could be measured by UV-visible spectrometry at the absorbance of 570 nm. These all results suggested that *A. niger* MSCU 0361 could synthesize nanoparticles, and the synthesized AuNPs in acetate buffer and in water solution were different. Moreover, the biosynthesized AuNPs could be used as catalyst for resazurin reduction. However, in order to confirm the ability of being an effective catalyst and to understand the catalytic mechanism of AuNPs, further studies are needed.

Keywords : gold nanoparticle, biosynthesis , catalytic activity , *Aspergillus niger*

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยโครงการเสริมประสบการณ์นี้จะสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีไม่ได้ หากไม่ได้รับความช่วยเหลืออย่างดีจาก อาจารย์ ดร.สรริสา ณ ป้อมเพ็ชร ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่กรุณาอบความรู้ คำแนะนำ ความคิดเห็นต่างๆ พร้อมทั้งสอนวิธีการปฏิบัติ การใช้อุปกรณ์ต่างๆภายในห้องปฏิบัติการ อีกทั้งยังคอยเป็นกำลังใจที่ดีในการทำงาน วิจัยครั้งนี้ตลอดมา รวมถึงการพัฒนาและปรับปรุงข้อบกพร่องต่างๆ ทำให้รายงานฉบับนี้สมบูรณ์และสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ให้ความรู้และคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยและต่อตัวผู้วิจัยเองในอนาคต

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำและอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีในงานวิจัยด้วยดีตลอดระยะเวลาการศึกษาและการทำวิจัย

ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จากงบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้โอนเคราะห์เงินทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณนางสาวคณิตดา มานาดี และนางสาว เมษศิริรินทร์ คนแรง เพื่อนนิสิตร่วมโครงการที่คอยช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาในการทำวิจัยและให้กำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการ 1804/16 และเพื่อนนิสิตประจำห้องปฏิบัติการนี้ ที่คอยให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับอุปกรณ์ในการทำงานวิจัยและเป็นกำลังใจที่ดีให้เสมอมา

ขอขอบคุณเพื่อนและรุ่นน้องทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดี สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนตลอดจนสำเร็จการศึกษา

นายฉัตรวรเชษฐ์ แซ่โกว
(Chatworachet Sae-kow)

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
-เชื้อรา <i>Aspergillus niger</i>	1
-อนุภาคทองคำนาโน	4
-การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยเชื้อรา	8
-ความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของอนุภาคทองคำนาโน	9
บทที่ 2 เครื่องมือ วัสดุ เคมีภัณฑ์	12
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	15
บทที่ 4 ผลการทดลอง	20
บทที่ 5 สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง	32
เอกสารอ้างอิง	
ภาษาอังกฤษ	37
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	44
ภาคผนวก ข	45
ภาคผนวก ค	46

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.1 ชนิดของเอมไซม์ที่สำคัญในอุตสาหกรรมที่ผลิตโดย <i>A. niger</i>	2-3
ตารางที่ 1.2 ตัวอย่างการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนทางชีวภาพด้วยสารสกัดจากแบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์และพืช	7
ตารางที่ 1.3 ตัวอย่างชนิดของเชื้อราที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน	9
ตารางที่ 1.4 ปฏิกิริยาทางเคมีที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาได้ด้วยอนุภาคทองคำนาโน	10
ตารางที่ 4.1 ขนาดโดยเฉลี่ยของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์จาก <i>A. niger</i> MSCU 0361 ในสารละลาย acetate buffer และในน้ำ	27
ตารางที่ 4.2 แสดงค่าศักย์ซีต้าของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์จาก <i>A. niger</i> MSCU 0361 ในสารละลาย acetate buffer และในน้ำ	28
ตารางที่ 4.3 แสดงค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ณ เวลาใดๆ ของสารละลายในการทดลองเร่งปฏิกิริยารีดักชัน resazurin	30

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 ลักษณะโคโลนีของรา <i>A. niger</i>	1
รูปที่ 1.2 รูปภาพวงจรชีวิต (life cycle) ของรา <i>A. niger</i>	2
รูปที่ 1.3 ความสามารถในการจับกับ ligand ที่ผิวของอนุภาคทองคำนาโน	4
รูปที่ 1.4 ตัวอย่างวิธีการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนแบ่งตามหลักการ Top-down approach และ Bottom-up approach และวิธีการในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนทั้ง 3 วิธี	6
รูปที่ 1.5 อธิบายการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนภายในเซลล์และภายนอกเซลล์เชื้อรา	8
รูปที่ 1.6 ความสามารถในการขนส่งอิเล็กตรอนของอนุภาคทองคำนาโนเพื่อเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (isomerization) ของ azobenzene	10
รูปที่ 3.1 แสดงจำนวนช่องและตำแหน่งสำหรับนับจำนวนสปอร์	15
รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของ <i>A. niger</i> MSCU0361 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA	20
รูปที่ 4.2 ลักษณะสีน้ำเลี้ยงเซลล์ (fungal filtrate) ของ <i>A. niger</i> MSCU 0361 จากสารละลาย 0.02 M H _{Au} Cl ₄	21
รูปที่ 4.3 ลักษณะสีน้ำเลี้ยงเซลล์ (fungal filtrate) ของ <i>A. niger</i> MSCU 0361 จากสารละลาย 0.3 M H _{Au} Cl ₄	22
รูปที่ 4.4 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสง	23
รูปที่ 4.5 ตะกอนของอนุภาคทองคำนาโนหลังจากปั่นเหวี่ยง	24
รูปที่ 4.6 ผล TEM ของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์จาก <i>A. niger</i> MSCU 0361 ด้วยสารละลาย 0.02 M H _{Au} Cl ₄	25-26
รูปที่ 4.7 แสดงกราฟการกระจายตัวของขนาดอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์จาก <i>A. niger</i> MSCU 0361 ด้วยสารละลาย 0.02 M H _{Au} Cl ₄	27
รูปที่ 4.8 กราฟเปรียบเทียบค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ที่ช่วงเวลา ต่างๆ	29
รูปที่ 4.9 เปรียบเทียบสีของสารละลายในการทดลองเร่งปฏิกิริยารีดักชัน resazurin ที่เวลา 0 นาที และ 60 นาที	31

บทที่ 1

บทนำ

1. เชื้อรา *Aspergillus niger*

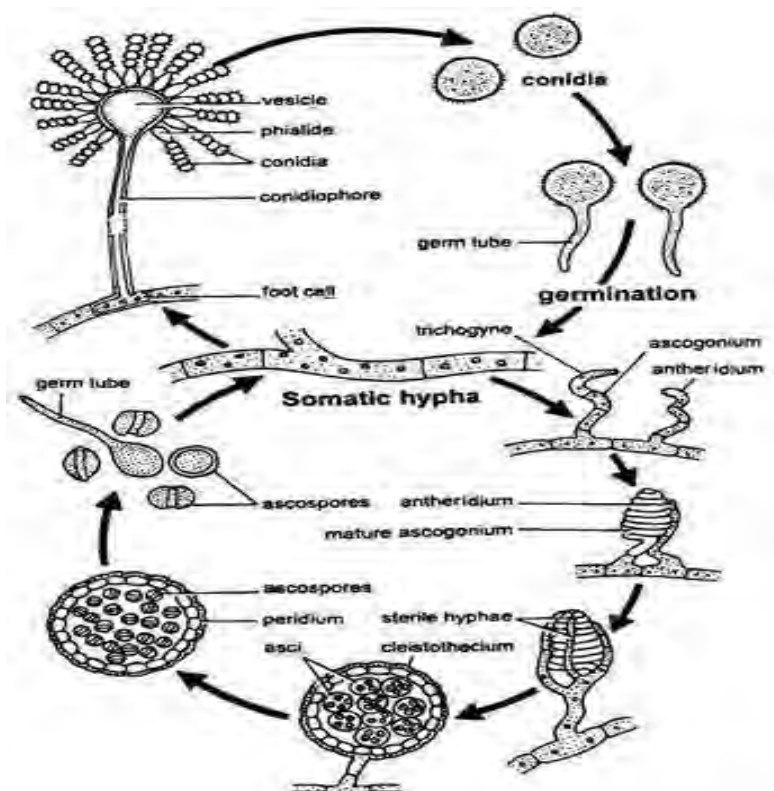
เชื้อรา *A. niger* เป็น filamentous fungi หรือเป็นราเส้นใยที่มีผนังกันและอยู่ในไฟลัม (phylum) Ascomycota โดยลักษณะเฉพาะของรา *A. niger* คือ มีโคโคนีสีเขียวเข้มหรือดำ ดังรูปที่ 1.1 ซึ่งเป็นส่วนสปอร์ของราที่สร้างมาจากโคนิเดีย (conidia) ทำให้ *A. niger* ถูกเรียกว่า “ราดำ” ในส่วนการสืบพันธุ์ของรา *A. niger* นั้นก็แบ่งออกเป็นการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนั้นจะสืบพันธุ์ด้วยการสร้างและปล่อยสปอร์ที่เรียกว่า conidia ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะสืบพันธุ์ด้วยการสร้างและปล่อยสปอร์ที่มีชื่อว่า ascospore ซึ่งอยู่ในถุงที่เรียกว่า ascus ดังรูปที่ 1.2 ซึ่งจากการสืบพันธุ์ทั้งสองแบบของ *A. niger* ทำให้รา *A. niger* สามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ

อีกหนึ่งคุณสมบัติที่สำคัญของรา *A. niger* คือ รา *A. niger* มีความสามารถในการสร้างเอมไซม์หรือเมทาบอลไลต์ที่มีส่วนสำคัญในอุตสาหกรรมได้หลากหลายชนิดทั้งภายในเซลล์และที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (Park et al., 2017) ดังตารางที่ 1.1 เชื้อรา *A. niger* จึงถูกนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย ยกตัวอย่างเช่นการใช้เอมไซม์ของ *A. niger* ผลิต citric acid (Vandenbergh et al., 2000) การหมักผลิตซีอิ้ว (soy sauce) โดยใช้เชื้อรา *A. niger* (Feng et al., 2020) เป็นต้น



รูปที่ 1.1 แสดงลักษณะโคโคนีของรา *A. niger*

ที่มา : <https://alchetron.com/Aspergillus-niger>



รูปที่ 1.2 รูปภาพวงจรชีวิต (life cycle) ของรา *A. niger* (El-Sheikh, 2016)

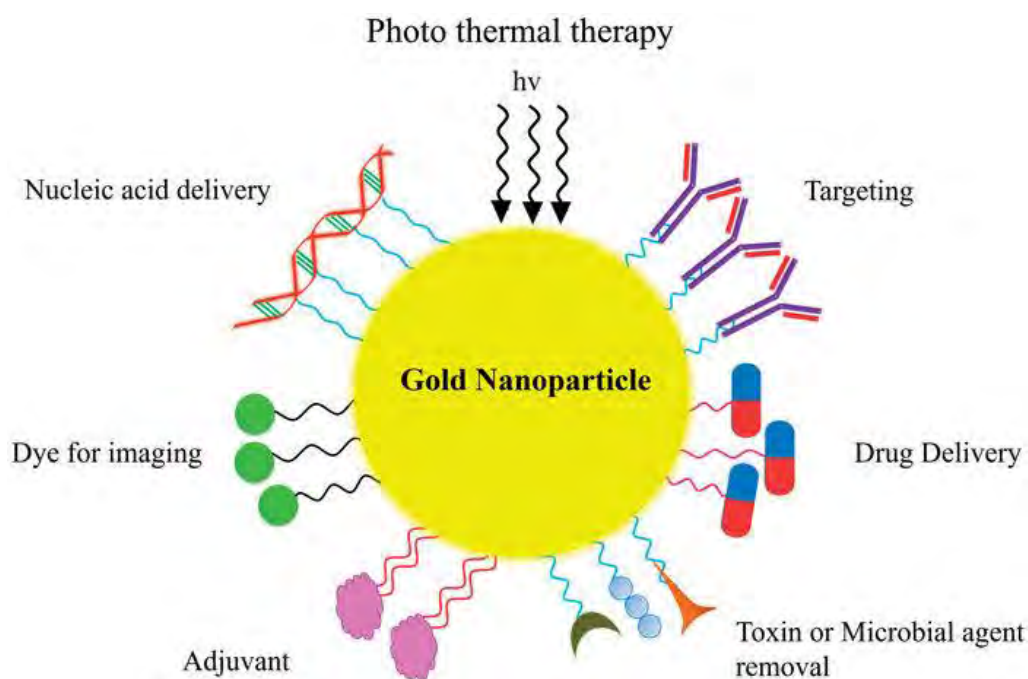
ตารางที่ 1.1 แสดงชนิดของเอนไซม์ที่สำคัญในอุตสาหกรรมที่ผลิตโดย *A. niger*

Industrial enzymes	Source	Function	Application	References
Alpha-Amylase	<i>A. niger</i>	Starch and glycogen hydrolysis	Brewing, beverage, textile and pulp	(Suganuma et al., 2007)
Aminopeptidase	<i>A. niger</i>	Cleavage of amino acids N-terminus	Brewing and soy sauce fermentation	(Marui et al., 2011)
Catalase	<i>A. niger</i>	$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	Food processing, textile and rubber production	(Pariza and Johnson, 2001)
Cellulase	<i>A. niger</i>	Cellulose hydrolysis	Drink, detergent, textile, and pulp production	(Villena and Gutierrez Correa, 2006)
Chymosin	<i>A. niger</i>	Casein hydrolysis	Milk and dairy products	(Pariza and Johnson, 2001)

Industrial enzymes	Source	Function	Application	References
Esterase	<i>A. niger</i>	Esters acid+alcohol	Cosmetics and perfumes	(Giuliani et al., 2001)
Alpha-Galactosidase	<i>A. niger</i>	Glycolipids and glycol proteins hydrolysis	Soy milk production	(Patil, Kote and Mulimani, 2009)
Beta-Glucanase	<i>A. niger</i>	beta-D-glucans hydrolysis	Grain feed industry	(Mathlouthi , Juin and Larbier, 2003)
Glucose oxidase	<i>A. niger</i>	Glucose \rightarrow H ₂ O ₂ + D-glucono-d-lactone	Breadmaking, dairy and wine/beer processing	(Wong et al, 2008)
beta-D-Glucosidase	<i>A. niger</i>	Beta-D-glucosides hydrolysis	Dyeing textiles	(Song, Imanaka, Imamura, Kajitani and Nakanishi, 2010)
Inulinase	<i>A. niger</i>	Inulin hydrolysis	Ethanol production	(Ohta, Hamada and Nakamura, 1993)
Lactase	<i>A. niger</i>	Lactose \rightarrow Galactose + glucose	Milk and dairy products	(Tosa and Shibatani, 1995)
Lipase	<i>A. niger</i>	Lipids hydrolysis	Paper, food, detergent, and textile industries	(Singh and Mukhopadhyay, 2012)
Xylanase	<i>A. niger</i>	beta-1,4-Xylan \rightarrow xylose	Bread making and beverage production	(Elgharbi, Hmida-Sayari, Zaafouri and Bejar, 2015)

2.อนุภาคทองคำนาโน (Gold nanoparticle)

อนุภาคทองคำนาโน (Gold nanoparticle : AuNP) คือ อนุภาคของทองคำที่มีขนาดตั้งแต่ 1-100 นาโนเมตร และด้วยความที่อนุภาคทองคำนาโนมีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตรทำให้มีสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่แตกต่างไปจากโลหะทองคำปกติคือมีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง ทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยาทางเคมีบริเวณพื้นที่ผิวได้ดีและพื้นที่ผิวของอนุภาคทองคำนาโนยังมีความสามารถในการจับกับ ligand ได้หลากหลายชนิด ดังรูปที่ 1.3 (Bagheri et al., 2018) จึงทำให้ในปัจจุบันอนุภาคทองคำนาโนถูกนำมาประยุกต์ใช้ทั้งด้านอุตสาหกรรม ด้านสิ่งแวดล้อมและด้านการแพทย์ ยกตัวอย่าง เช่น ด้านการแพทย์นำอนุภาคทองคำนาโนไปใช้เป็นตัวยา ทดสอบวินิจฉัยโรคและตรวจตัวหาคำแหน่งที่อยู่ของเซลล์มะเร็ง (Boisselier et al., 2009) ด้านสิ่งแวดล้อมมีการนำอนุภาคทองคำนาโนไปใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารพิษที่ปนเปื้อนมาจากน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรม (Wadhvani et al., 2018)



รูปที่ 1.3 ความสามารถในการจับกับ ligand ที่ผิวของอนุภาคทองคำนาโน (Bagheri et al., 2018)

โดยการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนแบ่งรูปแบบการสังเคราะห์ออกเป็น 2 รูปแบบคือ (1) top-down approach ซึ่งคือการสลายสารโมเลกุลขนาดใหญ่ให้เล็กลงให้กลายเป็นโครงสร้างระดับนาโน และ (2) bottom-up approach ซึ่งหมายถึงการรวมกันของอะตอมหรือโมเลกุลเล็กๆให้กลายเป็นโครงสร้างระดับนาโน ดังแสดงใน

รูปที่ 1.4 (Patra et al., 2014) และในปัจจุบันการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนมีด้วยกัน 3 วิธี ดังแสดงใน **รูปที่ 1.4** (Patra et al., 2014) ได้แก่ วิธีการสังเคราะห์ทางกายภาพ (physical method) วิธีการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical method) และวิธีการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (biological method) ดังนี้

2.1 วิธีการสังเคราะห์ทางกายภาพ (physical method)

วิธีการทางกายภาพเป็นวิธีที่ทำให้อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีความบริสุทธิ์ไม่มีการปนเปื้อนจากตัวทำละลาย อนุภาคมีการกระจายตัวได้ดี สามารถควบคุมขนาด รูปร่าง และปริมาณของอนุภาคได้ง่าย ซึ่งเป็นข้อดีของวิธีของการสังเคราะห์ทางกายภาพเมื่อเทียบกับวิธีทางเคมีและวิธีการทางชีวภาพ ตัวอย่าง วิธีการสังเคราะห์ทางกายภาพ เช่น การฉายรังสีเพื่อสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน (Freitas De Freitas et al., 2018) หรือวิธีการยิงแผ่นโลหะทองคำด้วยเลเซอร์เพื่อให้อนุภาคทองคำนาโนหลุดออกมา โดยวิธีนี้จะทำให้สามารถควบคุมขนาดและรูปร่างของอนุภาคทองคำได้ (Riabinina et al., 2012)

2.2 วิธีการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical method)

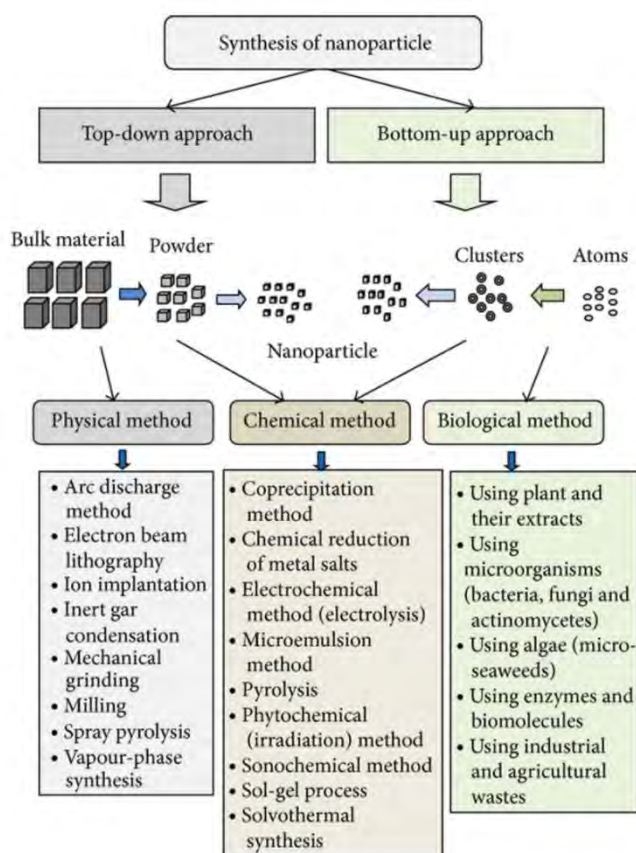
วิธีการทางเคมีเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน เนื่องจากสามารถสังเคราะห์ได้ปริมาณมาก ควบคุมขนาดและรูปร่างของอนุภาคทองคำนาโนได้ง่าย ซึ่งการสังเคราะห์ทางเคมีนั้น คือ การนำสารตั้งต้นหรือสารละลายที่มีไอออนของทองคำ (Au^{3+} : gold ion) ในรูปแบบต่างๆ มาทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันจนได้ออกมาเป็นอนุภาคทองคำนาโน (Au^0 : AuNP) ที่อยู่ในสารละลายด้วยตัวรีดิวซ์ (reducing agent) ยกตัวอย่าง เช่น การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้กรดเตตระคลอโรอริก ($HAuCl_4$) เป็นสารตั้งต้นและใช้ N-(2-hydroxyethyl)-N-methylmorpholinium tetrafluoroborate เป็นตัวรีดิวซ์ ทำให้กรดเตตระคลอโรอริกเกิดปฏิกิริยารีดักชันทองคำไอออน (Au^{3+} : gold ion) ให้กลายเป็นอนุภาคทองคำนาโน (Au^0 :AuNP) (Kim et al., 2006)

แต่ทั้งสองวิธีที่ได้กล่าวมาข้างต้นนั้นถึงแม้จะเป็นวิธีที่สังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนได้ง่ายและได้ปริมาณมาก รวมไปถึงสามารถควบคุมรูปร่างและขนาดของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ตามความต้องการแต่กลับพบว่าทั้งสองวิธีข้างต้นก็มีข้อจำกัดหรือข้อเสียที่ส่งผลกระทบต่อในหลายๆด้านเช่นกันไม่ว่าจะเป็น ด้านต้นทุนในการสังเคราะห์หรือการผลิตที่สูงเนื่องจากอุปกรณ์หรือสารเคมีที่ใช้มีราคาสูง ด้านความปลอดภัยในกระบวนการผลิต ซึ่งในการสังเคราะห์ทางกายภาพและเคมีอาจก่อให้เกิดอันตรายจากเครื่องมือหรือสารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ได้ และอีกหนึ่งข้อเสียของการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางเคมีคืออาจมีสารตกค้างหลงเหลือจากกระบวนการสังเคราะห์ทั้งในสิ่งแวดล้อมและในอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ จึงทำให้อนุภาคทองคำนาโนที่ได้นั้นไม่เหมาะสมแก่การนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ (Li et al., 2014) ส่งผลให้ในปัจจุบันนักวิจัยส่วนใหญ่จึงหันมาสนใจการสังเคราะห์อนุภาคทองคำด้วยวิธีการทางชีวภาพมากขึ้น เนื่องจากการสังเคราะห์ทางชีวภาพจะช่วย

ลดต้นทุนในการผลิตอนุภาคทองคำนาโนและไม่ทำให้เกิดสารตกค้างทั้งในสิ่งแวดล้อมและในอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ (Chen, C. C. et al., 2019)

2.3 วิธีการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (biological method)

การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพเป็นวิธีการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนโดยใช้เอมไซม์หรือเมทาบอลไลต์จาก แบคทีเรีย (Li et al., 2016) , ยีสต์ , เชื้อรา (Bhambure et al., 2009) และ พืช (Aljabali et al., 2018) มาใช้เป็นตัวรีดิวซ์ในปฏิกิริยารีดักชันแทนสารเคมี ทำให้อนุภาคทองคำนาโนที่ได้นั้นมีความเป็นพิษน้อยลงและสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิตได้ (Chen, I. H. et al., 2019) โดยในปัจจุบันก็มีการสังเคราะห์อนุภาคทองคำทางชีวภาพจากสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด ดังแสดงใน **ตารางที่ 1.2** แต่ข้อเสียของการสังเคราะห์อนุภาคทองคำทางชีวภาพ คือ ปัจจุบันยังไม่สามารถควบคุมขนาดและรูปร่างของอนุภาคทองคำนาโนให้เป็นไปตามที่ต้องการได้จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม



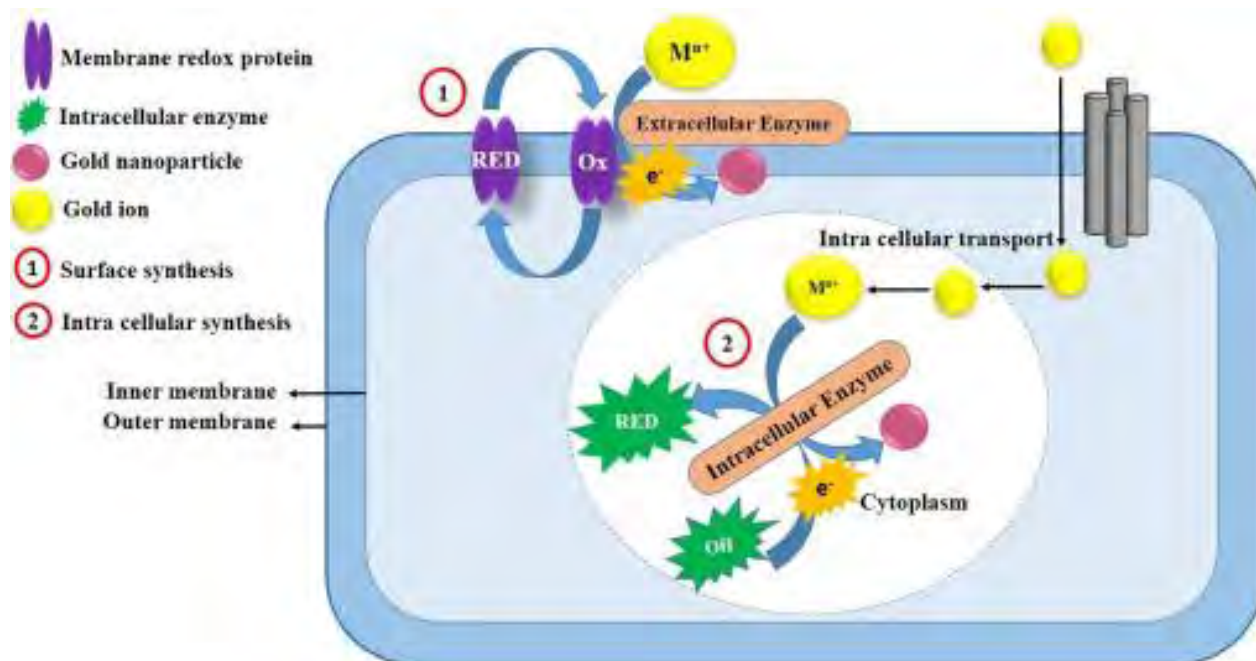
รูปที่ 1.4 ตัวอย่างวิธีการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน แบ่งตามหลักการ Top-down approach และ Bottom-up approach และวิธีการในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนทั้ง 3 วิธี (Patra et al., 2014)

ตารางที่ 1.2 ตัวอย่างการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนทางชีวภาพด้วยสารสกัดจากแบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ และพืช

สปีชีส์ (species)	ขนาดและรูปร่าง	อ้างอิง
แบคทีเรีย		
- <i>Acinetobacter</i> sp.	size 20 ± 10 nm ; polyhedral	(Wadhvani et al., 2014)
- <i>Bacillus</i> sp. GL1.3 (Psychrotolerant Antarctic bacteria)	size 30–50 nm ; spherical	(Das et al., 2020)
เชื้อรา		
- <i>Aspergillus</i> sp. WL-Au	average sizes 5.14 nm ; rod shape	(Qu et al., 2020)
- <i>Fusarium oxysporum</i>	average sizes 22 nm ; polyhedral	(Thakker et al., 2013)
ยีสต์		
- <i>Magnusiomyces ingens</i> LH-F1	average sizes 80.1 ± 9.8 nm ; spherical	(Zhang et al., 2016)
- <i>Trichosporon montevidense</i> WIN	average sizes 22.2 nm ; spherical and pseudo-spherical	(Shen et al., 2018)
พืช		
- <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (ใบอบเชย)	average sizes 25 nm ; spherical	(Smitha et al., 2009)
- <i>Rosa hybrida</i> (ใบกุหลาบ)	average sizes 10 nm ; spherical, triangular and hexagonal	(Noruzi et al., 2011)

3. การสังเคราะห์อนุภาคทองคำด้วยเชื้อรา

เชื้อราจัดเป็นเซลล์ยูคาริโอตที่ดำรงชีพด้วยการใช้สารอินทรีย์จากสิ่งมีชีวิตอื่น (heterotrophic) โดยการผลิตเอนไซม์ออกมาภายนอกเพื่อย่อยสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ให้เป็นโมเลกุลเล็กก่อนดูดซึมเข้าสู่เซลล์ ทำให้เชื้อรา มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์หลากหลายชนิดทั้งภายในเซลล์ (intracellular) และที่หลั่งออกมาภายนอก เซลล์ของเชื้อรา (extracellular) และเชื้อรายังเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีโครงสร้างผนังเซลล์ที่สามารถทนทานต่อความร้อน แรงดันออสโมซิสและความเข้มข้นของโลหะสูงๆได้ (Cabib et al., 1988) จึงทำให้เชื้อราเป็นหนึ่งในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่สำคัญสำหรับนำมาใช้สังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนทางชีวภาพ โดยจากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ที่เชื้อราผลิตทั้ง ภายในและภายนอกเซลล์มีความสามารถในการทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) เปลี่ยนไอออนของทองคำ (Au^{3+} : gold ion) ให้กลายเป็นอนุภาคทองคำนาโน (Au^0 : AuNP) ได้ ดังที่แสดงในรูปที่ 1.5 (Sengani et al., 2017) แต่จากการศึกษาในปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเอนไซม์ชนิดใดมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจึงทำให้อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อราต่างชนิดกันจะได้ขนาด รูปร่างและคุณสมบัติของอนุภาคทองคำนาโนต่างกัน ดังตารางที่ 1.3



รูปที่ 1.5 อธิบายการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนภายในเซลล์และภายนอกเซลล์เชื้อรา (Sengani et al., 2017)

ตารางที่ 1.3 ตัวอย่างชนิดของเชื้อราที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน

ชนิดของรา	Biosynthesis location	ขนาดและรูปร่าง	อ้างอิง
<i>Aspergillus</i> sp. WL-Au	Extracellular	average sizes 5.14 nm ; rod shape	(Qu et al., 2020)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Intracellular	average sizes 22 nm ; polyhedral	(Thakker et al., 2013)
<i>Cladosporium oxysporum</i>	Extracellular	average size 72.32 ± 21.80 nm ; quasi-spherical	(Bhargava et al., 2016)
<i>Trichoderma</i> sp.	Extracellular	average size 20–30 nm ; spherical	(Mishra et al., 2014)
<i>Penicillium Chrysogenum</i>	Extracellular	size 5-100 nm ; spherical, triangles and rod shapes	(Magdi et al., 2015)

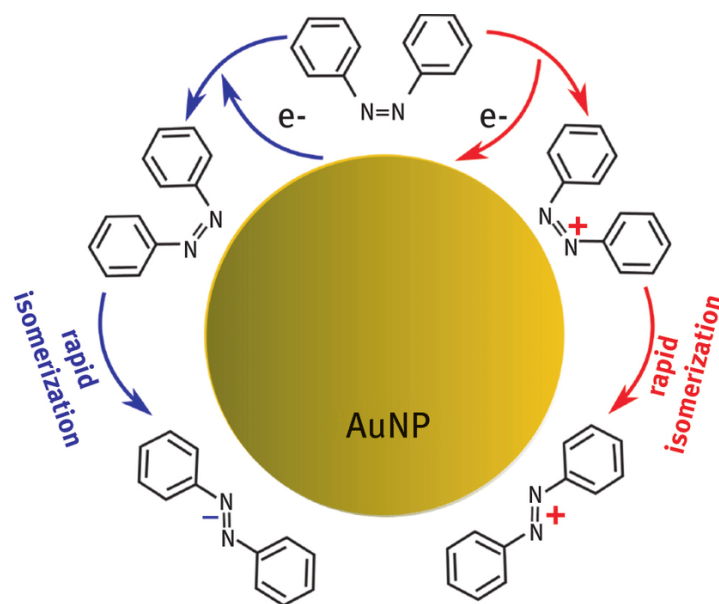
นอกจากนี้ยังพบว่ายังมีอีกหลายปัจจัยที่อาจส่งผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนทางชีวภาพ ตัวอย่างเช่น ปัจจัยทางชีวภาพ ประกอบด้วย สายพันธุ์ (species), การเจริญของเชื้อ (cultivation) และการเตรียมเชื้อ (sample preparation) ปัจจัยทางสภาวะต่างๆ (conditions) เช่น ความเป็นกรด-ด่าง (pH) อุณหภูมิ (temperature) และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (time of incubation)

ปัจจุบันการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยเชื้อราส่วนใหญ่จะเป็นการสังเคราะห์จากเอ็มไซม์หรือเมทาบอลิต์ที่เชื้อราหลั่งออกนอกเซลล์ (extracellular synthesis) เนื่องจาก ขั้นตอนในการสังเคราะห์ง่ายและสะดวกกว่าใช้การใส่เอ็นไซม์ภายในเซลล์ (intracellular synthesis) ไม่ต้องมีขั้นตอนการแยกและทำให้อนุภาคทองคำนาโนบริสุทธิ์ ไม่จำเป็นต้องทำให้เซลล์แตก ไม่มีปัญหาการปนเปื้อนจากโปรตีนหรือสารประกอบต่างๆที่ไม่ต้องการซึ่งอาจติดมาจากสารประกอบภายในเซลล์

4.ความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของอนุภาคทองคำนาโน

อนุภาคทองคำนาโนได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในหลากหลายด้านตามที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นและหนึ่งคุณสมบัติที่สำคัญของอนุภาคทองคำนาโน คือ อนุภาคทองคำนาโนมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาต่างๆได้ ดังที่แสดงใน **ตารางที่ 1.4** ซึ่งความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาต่างๆของอนุภาคทองคำนาโนนั้นเกิดจากความสามารถในการดูดซับอะตอมหรือ ligand ของพื้นผิวอนุภาคทองคำนาโนที่มีส่วนช่วยในการแลกเปลี่ยนอะตอมของสารเคมีหรือการสลายพันธะทางเคมี จนเกิดเป็นการเร่งปฏิกิริยาในที่สุด (Hvolbæk et al., 2007)

ยกตัวอย่างเช่น การอาศัยพื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโนเป็นตัวขนส่งอิเล็กตรอนเพื่อเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (isomerization) ของ azobenzene ดังแสดงใน **รูปที่ 1.6** (Marturano et al., 2017) และยังมีงานวิจัยที่สามารถยืนยันได้ว่าพื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโนมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาเคมีต่างๆ จากการค้นพบว่าอนุภาคทองคำนาโนขนาดเล็กจะมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาทางเคมีต่างๆ ได้ดีกว่าอนุภาคทองคำนาโนขนาดใหญ่ (Laoufi et al., 2011) เนื่องจากอนุภาคทองคำนาโนขนาดเล็กมีพื้นที่ผิวที่สามารถเกิดปฏิกิริยาทางเคมีได้มากกว่าอนุภาคทองคำนาโนขนาดใหญ่ และด้วยความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ของอนุภาคทองคำนาโน จึงทำให้ปัจจุบันอนุภาคทองคำนาโนถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทั้งด้านอุตสาหกรรมและด้านสิ่งแวดล้อม



รูปที่ 1.6 ความสามารถในการขนส่งอิเล็กตรอนของอนุภาคทองคำนาโนเพื่อเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (isomerization) ของ azobenzene (Marturano et al., 2017)

ตารางที่ 1.4 ปฏิกิริยาทางเคมีที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาได้ด้วยอนุภาคทองคำนาโน

ปฏิกิริยา	อ้างอิง
CO oxidation	(Laoufi et al., 2011)
Oxygen reduction	(Jin et al., 2014)
Hydrogen peroxide decomposition	(Naya et al., 2011)
Decolorization of azo dye	(Qu et al., 2017)
Reduction of nitrophenols	(Zhang et al., 2016)

ในโครงการวิจัยนี้ผู้ศึกษาต้องการศึกษาวิธีการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการสังเคราะห์เอมไซม์หรือเมทาบอลไลต์ต่างๆและหลั่งออกมาสู่ภายนอกเซลล์ได้ โดยในงานวิจัยครั้งนี้จะศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่เกิดจากปฏิกิริยารีดักชันระหว่างเอมไซม์และเมทาบอลไลต์ที่สร้างขึ้นและปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ของเชื้อ *A. niger* ใน fungal filtrate กับสารละลาย chloroauric acid (HAuCl_4) เพื่อให้เกิดการรีดิวซ์ไอออนของทองคำ (Au^{3+} : gold ion) ให้กลายเป็นอนุภาคทองคำนาโน (Au^0 : AuNP) ภายใต้การควบคุมอุณหภูมิในการเจริญของเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง เพื่อตรวจสอบการเกิดขึ้นอนุภาคทองคำนาโนด้วย UV-visible spectroscopy เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถทำได้ง่าย ส่วนการวัดขนาด รูปร่าง การกระจายตัวและความเสถียรของอนุภาคทองคำนาโน จะตรวจสอบด้วย Transmission Electron Microscopy (TEM), Dynamic Light Scattering (DLS) (Lin, et al., 2014) และ Zeta potential แล้วนำผลที่ได้ทั้งหมดมาศึกษาปัจจัยในเรื่องของสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกันของการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในสารละลาย acetate buffer และในน้ำที่มีผลต่อขนาด รูปร่างและการกระจายตัวของอนุภาคทองคำนาโน นอกจากนี้ผู้ศึกษาได้นำอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อรา *A. niger* มาทดสอบว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยารีดักชัน resazurin ได้หรือไม่ และหากมีความสามารถมีมากน้อยแค่ไหน เนื่องจากปฏิกิริยารีดักชัน resazurin เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้เร็วสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงได้ง่าย อีกทั้งยังมีประโยชน์ในการใช้ตรวจสอบการมีอยู่ของเชื้อแบคทีเรียได้อีกด้วย ดังนั้นจึงเลือกปฏิกิริยารีดักชัน resazurin มาใช้ในการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ทางชีวภาพ

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาและพัฒนาการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนโดยใช้ fungal filtrate ของเชื้อรา *A. niger*
2. เพื่อศึกษาขนาดและรูปร่างของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์จาก fungal filtrate ของเชื้อรา *A. niger*
3. เพื่อทดสอบคุณสมบัติของอนุภาคทองคำนาโนในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ต่อปฏิกิริยา รีดักชัน resazurin ให้เป็น resorufin

บทที่ 2

เครื่องมือ วัสดุ เคมีภัณฑ์

2.1 เครื่องมือ วัสดุ และเคมีภัณฑ์

เครื่องมือ

- 1) กรวยแก้ว
- 2) กระบอกตวงปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- 3) กระบอกตวงปริมาตร 500 มิลลิลิตร
- 4) แท่งแก้ว spreader
- 5) ขวด Erlenmeyer flask 250 ml ของบริษัท ISO Laborgerate GmbH ประเทศ เยอรมัน
- 6) ขวดใส่สารเคมี ขนาด 500 ml และ 1000 ml ของบริษัท DWK Life Science ประเทศ เยอรมัน
- 7) เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) 30 องศาเซลเซียส รุ่น INNOVA 4330 ของบริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 8) เครื่องชั่งหยاب แบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น PG 2002-s ของบริษัท Metler Toledo ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- 9) เครื่องชั่งหยابขนาดเล็ก ของบริษัท Camry
- 10) เครื่องอบฆ่าเชื้อขนาดเล็ก (Autoclave) รุ่น ES-215 ของบริษัท TOMY Seiko ประเทศญี่ปุ่น และเครื่องอบฆ่าเชื้อขนาดใหญ่ (Autoclave) รุ่น ES-315 ของบริษัท TOMY Seiko ประเทศญี่ปุ่น
- 11) เครื่องปั่นเหวี่ยงสารตกตะกอนขนาดเล็ก microcentrifuge (spin down) รุ่น KUBOTA 3700 ของบริษัท KUBOTA ประเทศญี่ปุ่น
- 12) เครื่องปั่นเหวี่ยงสารตกตะกอนขนาดกลาง (floor top refrigerated centrifuge with rotors) รุ่น KUBOTA5922 ของบริษัท KUBOTA ประเทศญี่ปุ่น
- 13) เครื่องทำความร้อนชนิดตั้งโต๊ะ (heat plate) รุ่น MS-H280-Pro ของบริษัท Scilogex ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 14) เครื่องมีอนับจำนวนเซลล์ (hemocytometer) ของบริษัท LW Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 15) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscopy) รุ่น CH30RF200 ของบริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น

- 16) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrometer) รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Spectronic ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 17) เครื่องนาโนทรอป (NanoDrop spectrophotometer) รุ่น Nanodrop 2000c ของ บริษัท Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 18) ตู้ชีวนิรภัย (biosafety cabinet) ของบริษัท LabMicrotech ประเทศไทย
- 19) ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U71V ของบริษัท Sanyo Electric Co. ประเทศญี่ปุ่น
- 20) ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Contherm Digital Series
- 21) ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (incubator) ของบริษัท Memmert ประเทศ เยอรมัน
- 22) ไมโครปิเปตต์ ปริมาตร 10 100 และ 1000 ไมโครลิตร ของบริษัท Capp Bravo ประเทศ เยอรมัน
- 23) อุปกรณ์นับจำนวน (Hand tally counter) ของบริษัท GOGO for digit ประเทศจีน
- 24) Automatic pipette ของบริษัท DLAB Levo Plus
- 25) เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น K-550 GE ของบริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 26) เครื่องเขย่าสารใช้เสียงความถี่สูง (Ultrasonic sonicator) ของบริษัท Elma ประเทศ เยอรมัน

วัสดุ

- 1) เพลตพลาสติก (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 (Whatmann No.1) ของบริษัท GE Healthcare
- 6) ผ้าก๊อต
- 7) ปิเปตพลาสติก (plastic pipette) ขนาด 5, 10 และ 25 มิลลิลิตร ของบริษัท SPL LifeScience
- 8) พาสเจอร์ปิเปต (pasteur pipette) ของบริษัท Volac
- 9) ฟิวเตอร์ขนาด 0.2 ไมครอน (filter) ของบริษัท GE Healthcare
- 10) หลอดฉีดยา 5 มิลลิลิตร (syringe) ของบริษัท Nipro ประเทศไทย

เคมีภัณฑ์

- 1) 85% กลีเซอรอล (85% glycerol) ของบริษัท Himedia
- 2) ผงอาหารเลี้ยงราสำเร็จรูปโปเตโต้เด็คโตริกโทส (potato dextrose broth) ของบริษัท Himedia
- 3) ผงอาหารเลี้ยงแบคทีเรียสำเร็จรูป (nutrient broth) ของบริษัท Himedia
- 4) ผงวุ้น (agar) ของบริษัท Himedia
- 5) Tween-20 ของบริษัท Life science
- 6) โกลคโลไรด์ (Gold chloride, AuCl₄)

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 ประเทศ ญี่ปุ่น เครื่องมือจากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 2) เครื่องมือวัดขนาดด้วยแสงตกกระทบ (Dynamic light scatter) ของบริษัท Malvern Instruments ประเทศอังกฤษ เครื่องมือจากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เชื้อรา

เชื้อราที่ใช้ในการทดลองนี้ได้รับจาก MSCU Microbial Culture Collection ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเชื้อราที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน ได้แก่

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

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 วิธีดำเนินการทดลอง

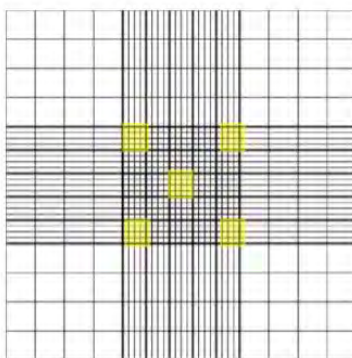
3.1.1 การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน

3.1.1.1 การเตรียมเชื้อสำหรับการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน

นำเชื้อรา *A. niger* จาก MSCU Microbial Culture Collection ที่คัดแยกมาจากดิน โดยห้องปฏิบัติการของ รองศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เรืองสำราญ ที่เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (4 วัน) เมื่อเชื้อเจริญเต็มทีลักษณะโคโลนีของ *A. niger* ที่เจริญบนจานอาหารจะเป็นสีเขียวเข้มและมีการสร้างสปอร์สีดำ

3.1.1.2 การเก็บสปอร์และนับจำนวนสปอร์

หลังจากที่เลี้ยงเชื้อจนเจริญเต็มที่แล้วจะเก็บสปอร์โดยการเติม 0.2 % Tween-20 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารที่มีราเจริญอยู่ จากนั้นจะใช้แท่ง spreader ที่ฆ่าเชื้อด้วย 95% ethanol ขูดเบาๆบริเวณโคโลนีเพื่อให้สปอร์หลุดออกแล้วดูดส่วนสารละลายที่มีสปอร์รวมอยู่กรองผ่านผ้าก๊อซที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเพื่อนำเส้นใยราที่อาจปนเปื้อนมาออกก่อน จากนั้นจะนำสปอร์ไปนับจำนวนด้วย hemocytometer โดยดูดสารละลายที่มีสปอร์อยู่ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นค่อยๆปล่อยสารละลายให้ไหลผ่านแผ่นปิดเพลทแก้ว (cover slip) เข้าไปยังช่องว่างที่มีเส้นตาราง (counting chamber grid) อยู่จนเต็มช่องทำแบบเดียวกันกับอีกด้านหนึ่งระมัดระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศเพราะจะทำให้เกิดความผิดพลาดในการนับได้ วิธีการนับสปอร์จะทำได้โดยใช้การมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า จะสังเกตเห็นช่องตารางตรงกลางจะมีทั้งหมด 25 ช่องใหญ่ แต่จะนับเพียง 5 ช่องใหญ่เท่านั้น ดังแสดงใน **รูปที่ 3.1** และทำซ้ำเช่นเดียวกันกับอีกด้านนำจำนวนสปอร์ที่นับได้จากทั้ง 2 ด้านรวมกันและหาค่าเฉลี่ย และนำมาคิดตามสูตรคำนวณด้านล่าง



รูปที่ 3.1 แสดงจำนวนช่องและตำแหน่งสำหรับนับจำนวนสปอร์

ที่มา : <https://www.abcam.com/protocols/counting-cells-using-a-hemocytometer>

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

ซึ่ง df = dilution factor

n = จำนวนค่าเฉลี่ยสปอร์ที่นับได้

3.1.1.3 การเตรียม fungal filtrate

ใส่สปอร์ที่ได้นับแล้วตามขั้นตอน 3.1.1.2 จำนวน 10^6 สปอร์ ลงในอาหาร PDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นนำ *A. niger* มากรองเพื่อเก็บ fungal biomass ด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกส่วนอาหารและส่วนของ fungal biomass ออกก่อน ขั้นตอนต่อมาล้าง fungal biomass ของราด้วยน้ำปราศเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 50 มิลลิลิตร เพื่อล้างส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อาจจะยังติดอยู่กับ biomass ออก ทิ้งไว้สักพักเพื่อพักให้น้ำกรองออกจนหมดและนำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งตั้งโต๊ะขนาดเล็กให้มีน้ำหนักของ fungal biomass ของเชื้อเท่ากับ 30 กรัม จากนั้นนำ fungal biomass ใส่ลงในขวด flask ปริมาตร 250 มิลลิลิตร และเติมน้ำปราศจากเชื้อลงไป 60 มิลลิลิตร สุดท้ายนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน หลังจากครบ 4 วัน แล้วนำมากรองส่วน fungal biomass ออกด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อเก็บส่วน fungal filtrate ไว้ใช้ในขั้นตอนการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนต่อไป

3.1.1.4 สังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน

3.1.1.4.1 สังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในสารละลาย acetate buffer

เติมสารละลาย 0.02 M HAuCl_4 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่มี fungal filtrate ของรา *A. niger* 450 ไมโครลิตร ที่ผสมอยู่กับสารละลาย acetate buffer (pH 4.6) 450 ไมโครลิตร จากนั้นนำเอาหลอดทดลองที่มีสารละลายทั้งสามดังกล่าวผสมอยู่นั้นเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 15-20 นาที สังเกตการณ์เปลี่ยนสีของสารละลายและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.1.1.4.2 สังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในน้ำ

เติมสารละลาย HAuCl_4 0.02 M 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่มี fungal filtrate ของรา *A. niger* 450 ไมโครลิตร ที่ผสมอยู่กับน้ำปราศจากเชื้อ 450 ไมโครลิตร จากนั้นนำเอาหลอดทดลองที่มีสารละลายทั้งสามดังกล่าวผสมอยู่นั้นเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 15-20 นาที สังเกตการณ์เปลี่ยนสีของสารละลายและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.1.1.5 การแยกอนุภาคทองคำนาโนออกจาก fungal filtrate

นำอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จากข้อ 3.1.1.4.1 และ 3.1.1.4.2 ใส่ลงในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำจนกว่าสารละลายจะใสหรือพบว่าอนุภาคทองคำนาโนตกตะกอนลงก้นหลอดจนหมด จากนั้นค่อยๆดูดส่วนของเหลวออกให้ได้มากที่สุดระวังอย่าให้อนุภาคทองคำนาโนที่ก้นหลอดฟุ้ง จากนั้นทำให้อนุภาคทองคำนาโนละลายด้วยการเติมน้ำปราศจากเชื้อ

3.2.1 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-visible spectrometry

นำอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จากข้อ 3.1.1.4.1 และ 3.1.1.4.2 มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-visible spectrometry ที่ช่วงคลื่นตั้งแต่ 200-800 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง NanoDrop2200 เป็นวิธีพื้นฐานเพื่อยืนยันการเกิดอนุภาคทองคำนาโน โดยอนุภาคทองคำนาโนจะมีค่าการดูดกลืนแสงจำเพาะระหว่าง 530-560 นาโนเมตร โดยขั้นตอนการวัดค่าจะใช้ น้ำปราศจากเชื้อเป็น blank จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในสารละลายที่แตกต่างกันในข้อ 3.1.1.4.1 และ 3.1.1.4.2 ซึ่งเป็นกลุ่มทดลองที่คาดว่ามิ้อนุภาคทองคำนาโนเกิดขึ้นเปรียบเทียบกับสารละลาย 0.02 M HAuCl₄ ผสมกับน้ำที่ใช้เป็นชุดควบคุม

3.2.2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อทำ Dynamic Light Scattering (DLS) และ Zeta potential

นำอนุภาคทองคำนาโนปั่นแยกส่วน fungal filtrate ออกแล้วมาละลายด้วยน้ำปราศจากเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) จากนั้นย้ายสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปใส่ลงในหลอดทดลอง ขนาดเล็กปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมน้ำปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรสุทธิ 3 มิลลิลิตร และส่งตัวอย่างที่เตรียมได้ไปที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.3 การเตรียมตัวอย่างเพื่อทำ Transmission Electron Microscopy (TEM)

นำอนุภาคทองคำนาโนปั่นแยกส่วน fungal filtrate ออกแล้ว มาละลายด้วยน้ำปราศจากเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) ปิเปตสารละลายมา 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด microtube หลอดใหม่ จากนั้นเติมน้ำ deionized ปราศจากเชื้อลงไปอีก 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันปิดฝาหลอดด้วย พาราฟินและห่อด้วยฟอยล์เพื่อไม่ให้สารละลายโดนแสง จากนั้นส่งตัวอย่างไปเพื่อเตรียมและส่องกล้อง TEM (transmission electron microscope) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.4 การศึกษาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยารีดักชัน Resazurin ของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จาก *A. niger*

3.2.4.1 สังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน

เตรียมเชื้อและ fungal filtrate เช่นเดียวกันกับกับข้อ 3.1.1.1 – 3.1.1.3 แล้วเติมสารละลาย 0.3 M HAuCl₄ 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่มี fungal filtrate ของรา *A. niger* 450 ไมโครลิตร ผสมอยู่กับสารละลาย acetate buffer (pH 4.6) 450 ไมโครลิตร จากนั้นนำเอาหลอดทดลองนั้นเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 60 - 90 นาที สังเกตการณ์เปลี่ยนสีของสารละลาย

3.2.4.2 การแยกอนุภาคทองคำนาโนออกจาก fungal filtrate

นำอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จากข้อ 3.2.4.1 ใส่ลงในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำเช่นเดิมจนสารละลายใสและพบว่าอนุภาคทองคำนาโนตกตะกอนจนหมด จากนั้นค่อยๆดูดส่วนของเหลวออกให้ได้มากที่สุดระวังอย่าให้อนุภาคทองคำนาโนที่กั้นหลอดฟุ้งดูดจนของเหลวหมด แล้วนำไประเหยแห้งโดยเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ภายใต้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำอนุภาคทองคำนาโนที่ได้ไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียดเพื่อวัดน้ำหนักแห้งในหน่วยมิลลิกรัม แล้วเติมน้ำปราศจากเชื้อเพื่อปรับให้มีความเข้มข้นเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บเป็น stock เพื่อใช้ในการทดสอบการเร่งปฏิกิริยา resazurin

3.2.4.3 เตรียมสารละลาย Hydroxylamine

ชั่งสาร Hydroxylamine Hydrochloride ให้ได้น้ำหนัก 6.9 มิลลิกรัม แล้วนำไปละลายในน้ำ 1 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้สารละลาย Hydroxylamine ที่มีความเข้มข้น 0.1 M

3.2.4.4 เตรียมสารละลาย resazurin

ชั่งสาร resazurin sodium salt ให้ได้น้ำหนัก 6.3 มิลลิกรัม แล้วนำไปละลายในน้ำ 2.5 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้สารละลาย resazurin ที่มีความเข้มข้น 10 mM หลังจากนั้นนำสารละลาย resazurin ที่ได้ใส่หลอด syringe ขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วกรองสารละลายผ่าน microfilter 0.2 ไมครอน เก็บสารละลาย resazurin ที่ผ่านการกรองเรียบร้อยแล้วไว้ในตู้เย็น

3.2.4.5 ทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยารีดักชัน resazurin ให้เป็น resorufin ของอนุภาคทองคำนาโน

นำสารละลายอนุภาคทองคำนาโนในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ได้ในข้อ 3.2.4.2 มาทำให้ละลายอย่างสมบูรณ์ด้วยการใช้คลื่นเสียงโดยเครื่อง Sonicator bath จากนั้นนำสารละลายอนุภาคทองคำนาโนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 100 ไมโครลิตร ผสมเข้ากับสารละลาย 0.1 M Hydroxylamine 40 ไมโครลิตร และสารละลาย 10 mM resazurin 200 ไมโครลิตร ลงในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมชุดควบคุมของการทดลองนี้ 2 ชุดคือ 1) สารละลาย 10 mM resazurin 200 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำปราศจากเชื้อ 140 ไมโครลิตร 2) สารละลายอนุภาคทองคำนาโนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่ได้ทั้งหมดไปตรวจติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.2.4.6. ตรวจติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วย UV-visible spectrometry

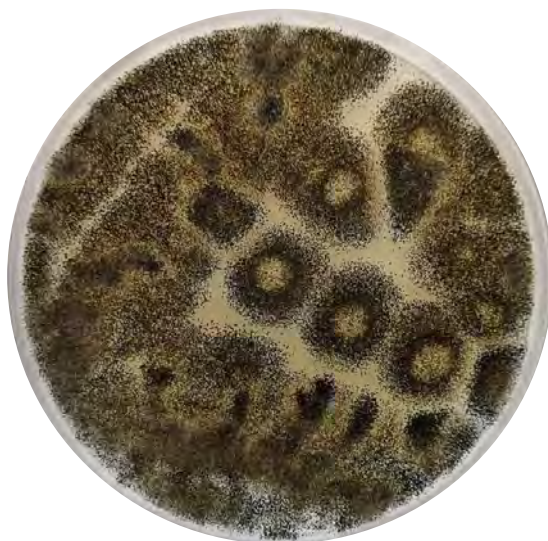
นำสารละลายที่ได้ทั้ง 4 จากข้อ 3.2.4.5 มาตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยการวัดความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง NaNoDrop2200 เพื่อตรวจสอบการเกิด resorufin เนื่องจาก resorufin จะมีค่าการดูดกลืนแสงจำเพาะที่ประมาณ 570 นาโนเมตร โดยขั้นตอนการวัดค่าจะใช้น้ำปราศจากเชื้อเป็น blank และจะตรวจสอบสารละลายแต่ละหลอดเมื่อเกิดปฏิกิริยาที่เวลา 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 และ 36 นาที สังเกตการณ์การดูดกลืนแสงและจดบันทึกค่าการดูดกลืนที่ 570 นาโนเมตร

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

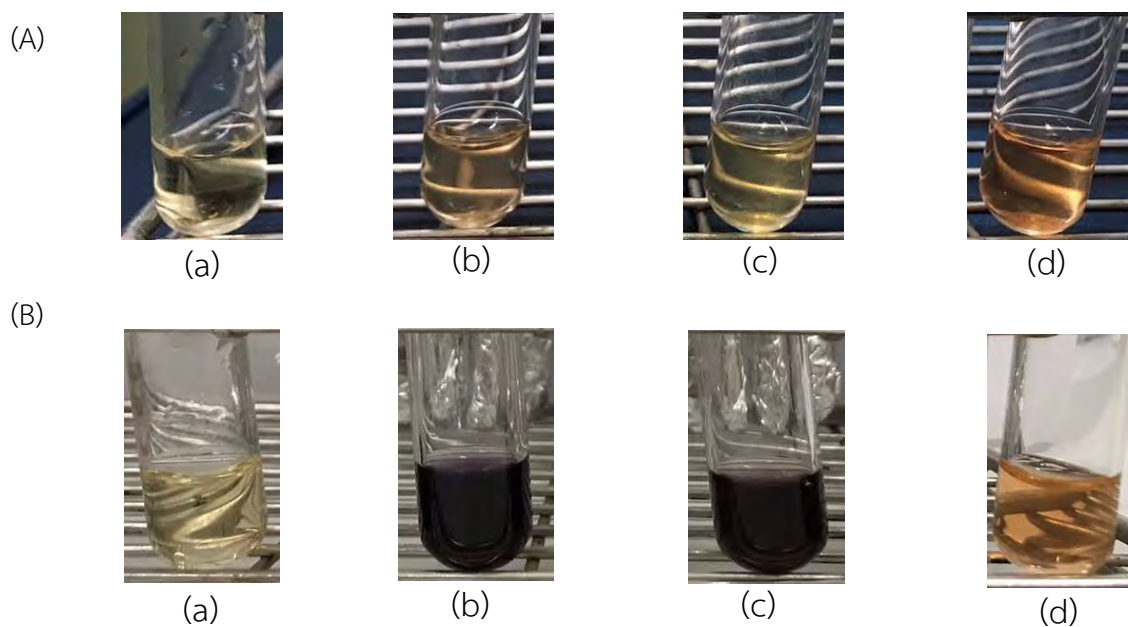
จากการเลี้ยงเชื้อ *A. niger* MSCU 0361 ที่ได้จาก Microbial Culture Collection จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ป่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ของ *A. niger* MSCU 0361 ในระยะแรกโคโลนีมีสีเขียวแต่เมื่อราเจริญได้เต็มที่จะมีการสร้างสปอร์เกิดขึ้นทำให้สีของโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มและมีบริเวณที่มีสีดำเป็นบริเวณที่รามีการสร้างสปอร์ขึ้น ดังแสดงใน **รูปที่ 4.1**



รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของ *A. niger* MSCU 0361 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

4.2 ผลการเปลี่ยนสีของสาร

จากการทดลองสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในข้อ 3.1.1.4 พบว่าน้ำเลี้ยงเซลล์ (fungal filtrate) ของ *A. niger* MSCU 0361 ที่ผสมด้วยสารละลาย acetate buffer หรือน้ำ แล้วนำมาเติมด้วยสารละลาย 0.02 M HAuCl_4 และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด พบการเปลี่ยนแปลงสีของน้ำเลี้ยงเซลล์เปลี่ยนจากสีเหลืองอมส้มใสเป็นสีม่วง **รูปที่ 4.2** ภายในเวลา 10-15 นาที ซึ่งเป็นผลที่เกิดจากสมบัติการดูดกลืนของอนุภาคทองคำนาโนแสดงถึงการเกิดปฏิกิริยารีดักชันและเกิดการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนขึ้นภายในสารละลาย



รูปที่ 4.2 ลักษณะสีน้ำเลี้ยงเซลล์ (fungal filtrate) ของ *A. niger* MSCU 0361 (A) หลังเติมสารละลาย HAuCl_4 0 นาที (B) หลังเติมสารละลาย HAuCl_4 15 นาที ; (a) acetate buffer+ fungal filtrate (b) acetate buffer+ fungal filtrate + HAuCl_4 (c) H_2O + fungal filtrate + HAuCl_4 (d) H_2O + fungal filtrate

และจากการทดลองสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในข้อ 3.2.4.1 พบว่าน้ำเลี้ยงเซลล์ (fungal filtrate) ของ *A. niger* MSCU 0361 ที่ผสมด้วยสารละลาย acetate buffer แล้วเติมด้วยสารละลาย 0.3 M HAuCl₄ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด พบการเปลี่ยนแปลงสีของน้ำเลี้ยงเซลล์เปลี่ยนจากสีเหลืองใสเป็นสีม่วงดำ **รูปที่ 4.3** ภายในเวลา 60-90 นาที

(A)



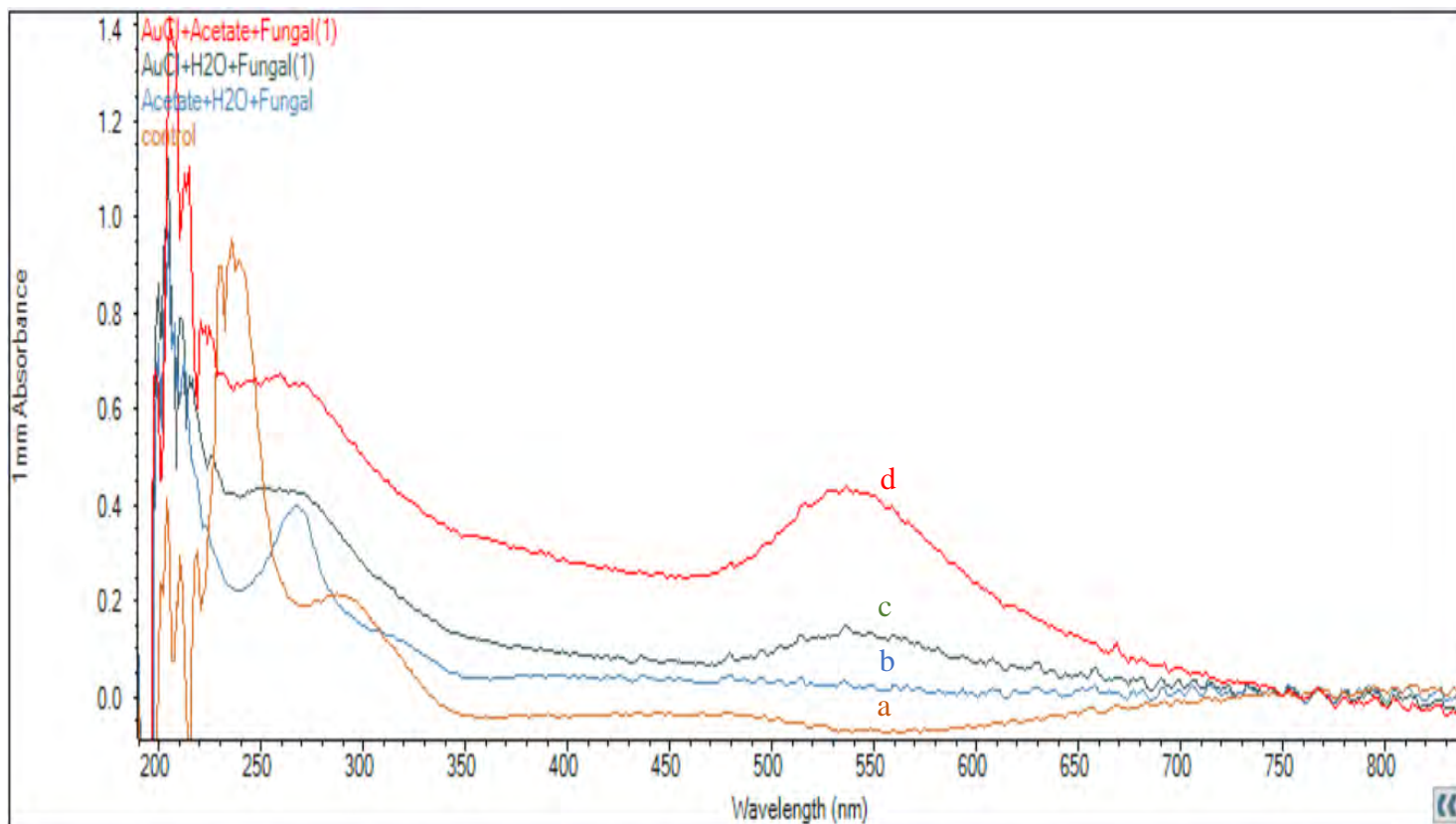
(B)



รูปที่ 4.3 ลักษณะสีน้ำเลี้ยงเซลล์ (fungal filtrate) ของ *A. niger* MSCU 0361 (A) ก่อนเติมสารละลาย 0.3 M HAuCl₄ ในสารละลาย acetate buffer + fungal filtrate (B) หลังเติมสารละลาย 0.3 M HAuCl₄ ในสารละลาย acetate buffer + fungal filtrate 60-90 นาที

4.3 ผลค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำนาโน

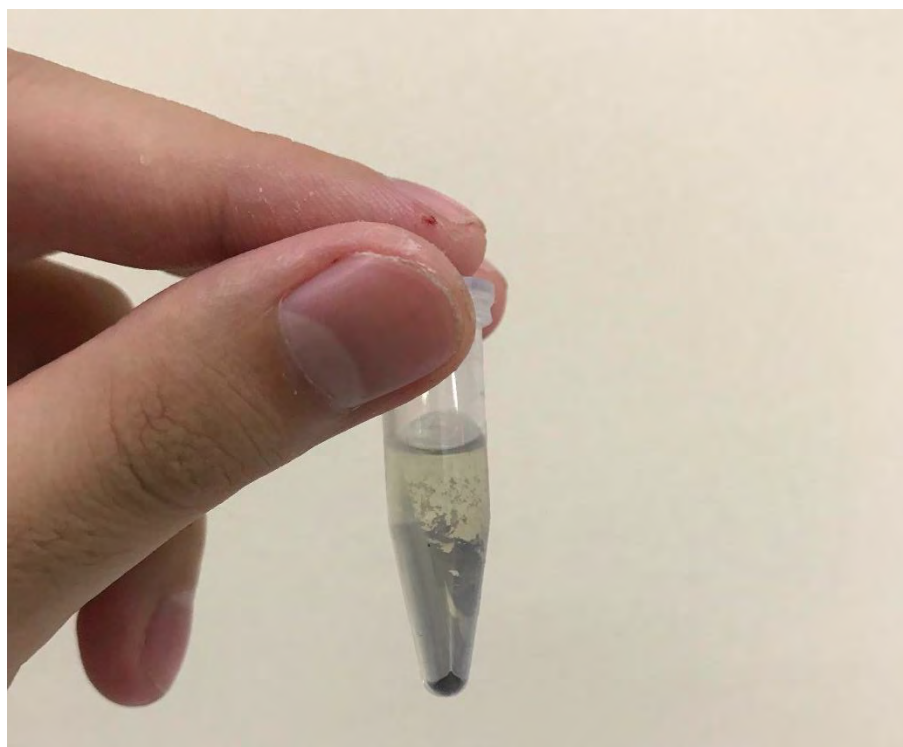
การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่เกิดขึ้นนอกจากสามารถสังเกตจากการเปลี่ยนสีของสารละลายแล้วยังสามารถวิเคราะห์ได้จากค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร ด้วย UV-visible spectrometer จากผลที่แสดงใน **รูปที่ 4.4** พบการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 530-570 นาโนเมตร ของสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจากน้ำเลี้ยงเชื้อของ *A. niger* MSCU 0361 ที่เติมสารละลาย 0.02 M HAuCl₄ ในสารละลาย acetate buffer และในน้ำ ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในสารละลาย acetate buffer และในน้ำ เท่ากับ 0.433 และ 0.143 ตามลำดับ ที่ความยาวคลื่น 536 นาโนเมตร ส่วนสารละลาย 0.02 M HAuCl₄ ที่ผสมกับสารละลาย acetate buffer และน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผสมกับสารละลาย acetate buffer และน้ำ ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมไม่พบค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 530-570 นาโนเมตร และจากกราฟของชุดทดลองทั้งสองที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อจะพบการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ซึ่งอาจเกิดจากการดูดกลืนแสงของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนหรือเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย 0.02 M HAuCl₄ ที่ผสมกับ acetate buffer (a), น้ำเลี้ยงเชื้อผสมกับสารละลาย acetate buffer และน้ำ (b), สารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อของ *A. niger* MSCU 0361 ในน้ำ (c) และในสารละลาย acetate buffer (d)

4.4 การปั่นแยกอนุภาคทองคำนาโน

ขั้นตอนการแยกอนุภาคทองคำนาโนออกจากส่วนที่เป็นของเหลวโดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จะสังเกตเห็นตะกอนเล็กๆอยู่ที่ก้นหลอดดังแสดงใน **รูปที่ 4.5** ซึ่งตะกอนเหล่านี้คือ อนุภาคทองคำนาโนที่ได้จากการสังเคราะห์และเมื่อนำอนุภาคทองคำนาโนที่ได้จากการสังเคราะห์โดยใช้สารละลาย 0.3 M HAuCl_4 ในสารละลาย acetate buffer ไประเหยให้แห้งภายใต้อุณหภูมิต่ำเพื่อให้ส่วนของเหลวออกหมด เป็นเวลา 3 วัน วัตุน้ำหนักออกมาได้ 0.49 มิลลิกรัม

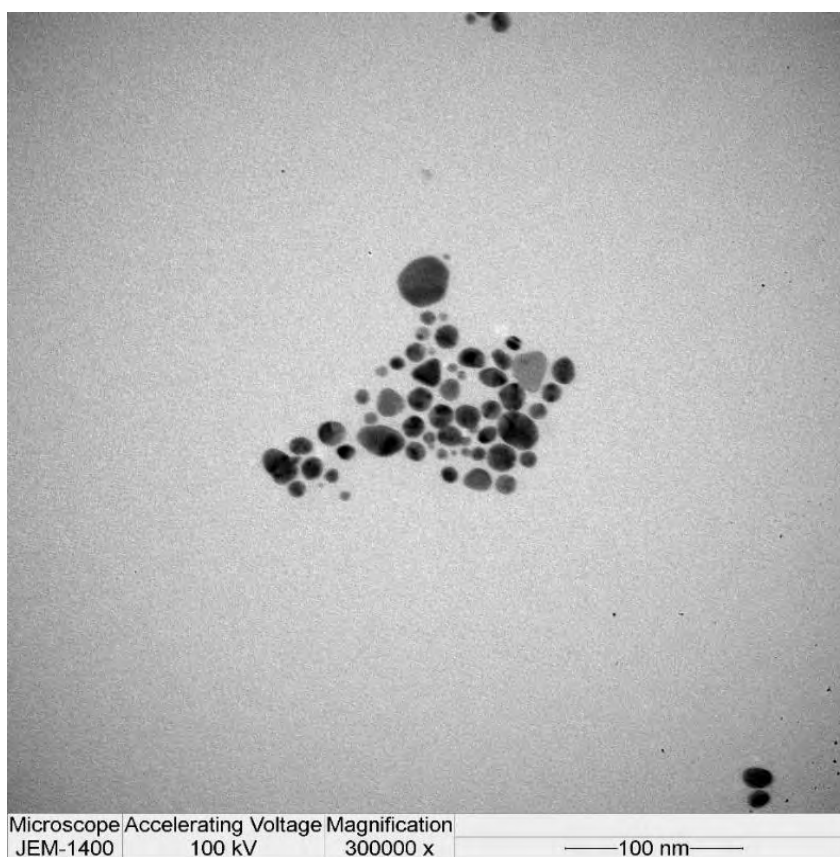


รูปที่ 4.5 ตะกอนของอนุภาคทองคำนาโนหลังจากปั่นเหวี่ยง

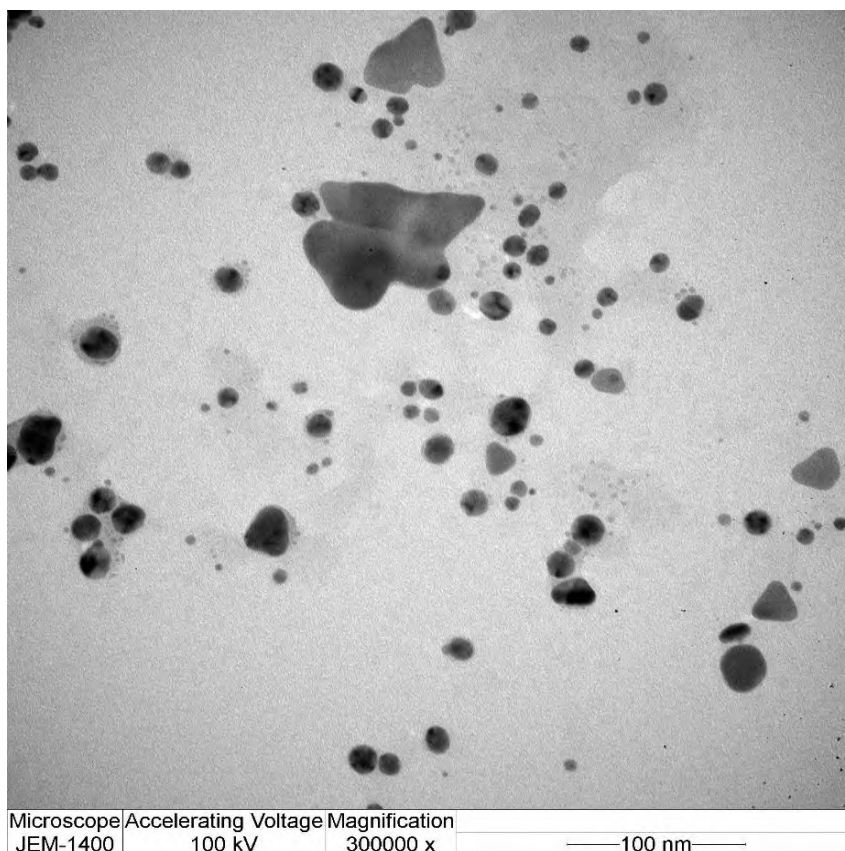
4.5 ผลการวิเคราะห์ลักษณะรูปร่างของอนุภาคทองคำนาโนด้วย Transmission Electron Microscopy (TEM)

จากผลการวิเคราะห์รูปร่างและการกระจายตัวของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์จาก *A. niger* MSCU 0361 ในสารละลาย acetate buffer และในน้ำ ด้วยกล้อง TEM พบว่าลักษณะรูปร่างของอนุภาคทองคำนาโนที่ได้จากการสังเคราะห์ในสารละลาย acetate buffer มีความสม่ำเสมอของรูปร่างมากกว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ในน้ำหรือกล่าวคืออนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ในสารละลาย acetate buffer พบรูปร่างส่วนใหญ่เป็นทรงกลม ส่วนอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ในน้ำพบว่า มีทั้งทรงกลม สามเหลี่ยมและรูปร่างไม่แน่นอน ในส่วนของการกระจายตัวพบว่าการกระจายตัวของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ในสารละลาย acetate buffer มีการเกาะกลุ่มกันมากกว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ในน้ำซึ่งมีการกระจายตัวอย่างกระจัดกระจาย ไม่เป็นระเบียบ ดังรูปที่ 4.6

(A)



(B)



รูปที่ 4.6 ผล TEM ของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์จาก *A. niger* MSCU 0361 ในสารละลาย acetate buffer (A) และในน้ำ (B)

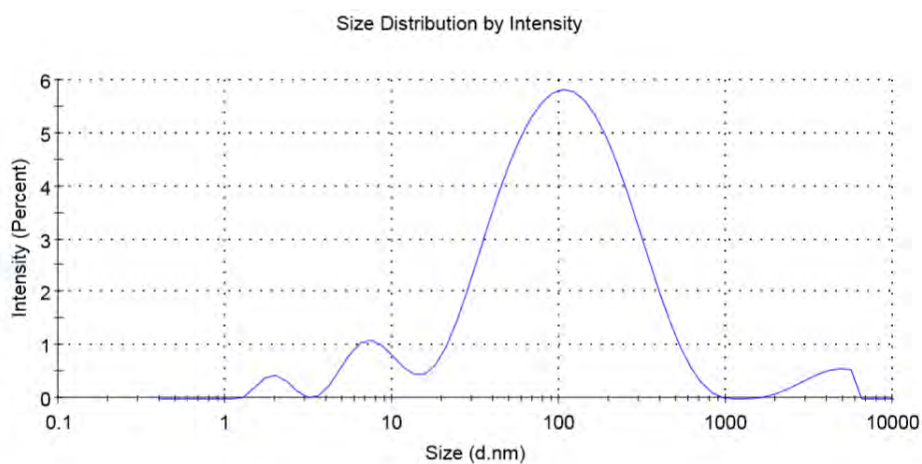
4.6 ผลการวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี Dynamic Light Scattering (DLS)

ผลการวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคทองคำนาโนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย DLS ซึ่งอาศัยหลักการตรวจวัดความถี่ที่เปลี่ยนแปลงของแสงที่กระเจิงจากพื้นผิวอนุภาคที่เคลื่อนที่แบบ Brownian ในการทดลองนี้ได้นำอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์จาก *A. niger* MSCU 0361 ซึ่งเตรียมได้จากขั้นตอนที่ 3.1.1.4.1 และ 3.1.1.4.2 ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DLS พบว่าขนาดของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จาก *A. niger* MSCU 0361 ในสารละลาย acetate buffer มีขนาดอยู่ในช่วง 8 - 3950 นาโนเมตร ดังรูปที่ 4.7 มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 63.31 นาโนเมตร และมีค่า polydispersity index (PDI) เท่ากับ 0.592 ดัง ตารางที่ 4.1 ส่วนอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จาก *A. niger* MSCU 0361 ในน้ำมีขนาดอยู่ในช่วง 160 - 4673 นาโนเมตร ดังรูปที่ 4.7 มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 90.07 นาโนเมตร และมีค่า PDI เท่ากับ 0.497 ดังตารางที่ 4.1

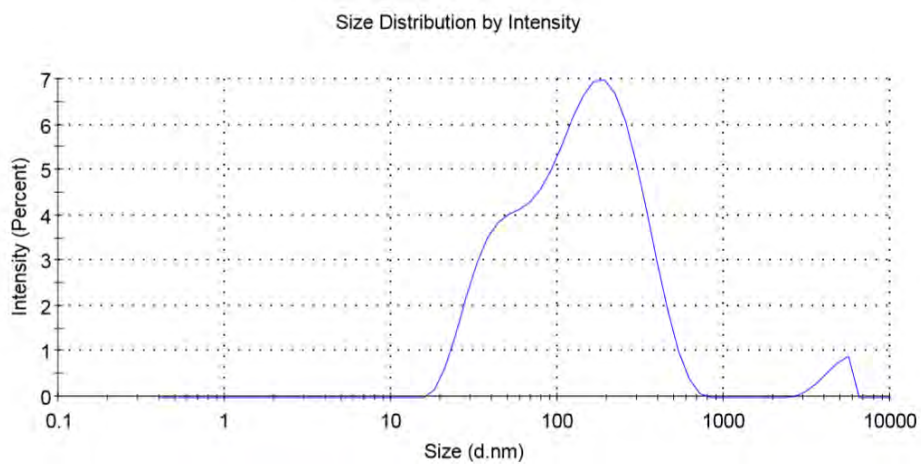
ตารางที่ 4.1 ขนาดโดยเฉลี่ยของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์จาก *A. niger* MSCU 0361 ในสารละลาย acetate buffer และในน้ำ

ชุดการทดลอง	Average particle size (nm)	Average PDI
ในสารละลาย acetate buffer	63.31	0.592
ในน้ำ	90.07	0.497

(A)



(B)



รูปที่ 4.7 กราฟการกระจายตัวของขนาดอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์จาก *A. niger* MSCU 0361 ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลาย 0.02 M HAuCl_4 ในสารละลาย acetate buffer (A) ในน้ำ (B)

4.7 ผลการวิเคราะห์ความเสถียรของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี Zeta potential

ผลของ Zeta potential ซึ่งเป็นค่าความแตกต่างของประจุไฟฟ้าระหว่างชั้นความหนาแน่นของไอออนที่อยู่รอบๆอนุภาคทองคำนาโนและประจุในของเหลวที่อยู่ล้อมรอบอนุภาคทองคำนาโน (มีหน่วยเป็นมิลลิโวลต์) และพบว่าโดยปกติอนุภาคทองคำนาโนจะเสถียรเมื่อศักย์ซีต้ามีค่ามากกว่า + 20 mV หรือ น้อยกว่า -20 mV ซึ่งผลการวิเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ในการทดลองนี้ด้วย Zeta potential พบว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จาก *A. niger* MSCU 0361 โดยใช้สารละลาย acetate buffer และใช้น้ำ มีค่าศักย์ซีต้า เท่ากับ -24.8 มิลลิโวลต์ และ -22.8 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.2 จึงสามารถแปลผลได้ว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ในการทดลองนี้ค่อนข้างเสถียร

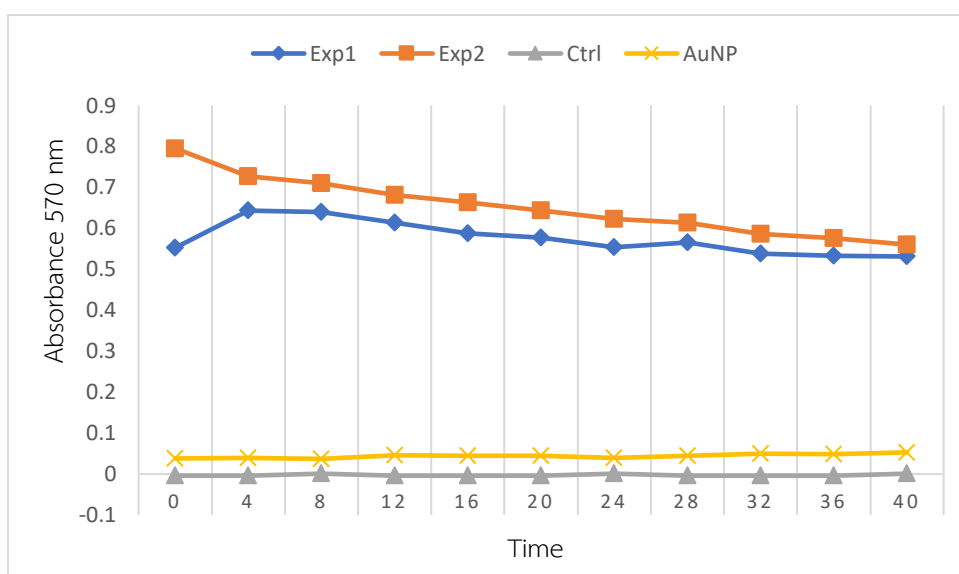
ตารางที่ 4.2 แสดงค่าศักย์ซีต้าของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์จาก *A. niger* MSCU 0361 ในสารละลาย acetate buffer และในน้ำ

ชุดการทดลอง	ค่าศักย์ซีต้า (mV)
ในสารละลาย acetate buffer	-24.8
ในน้ำ	-22.8

4.8 ผลการเร่งปฏิกิริยารีดักชัน resazurin เป็น resorufin ด้วยอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จาก *A. niger* MSCU 0361

ผลจากการศึกษาการเร่งปฏิกิริยารีดักชัน resazurin เป็น resorufin ด้วยอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จาก *A. niger* MSCU 0361 โดยการใช้สารละลาย 0.3 M HAuCl₄ ในสารละลาย acetate buffer ซึ่งตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ทุกๆ 4 นาที ด้วย UV-visible spectrometer เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร เป็นค่าการดูดกลืนแสงของ resorufin จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ในเวลาที่ต่างๆของแต่ละสารละลายมาสร้างกราฟเปรียบเทียบกันระหว่างสารละลายที่เร่งปฏิกิริยาการรีดักชันด้วยอนุภาคทองคำนาโน สารละลายที่ไม่ได้เร่งปฏิกิริยารีดักชันด้วยอนุภาคทองคำนาโน อนุภาคทองคำนาโน และสารละลาย resazurin ที่ไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมได้ผลดัง **รูปที่ 4.8** และจากผลการทดลองพบว่าในสารละลายที่เร่งปฏิกิริยาการรีดักชันด้วยอนุภาคทองคำนาโนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.795 ตั้งแต่การวัดค่าการดูดกลืนแสงในครั้งแรกหรือทันทีหลังใส่อนุภาคทองคำนาโนลงไปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (0 นาที) **ตารางที่ 4.3** ส่วนในสารละลายที่ไม่ได้เร่งปฏิกิริยารีดักชันด้วยอนุภาคทองคำนาโนวัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.643 ที่เวลา 4 นาที หลังเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันด้วย 0.1 M hydroxylamine ดังแสดงใน **ตารางที่ 4.3** ส่วนในสารละลาย resazurin และสารละลายอนุภาคทองคำนาโนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิลิตร ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงเมื่อเวลาผ่านไป ดังแสดงใน **ตารางที่ 4.3** และเมื่อเปรียบเทียบสีของสารละลายที่เวลา 0 นาที พบว่าสีของสารละลายที่เหนียวทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันทั้งที่เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโนและไม่ได้เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโนมีสีของสารละลายเป็นสีม่วงเข้ม ซึ่งแตกต่างจากสีของสารละลาย resazurin ที่ไม่ได้เหนียวทำให้เกิดปฏิกิริยาซึ่งมีสารละลายเป็นสีน้ำเงิน ดัง**รูปที่ 4.9** แต่เมื่อเปรียบเทียบสีของสารละลายที่เวลา 60 นาที หลังเหนียวทำให้เกิดปฏิกิริยาพบว่าสีของสารละลายที่เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโนและสารละลายที่ไม่ได้เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโนเปลี่ยนแปลงเป็นสีชมพูอมม่วงแต่สีของสารละลายที่เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโนมีสีของสารละลายที่อ่อนกว่า ส่วนสีของสารละลาย resazurin ที่ไม่ได้เหนียวทำให้เกิดปฏิกิริยาไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ดัง**รูปที่ 4.9**

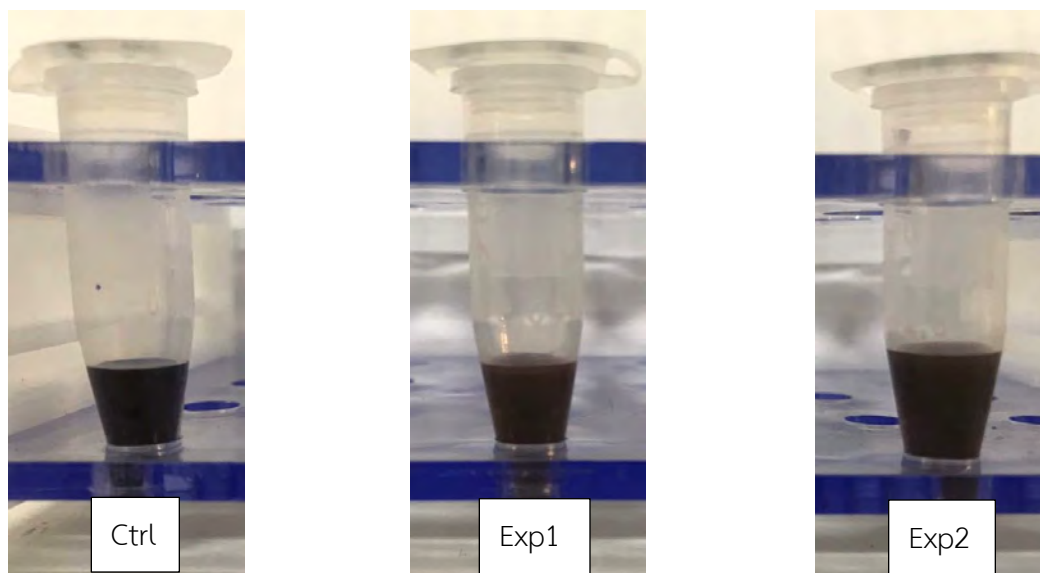


รูปที่ 4.8 กราฟเปรียบเทียบค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ณ เวลาใดๆ ; สารละลายที่ไม่ได้เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโน (Exp1), สารละลายที่เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำ (Exp2), สารละลาย 10 mM resazurin (Ctrl) และสารละลายอนุภาคทองคำนาโนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (AuNP)

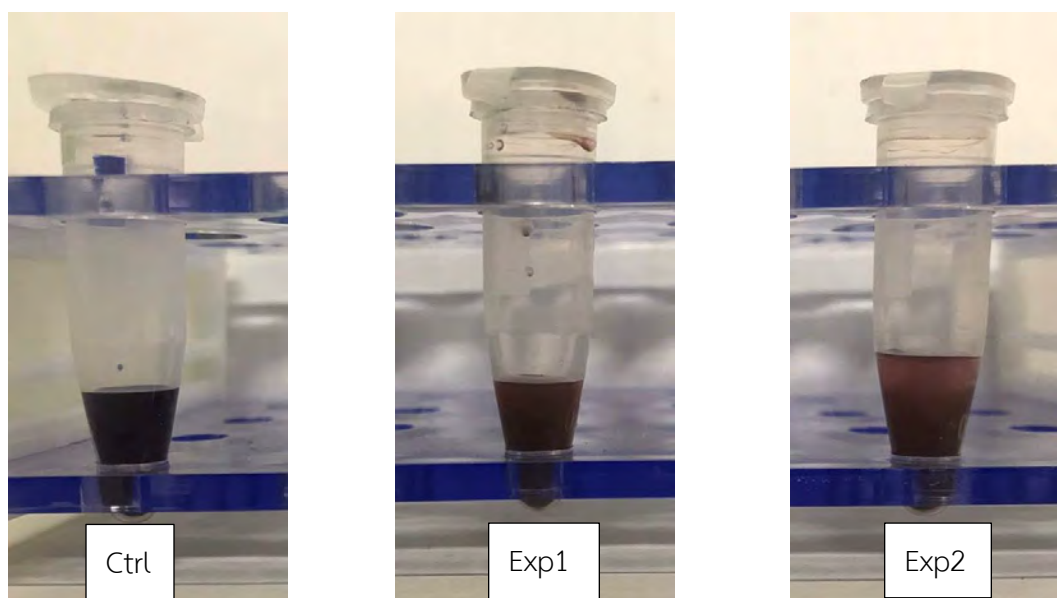
ตารางที่ 4.3 แสดงค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ณ เวลาใดๆของสารละลาย ; สารละลายที่ไม่ได้เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโน (Exp1), สารละลายที่เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำ (Exp2), สารละลาย 10mM resazurin (Ctrl) และสารละลายอนุภาคทองคำนาโน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (AuNP)

ค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm (ค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงของ resorufin)				
เวลา	Exp1	Exp2	Ctrl	AuNP
0	0.552	0.795	-0.004	0.038
4	0.643	0.727	-0.004	0.039
8	0.639	0.71	0.001	0.037
12	0.614	0.681	-0.004	0.046
16	0.587	0.663	-0.004	0.044
20	0.577	0.643	-0.004	0.044
24	0.554	0.623	0.001	0.04
28	0.565	0.613	-0.004	0.044
32	0.538	0.586	-0.004	0.05
36	0.533	0.576	-0.004	0.048
40	0.531	0.56	0.001	0.053

(A)



(B)



รูปที่ 4.9 เปรียบเทียบสีของสารละลายที่เวลา 0 นาที (A) และ 60 นาที (B) หลังการเกิดปฏิกิริยา ;
Ctrl : สารละลาย 10mM resazurin, Exp1 : สารละลายที่ไม่ได้เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโน,
Exp2 : สารละลายที่เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำ

บทที่ 5

สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ศึกษาเกี่ยวกับการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน (AuNP) ด้วยวิธีการทางชีวภาพ (biosynthesis) จากน้ำเลี้ยงเซลล์เชื้อรา (fungal filtrate) ของเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ซึ่งเคยมีการรายงานว่าการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนมีความเกี่ยวข้องกับเอนไซม์หรือเมทาบอลิต์ที่เชื้อราสร้างและหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งมีความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนของทองคำ (Au^{3+} : gold ion) ในสารละลายไฮดรอกลอร์ไรด์ ($HAuCl_4$) ให้กลายเป็นอนุภาคทองคำนาโน (Au^0 : AuNP) ได้ ซึ่งงานวิจัยนี้ต้องการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้เชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 เพื่อนำอนุภาคทองคำนาโนมาศึกษารูปร่าง ลักษณะ ขนาด ความเสถียรและความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยารีดักชัน resazurin ให้การกลายเป็น resorufin โดยจากการทดลองพบว่าในงานวิจัยนี้สามารถสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนได้โดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายน้ำเลี้ยงเซลล์เชื้อราที่เติมสารละลาย $HAuCl_4$ ลงไป จากสีเหลืองอมส้มในช่วงแรกเป็นสีม่วงถึงม่วงดำเมื่อเวลาผ่านไปและจากการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ในช่วงความยาวคลื่น 530-560 นาโนเมตร ด้วย UV-visible spectrometer ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายน้ำเลี้ยงเชื้อเมื่อเติมสารละลาย $HAuCl_4$ ลงไปและการพบความสามารถในการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำนาโนในช่วงความยาวคลื่น 530-560 นาโนเมตร เกิดจากอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีปรากฏการณ์เชิงแสงที่เรียกว่า surface plasmon resonance (SPR) จึงเป็นเหตุให้สมบัติการดูดกลืนแสงของสารละลายเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเกิดการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนขึ้นภายในสารละลาย (El-Brolossy et al., 2008) แต่จากผลการทดลองพบว่าสีของสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในสารละลาย acetate buffer โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย $HAuCl_4$ ที่แตกต่างกันคือ 0.02 M และ 0.3 M ให้การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายที่แตกต่างกันคือสีม่วงและสีม่วงอมดำ อีกทั้งยังใช้เวลาในการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายแตกต่างกันอีกด้วย โดยสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนโดยใช้สารละลาย 0.02 M $HAuCl_4$ พบการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายหลังเติมสารละลาย 0.02 M $HAuCl_4$ ลงในน้ำเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 15 นาที ส่วนสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนโดยใช้สารละลาย 0.3 M $HAuCl_4$ พบการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายหลังเติมสารละลาย 0.3 M $HAuCl_4$ ลงในน้ำเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 60 นาที ซึ่งคาดว่าที่ผลการทดลองเป็นเช่นนี้อาจเป็นผลมาจากความเข้มข้นของสารละลาย $HAuCl_4$ ที่ใช้มีความเข้มข้นมากเกินไปและไม่เหมาะสมกับปริมาณของโปรตีนหรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในน้ำเลี้ยงเชื้ออาจทำให้โปรตีนหรือเอนไซม์นั้นถูกทำลายหรือเสียสภาพจากสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลง pH อย่างรวดเร็วด้วยความเข้มข้นของสารละลาย $HAuCl_4$ ที่มากเกินไป (Roy et al., 2016) ส่งผลให้กระบวนการสังเคราะห์เกิดขึ้นช้าลงและขนาด รูปร่างรวมถึงปริมาณของอนุภาคทองคำนาโนที่ได้เปลี่ยนแปลงไปสีของสารละลายที่ได้จึงแตกต่างกัน

ส่วนค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่มากที่สุดในช่วงความยาวคลื่น 530-560 นาโนเมตร ของสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนค้ำจาก *A. niger* MSCU 0361 ในสารละลาย acetate buffer และในน้ำ พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.433 และ 0.143 ตามลำดับ ที่ความยาวคลื่น 536 นาโนเมตร ซึ่งค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกันนี้สามารถบ่งบอกได้ว่าปริมาณของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ในสารละลาย acetate buffer มากกว่าปริมาณของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ในน้ำ เนื่องจากค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในสารละลาย acetate buffer มีค่ามากกว่าค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในน้ำ โดยที่ผลการทดลองเป็นเช่นนี้คาดว่าน่าจะเป็นผลมาจาก acetate buffer มีความสามารถในการควบคุมความเป็นกรด-ด่างได้ดีกว่าน้ำทำให้สภาวะในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนคงที่และเหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนมากกว่าสภาวะการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในน้ำ (Parial et al., 2014)

ในส่วนผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยกล้อง TEM, dynamic light scattering (DLS) และ Zeta potential พบว่ามีความแตกต่างกันของการกระจายตัว ขนาดและความเสถียรของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จาก *A. niger* MSCU 0361 ในสารละลาย acetate buffer และในน้ำ โดยผลจาก TEM แสดงให้เห็นว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ในสารละลาย acetate buffer มีรูปร่างส่วนใหญ่เป็นทรงกลม เกาะกลุ่มกันดี ส่วนอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ในน้ำพบว่ามีรูปร่างหลากหลายไม่ว่าจะเป็นทรงกลม สามเหลี่ยมและรูปร่างไม่แน่นอน มีการกระจายตัวของอนุภาคทองคำนาโนอย่างไม่เป็นระเบียบ ซึ่งที่ผลของการกระจายตัวและรูปร่างที่แตกต่างกันนี้ คาดว่าเกิดจากสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนเช่นเดียวกันกับเหตุผลที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นในเรื่องความแตกต่างของปริมาณอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ในสารละลาย acetate buffer และในน้ำ นอกจากนี้ขนาดเฉลี่ยของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ในสารละลาย acetate buffer และในน้ำที่วัดได้จากวิธี DLS มีค่าแตกต่างกันคือ 63.31 นาโนเมตร และ 90.07 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยการตรวจวัดขนาดด้วยวิธี DLS เป็นวิธีที่วัดขนาดของอนุภาคโดยอาศัยหลักการวัดการกระเจิงแสงที่ตกกระทบกับพื้นผิวของอนุภาคหรือโมเลกุลของสารที่เคลือบอยู่บนผิว ซึ่งหากพบว่าขนาดเฉลี่ยที่ได้มีค่าแตกต่างกันก็อาจจะแปลผลได้ว่าสารหรือโมเลกุลที่เคลือบอยู่บนผิวอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ในสารละลาย acetate buffer และในน้ำน่าจะมีขนาดแตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามขนาดเฉลี่ยที่ได้จากวิธี DLS อาจมีความคลาดเคลื่อนหากมีการทับซ้อนกันของอนุภาคทองคำนาโน เนื่องจากการตรวจวัดขนาดของอนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธี DLS จะไม่สามารถแยกวัดขนาดของอนุภาคทองคำนาโนที่ทับซ้อนกันได้ นอกจากขนาดแล้ววิธีการตรวจวัดด้วย DLS ยังสามารถบอกการกระจายตัวของขนาดอนุภาคทองคำนาโนได้จากค่า polydispersity index (PDI) ซึ่งอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ในสารละลาย acetate buffer และในน้ำ มีค่า PDI เท่ากับ 0.592 และ 0.497 ตามลำดับ จึงสามารถบอกได้ว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ใน acetate buffer และในน้ำมีการกระจายตัวแบบไม่สม่ำเสมอ

ส่วนผลของการวิเคราะห์ด้วย Zeta potential พบว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ในสารละลาย acetate buffer และในน้ำ มีค่าศักย์ซีต้า เท่ากับ -24.8 mV และ -22.8 mV ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่มากกว่า $+20$ mV หรือน้อยกว่า -20 mV (Thilagam et al., 2020) จึงสามารถสรุปผลออกมาได้ว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ในสารละลาย acetate buffer และในน้ำค่อนข้างเสถียรแต่ที่ค่าศักย์ซีต้าแตกต่างกันนั้นคาดว่าเกิดจากสภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน เช่น ความเป็นกรดต่างที่แตกต่างกันส่งผลให้การทำงานของเอมไซม์หรือเมทาบอลิต์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ทำงานได้มากน้อยต่างกัน (Wang et al., 2014) หรืออาจเกิดจากสารและโมเลกุลที่เคลือบอยู่บนผิวอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ในสารละลาย acetate buffer และในน้ำมีความแตกต่างกัน

การทดสอบความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาต่อปฏิกิริยารีดักชัน resazurin ให้เป็น resorufin ของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 โดยใช้สารละลาย 0.3 M HAuCl_4 ในสารละลาย acetate buffer ด้วยการตรวจสอบการเกิดขึ้นของ resorufin จากการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ทุกๆ 4 นาที หลังเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชัน resazurin เนื่องจาก resorufin มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร (Wang et al., 1998) ซึ่งผลจากการทดลองพบว่าสารละลายที่เหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชัน resazurin และใส่อนุภาคทองคำนาโนลงไปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร เท่ากับ 0.795 ตั้งแต่ตรวจวัดการดูดกลืนแสงในครั้งแรกหรือที่ 0 นาที และค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร จะลดลงเรื่อยๆเมื่อเวลาผ่านไป ส่วนสารละลายที่เหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันแต่ไม่ได้ใส่อนุภาคทองคำนาโนลงไปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร เท่ากับ 0.552 ที่เวลา 4 นาทีหลังเกิดปฏิกิริยา หลังจากนั้นค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร จะลดลงเรื่อยๆเมื่อเวลาผ่านไป โดยผลการทดลองที่ได้สามารถสรุปได้ว่าในสารละลายที่เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโนพบการเปลี่ยน resazurin เป็น resorufin ได้รวดเร็วกว่าในสารละลายที่ไม่ได้เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโน เนื่องจากสารละลายที่เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโนสามารถวัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ได้ตั้งแต่วัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงในครั้งแรกหรือที่ 0 นาที ซึ่งเร็วกว่าสารละลายที่ไม่ได้เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโนที่วัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงได้หลังจากเกิดปฏิกิริยาไปแล้ว 4 นาที อีกทั้งค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงรวมทั้งความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ที่วัดได้จากสารละลายที่เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโนยังมีค่ามากกว่าค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงรวมทั้งที่วัดได้จากสารละลายที่ไม่ได้เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโนหรือแปลผลออกมาได้ว่าปริมาณของ resorufin ที่เกิดขึ้นในสารละลายที่เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโนมีปริมาณมากกว่าปริมาณของ resorufin ที่เกิดขึ้นในสารละลายที่ไม่ได้เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโน แต่จากผลการทดลองที่พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ลดลงหรือปริมาณของ resorufin ในสารละลายทั้งสองลดลง คาดว่าน่าจะเกิดจาก

การที่ resorufin ที่เกิดขึ้นภายในสารละลายทั้งสองเกิดปฏิกิริยารีดักชันต่อไปทำให้ resorufin กลายเป็น dihydroresorufin (Song et al., 2014) ซึ่งไม่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ได้ ส่งผลให้ค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงรวมที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ของสารละลายทั้งสองลดลงหรือปริมาณของ resorufin ที่เกิดขึ้นภายในสารละลายทั้งสองลดลงเมื่อเวลาผ่านไปและในส่วนสีของสารละลายทั้งที่เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโนและไม่ได้เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโนเมื่อเวลาผ่านไป 60 นาทีนับตั้งแต่เริ่มเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาพบว่าสีของสารละลายทั้งสองเปลี่ยนจากสีม่วงเข้มเป็นสีม่วงอมชมพูแต่แตกต่างกันที่สารละลายที่เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโนนั้นมีสีม่วงอมชมพูอ่อนมากกว่าสารละลายที่ไม่ได้เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโนซึ่งสีม่วงอมชมพูเข้ม โดยที่สีของสารละลายทั้งสองมีความแตกต่างกันนี้คาดว่าน่าจะเกิดจากการที่สารละลายที่เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโนนั้นหลังเกิดปฏิกิริยาผ่านไป 60 นาทีแล้วมีปริมาณของ resorufin (สีชมพู) เกิดขึ้นภายในสารละลายมากกว่าในสารละลายที่ไม่ได้เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโนหรือกล่าวคือภายในสารละลายที่ไม่ได้เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโนยังคงมีปริมาณ resazurin (สีน้ำเงิน)หลงเหลืออยู่มากสีของสารละลายที่ได้หลังเกิดปฏิกิริยาผ่านไป 60 นาทีจึงเป็นสีม่วงอมชมพูเข้ม

ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้ในการทดลองนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยารีดักชัน resazurin จึงควรทำการทดลองซ้ำโดยปรับระยะเวลาในการตรวจติดตามการเกิดปฏิกิริยาหรือการเพิ่มขึ้นของค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ resorufin ใช้ดูดกลืนแสงจาก ทุกๆ 4 นาที เปลี่ยนเป็นทุกๆ 30 นาที ทุกๆ 15 วินาที และ ทุกๆ 5 วินาที เนื่องจาก จากผลการตรวจวัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ทุกๆ 4 นาที ที่ได้ในงานทดลองนี้พบว่าสามารถตรวจวัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ในสารละลายที่เร่งปฏิกิริยารีดักชัน resazurin ด้วยอนุภาคทองคำนาโนได้ตั้งแต่ครั้งแรกที่ตรวจวัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาในการรีดักชัน resazurin นั้นเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วในหน่วยวินาที ดังนั้น หากต้องการตรวจวัดการเกิดขึ้นของ resorufin ที่ได้จากปฏิกิริยารีดักชัน resazurin ควรตรวจวัดในหน่วยวินาทีและควรทำทันทีหลังเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยา เพื่อให้ทราบถึงเวลาที่แน่นอนในเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยน resazurin ให้เป็น resorufin ของทั้งสารละลายที่เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโนและสารละลายที่ไม่ได้เร่งปฏิกิริยาด้วยอนุภาคทองคำนาโน ซึ่งจะช่วยให้สามารถนำเวลาที่แน่นอนในเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยน resazurin ให้เป็น resorufin ของสารละลายทั้งสองมาเปรียบเทียบให้เห็นความสามารถในการเร่งปฏิกิริยารีดักชันของอนุภาคทองคำนาโนได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้นและจะทำให้สามารถยืนยันความสามารถในการเร่งปฏิกิริยารีดักชัน resazurin ของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์จากเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ในการทดลองนี้ได้

จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 มีความสามารถในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนแต่ผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในสารละลาย acetate buffer และในน้ำ มีปริมาณ ขนาด รูปร่างและคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่างกัน อย่างไรก็ตาม

ตามเนื่องจากในปัจจุบันยังไม่ทราบถึงกลไกที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่แน่ชัดจึงอาจจะมีปัจจัยอื่นนอกจากค่าความเป็นกรด-ด่างที่อาจส่งผลต่อคุณสมบัติของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้เช่นกัน (Mishra et al., 2014) ในส่วนของการทดลองที่ศึกษาความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยารีดักชัน resazurin ให้กลายเป็น resorufin ของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จาก *A. niger* MSCU 0361 พบว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีแนวโน้มที่จะสามารถเร่งปฏิกิริยารีดักชัน resazurin ให้กลายเป็น resorufin ได้แต่ผลการทดลองที่ได้ยังไม่ชัดเจน จึงควรทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จาก *A. niger* MSCU 0361 มีความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยารีดักชัน resazurin ให้กลายเป็น resorufin ได้จริงดังที่กล่าวไปข้างต้น อีกทั้งยังควรได้รับการศึกษาเพิ่มเติมให้เข้าใจถึงกลไกในการเร่งปฏิกิริยารีดักชันของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จาก *A. niger* MSCU 0361 เพื่อที่จะนำความรู้และความเข้าใจในกลไกการเร่งปฏิกิริยารีดักชันของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จาก *A. niger* MSCU 0361 ไปใช้สำหรับการทดลองและพัฒนาให้สามารถนำอนุภาคทองคำนาโนไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมสำหรับการเร่งปฏิกิริยารีดักชันของสารเคมีให้สีเขียวที่มักพบในน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมต่อไปได้

อ้างอิง

- Aljabali, A. a. A., Akkam, Y., Al Zoubi, M. S., Al-Batayneh, K. M., Al-Trad, B., Abo Alrob, O., Alkilany, A. M., Benamara, M., & Evans, D. J. (2018). Synthesis of Gold Nanoparticles Using Leaf Extract of *Zizyphus zizyphus* and their Antimicrobial Activity. *Nanomaterials (Basel)*, *8*(3). doi:10.3390/nano8030174
- 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. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, *46*(sup1), 462-471. doi:10.1080/21691401.2018.1430585
- Bhambure, R., Bule, M., Shaligram, N., Kamat, M., & Singhal, R. (2009). Extracellular Biosynthesis of Gold Nanoparticles using *Aspergillus niger* - its Characterization and Stability. *Chemical Engineering & Technology*.
- Bhargava, A., Jain, N., Khan, M. A., Pareek, V., Dilip, R. V., & Panwar, J. (2016). Utilizing metal tolerance potential of soil fungus for efficient synthesis of gold nanoparticles with superior catalytic activity for degradation of rhodamine B. *J Environ Manage*, *183*, 22-32. doi:10.1016/j.jenvman.2016.08.021
- Boisselier, E., & Astruc, D. (2009). Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev*, *38*(6), 1759-1782. doi:10.1039/b806051g
- Cabib, E., Bowers, B., Sburlati, A., & Silverman, S. J. (1988). Fungal cell wall synthesis: the construction of a biological structure. *Microbiol Sci*, *5*(12), 370-375.
- Chen, C. C., Li, J. J., Guo, N. H., Chang, D. Y., Wang, C. Y., Chen, J. T., Lin, W. J., Chi, K. H., Lee, Y. J., Liu, R. S., Chen, C. L., & Wang, H. E. (2019). Evaluation of the Biological Behavior of a Gold Nanocore-Encapsulated Human Serum Albumin Nanoparticle (Au@HSANP) in a CT-26 Tumor/Ascites Mouse Model after Intravenous/Intraperitoneal Administration. *Int J Mol Sci*, *20*(1). doi:10.3390/ijms20010217
- Chen, I. H., Chen, Y. F., Liou, J. H., Lai, J. T., Hsu, C. C., Wang, N. Y., & Jan, J. S. (2019). Green synthesis of gold nanoparticle/gelatin/protein nanogels with enhanced bioluminescence/biofluorescence. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, *105*, 110101. doi:10.1016/j.msec.2019.110101

- Das, K. R., Tiwari, A. K., & Kerkar, S. (2020). Psychrotolerant Antarctic bacteria biosynthesize gold nanoparticles active against sulphate reducing bacteria. *Prep Biochem Biotechnol*, 5(5), 438-444. doi:10.1080/10826068.2019.1706559
- El-Brolossy, T. A., Abdallah, T., Mohamed, M. B., Abdallah, S., Easawi, K., Negm, S., & Talaat, H. (2008). Shape and size dependence of the surface plasmon resonance of gold nanoparticles studied by Photoacoustic technique. *The European Physical Journal Special Topics*, 153(1), 361-364. doi:10.1140/epjst/e2008-00462-0
- El-Sheikh, D. T. M. a. E.-G. a. D. H. H. (2016). *Mycology* OMICS Group eBooks.
- Elgharbi, F., Hmida-Sayari, A., Zaafour, Y., & Bejar, S. (2015). Expression of an *Aspergillus niger* xylanase in yeast: Application in breadmaking and in vitro digestion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 103-109.
- Feng, K., Huang, Z., Peng, B., Dai, W., Li, Y., Zhu, X., Chen, Y., Tong, X., Lan, Y., & Cao, Y. (2020). Immobilization of *Aspergillus niger* lipase onto a novel macroporous acrylic resin: Stable and recyclable biocatalysis for deacidification of high-acid soy sauce residue oil. *Bioresour Technol*, 298, 122553. doi:10.1016/j.biortech.2019.122553
- Freitas De Freitas, L., Varca, G. H. C., Dos Santos Batista, J. G., & Benevolo Lugao, A. (2018). An Overview of the Synthesis of Gold Nanoparticles Using Radiation Technologies. *Nanomaterials (Basel)*, 8(11). doi:10.3390/nano8110939
- Giuliani, S., Piana, C., Setti, L., Hochkoepler, A., Pifferi, P. G., Williamson, G., & Faulds, C. B. (2001). Synthesis of pentylferulate by a feruloyl esterase from *Aspergillus niger* using water-in-oil microemulsions. *Biotechnology Letters*, 23, 325-330.
- Hvolbæk, B., Janssens, T. V. W., Clausen, B. S., Falsig, H., Christensen, C. H., & Nørskov, J. K. (2007). Catalytic activity of Au nanoparticles. *Nano Today*, 2(4), 14-18. doi:10.1016/s1748-0132(07)70113-5
- Jin, C., Cao, X., Lu, F., Yang, Z., & Yang, R. (2014). Facile synthesis of gold-nanoparticle-decorated Gd(0.3)Ce(0.7)O(1.9) nanotubes with enhanced catalytic activity for oxygen reduction reaction. *ACS Appl Mater Interfaces*, 6(2), 847-853. doi:10.1021/am403954r
- Kim, K.-S., Choi, S., Cha, J.-H., Yeon, S.-H., & Lee, H. (2006). Facile one-pot synthesis of gold nanoparticles using alcohol ionic liquids. *Journal of Materials Chemistry*, 16(14). doi:10.1039/b601478j

- Laoufi, I., Saint-Lager, M. C., Lazzari, R., Jupille, J., Robach, O., Garaudée, S., Cabailh, G., Dolle, P., Cruguel, H., & Bailly, A. (2011). Size and Catalytic Activity of Supported Gold Nanoparticles: An in Operando Study during CO Oxidation. *The Journal of Physical Chemistry C*, *115*(11), 4673-4679. doi:10.1021/jp1110554
- Li, J., Li, Q., Ma, X., Tian, B., Li, T., Yu, J., Dai, S., Weng, Y., & Hua, Y. (2016). Biosynthesis of gold nanoparticles by the extreme bacterium *Deinococcus radiodurans* and an evaluation of their antibacterial properties. *Int J Nanomedicine*, *11*, 5931-5944. doi:10.2147/IJN.S119618
- Li, N., Zhao, P., & Astruc, D. (2014). Anisotropic gold nanoparticles: synthesis, properties, applications, and toxicity. *Angew Chem Int Ed Engl*, *53*(7), 1756-1789. doi:10.1002/anie.201300441
- Magdi, H. M., & Bhushan, B. (2015). Extracellular biosynthesis and characterization of gold nanoparticles using the fungus *Penicillium chrysogenum*. *Microsystem Technologies*, *21*(10), 2279-2285. doi:10.1007/s00542-015-2666-5
- Mathlouthi, N., Juin, H., & Larbier, M. (2003). Effect of xylanase and beta-glucanase supplementation of wheat- or wheat- and barley-based diets on the performance of male turkeys. *British Poultry Science*, *44*, 291-298.
- Marturano, V., Ambrogi, V., Bandeira, N. a. G., Tytkowski, B., Giamberini, M., & Cerruti, P. (2017). Modeling of Azobenzene-Based Compounds. *Physical Sciences Reviews*, *2*(11). doi:10.1515/psr-2017-0138
- Mishra, A., Kumari, M., Pandey, S., Chaudhry, V., Gupta, K. C., & Nautiyal, C. S. (2014). Biocatalytic and antimicrobial activities of gold nanoparticles synthesized by *Trichoderma* sp. *Bioresour Technol*, *166*, 235-242. doi:10.1016/j.biortech.2014.04.085
- Naya, S., Teranishi, M., Kimura, K., & Tada, H. (2011). A strong support-effect on the catalytic activity of gold nanoparticles for hydrogen peroxide decomposition. *Chem Commun (Camb)*, *47*(11), 3230-3232. doi:10.1039/c0cc03047c
- Noruzi, M., Zare, D., Khoshnevisan, K., & Davoodi, D. (2011). Rapid green synthesis of gold nanoparticles using *Rosa hybrida* petal extract at room temperature. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, *79*(5), 1461-1465. doi:10.1016/j.saa.2011.05.001

- Ohta, K., Hamada, S., & Nakamura, T. (1993). Production of high concentrations of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 729-733.
- Pariza, M. W., & Johnson, E. A. (2001). Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: Update for a new century. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, 33, 173-186.
- Parial, D., & Pal, R. (2014). Biosynthesis of monodisperse gold nanoparticles by green alga *Rhizoclonium* and associated biochemical changes. *Journal of Applied Phycology*, 27(2), 975-984. doi:10.1007/s10811-014-0355-x
- Park, H. S., Jun, S. C., Han, K. H., Hong, S. B., & Yu, J. H. (2017). Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. *Adv Appl Microbiol*, 100, 161-202. doi:10.1016/bs.aambs.2017.03.001
- Patil, A. G., Kote, N. V., & Mulimani, V. (2009). Enzymatic removal of flatulence-inducing sugars in chickpea milk using free and polyvinyl alcohol immobilized alpha-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36, 29-33.
- Patra, J. K., & Baek, K. H. (2014). Green Nanobiotechnology: Factors Affecting Synthesis and Characterization Techniques. *Journal of Nanomaterials*, 2014, 1-12. doi:10.1155/2014/417305
- Qu, Y., Lian, S., Shen, W., Li, Z., Yang, J., & Zhang, H. (2020). Rod-shaped gold nanoparticles biosynthesized using Pb(2+)-induced fungus *Aspergillus* sp. WL-Au. *Bioprocess Biosyst Eng*, 43(1), 123-131. doi:10.1007/s00449-019-02210-w
- Qu, Y., Pei, X., Shen, W., Zhang, X., Wang, J., Zhang, Z., Li, S., You, S., Ma, F., & Zhou, J. (2017). Biosynthesis of gold nanoparticles by *Aspergillum* sp. WL-Au for degradation of aromatic pollutants. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 88, 133-141. doi:10.1016/j.physe.2017.01.010
- Riabinina, D., Zhang, J., Chaker, M., Margot, J., & Ma, D. (2012). Size Control of Gold Nanoparticles Synthesized by Laser Ablation in Liquid Media. *ISRN Nanotechnology*, 2012, 1-5. doi:10.5402/2012/297863

- Roy, S., Das, T. K., Maiti, G. P., & Basu, U. (2016). Microbial biosynthesis of nontoxic gold nanoparticles. *Materials Science and Engineering: B*, 203, 41-51. doi:10.1016/j.mseb.2015.10.008
- Sengani, M., Grumezescu, A. M., & Rajeswari, V. D. (2017). Recent trends and methodologies in gold nanoparticle synthesis—A prospective review on drug delivery aspect. *OpenNano*, 37-46. doi:10.1016/j.onano.2017.07.001
- Shen, W., Qu, Y., Li, X., Pei, X., You, S., Yin, Q., Wang, J., & Ma, Q. (2018). Comparison of gold nanoparticles biosynthesized by cell-free extracts of *Labrys*, *Trichosporon montevidense*, and *Aspergillus*. *Environ Sci Pollut Res Int*, 25(14), 13626-13632. doi:10.1007/s11356-017-1050-7
- Singh, A. K., & Mukhopadhyay, M. (2012). "Overview of fungal lipase: A review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 486-520.
- Smitha, S. L., Philip, D., & Gopchandran, K. G. (2009). Green synthesis of gold nanoparticles using *Cinnamomum zeylanicum* leaf broth. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 74(3), 735-739. doi:10.1016/j.saa.2009.08.007
- Song, J., Imanaka, H., Imamura, K., Kajitani, K., & Nakanishi, K. (2010). Development of a highly efficient indigo dyeing method using indican with an immobilized beta-glucosidase from *Aspergillus niger*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110, 281-287.
- Song, P., Ruan, M., Sun, X., Zhang, Y., & Xu, W. (2014). Theoretical study of resorufin reduction mechanism by NaBH₄. *J Phys Chem B*, 118(34), 10224-10231. doi:10.1021/jp505739p
- Suganuma, T., Fujita, K., & Kitahara, K. (2007). Some distinguishable properties between acid-stable and neutral types of alpha-amylases from acid-producing koji. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104, 353-362.
- Thakker, J. N., Dalwadi, P., & Dhandhukia, P. C. (2013). Biosynthesis of Gold Nanoparticles Using *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense JT1, a Plant Pathogenic Fungus. *ISRN Biotechnol*, 2013, 515091. doi:10.5402/2013/515091
- Thilagam, R., & Gnanamani, A. (2020). Preparation, characterization and stability assessment of keratin and albumin functionalized gold nanoparticles for biomedical applications. *Applied Nanoscience*. doi:10.1007/s13204-020-01250-z

- Tosa, T., & Shibatani, T. (1995). Industrial application of immobilized biocatalysts in Japan. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 750, 364-375.
- Vandenberghe, L. P. S., Soccol, C. R., Pandey, A., & Lebeault, J. M. (2000). Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 74(2), 175-178.
- Villena, G. K., & Gutierrez-Correa, M. (2006). Production of cellulase by *Aspergillus niger* biofilms developed on polyester cloth. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 262-268.
- Wadhvani, S. A., Shedbalkar, U. U., Nadhe, S., Singh, R., & Chopade, B. A. (2018). Decolorization of textile dyes by combination of gold nanocatalysts obtained from *Acinetobacter* sp. SW30 and NaBH₄. *Environmental Technology & Innovation*, 9, 186-197. doi:10.1016/j.eti.2017.12.001
- Wadhvani, S. A., Shedbalkar, U. U., Singh, R., Karve, M. S., & Chopade, B. A. (2014). Novel polyhedral gold nanoparticles: green synthesis, optimization and characterization by environmental isolate of *Acinetobacter* sp. SW30. *World J Microbiol Biotechnol*, 30(10), 2723-2731. doi:10.1007/s11274-014-1696-y
- Wang, A., Ng, H. P., Xu, Y., Li, Y., Zheng, Y., Yu, J., Han, F., Peng, F., & Fu, L. (2014). Gold Nanoparticles: Synthesis, Stability Test, and Application for the Rice Growth. *Journal of Nanomaterials*, 2014, 1-6. doi:10.1155/2014/451232
- Wang, S., Holyoak, G. R., Panter, K. E., Liu, Y., Evans, R. C., & Bunch, T. D. (1998). Resazurin reduction assay for ram sperm metabolic activity measured by spectrophotometry. *Proc Soc Exp Biol Med*, 217(2), 197-202. doi:10.3181/00379727-217-44223
- Wong, C. M., Wong, K. H., & Chen, X. D. (2008). Glucose oxidase: Natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 927-938
- Zhang, X., Qu, Y., Shen, W., Wang, J., Li, H., Zhang, Z., Li, S., & Zhou, J. (2016). Biogenic synthesis of gold nanoparticles by yeast *Magnusiomyces ingens* LH-F1 for catalytic reduction of nitrophenols. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 497, 280-285. doi:10.1016/j.colsurfa.2016.02.033

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงราเหลว Potato dextrose broth (PDB) ผงอาหารสำเร็จรูป

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

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

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงราแข็ง Potato dextrose agar (PDA)

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

ผงวุ้น	15 กรัม
--------	---------

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

ละลายลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
วิธีการเตรียมสารเคมี

1. 0.02 M Chlorauric acid solution 1 มิลลิลิตร

Gold (III) chloride 0.60 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ใช้กระดาษฟรอยด์ปิดรอบขวด และนำไปแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส

2. 0.3 M Chlorauric acid solution 1 มิลลิลิตร

Gold (III) chloride 26.13 ไมโครลิตร

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ใช้กระดาษฟรอยด์ปิดรอบขวด และนำไปแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส

3. Acetate buffer 1 ลิตร

distilled water 800 มิลลิลิตร

Sodium Acetate 1.861 กรัม

Acetic Acid 4.643 กรัม

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วปรับ pH ด้วยเครื่อง pH meter ให้ได้ pH เท่ากับ 4.6 จากนั้นจึงปรับปริมาณให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำปราศจากเชื้อ

ภาคผนวก ค

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง

เครื่องนาโนดรอป (NanoDrop2000)

ลักษณะและองค์ประกอบของเครื่องนาโนดรอป (NanoDrop2000) ของบริษัท Thermo Scientific ประเทศ สหรัฐอเมริกา เครื่องนาโนดรอปที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงนี้ทำการวัดที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง



ขั้นตอนการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องนาโนดรอป (NanoDrop2000) มีดังนี้

1. คลิกโปรแกรม NanoDrop 2000 ที่ PC หรือ Notebook
2. เลือกวิธีการวัดเป็น UV-visible
3. ตั้งค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ต้องการจะวัด เช่น ความยาวคลื่น
4. ทำความสะอาดแท่นวัด (Pedestal) ด้วยน้ำกลั่นก่อนใช้งานทุกครั้ง
5. หยดสารละลาย Blank ที่แท่นวัด และคลิกที่ปุ่ม Blank เพื่อวัด
6. หยดสารละลาย Blank ออกด้วยกระดาดเซ็ทเลนส์และหยดตัวอย่าง (Sample) ปริมาตรไม่เกิน 10 ไมโครลิตร ลงบนแท่นวัด จากนั้นคลิก Measure เพื่อวัดค่า
7. อ่านผลการวัดที่หน้าจอกอมพิวเตอร์

คำแนะนำ

1. ควรทำการ Re blank ทุก 30 นาที
2. ทำความสะอาดหัวอ่านด้วยน้ำกลั่นทุกครั้งเมื่อเปลี่ยนตัวอย่าง
3. ห้ามนำของแข็งไปขูดแท่นวัด