



## โครงการ

# การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** ปริมาณเซลล์โลสและการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของไบโไฟจากพันธุ์ที่ต่างกัน  
ในประเทศไทย

**ชื่อนิสิต** นางสาวรุ่งทิวา      มารศรี      5932636723

นางสาววรรษชล      เล็กสมบูรณ์      5932637323

**ภาควิชา**      เทคโนโลยีทางภาพและการพิมพ์

**ปีการศึกษา**      2562

คณะวิทยาศาสตร์      จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริมาณเซลล์โลสและการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของใบไม้จากพันธุ์ที่ต่างกันในประเทศไทย

โดย

นางสาวรุ่งทิวา มารศรี รหัสประจำตัวนิสิต 5932636723

นางสาววรรณชวล เล็กสมบูรณ์ รหัสประจำตัวนิสิต 5932637323

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

อาจารย์ ดร.กมลวรรณ ภาคาคผล

รายงานโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้

เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาเทคโนโลยีทางภาพและการพิมพ์

ภาควิชาเทคโนโลยีทางภาพและการพิมพ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

\*\*\*\*\*

เนื่องจากสถานการณ์การระบาดของโรคไวรัส COVID-19  
ในช่วงภาคปลายการศึกษา 2562 จึงส่งผลให้ไม่สามารถ  
ดำเนินการได้ครบตามวัตถุประสงค์ของโครงการ

\*\*\*\*\*

หัวข้อ ปริมาณเซลล์โลสและการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของไบโไฟจากพันธุ์ที่ต่างกันในประเทศไทย

นิสิตผู้ดำเนินโครงการ นางสาวรุ่งทิวา มารศรี รหัสนิสิต 5932636723

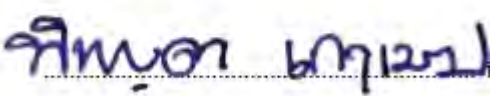
นางสาววรรษชล เล็กสมบูรณ์ รหัสนิสิต 5932637323

ภาควิชา เทคโนโลยีทางภาพและการพิมพ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ อ.ดร.กมลวรรณ ภาคผล

---

ภาควิชาเทคโนโลยีทางภาพและการพิมพ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับว่าโครงการส่งเสริมประสบการณ์เรื่อง “ ปริมาณเซลล์โลสและการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของไบโไฟจากพันธุ์ที่ต่างกันในประเทศไทย ” เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาระดับปริญญาตรีสาขาเทคโนโลยีทางภาพและการพิมพ์

  
..... หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ ดร.พิชญดา เกตุเมฆ)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

(อ.ดร.กมลวรรณ ภาคผล)

ชื่อนิสิต นางสาวรุ่งทิwa มารศรี รหัสนิต 5932636723  
นางสาววรรษชล เล็กสมบุรณ์ รหัสนิต 5932637323

ชื่อเรื่อง ปริมาณเซลล์โลสและการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของไบโไฟจากพันธุ์ที่ต่างกันในประเทศไทย

อาจารย์ที่ปรึกษา อ.ดร.กมลวรรณ ภาคผล

### บทคัดย่อ

ไบโไฟเป็นอีกหนึ่งพืชเศรษฐกิจทางเลือกใหม่สำหรับเกษตรกร เนื่องจากไบโไฟเป็นพืชอเนกประสงค์ สามารถนำมาใช้งานได้ทุกส่วน แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าไบโไฟส่วนมากถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นแค่เพียงปุ๋ยหมักและชาเท่านั้น ทั้งที่ไบโไฟมี แร่ธาตุ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และสารต้านเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิด รวมถึงเป็นแหล่งของเซลล์โลสที่เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพด้วย โครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณเซลล์โลสในไบโไฟต่างพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทยและศึกษาความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์เมื่อไบโไฟถูกแปลงสภาพอยู่ในรูปของนาโนเซลล์โลส จากการศึกษาไบโไฟ 5 พันธุ์ พบว่า ไบโไฟข้าวหลาม (กาบแดง) และไบโไฟดำ (ขาว) มีปริมาณเซลล์โลสสูงกว่าอีกสามพันธุ์ ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 29.87% และ 26.53% ตามลำดับ ดังนั้นไบโไฟทั้ง 2 พันธุ์จึงถูกนำมาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์และผลิตเป็นนาโนเซลล์โลส จากการศึกษาวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าหลังผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ เส้นใยของไบโไฟข้าวหลาม (กาบแดง) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่าและความยาวเส้นใยที่ยาวกว่าเส้นใยจากไบโไฟดำ (ขาว) ซึ่งส่งผลให้เส้นผ่านศูนย์กลางของนาโนเซลล์โลสจากไบโไฟข้าวหลาม (กาบแดง) มีขนาดใหญ่กว่าไบโไฟดำ (ขาว) เช่นกัน จากการศึกษาความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของนาโนเซลล์โลสที่อยู่ในรูปสารแขวนลอยในน้ำ พบว่านาโนเซลล์โลสจากไบโไฟข้าวหลาม (กาบแดง) สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*Staphylococcus aureus*) ได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli*) ได้ ในขณะที่นาโนเซลล์โลสจากไบโไฟดำ (ขาว) ไม่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและลบ คาดว่าประสิทธิภาพการต้านเชื้อจุลินทรีย์อาจน้อยกว่าความเป็นจริง เนื่องจากตรวจพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นในนาโนเซลล์โลสของไบโไฟทั้ง 2 พันธุ์ อย่างไรก็ตาม ข้อมูลข้างต้นสามารถใช้เป็นแนวทางการศึกษานาโนเซลล์โลสจากไบโไฟได้ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ ไบโไฟ, เซลล์โลส, การต้านเชื้อจุลินทรีย์,

นาโนเซลล์โลส

ลายมือชื่อนิสิต.....วรรษชล เล็กสมบุรณ์

ภาควิชา เทคโนโลยีทางภาพและการพิมพ์

ลายมือชื่อนิสิต.....รุ่งทิwa มารศรี

ปีการศึกษา 2562

ลายมือชื่ออาจารย์.....Kamran P.

**Research Students**      Rungtiwa Marasri      ID No. 5932636723

Watsachon Leksomboon      ID No. 5932637323

**Project title**      Cellulose Content and Antimicrobial Activity of Bamboo Leaves from Heterogeneous Varieties in Thailand

**Project Advisors**      Dr. Kamonwan Pacaphol

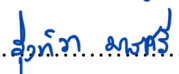
### Abstract

Bamboo is one of the alternative industrial crops for agriculturists. Since it is a multi-purpose plant, that entire part can be used. However, most of the bamboo leaves are only used in fertilizers and bamboo leaf tea. In fact, there are plenty of minerals, bioactive and antimicrobial compounds in bamboo leaves and they are a resource of cellulose, which is a kind of biopolymers. The objectives of the study were determination of cellulose contents in bamboo leaves from heterogeneous varieties in Thailand and examine antimicrobial activity of nanocellulose produced from the bamboo leaves. In this research, the five varieties of the bamboo leaves were studied. It was found that *Cephalostachyum pergracile* and *Bambusa vulgaris Schrad. ex H. Wendl* leaves had cellulose contents more than the others that were 29.87% and 26.53%, respectively. Thus, both varieties were selected for further processes which were purification and production of the nanocellulose. In morphological analysis after the purification, the obtained fibers from *Cephalostachyum pergracile* displayed larger diameters than those of *Bambusa vulgaris Schrad. ex H. Wendl*. Those results corresponded to sizes of the nanocellulose that fiber diameters from *Cephalostachyum pergracile* were larger than another one. In addition, it was found that antimicrobial activity of nanocellulose in water-based suspension form exhibited slight reduction of gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*) in *Cephalostachyum pergracile* sample. However, that sample did not show antimicrobial activity with gram-negative bacteria (*Escherichia coli*). While the nanocellulose from another bamboo did not display reductions of any bacteria. The antimicrobial efficiency might be less than the fact because contaminations of other microbes in both samples were found. The above data could be nevertheless used as a guide for any future studies related to bamboo leaves.

Department of Imaging and Printing Technology

Student's signature..  ..

Faculty of Science

Student's signature.....  .....

Academic year 2019

Advisor's signature.....  .....

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยปริมาณเซลล์โลสและการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของไบโไฟจากพันธุ์ที่ต่างกันในประเทศไทยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการเรียนการสอนตามหลักสูตรในระดับปริญญาตรีของภาควิชาเทคโนโลยีทางภาพและการพิมพ์ คณะวิทยาศาสตร์ เพื่อสร้างเสริมประสบการณ์ ประจำปีการศึกษา 2562 โดยงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงมาได้ด้วยดีจากความอนุเคราะห์ของอาจารย์และบุคลากรในหลายฝ่าย

ทั้งนี้ คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.กมลวรรณ ภาคผล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการเป็นอย่างยิ่ง ที่ได้คอยช่วยเหลือในการลงทุน ลงแรง ระยะเวลาในการดูแล และให้คำแนะนำเป็นอย่างดีเสมอมา ตลอดจนช่วยชี้แนะ และเป็นกำลังสำคัญในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นตลอดการทำวิจัยไม่ว่าจะทั้งทางตรง หรือทางอ้อมก็ตาม

ขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีทางภาพและการพิมพ์ โดยเฉพาะรศ.ดร. สิริวรรณ พัฒนาฤดี อาจารย์ประจำรายวิชา Senior Project และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชา พี่สมชาย ภวจินวร ที่ให้ความช่วยเหลือ คอยให้คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกตลอดการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณคณะกรรมการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้สนับสนุนเงินทุนสำหรับงานวิจัยนี้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ฅ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1    ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ	1
1.2    วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
1.3    ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎี	3
2.1    ใบไฟ	3
2.1.1    พันธุ์ไฟที่ปลูกในประเทศไทย	3
2.1.2    องค์ประกอบทางเคมีของไฟ	7
2.2    กระบวนการผลิตเชื้อบริสุทธิ์	9
2.2.1    การผลิตเชื้อ	9
2.2.2    การฟอกเชื้อ	10
2.3    นาโนเซลลูโลส	11
2.4    การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของพีชตามวิธีของ Goering และ Van Soest (1970)	13
2.5    กลไกการต้านเชื้อจุลินทรีย์และการวิเคราะห์	14
2.6    งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16



บทที่ 3	การทดลอง	17
3.1	วัตถุประสงค์และสารเคมี	17
3.2	อุปกรณ์และเครื่องมือทดสอบ	18
3.3	วิธีการทดลอง	19
3.4	การวิเคราะห์	29
3.5	วิเคราะห์ผลการทดลองและสรุปผล	33
บทที่ 4	ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	34
4.1	ปริมาณเซลล์ลูโลสและองค์ประกอบอื่น ๆ	34
4.2	ปริมาณผลผลิต (yield)	35
4.3	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	36
4.4	ความยาวของเส้นใย	42
4.5	การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของนาโนเซลล์ลูโลส	43
บทที่ 5	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	48
5.1	สรุปผลการทดลอง	48
5.2	ข้อเสนอแนะ	48
เอกสารอ้างอิง		49

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3-1 วิธีการและสภาวะที่ใช้ในการทดสอบการต้านเชื้อจุลินทรีย์	32
ตารางที่ 4-1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบในตัวอย่าง	34
ตารางที่ 4-2 น้ำหนักเชื้อก่อน-หลังจากการต้มและฟอกเชื้อของไฟแต่ละพันธุ์	35
ตารางที่ 4-3 เส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อไบไฟในแต่ละพันธุ์ที่สภาวะต่าง ๆ	41
ตารางที่ 4-4 ความยาวเฉลี่ยของเส้นใยของแต่ละพันธุ์ไฟในแต่ละสภาวะ	42
ตารางที่ 4-5 ข้อมูลดิบของผลการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและลบ	43
ตารางที่ 4-6 การยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกของแต่ละพันธุ์ไฟ	44
ตารางที่ 4-7 การยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบของแต่ละพันธุ์ไฟ	44

## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2-1 ไม้ดำ (ชาว)	4
ภาพที่ 2-2 ไม้เปี๊ยะ (แม่ตะวอ)	4
ภาพที่ 2-3 ไม้ซางหม่น (นวลราชินี)	5
ภาพที่ 2-4 ไม้ข้าวหลาม (กอบแดง)	6
ภาพที่ 2-5 ไม้บง (ใหญ่)	6
ภาพที่ 2-6 $\beta$ -D-anhydroglucopyranose เชื่อมติดกันด้วยการยึดติดระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 4	7
ภาพที่ 2-7 $\beta$ -D-xylopyranose	7
ภาพที่ 2-8 L-arabinofuranose	7
ภาพที่ 2-9 4-O-methylglucuronic acid	7
ภาพที่ 2-10 (a) p-hydroxyphenyl propane; (b) guaiacyl; and (c) syringyl	8
ภาพที่ 2-11 แสดงลักษณะของเซลลูโลสนาโนไฟบริล	12
ภาพที่ 2-12 กลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่อจุลินทรีย์	15
ภาพที่ 2-13 ภาพจาก SEM ของ (a) ไม้ (b) เซลลูโลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยสารเคมี	16
(c) นาโนเซลลูโลส	
ภาพที่ 3-1 การรีฟลักซ์ตัวอย่างพืช	22
ภาพที่ 3-2 เติมสารละลาย combined permanganate ลงใน crucible ที่มีตัวอย่างอยู่	23
ภาพที่ 3-3 ตัวอย่างเริ่มกลายเป็นสีขาว	24
ภาพที่ 3-4 เถ้าที่ได้หลังจากการเผา	24
ภาพที่ 3-5 การต้มเชื้อ	25
ภาพที่ 3-6 เชื้อที่ผ่านการกรองสารละลายต่างออกและถูกชะล้างด้วยน้ำกลั่น	26

ภาพที่ 3-7 เชื้อที่ผ่านการคั่นน้ำออกแล้ว	26
ภาพที่ 3-8 ตัวอย่างการเก็บสารละลายต่างที่ผ่านการต้มเชื้อในแต่ละรอบ	27
ภาพที่ 3-9 การฟอกเชื้อ	27
ภาพที่ 3-10 เชื้อที่ผ่านการฟอก กรองสารละลายออก และถูกชะล้างด้วยน้ำกลั่น	28
ภาพที่ 3-11 ปั่นเชื้อกับน้ำด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง	28
ภาพที่ 3-12 การผลิตนาโนเซลลูโลส	29
ภาพที่ 3-13 การตั้งค่าเครื่อง FQA	31
ภาพที่ 3-14 เครื่อง FQA เริ่มทำการวิเคราะห์	31
ภาพที่ 3-15 แผนภาพแสดงขั้นตอนต่าง ๆ ในการทดลอง	33
ภาพที่ 4-1 % Yield ภายหลังจากการต้มและฟอกเชื้อของไม้แต่ละพันธุ์	35
ภาพที่ 4-2 (ก) และ (ข) ข้าวหลาม (กาบแดง) ก่อนต้มเชื้อ ที่กำลังขยาย 250x และ 10,000x ตามลำดับ	36
ภาพที่ 4-3 (ก) และ (ข) ข้าวหลาม (กาบแดง) หลังต้มเชื้อ ที่กำลังขยาย 250x และ 10,000x ตามลำดับ	37
ภาพที่ 4-4 (ก) และ (ข) ข้าวหลาม (กาบแดง) หลังฟอกเชื้อ ที่กำลังขยาย 250x และ 10,000x ตามลำดับ	37
ภาพที่ 4-5 (ก) และ (ข) นาโนเซลลูโลสจากข้าวหลาม (กาบแดง) ที่กำลังขยาย 10,000x และ 25,000x ตามลำดับ	38
ภาพที่ 4-6 (ก) และ (ข) คำ (ขวา) ก่อนต้มเชื้อ ที่กำลังขยาย 250x และ 10,000x ตามลำดับ	38
ภาพที่ 4-7 (ก) และ (ข) คำ (ขวา) หลังต้มเชื้อ ที่กำลังขยาย 250x และ 10,000x ตามลำดับ	39
ภาพที่ 4-8 (ก) และ (ข) คำ (ขวา) หลังฟอกเชื้อ ที่กำลังขยาย 250x และ 10,000x ตามลำดับ	39
ภาพที่ 4-9 (ก) และ (ข) นาโนเซลลูโลสจากคำ (ขวา) ที่กำลังขยาย 10,000x และ 25,000x ตามลำดับ	40
ภาพที่ 4-10 ความสัมพันธ์ของความยาวเฉลี่ยเส้นใยแต่ละพันธุ์ไม้ที่สภาวะต่าง ๆ	42

ภาพที่ 4-11 จำนวนแบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i> ในนาโนเซลล์ูโลสจากใบไผ่ข้าวหลาม (กาบแดง) ที่เวลา 0 ชั่วโมง ที่การเจือจาง $10^{-3}$ (A) และ 24 ชั่วโมง ที่การเจือจาง $10^{-2}$ (B)	45
ภาพที่ 4-11 จำนวนแบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i> ในนาโนเซลล์ูโลสจากใบไผ่ดำ (ขวา) ที่เวลา 0 ชั่วโมง ที่การเจือจาง $10^{-3}$ (A) และ 24 ชั่วโมง ที่การเจือจาง $10^{-2}$ (B)	45
ภาพที่ 4-11 จำนวนแบคทีเรีย <i>Escherchia Coli</i> ในนาโนเซลล์ูโลสจากใบไผ่ข้าวหลาม (กาบแดง) ที่เวลา 0 ชั่วโมง ที่การเจือจาง $10^{-3}$ (A) และ 24 ชั่วโมง ที่การเจือจาง $10^{-3}$ (B)	46
ภาพที่ 4-11 จำนวนแบคทีเรีย <i>Eschechia Coli</i> ในนาโนเซลล์ูโลสจากใบไผ่ดำ (ขวา) ที่เวลา 0 ชั่วโมง ที่การเจือจาง $10^{-3}$ (A) และ 24 ชั่วโมง ที่การเจือจาง $10^{-3}$ (B)	46

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ประชากรส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเกษตรกร อย่างไรก็ตามพบว่าปัญหาหลักของเกษตรกรในประเทศที่สืบเนื่องมาอย่างยาวนานตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันคือ การปลูกพืชซ้ำซ้อนจึงส่งผลให้เกิดปัญหาสินค้าล้นตลาด และราคาผลผลิตตกต่ำอยู่บ่อยครั้ง ดังนั้น รัฐบาลจึงมีแนวทางในการส่งเสริมให้เกษตรกรเปลี่ยนมาทำการเกษตรแบบผสมผสาน นั่นคือการปลูกพืชหลากหลายพันธุ์บนบริเวณพื้นที่เพาะปลูกเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว ปัจจุบัน เนื่องจากไม้เป็นพืชตระกูลหญ้าที่มีขนาดลำต้นใหญ่ และให้น้ำหนักชีวมวลต่อไร่ในระยะเวลาที่เท่ากันสูงกว่าพืชชนิดอื่น [1] การปลูกไม้ทำได้ง่ายโดยไม่ต้องใช้ปุ๋ยเคมีหรือสารเคมีกำจัดศัตรูพืช โตเร็ว เก็บเกี่ยวผลผลิตได้ในระยะเวลาอันสั้น (6 เดือน – 3 ปี ขึ้นอยู่กับพันธุ์) สามารถปลูกได้ภายใต้สภาพที่หลากหลายทั้งในบริเวณแห้งแล้งและร้อนชื้น และปลูกผสมกับพืชชนิดอื่น ๆ เช่น ยางพารา และผลไม้ชนิดต่าง ๆ ได้ ทั้งยังช่วยป้องกันการชะล้างพังทลาย การกัดเซาะของหน้าดิน และสามารถดูดซึมน้ำลงสู่ใต้ดินได้อย่างรวดเร็วในปริมาณมาก ซึ่งจะช่วยลดความเสียหายหากเกิดปัญหาอุทกภัยขึ้น นอกจากนี้ไม้ยังเป็นพืชอเนกประสงค์ที่สามารถนำมาใช้ได้ทุกส่วน ทั้งลำต้น ใต้ดินหรือเหง้า (rhizome) หน่อ (shoot) ลำต้นบนดิน (culm) รวมถึงใบไม้ (bamboo leaf) โดยทั่วไปแล้วไม้จะถูกนำมาใช้ในงานจำพวกอุตสาหกรรมเฟอร์นิเจอร์ อาหาร และการผลิตเชื้อเพลิง ซึ่งจะใช้ในส่วนของลำต้น ใต้ดิน ลำต้นบนดิน และหน่อเป็นหลัก

ในส่วนของใบไม้นั้น มักมีการใช้งานใบไม้เป็นเพียงปุ๋ยหมักและชาใบไม้ แต่แท้จริงแล้วใบไม้นั้นอุดมไปด้วยแร่ธาตุและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) หลากหลายชนิด โดยจากงานวิจัยของ Nirmala และคณะ [2] ได้ทำการศึกษาไม้หลากหลายพันธุ์ เช่น ไม้โมโซ และไม้ดำ พบสารที่มีประโยชน์ในใบไม้ ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี และฟีนอล รวมไปถึงแร่ธาตุที่สำคัญ ได้แก่ ซีลีเนียม (selenium) ซิงค์ (zinc) เหล็ก (iron) แมงกานีส (manganese) ในส่วนของงานวิจัยของ Sahoo และคณะ [3] ได้ศึกษาหาปริมาณธาตุโลหะในใบไม้หลายชนิด ได้แก่ ไม้ตง ไม้ซาง และไม้บง พบว่ามีปริมาณธาตุโลหะ 410, 446 และ 366 ในหน่วยกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งหนังสือของ Azcecz และ Orege [4] ระบุว่าธาตุโลหะถูกพบในลำต้นและใบของไม้ที่ประมาณ 21% จากองค์ประกอบทั้งหมด และสามารถนำไปใช้เป็นสารประกอบทางเคมีและทางเภสัชกรรม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Afim และคณะ [5] ที่ได้ศึกษาความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial activities) ของใบไม้ พบว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในไม้ขน (*Phyllostachys pubescens* Mazel) สามารถยับยั้งเชื้อเอสเชอริเชีย โคลิ (*Escherichia coli*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้ และงานวิจัยของ Xiao และคณะ [6] พบว่าไม้ชนิดเดียวกันนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก นั่นคือ สแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) ได้อีกด้วย ประกอบกับข้อมูลเพิ่มเติมจากงานวิจัยของ Cui และคณะ [7] ซึ่งเปิดเผยว่า การต้าน

เชื้อจุลินทรีย์ในใบไผ่โมไซ (Phyllostachys heterocyclus cv. Pubescens) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ได้ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการนำใบไผ่จากหลากหลายพันธุ์ที่เพาะปลูกในประเทศไทยมาทำการทดลองและศึกษาเพื่อหาปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ในใบไผ่ต่างพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทย แล้วจึงคัดเลือกพันธุ์ไผ่จากปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ที่สูงกว่าสำหรับใช้ในการผลิตนาโนเซลล์จุลินทรีย์ และตรวจสอบความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของนาโนเซลล์จุลินทรีย์จากใบไผ่เพื่อเป็นองค์ความรู้ในการคัดเลือกพันธุ์ไผ่เหล่านี้มาผลิตเป็นนาโนเซลล์จุลินทรีย์เพื่อใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น เวชสำอาง ต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1.2.1 เพื่อหาปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ในใบไผ่ต่างพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทย
- 1.2.2 เพื่อคัดเลือกพันธุ์ไผ่จากปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ที่สูงกว่าสำหรับใช้ในการผลิตนาโนเซลล์จุลินทรีย์
- 1.2.3 เพื่อตรวจสอบความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของนาโนเซลล์จุลินทรีย์จากใบไผ่

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.3.1 ข้อมูลเปรียบเทียบให้เห็นถึงความแตกต่างของปริมาณเซลล์จุลินทรีย์และองค์ประกอบทางเคมีอื่น ๆ ที่มีอยู่ในใบไผ่แต่ละพันธุ์
- 1.3.2 ข้อมูลเพื่อใช้ในการวิจัยต่อยอดในการเลือกใช้พันธุ์ไผ่เพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่จากใบไผ่ รวมทั้งการใช้องค์ความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์เยื่อ กระดาษ และด้านนาโนเทคโนโลยีในการแปรสภาพใบไผ่ให้เป็นผลิตภัณฑ์เส้นใยเซลล์จุลินทรีย์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางในระดับนาโนเมตรได้
- 1.3.3 ข้อมูลความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของนาโนเซลล์จุลินทรีย์จากใบไผ่ในพันธุ์ที่เลือกทดสอบ

## บทที่ 2

### ทฤษฎี

#### 2.1 ใบไม้

##### 2.1.1 พันธุ์ไม้ที่ปลูกในประเทศไทย

ไม้เป็นพืชตระกูลหญ้าที่สูงที่สุดในโลก ทั้งยังมีการเจริญเติบโตที่เร็วที่สุดในโลกอีกด้วย มีลักษณะเป็นลำต้นตั้งตรงที่มีความสูงได้ถึง 50 เมตรขึ้นอยู่กับพันธุ์ ลำต้นมีข้อ (node) และปล้อง (internode) ลำต้นส่วนที่อยู่ใต้ดิน เรียกว่า เหง้า (rhizome) ซึ่งแตกแขนงไปตามแนวระดับ ลำต้นใต้อาจมีกาบ โดยอาจมีหรือไม่มีขนก็ได้ ดอกมีลักษณะเป็นช่อดอก (inflorescens) มีกลีบเพียง 2 – 3 กลีบเท่านั้น มีเนื้อและเปลือกที่แข็ง ไม้ร้อน [8] ไม้เป็นพืชอเนกประสงค์ที่อยู่คู่กับวิถีชีวิตของคนไทย และคนเอเชียมาอย่างช้านาน เนื่องด้วยประเทศไทย ตั้งอยู่ในเขตร้อนซึ่งนับว่าเป็นปัจจัยที่พอเหมาะกับการกระจายพันธุ์และการเจริญเติบโตของไม้ จึงสามารถพบเห็นไม้ขึ้นอยู่ตามพื้นที่ทั่วไปและมีชนิดของพันธุ์ที่หลากหลาย

จากการสำรวจชนิดของพันธุ์ไม้ในประเทศไทยของสราวุธ และคณะ [9] คาดว่ามีจำนวนทั้งหมด 15 – 17 สกุล (genera) 80 – 100 ชนิด (species) กระจายอยู่ทั่วทุกภาคของพื้นที่ประเทศไทย ทั้งนี้ จะพบมากในป่าเบญจพรรณ และป่าเต็งรัง

โดยพันธุ์ไม้ที่ปลูกในประเทศไทย ซึ่งได้นำมาใช้ในการทดลองมีอยู่ 5 ชนิดด้วยกัน ได้แก่

##### 2.1.1.1 ไม้ดำ (ชาว)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Bambusa vulgaris Schrad*

มักพบมากในป่าดิบ แถบจังหวัดกาญจนบุรีและจันทบุรี ไม่มีหนาม สูงประมาณ 10 – 12 เมตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำ 7 – 10 เซนติเมตร ปล้องยาว 30 – 40 เซนติเมตร ลำต้นจะมีสีเขียวคล้ำเกือบเป็นสีดำ และมีเนื้อหนา

การนำไปใช้ประโยชน์ มักนิยมนำลำต้นไปใช้ทำนั้งร้านก่อสร้าง และเครื่องจักรสานต่าง ๆ ส่วนของหน่อสามารถรับประทานได้





ภาพที่ 2-1 ไผ่ดำ (ชวา)

#### 2.1.1.2 ไผ่เป่าะ (แม่ตะวอ)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Dendrocalamus giganteus*

พบในพื้นที่บริเวณภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สูงประมาณ 30 เมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำ 10 – 20 เซนติเมตร ปล้องยาวประมาณ 30 เซนติเมตร ลำคั้นมีสีเขียว เนื้อแข็งเปราะ ข้อเรียบ หน่อมีขนาดใกล้เคียงกับลำ และมีสีเหลืองอมขาว

การนำไปใช้ประโยชน์ นิยมนำมาทำกระบอกข้าวหลาม ไม่นิยมนำมาทำเครื่องจักรสาน เนื่องจากมีเนื้อที่แข็งและเปราะ



ภาพที่ 2-2 ไผ่เป่าะ (แม่ตะวอ)

### 2.1.1.3 ไม้ซางหม่น (นวลราชินี)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Dendrocalamus sericeus*

ลักษณะโดยทั่วไปเป็นกอขนาดใหญ่ ลำใหญ่ตรง สูงประมาณ 15 – 20 เมตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำ 6 – 10 เซนติเมตร ปล้องยาว 30 - 40 เซนติเมตร ลำมีสีเขียวหม่น ลำอ่อนมีแป้งสีขาวอยู่ที่ปล้อง ส่วนลำแก่จะมีสีเขียวเข้ม และมีเนื้อหนา ลักษณะของใบจะคล้ายกับไผ่ตง มักพบมากทางภาคเหนือ

การนำไปใช้ประโยชน์ ส่วนของลำจะนำไปใช้ในงานก่อสร้างสำหรับเฟอร์นิเจอร์คุณภาพดี และมีราคาสูง (ภาพที่ 2-3) ใช้หน่อในการทำอาหาร โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 1.5 – 2 กิโลกรัม เมื่อไผ่มีอายุ 3 ปีจะให้หน่อเฉลี่ยสูงสุดถึง 40 หน่อต่อกอ



ภาพที่ 2-3 ไม้ซางหม่น (นวลราชินี)

### 2.1.1.4 ไม้ข้าวหลาม (กาบแดง)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Cephalostachyum pergracile*

พบมากบริเวณตอนเหนือของจังหวัดกาญจนบุรี และภาคตะวันออกเฉียงเหนือบางส่วน มีความสูงเฉลี่ย 7 – 8 เมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำ 5 - 7.5 เซนติเมตร ปล้องยาว 30 เซนติเมตร หน่อมีขนาดใหญ่ ลำไผ่มีสีเขียวอมเทา และกาน้ำมีสีหมากสุก

การนำไปใช้ประโยชน์ มักนำลำต้นมาใช้ทำกระบอกข้าวหลาม ส่วนของหน่อสามารถนำมารับประทานได้แต่ไม่เป็นที่นิยมนัก



ภาพที่ 2-4 ไม้ข้าวหลาม (กาบแดง)

#### 2.1.1.5 ไม้บง (ใหญ่)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Bambusa nutans* Wall. Ex Munro

โดยทั่วไปมักพบตามธรรมชาติในป่าดิบเขา ป่าดิบชื้น หรือบริเวณป่าที่มีความชื้นค่อนข้างสูง โดยลักษณะทั่วไปคล้ายกับไม้ตง ไม้บงใหญ่ในป่าชื้นจะมีขนาดใหญ่มาก มีความสูงถึง 15 – 30 เมตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำ 12 – 20 เซนติเมตร ลำมีความหนาประมาณ 1 – 3 เซนติเมตร ปล้องยาว 30 – 60 เซนติเมตร ลำอ่อนของปล้องล่างมีขนสีน้ำตาลซีดปกคลุมหนาแน่น ปล้องบนมีขนสีขาวถึงสีเทาปกคลุม ลำแก่จะมีสีเขียวเข้มหรือสีเขียวอมเทา มักพบรากอากาศบริเวณข้อของปล้องด้านล่าง (ภาพที่ 2-5)

การนำไปใช้ประโยชน์ ส่วนใหญ่มักนำไปใช้ในงานก่อสร้าง เฟอร์นิเจอร์ เครื่องจักรสาน ส่วนของหน่อสามารถรับประทานได้ และมีรสชาติใกล้เคียงกับไม้ตง



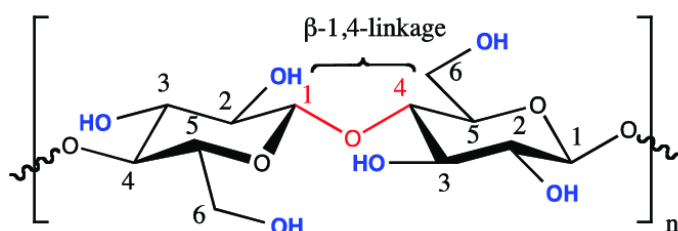
ภาพที่ 2-5 ไม้บง (ใหญ่)

## 2.1.2 องค์ประกอบทางเคมีของไฟ

องค์ประกอบทางเคมีหลัก ๆ ของไบโไฟนั้นมีความคล้ายคลึงกันกับที่พบในไม้สนและไม้ใบกว้าง แต่องค์ประกอบต่าง ๆ จะมีปริมาณที่แตกต่างกันออกไป ประกอบด้วย [10]

### 2.1.2.1 เซลลูโลส

เซลลูโลสในไฟมีความใกล้เคียงกับเซลลูโลสที่ได้จากแหล่งอื่น ๆ นั่นคือ ประกอบไปด้วยโมเลกุลของเบตาดีแอนไฮโดรกลูโคไพราโนส ( $\beta$ -D-anhydroglucopyranose) ที่มาต่อกันเป็นโมเลกุลสายยาว มีโครงสร้างที่เป็นระเบียบ และเชื่อมติดกันด้วยการยึดระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 4 (ภาพที่ 2-6) ซึ่งเป็นพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic bonds)

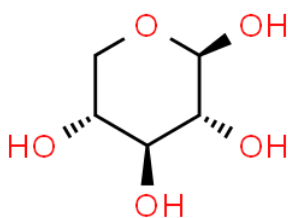


ภาพที่ 2-6  $\beta$ -D-anhydroglucopyranose เชื่อมติดกันด้วยการยึดติดระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 4 [11]

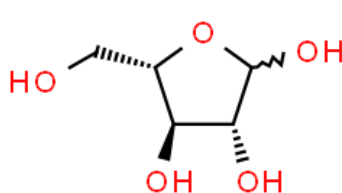
### 2.1.2.2 เฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลสในไบโไฟ ประกอบไปด้วยสาร อาทิเช่น ดีไซโลส (D-xylose), แอลอราบินโนส (L-arabinose), ดีกลูโคส (D-glucose), ดีแมนโนส (D-mannose), กรดดีกลูคิวโรนิก (D-glucuronic acid) และไซแลน (xylan)

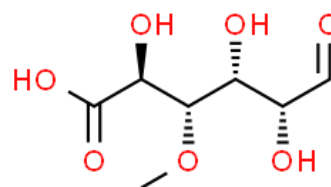
xylan ในไบโไฟประกอบไปด้วยโมเลกุลที่เชื่อมต่อกันระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 4 เป็นแกนยาวของเบตาดีไซโลไพราโนส ( $\beta$ -D-xylopyranose) (ภาพที่ 2-7) ซึ่งมี แอลอราบินโนฟูราโนส (L-arabinofuranose) (ภาพที่ 2-8) และ กรด 4-เมทิลกลูคิวโรนิก (4-O-methylglucuronic acid) (ภาพที่ 2-9) มาต่อเป็นแขนงที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3



ภาพที่ 2-7  $\beta$ -D-xylopyranose



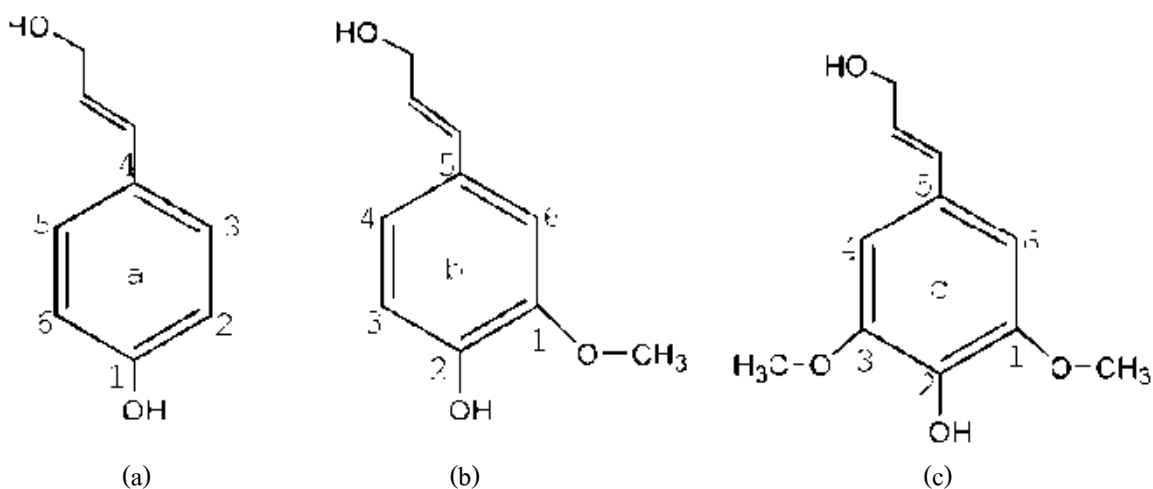
ภาพที่ 2-8 L-arabinofuranose



ภาพที่ 2-9 4-O-methylglucuronic acid

### 2.1.2.3 ลิกนิน

ลิกนินในใบไม้เป็นพอลิเมอร์ของสารจำพวกโพลีฟีนอลิก (polyphenolic) มาต่อกันทั้งระนาบ 3 มิติ และมีลักษณะการเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบในโครงสร้าง หรือเรียกว่า โครงสร้างอสัณฐาน (amorphous) ประกอบไปด้วยโมเลกุลชนิดต่าง ๆ ของฟีนิลโพรเพน (phenylpropane) นั่นคือ กัวเอียซิล (guaiacyl (G)), ซิงริงจิล (syringyl (S)) และ พิวไฮดรอกซีฟีนิลโพรเพน (p-hydroxyphenyl propane) (ภาพที่ 2-10) ซึ่งจะมีความแตกต่างจากลิกนินที่อยู่ในไม้สน และไม้ใบกว้าง



ภาพที่ 2-10 (a) p-hydroxyphenyl propane; (b) guaiacyl; and (c) syringyl [12]

### 2.1.2.4 ธาตุอินทรีย์

ปริมาณของแร่ธาตุหรือสารอินทรีย์ในไม้ มักถูกวัดด้วยปริมาณของเถ้าซึ่งเหลืออยู่หลังจากการเผาที่อุณหภูมิสูงถึง  $575 \pm 25$  องศาเซลเซียส จนกระทั่งปริมาณของคาร์บอนถูกเผาออกไปจนหมด

ปริมาณของเถ้าในไม้นั้นค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับไม้ชนิดอื่น ๆ เถ้าประกอบไปด้วยซิลิกา เป็นองค์ประกอบหลักซึ่งมีอยู่ประมาณ 20 – 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเถ้าทั้งหมด โดยพบว่าปริมาณของเถ้าจะสูงขึ้นในส่วนด้านบนของลำไม้ไผ่แก่ ทั้งนี้ นอกจากซิลิกาแล้ว ยังพบโพแทสเซียม (K) และ โซเดียม (Na) ในไม้อีกด้วย

## 2.2 กระบวนการผลิตเยื่อบริสุทธิ์

### 2.2.1 การผลิตเยื่อ

การผลิตเยื่อ คือ กระบวนการในการพยายามแยกเส้นใยออกมาเป็นเส้นเดี่ยว ๆ โดยอาจมีการเอาลิกนินออกหรือไม่มีการเอาออกก็ได้ เพื่อนำเส้นใยที่ได้ไปใช้ในกระบวนการผลิตกระดาษหรือกระบวนการอื่น ๆ และในการผลิตเยื่อสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 วิธีการหลัก ๆ ได้แก่ การผลิตเยื่อเชิงกล, การผลิตเยื่อเชิงเคมี และการผลิตเยื่อลูกผสม [13]

ก. **การผลิตเยื่อเชิงกล (mechanical pulping)** เป็นการผลิตเยื่อ โดยอาศัยแรงกลเพียงอย่างเดียวในการแยกเส้นใยออกจากกัน ไม่มีการใช้สารเคมีในการผลิต มักใช้กับไม้เนื้ออ่อนที่มีสีอ่อนและไม่มีเรซินเป็นองค์ประกอบ ให้ผลผลิตที่ค่อนข้างสูง อยู่ที่ประมาณ 90 – 98% และไม่มีการกำจัดลิกนินออกจากเยื่อ ทั้งนี้ การผลิตเยื่อเชิงกลสามารถแบ่งย่อยออกได้เป็น 3 ประเภท คือ

(1) การผลิตเยื่อแบบหินบด (stone ground-wood pulping, SGWP) เป็นวิธีที่มีความเก่าแก่มากที่สุดและยังมีการใช้งานอยู่จนถึงปัจจุบัน เป็นการนำเอาเปลือกออกแล้วนำมาวางเรียงในตัวหินที่ใช้สำหรับบด (stone grinder) ตามแนวยาว เมื่อสัมผัสกับผิวหน้าที่หยาบของตัวหินบด ท่อนไม้จะถูกทั้งแรงกดและแรงเฉือน และเกิดการคลายตัวเมื่อห่างจากตัวหินบดจนทำให้ท่อนไม้เกิดการล้า ส่งผลให้เส้นใยบริเวณผิวหน้าเกิดการคลายตัวออก นอกจากนี้ การที่ท่อนไม้เกิดการเสียดสีกับตัวหินบดที่หมุนด้วยความเร็ว รวมถึงท่อนไม้ที่อยู่ภายในตัวหินบดจะมีการเสียดสีกันเองจนเกิดแรงเสียดทาน จึงทำให้เกิดความร้อนขึ้น ลิกนินจึงอ่อนตัวลง ทำให้เส้นใยเกิดการหลุดออกมาได้ง่าย เส้นใยที่ได้จะมีขนาดสั้นและไม่สมบูรณ์นัก

(2) การผลิตเยื่อแบบจานบด (refiner mechanical pulping, RMP) จะแตกต่างจาก SGWP ตรงที่มีการใช้ชิ้นไม้ขนาดเล็ก (wood chip) แทนการใช้ท่อนไม้ที่ผ่านการเปลือกแล้ว โดยชิ้นไม้ขนาดเล็กจะถูกบดในบริเวณระหว่างจานหมุนบดเยื่อสองแผ่น ในเครื่อง ที่เรียกว่า refiner ซึ่งเส้นใยที่ได้จะมีขนาดที่ยาวและแข็งแรงกว่าเส้นใยที่ได้จาก SGWP

(3) การผลิตเยื่อด้วยกระบวนการทางความร้อนและเชิงกล (thermomechanical pulping, TMP) พัฒนามาจาก RMP จะมีการให้ไอน้ำแก่ชิ้นไม้ภายใต้สภาวะที่มีความดันสูงก่อนนำเข้าสู่เครื่อง refiner และระหว่างที่อยู่ในเครื่อง refiner เพื่อทำให้ชิ้นไม้มีความอ่อนตัว และเนื่องจากมีความร้อนในกระบวนการผลิต ส่งผลให้ลิกนินเกิดการอ่อนตัวลง เส้นใยจึงถูกแยกออกจากกันได้ง่ายขึ้น ซึ่งเส้นใย TMP ที่ได้จะมีขนาดยาวกว่าเส้นใยที่ได้จาก RMP และมีความสมบูรณ์มากกว่า

ข. **การผลิตเยื่อเชิงเคมี (chemical pulping)** เป็นการใช้สารเคมีในการทำปฏิกิริยากับเยื่อเพื่อกำจัดลิกนินออกด้วยการละลาย ส่งผลให้เส้นใยเกิดการแยกตัวออกจากกันได้ง่าย โดยชิ้นไม้และสารเคมีที่ใช้ในการผลิตจะถูกใส่

ลงไปหม้อต้มเยื่อที่มีทั้งความดันและอุณหภูมิสูง เรียกว่า digester ซึ่งเยื่อเคมีที่ได้จะมีความขาว ความสว่าง และความแข็งแรงที่มากกว่าเยื่อเชิงกล และเนื่องจากปริมาณของลิกนินที่หลงเหลืออยู่ในเส้นใยนั้นมีน้อย ทำให้เส้นใยมีความเหลือง (yellowness) ต่ำกว่า จึงมีความคงตัวต่อแสง ความชื้น และอุณหภูมิได้ดีกว่า อย่างไรก็ตาม ผลผลิตของเยื่อเชิงเคมีนั้นค่อนข้างน้อย โดยจะอยู่ที่ประมาณ 40-50% เท่านั้น ทั้งนี้ การผลิตเยื่อเชิงเคมีสามารถแบ่งย่อยออกตามประเภทของสารเคมีที่ใช้ได้เป็น 2 ประเภท คือ

(1) การผลิตเยื่อเคมีแบบซัลไฟต์ (sulfite pulping) เป็นกระบวนการที่มีความเป็นกรด โดยใช้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ( $\text{SO}_2$ ) ในการทำปฏิกิริยากับลิกนิน ในกรณีของ acid sulfite pulping ซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะผลิตมาจากกรดซัลฟิวรัส ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ) และสารประกอบไบซัลไฟต์ ( $\text{MHSO}_3$ ) เมื่อ M คือ แคลเซียม (Ca), แมกนีเซียม (Mg) หรือ โซเดียม (Na) ส่วนในกรณีของ bisulfite pulping ซัลเฟอร์ไดออกไซด์นั้นผลิตมาจากสารประกอบไบซัลไฟต์ ( $\text{MHSO}_3$ ) เช่นเดียวกัน แต่จะไม่มีกรดซัลฟิวรัส

(2) การผลิตเยื่อเคมีแบบซัลเฟต (sulfate pulping หรือ kraft pulping) เป็นกระบวนการที่มีความเป็นด่าง และถูกดัดแปลงมาจาก soda process ซึ่งมีการใช้เพียงแคโซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ ) เพียงอย่างเดียว โดยจะใช้โซเดียมซัลไฟด์ ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ในการทำปฏิกิริยากับลิกนิน ซึ่งโซเดียมไฮดรอกไซด์จะเป็นตัวทำปฏิกิริยาหลัก ในขณะที่ไฮโดรซัลไฟด์ไอออน ( $\text{SH}^-$ ) จะทำหน้าที่ในการช่วยให้สารเคมีซึมเข้าสู่เนื้อไม้ได้เร็วขึ้น รวมไปถึงช่วยป้องกันส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตของเส้นใย และป้องกันการกลับมารวมตัวของลิกนิน

ก. การผลิตเยื่อคุณภาพสูง เช่น chemi-thermomechanical pulp หรือ CTMP จะมีการใช้ทั้งสารเคมี ความร้อน และแรงกลในการผลิตเยื่อ โดยส่วนมากจะเป็นการใส่สารเคมีในระหว่างช่วงที่ขึ้นไม้ผ่านการอบไอน้ำ (steaming) ซึ่งเยื่อที่ได้ออกมาจะมีสมบัติอยู่ระหว่างเยื่อเชิงกล และเยื่อเชิงเคมีนั่นเอง

### 2.2.2 การฟอกเยื่อ

ในส่วนของการฟอกเยื่อ (bleaching) เยื่อบางชนิดจะมีค่าความขาวสว่างต่ำอันเนื่องมาจากลิกนินที่หลงเหลืออยู่ในเยื่อกลุ่มโครโมฟอร์ (chromophoric groups) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับแสงและความชื้น เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางส่วนของสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกในกลุ่มโครโมฟอร์ให้กลายเป็นสารเหมือนควิโนนซึ่งดูดกลืนแสงได้ โดยสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกนี้เองจะสามารถสร้างสารประกอบที่มีสีกับโลหะหนักบางชนิด เช่น เหล็ก (Fe) และทองแดง (Cu) ทำให้กลายเป็นสีเหลืองได้ กระบวนการฟอกเยื่อแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

(1) การฟอกลิกนิน (lignin bleaching) ลิกนินจะไม่ได้ถูกกำจัดออก แต่เป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกลุ่มโครโมฟอร์ในลิกนิน ทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยากับแสงและความชื้น สีเหลืองจึงไม่เกิดขึ้น อย่างไรก็ตาม ความขาวสว่างที่ได้จะมีค่าปานกลางและไม่ถาวร ใช้สำหรับการฟอกเยื่อที่ให้ผลผลิตสูงอย่างเยื่อเชิงกล เนื่องจากลิกนินไม่ได้ถูก

กำจัดออกเลย ส่วนสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ โซเดียมเปอร์ออกไซด์ ( $\text{Na}_2\text{O}_2$ ), ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) และ โซเดียมไดโครโอเนต ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) มักนิยมใช้ในการฟอกเยื่อแบบครั้งเดียว ทั้งนี้ กระบวนการนี้มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า การทำให้ขาว (brightening)

(2) การกำจัดลิกนิน (lignin removal) เป็นการกำจัดลิกนินออกจากเยื่อ ทำให้ความขาวสว่างที่ได้มีค่าสูง และค่อนข้างถาวร สารเคมีที่ใช้ ได้แก่ คลอรีน ( $\text{Cl}_2$ ), โซเดียมไฮโปคลอไรต์ ( $\text{NaClO}$ ), โซเดียมคลอไรต์ ( $\text{NaClO}_2$ ) และ สารประกอบคลอรีนไดออกไซด์ ( $\text{ClO}_2$ ) นิยมใช้ฟอกเยื่อชนิดเยื่อเชิงเคมี และมักใช้ในการฟอกเยื่อแบบหลายครั้ง

ข้อดีของการใช้งาน  $\text{H}_2\text{O}_2$  เมื่อเทียบกับสารประกอบจำพวกคลอรีนต่าง ๆ [14]

เนื่องจากแก๊สคลอรีนนั้นมีความเป็นพิษ มีฤทธิ์ในการกัดกร่อนเนื้อเยื่อ จึงทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง รวมถึงระบบทางเดินหายใจ การใช้  $\text{H}_2\text{O}_2$  ซึ่งสลายตัวได้แก๊สออกซิเจน ( $\text{O}_2$ ) และน้ำ ( $\text{H}_2\text{O}$ ) จึงมีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่า ทั้งยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและลดการกลับสี (brightness reversion) ของเยื่อกระดาษได้

### 2.3 นาโนเซลลูโลส

นาโนเซลลูโลส (nanocellulose) หมายถึง กลุ่มโมเลกุลของเซลลูโลสที่มีขนาดในระดับนาโน (1 – 100 nm) อย่างน้อยหนึ่งมิติ การทดลองสกัดนาโนเซลลูโลสเกิดขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1983 โดย Turbak และคณะ [15] โดยเริ่มจากการนำเยื่อไม้มาเป็นวัตถุดิบตั้งต้น ปัจจุบัน มีการสังเคราะห์นาโนเซลลูโลสและนำไปใช้งานเป็นในรูปแบบของการเสริมแรงในวัสดุพอลิเมอร์ (polymer reinforcement) เพื่อผลิตชีววัสดุ (biomaterials) ที่มีประสิทธิภาพสูงมากขึ้น เนื่องจากการลดขนาดของเส้นใยสามารถเพิ่มคุณสมบัติเชิงกายภาพและเชิงกลให้แก่เส้นใยเซลลูโลสได้อีกทั้งยังเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายทางธรรมชาติ แต่คุณสมบัติต่าง ๆ นี้ขึ้นอยู่กับวิธีและกระบวนการสกัดที่เลือกใช้ [16] ซึ่งกระบวนการสกัดนาโนเซลลูโลสแบ่งออกเป็น 2 วิธี [15] คือ

(1) วิธีแบบบนลงล่าง (top-down method) เป็นการใช้เอนไซม์หรือสารเคมีในการแยกสารที่ไม่ใช่เซลลูโลสออก แล้วนำเซลลูโลสสกัดที่ได้มาลดขนาดโดยวิธีทางเคมีและ/หรือทางเชิงกล

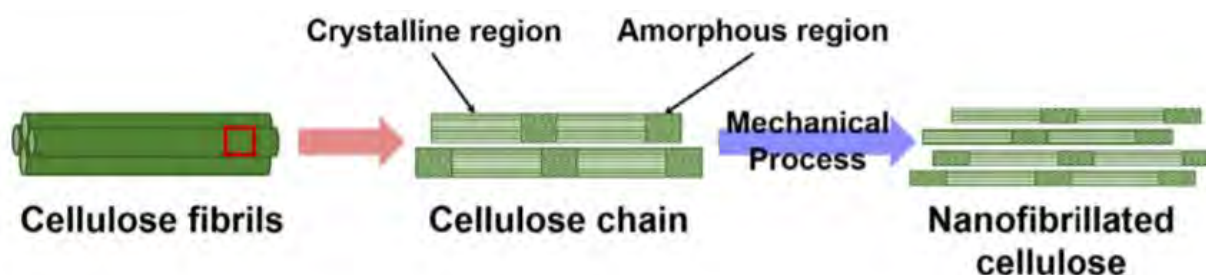
(2) วิธีแบบล่างขึ้นบน (bottom-up method) เป็นการผลิตนาโนเซลลูโลสจากจุลินทรีย์โดยแบคทีเรียจำพวก แอซิโตแบคเตอร์ (*Acetobacter*), อโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium*), ซูโดโมนาส (*Pseudomonas*), ไรโซเบียม (*Rhizobium*), และ อัลคาลิเจินส์ (*Alcaligenes*) ในการทำให้เกิดการเพิ่มขนาดจากจุลินทรีย์เป็นนาโนเซลลูโลส



นาโนเซลลูโลสสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดหลัก ๆ [17] ได้แก่

(1) เซลลูโลสนาโนคริสทอลล์ (Cellulose nanocrystals, CNC) หรือ nanocrystalline cellulose (NNC) หรือ cellulose nanowhiskers (CNW) คือ นาโนเซลลูโลส ที่มีรูปร่างเป็นแท่งสั้น ๆ หรือคล้ายเมล็ดข้าวสาร มีความแข็งแรงสูง ส่วนมากสกัดได้จากวิธีการไฮโดรไลซิสด้วยกรด (acid hydrolysis)

(2) เซลลูโลสนาโนไฟบริล (cellulose nanofibril, CNF) หรือ nanofibrillated cellulose (NFC) หรือ microfibrillated cellulose (MFC) คือ นาโนเซลลูโลสที่มีรูปร่างเป็นเส้นใยยาว และมีความยุ่งเหยิง องค์กรประกอบทางเคมี ประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นผลึก (crystalline) และอสัณฐาน (amorphous) โดยทั่วไป ได้จากกระบวนการเชิงกล หรือ กระบวนการเชิงเคมีร่วมกับกระบวนการเชิงกล [16] เมื่อเปรียบเทียบกับเซลลูโลสนาโนคริสทอลล์ เซลลูโลสนาโนไฟบริลจะมีสัดส่วนความยาวต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางยาวกว่า พื้นที่ผิวสูงกว่า และหมู่ไฮดรอกซิลที่แผ่ขยายมากกว่า ทำให้ปรับผิวหน้าโครงสร้างได้ง่าย



ภาพที่ 2-11 แสดงลักษณะของเซลลูโลสนาโนไฟบริล [17]

(3) bacterial nanocellulose เป็นนาโนเซลลูโลสที่ต่างจาก 2 ชนิดที่ได้กล่าวถึงไปแล้ว เนื่องมาจากการสกัดจากวิธีล่างขึ้นบน (bottom-up method) ผลิตได้จากการสร้างขึ้นของน้ำตาลโมลกุลต่ำโดยแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียที่ใช้กันเป็นส่วนใหญ่ คือ กลูคอนอะซิโตแบคเตอร์ ไซลินัส (gluconacetobacter xylinus) และจะอยู่ในรูปของสารบริสุทธิ์ โดยปราศจากองค์ประกอบอื่น ๆ ของชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลส (lignocellulosic biomass) เช่น ลิกนิน

ในส่วนของการนำนาโนเซลลูโลสไปใช้งานนั้น สามารถประยุกต์ใช้ในอาหารได้ เช่น บรรจุภัณฑ์อาหาร อิมัลซิไฟเออร์ วัตถุเจือปนอาหาร และวัสดุเชิงประกอบ อีกทั้งยังใช้ในการแพทย์และอุตสาหกรรมอื่น ๆ ได้ นอกจากนี้ ยังมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับนาโนเซลลูโลสจากไฟ ระบุว่า นาโนเซลลูโลสที่สังเคราะห์ด้วยวิธี tempo-mediated oxidation จากไฟก็สามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้เช่นเดียวกัน [18]

## 2.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของพืชตามวิธีของ Goering และ Van Soest (1970)

เป็นการสกัดตัวอย่างโดยเริ่มจากการใช้สารชะล้างที่มีความเป็นกลาง (neutral detergent) สำหรับองค์ประกอบของผนังเซลล์ ซึ่งเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณของแร่ธาตุ แล้วนำตัวอย่างที่ถูกสกัดแล้วมาสกัดต่อด้วยสารชะล้างที่มีค่าเป็นกรด (acidic detergent) เพื่อสกัดหาปริมาณของเฮมิเซลลูโลส จากนั้นจึงนำตัวอย่างเดิมมาสกัดต่อไปเพื่อหาปริมาณของลิกนินด้วยเปอร์แมงกาเนตลิกนิน (permanganateliginin) ในขั้นตอนสุดท้ายจะนำส่วนของตัวอย่างที่ผ่านการสกัดลิกนินออกไปเผาให้กลายเป็นเถ้าเพื่อหาปริมาณของเซลลูโลส

สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ขั้นตอน [19] ดังนี้

- (1) การสกัดด้วย neutral detergent

$$\% \text{ Neutral detergent fiber (NDF)} = \frac{[(\text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนัก NDF}) - \text{น้ำหนัก crucible}] \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}}$$

- (2) การสกัดด้วย acidic detergent

$$\% \text{ Acid detergent fiber (ADF)} = \frac{[(\text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนัก ADF}) - \text{น้ำหนัก crucible}] \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}}$$

$$\% \text{ Hemicellulose} = \% \text{ NDF} - \% \text{ ADF}$$

- (3) การวิเคราะห์หาเปอร์แมงกาเนตลิกนิน (permanganateliginin (PML))

$$\% \text{ Lignin} = \frac{(A-B) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}}$$

$$\text{โดยที่ } A = \text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนัก ADF}$$

$$B = \text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนักพืชที่ผ่านการสกัดลิกนินออก}$$

$$C = \text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}$$

- (4) การวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลสด้วยการเผาเถ้า

$$\% \text{ Cellulose} = \frac{(B-D) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}}$$

$$\text{โดยที่ } D = \text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนักตัวอย่างพืชหลังการเผา}$$

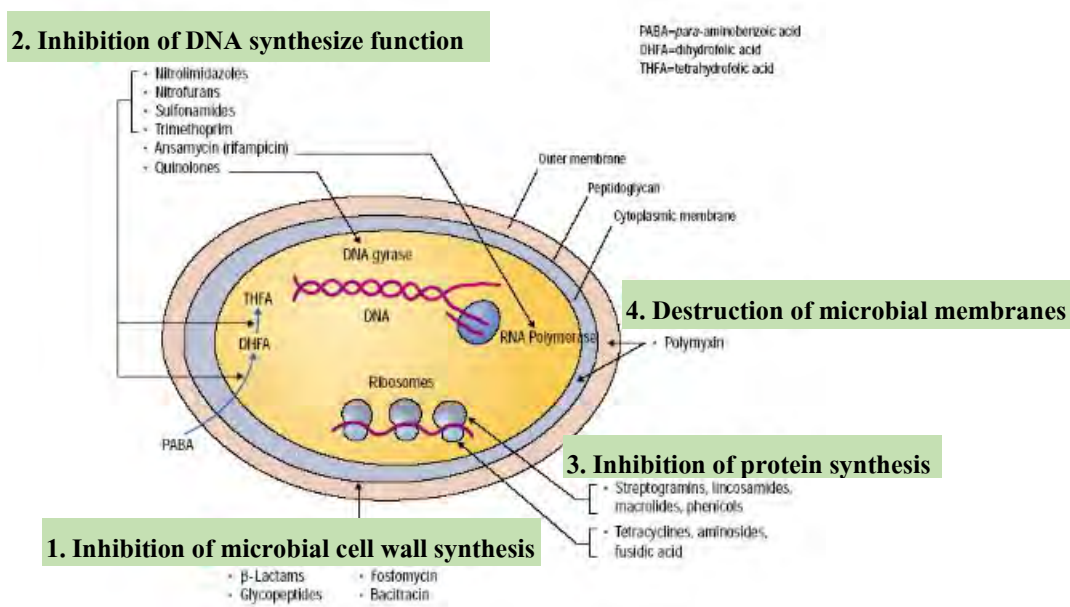
## 2.5 กลไกการต้านเชื้อจุลินทรีย์และการวิเคราะห์

จุลินทรีย์มีทั้งชนิดที่เป็นประโยชน์และให้โทษ ซึ่งในส่วนของจุลินทรีย์ที่ให้โทษนั้น จะก่อให้เกิดการสูญเสียและการทำลายได้หลากหลายประการ เช่น จุลินทรีย์อาจเป็นสาเหตุในการก่อโรคแก่มนุษย์ สัตว์ ตลอดจนพืชพรรณต่าง ๆ จากการปนเปื้อนในอาหารหรือวัตถุดิบที่ใช้ในการประกอบอาหาร ซึ่งมีการผลิตสารบางอย่างออกมาจนทำให้อาหารนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจนไม่สามารถรับประทานได้ หรืออาจผลิตสารบางอย่างที่เป็นอันตรายต่อร่างกายเมื่อบริโภคเข้าไป จุลินทรีย์สามารถทำลายวัสดุได้หลายชนิดไม่ว่าจะเป็นข้าวของเครื่องใช้ เช่น ไม้ หนังสัตว์ ผ้า สะพาน อาคาร บ้านเรือน สีทาบ้าน ตลอดจนโบราณวัตถุ หรืออาจทำให้เปลี่ยนสภาพไปอันจะก่อให้เกิดความเสียหายในด้านต่าง ๆ ได้ ดังนั้น เพื่อไม่ให้เกิดความสูญเสียเหล่านี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องหาวิธีการในการควบคุมจุลินทรีย์ดังกล่าว ซึ่งวิธีการควบคุมนั้นมีหลายวิธี ทั้งแบบการฆ่า การยับยั้ง และการกำจัดจุลินทรีย์ออกไปนั่นเอง [20]

สารต้านเชื้อจุลินทรีย์หรือสารปฏิชีวนะ คือ สารที่ได้มาจากการสังเคราะห์ขึ้นด้วยวิธีทางเคมี หรือสารที่สร้างมาจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ และทำลายได้ ซึ่งสามารถแบ่งประเภทการทำงานของสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ 2 แบบ คือ (1) เข้าไปทำลายหรือฆ่าจุลินทรีย์ เรียกว่า แบคเทอริโอไซด์อล (bacteriocidal) และ (2) มีผลไปยับยั้งการเจริญหรือการขยายตัวของจุลินทรีย์ เรียกว่า แบคเทอริโอสแตติก (bacteriostatic)

สำหรับการจำแนกประเภทของสารต้านเชื้อจุลินทรีย์จะจำแนกตามกลไกวิธีการเข้าขัดขวางการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หรือแบคทีเรีย โดยจะสามารถแบ่งออกได้ทั้งหมด 4 ประเภท [21] ดังแสดงในภาพที่ 2-12 คือ

- (1) ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์
- (2) ขัดขวางเมตาบอลิซึมของ DNA
- (3) ยับยั้งการสร้างโปรตีน
- (4) ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์



ภาพที่ 2-12 กลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่อจุลินทรีย์ [21]

ในส่วนของ การวิเคราะห์หรือทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ สามารถทำได้ 2 วิธี [22] ดังนี้

ก. **การทำให้เจือจาง (dilution method)** – เป็นการเจือจางสารเคมีหรือสารสกัดในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ให้มีความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ สำหรับนำมาเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่ผสมสารเคมีลงไป แล้ววัดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยการเจือจางนี้สามารถเจือจางได้ทั้งในอาหารแข็ง (agar dilution method) ซึ่งจะเหมาะกับเชื้อราที่มีการเจริญแบบแผ่ไปบนผิวหน้าของอาหาร และการเจือจางในอาหารเหลว (broth dilution method) จะเหมาะกับเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ หรือเชื้อราที่ส่วนของการขยายพันธุ์มีการเจริญเติบโตคล้ายกับยีสต์

ข. **การแพร่ (diffusion method)** – เป็นการทำให้ตัวยาหรือสารสกัดจากจุดใดจุดหนึ่งซึมเข้าไปในอาหารที่มีการผสมเชื้อจุลินทรีย์ในจำนวนที่เหมาะสมลงไป ซึ่งสารสกัดจะมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยการวัดผล จะทำในบริเวณที่เกิดการยับยั้งของเชื้อจุลินทรีย์ (zone of inhibition หรือ clear zone) ทั้งนี้ วิธีการนี้ยังสามารถแบ่งย่อยออกได้เป็นอีก 2 แบบ นั่นคือ

(1) paper disc methods ใช้กระดาษกรองเป็นแผ่นดิสก์สำหรับหยดสารสกัด เพื่อให้สารสกัดเกิดการซึมจากกระดาษกรองลงไปยังจานเพาะเชื้อ

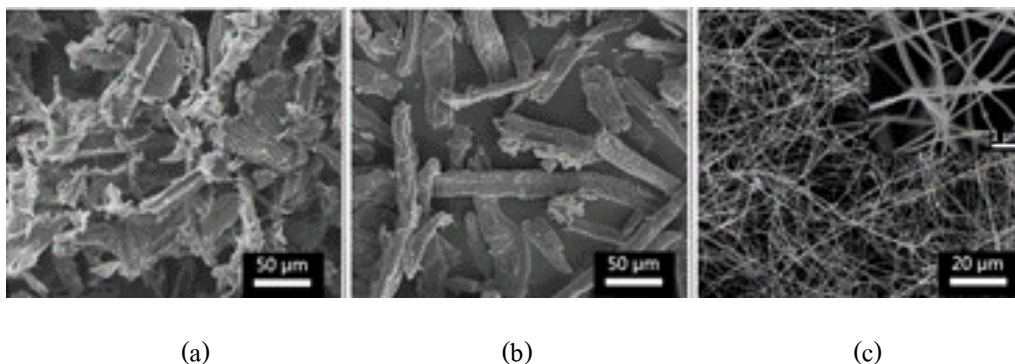
(2) thin layer chromatography disc methods (TLC) ใช้ TLC เป็นแผ่นดิสก์สำหรับวางแผ่นซิลิกาเจลบนแผ่นกระดาษ TLC บริเวณที่ตรวจพบ fraction แล้วนำแผ่น TLC วางลงในจานเพาะเชื้อเพื่อทำการทดสอบต่อไป

## 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยของ Azeez และ Orege [4] ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของลำต้นและใบไม้ ประกอบไปด้วย 3 องค์ประกอบหลัก ได้แก่ เซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน มีความเกี่ยวข้องกันอย่างใกล้ชิดและมีโครงสร้างที่ซับซ้อน โดยสัดส่วนขององค์ประกอบหลักมีมากถึง 90% จากมวลรวมทั้งหมด ซึ่งมีปริมาณของเซลลูโลสอยู่ประมาณ 21% ในส่วนขององค์ประกอบที่มีสัดส่วนรองลงมาจะประกอบไปด้วยรงควัตถุ (pigment), แทนนิน (tannins), โปรตีน (protein), ไขมัน (fat), เพคติน (pectin), เถ้า (ash), เรซิน (resins), แวกซ์ (waxes) และเกลืออนินทรีย์ (inorganic salts) องค์ประกอบเหล่านี้มีบทบาทที่สำคัญต่อกิจกรรมทางกายภาพของไม้ จะถูกพบในช่องว่างของเซลล์ (cell cavity) หรือ ออร์แกเนลล์พิเศษ (special organelles) และองค์ประกอบของไม้นั้นมีความคล้ายคลึงกับไม้ชนิดอื่น ๆ แต่จะต่างกันตรงที่ไม้มีปริมาณขององค์ประกอบรองที่สูงกว่า

งานวิจัยของ Marloie และคณะ [23] ได้ศึกษาสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของใบไม้ต่อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) และเอสเชอริเชีย โคลิ (*Escherichia coli*) เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้มักเป็นสาเหตุในการติดเชื้อแบคทีเรียและเป็นเชื้อโรคที่มักพบในผู้ป่วยที่ต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลทั่วโลก อาทิเช่น โรคท้องร่วง, โรคปอดบวม และเยื่อหุ้มสมองอักเสบในกรณีที่เกิดการติดเชื้ออย่างรุนแรง เป็นต้น โดยผลลัพธ์ที่ได้ พบว่าใบไม้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่าใบไม้สามารถนำมาใช้เป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์และสามารถนำมาใช้งานทางการแพทย์ได้ อย่างการนำไปผลิตเป็นอาหารทางการแพทย์และยารักษาโรค

และจากการศึกษาการผลิตนาโนเซลลูโลสที่มีความบริสุทธิ์สูงซึ่งสกัดจากผนังเซลล์ของใบไม้ โดย Fan และคณะ [24] พบว่าสามารถทำการสกัดใบไม้จากธรรมชาติได้จริง โดยใช้กระบวนการผสมกันระหว่างการปรับสภาพด้วยสารเคมี (chemical pretreatments) กับกระบวนการอัลตราโซนิกส์ (ultrasonic process) ได้นาโนเซลลูโลสที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 53.2 นาโนเมตร และทำการศึกษาลักษณะของนาโนเซลลูโลสที่ได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope (SEM)) ดังแสดงในภาพที่ 2-13



ภาพที่ 2-13 ภาพจาก SEM ของ (a) ใบไม้ (b) เซลลูโลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยสารเคมี (c) นาโนเซลลูโลส [24]

### บทที่ 3

#### การทดลอง

#### 3.1 วัตถุประสงค์และสารเคมี

1. กรด-3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic acid (DNS))
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide (NaOH))
3. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรต (sodium potassium tartrate (rochelle salt))
4. สารละลายฟีนอล (phenol solution)
5. โซเดียมเมตาไบซัลเฟต (sodium metabisulphate)
6. ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต ไดไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
7. โซเดียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต ไดไฮเดรต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
8. โซเดียมลอริลซัลเฟต (sodium lauryl sulphate)
9. ไดโซเดียมเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิเตต ดีไฮเดรต (disodium ethylenediamine tetraacetate (EDTA) dehydrate)
10. โซเดียมบอเรต เดคาไฮเดรต (sodium borate decahydrate ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ))
11. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
12. 2-เอทอกซีเอทานอล (2-ethoxyethanol)
13. กรดซัลฟูริก (sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ))
14. ซีทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (cetyl trimethylammonium bromide (CTAB))
15. โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตชนิดอิ่มตัว (saturated potassium permanganate ( $\text{KMnO}_4$ ))
16. ซิลเวอร์ซัลเฟต ( $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ )
17. ไอร์ออน (III) ไนเตรต ไนนะไฮเดรต ( $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ )
18. ซิลเวอร์ไนเตรต ( $\text{AgNO}_3$ )

19. โพแทสเซียมอะซิเตท (potassium acetate)
20. กรดอะซิติก (acetic acid)
21. เทอร์เชียรีบิวทิลแอลกอฮอล์ (tertiary butyl alcohol)
22. ลิกนินบัฟเฟอร์ (lignin buffer)
23. กรดออกซาลิก (oxalic acid)
24. เอทานอล (ethanol)
25. กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
26. น้ำกลั่น
27. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>))
28. โซเดียมซิลิเกต (sodium silicate (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>))
29. โซเดียมซัลไฟต์ (sodium sulfite (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>))
30. เดคะไฮโดรเนฟทาเลน (decarhydronephthalene)
31. ใบไม้ 5 พันธุ์ ได้แก่ ไม้คำ (ขวา), ไม้เป่า (แม่ตะวอ), ไม้ขางหม่น (นวลราชินี), ไม้ข้าวหลาม (กาบแดง) และ ไม้บง (ใหญ่)

## 3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือทดสอบ

### 3.2.1 อุปกรณ์

1. โถดูดความชื้น (dessicator)
2. แผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์
3. เทอร์โมมิเตอร์
4. แท่งแม่เหล็กกวนสาร
5. ตัวควบแน่น (condenser)
6. ถ้วยกรองแบบแก้ว (sintered glass crucible)

### 3.2.2 เครื่องมือทดสอบ

1. เครื่องบดแห้งอเนกประสงค์
2. เครื่องปั่นความเร็วรอบสูง (BUO – 121280, Buono, Taiwan)
3. เครื่องกวนสารชนิดให้ความร้อน
4. ตู้อบ
5. เครื่องบดผสมแรงดันสูง (LM20, Microfluidic, Westwood, MA)
6. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JSM-IT-500HR & JSM-7800F, JEOL, Peabody, MA)
7. เครื่องวิเคราะห์ความยาวเส้นใย (LDA02, Fiber Quality Analyzer, Hawkesbury, Canada)
8. เครื่องชั่งน้ำหนัก (ทศนิยมอย่างน้อย 3 ตำแหน่ง)
9. เครื่องปั๊มสุญญากาศ
10. เครื่องเผาถ้ำ

### 3.3 วิธีการทดลอง

#### 3.3.1 การเตรียมใบไม้

นำใบไม้ทั้ง 5 พันธุ์ที่ได้มาจากสวนลุงโชค อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา มาตากแห้งเพื่อกำจัดความชื้นออก จากนั้นจึงนำไปบดด้วยเครื่องบดแห้งอเนกประสงค์ แล้วนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อไล่ความชื้นอีกครั้ง ก่อนจะนำไปทำการทดลองในข้อ 3.3.2 ต่อไป

#### 3.3.2 การหาปริมาณเซลลูโลสและองค์ประกอบอื่น ๆ ตามวิธีการของ Goering & Van Soest (1970) [19]

##### การเตรียมสารเคมี

ก. การเตรียมสารละลาย dinitrosalicylic acid (DNS)		
3,5-dinitrosalicylic Acid	7.49	กรัม
NaOH	13.98	กรัม
rochelle salt	216.10	กรัม
phenol solution (pH 7.0)	5.37	มิลลิลิตร



sodium metabisulphate	5.86	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

ข. การเตรียม 50 mM sodium phosphate buffer pH 7

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5.15	กรัม
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.30	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

ค. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ห่อหุ้มประกอบของลิกโนเซลลูโลส

(1) การเตรียมสารชะล้างที่มีค่าเป็นกลาง (neutral detergent)

sodium lauryl sulphate	30	กรัม
disodium ethylenediamine tetraacetate (EDTA) dehydrate	16.18	กรัม
sodium borate decahydrate ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ )	6.81	กรัม
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	4.56	กรัม
2-ethoxyethanol (ethylene glycol monoethyl ether)	10	มิลลิลิตร

นำ EDTA และ  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  มาละลายในน้ำกลั่นพอประมาณ นำไปต้มจนละลายหมด จากนั้นนำไปผสมกับ sodium lauryl sulphate และ 2-ethoxyethanol แล้วจึงนำ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  มาละลายในน้ำกลั่นพอประมาณ นำไปต้มจนละลายหมด แล้วนำไปผสมกับสารละลายข้างต้น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.9-7.1

(2) การเตรียมสารชะล้างที่มีค่าเป็นกรด (acidic detergent)

sulfuric acid (% assay = 100)	49.04	กรัม
cetyl trimethylammonium bromide (CTAB)	20	กรัม

นำกรดซัลฟิวริกใส่ลงในขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1 ลิตร ที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่พอประมาณ ผสมให้เข้ากัน และปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ตรวจสอบความเข้มข้นของสารละลายด้วยวิธีการไตเตรท ให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1 N แล้วจึงเติม cetyl trimethylammonium bromide ลงไป ผสมให้เข้ากัน

- (3) การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตชนิดอิ่มตัว (saturated potassium permanganate)

KMnO <sub>4</sub>	450	กรัม
Ag <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.05	กรัม

ละลาย KMnO<sub>4</sub> และ Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดแก้วสีชา จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น ระวังอย่าให้โดนแสง

- (4) การเตรียมสารละลาย lignin buffer

Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	6	กรัม
AgNO <sub>3</sub>	0.15	กรัม
potassium acetate	5	กรัม
acetic acid, glacial	500	กรัม
tertiary butyl alcohol	400	กรัม

ละลาย Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O และ AgNO<sub>3</sub> ในน้ำกลั่น แล้วนำมาผสมกับ acetic acid และ potassium acetate จากนั้นจึงเติม tertiary butyl alcohol ผสมลงไปให้เข้ากัน

- (5) การเตรียมสารละลายเปอร์แมงกาเนตผสม (combined permanganate)

ผสม saturated potassium permanganate กับ lignin buffer ในอัตราส่วน 2:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยจะต้องทำการเตรียมใหม่ก่อนนำไปใช้ เก็บไว้ไม่เกิน 1 สัปดาห์ในตู้เย็นและห้ามไม่ให้ถูกแสง หากสารกลายเป็นสีแดงจะไม่สามารถนำมาใช้ได้

- (6) การเตรียมสารละลายดีมิเนอรัลไลซิง (demineralizing)

oxalic acid dehydrate	50	กรัม
-----------------------	----	------

95% ethanol	700	มิลลิลิตร
hydrochloric acid (HCl)	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	250	มิลลิลิตร

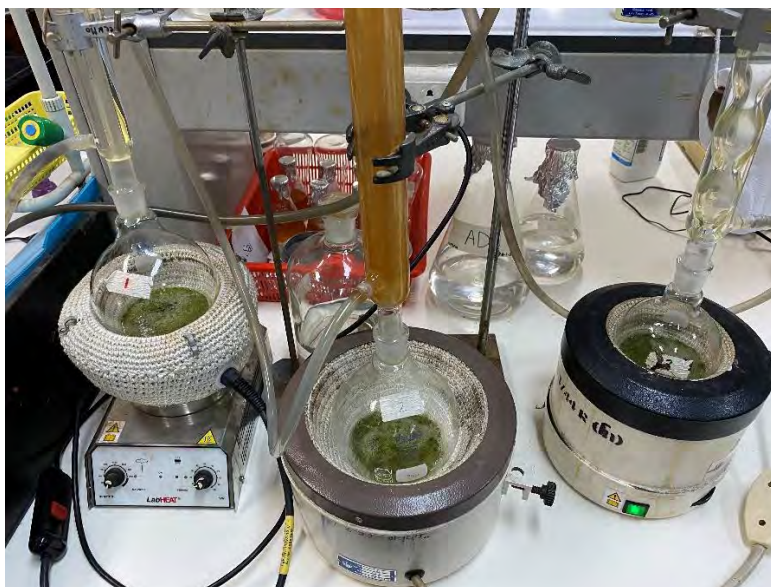
ละลาย oxalic acid dehydrate ใน 95% ethanol แล้วทำการเติม HCl และน้ำกลั่นลงไป ตามลำดับ จากนั้นจึงผสมให้เข้ากัน

### การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

#### ก. การสกัดด้วยสารละลาย neutral detergent

(1) นำ sintered glass crucible เบอร์ 1 ขนาด 50 มิลลิลิตร ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่โถดูดความชื้น ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วทำการชั่งน้ำหนัก

(2) นำตัวอย่างพืชที่ผ่านการบดละเอียดใส่ลงในบีกเกอร์ทรงสูง แล้วเติมสารละลาย neutral detergent 100 มิลลิลิตร sodium sulfite 0.5 กรัม และ decahydronaphthalene 2 มิลลิลิตรลงไป จากนั้นนำมาทำการกลั่นแบบไหลกลับหรือรีฟลักซ์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง



ภาพที่ 3-1 การรีฟลักซ์ตัวอย่างพืช

(3) ถ่ายส่วนผสมที่ผ่านการรีฟลักซ์แล้ว ลงใน sintered glass crucible ทำการล้างตัวอย่างใน crucible ด้วยน้ำร้อน (อุณหภูมิประมาณ 90-100 องศาเซลเซียส) 3-4 ครั้ง แล้วล้างด้วย acetone อีก 2 ครั้ง ดูดสารละลายออกด้วยปั๊มสุญญากาศ จากนั้นนำ crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

(4) นำ crucible ออกมาทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วทำการชั่งน้ำหนัก โดยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น คือ ปริมาณของเยื่อใยที่สกัดด้วยสารละลายที่เป็นกลาง (neutral detergent fiber (NDF))

#### ข. การวิเคราะห์หาปริมาณเฮมิเซลลูโลสด้วยสารละลาย acidic detergent

(1) นำตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดด้วย neutral detergent แล้วจากข้อ ก. มาถ่ายใส่ลงในบีกเกอร์ เพื่อทำการรีฟลักซ์ด้วย acid detergent โดยเติม acid detergent 100 มิลลิลิตร และ decahydronaphthalene 2 มิลลิลิตรลงไป รีฟลักซ์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยนับเวลาตั้งแต่สารละลายเริ่มเดือด

(2) ทำการกรองตัวอย่างพืชใน crucible ใยเค็มเพื่อลดการสูญเสียตัวอย่างให้น้อยที่สุด แล้วล้างด้วยน้ำร้อน (อุณหภูมิประมาณ 90-100 องศาเซลเซียส) 3-4 ครั้ง จากนั้นล้างด้วย 80% ethanol อีก 2 ครั้ง

(3) นำ crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นใน โถดูดความชื้น แล้วทำการชั่งน้ำหนัก โดยน้ำหนักที่ได้ คือ น้ำหนักของ acid detergent fiber (ADF) ซึ่งน้ำหนักที่แตกต่างระหว่าง NDF และ ADF นี้ คือ น้ำหนักของเฮมิเซลลูโลสนั่นเอง

#### ค. การวิเคราะห์หาปริมาณลิกนิน (permanganatelignin ,PML)

(1) เติมสารละลาย combined permanganate 25 มิลลิลิตร ลงใน crucible ที่มีตัวอย่างบรรจุอยู่ ซึ่งผ่านการสกัดด้วย acidic detergent มาแล้วจากข้อ ข. แช่ crucible ลงในถาดที่มีน้ำเย็นสูงประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วคนด้วยแท่งแก้วเป็นบางครั้งเพื่อไม่ให้ตัวอย่างจับตัวกันเป็นก้อน ทิ้งไว้ 45 นาที จากนั้นทำการดูดสารละลายออกโดยใช้ vacuum pump



ภาพที่ 3-2 เติมสารละลาย combined permanganate ลงใน crucible ที่มีตัวอย่างบรรจุอยู่

(2) เติมสารละลาย combined permanganate 25 มิลลิลิตร ลงใน crucible อีกครั้ง ทิ้งไว้ 45 นาที แล้วทำการดูดสารละลายออกโดยใช้ vacuum pump เช่นเดิม

(3) เติมสารละลาย demineralizing ลงใน crucible แต่ละถ้วย แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงดูดสารละลายออกโดยใช้ vacuum pump ทำซ้ำจนตัวอย่างกลายเป็นสีขาวภายในเวลา 20 นาที จากนั้นล้างออกด้วย 80% ethanol และ acetone สุดท้ายทำการดูดสารละลายออกอีกครั้งด้วย vacuum pump



ภาพที่ 3-3 ตัวอย่างเริ่มกลายเป็นสีขาว

(4) นำ crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่าง acid detergent fiber (ADF) และน้ำหนักพืชที่ผ่านการสกัดลิกนินออก ซึ่งน้ำหนักที่หาได้นี้ คือ น้ำหนักของลิกนิน

#### ง. การวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลสด้วยการเผาเถ้า

นำ crucible ที่ผ่านการสกัดลิกนินออกแล้วจากข้อ ค. ไปเผาในเครื่องเผาเถ้าที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปล่อยให้เย็นใน desiccator แล้วทำการชั่งน้ำหนัก ซึ่งน้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่างน้ำหนักพืชที่ผ่านการสกัดลิกนินออกกับน้ำหนักหลังการเผาเถ้า คือ น้ำหนักของเซลลูโลส ส่วนน้ำหนักเถ้าที่ได้คือ ผลต่างระหว่างน้ำหนักหลังการเผากับน้ำหนักของ crucible



ภาพที่ 3-4 เถ้าที่ได้หลังจากการเผา

### 3.3.3 การทำเยื่อให้บริสุทธิ์

โดยใช้ใบไม้ที่ได้ทำการคัดเลือกพันธุ์จากปริมาณเซลลูโลสที่สูงกว่ามา 2 ชนิด

ก. การทำเยื่อให้บริสุทธิ์โดยการต้มกับสารละลายด่าง (alkali treatment)

(1) นำแท่งแม่เหล็กกวนสารและเยื่อใบไม้พันธุ์ละ 40 กรัมที่ผ่านการปั่นละเอียดแล้วใส่ลงในบีกเกอร์ ขนาด 2,000 มิลลิลิตร (ใส่แยกบีกเกอร์ละ 1 ชนิด) จากนั้นเทสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 4% w/v ลงไปจนท่วม โดยให้ปริมาณสุทธิเป็น  $\frac{3}{4}$  ของบีกเกอร์ และใช้แท่งแก้วคนส่วนผสมให้เข้ากัน

(2) นำบีกเกอร์ไปติดตั้งบนเครื่องกวนสารชนิดให้ความร้อน (hot plate) โดยใช้กระดาษฟอยล์แทนฝาปิดเพื่อลดการระเหยของสารละลาย จากนั้นทำการฉีกกระดาษฟอยล์ให้ขาดออกที่บริเวณด้านหนึ่งประมาณ 1.5 นิ้ว เพื่อให้สามารถใส่เทอร์โมมิเตอร์ลงไปสำหรับวัดอุณหภูมิของสารละลายได้

(3) จัดวางให้แท่งแม่เหล็กกวนสารอยู่บริเวณตรงกลางของก้นบีกเกอร์ และทำการปรับระดับการกวนสารให้พอดี ไม่แรงหรือเบาจนเกินไป เพื่อให้เกิดลักษณะการผสมของสารเป็นรูปเบวอร์เท็กซ์ (vortex)

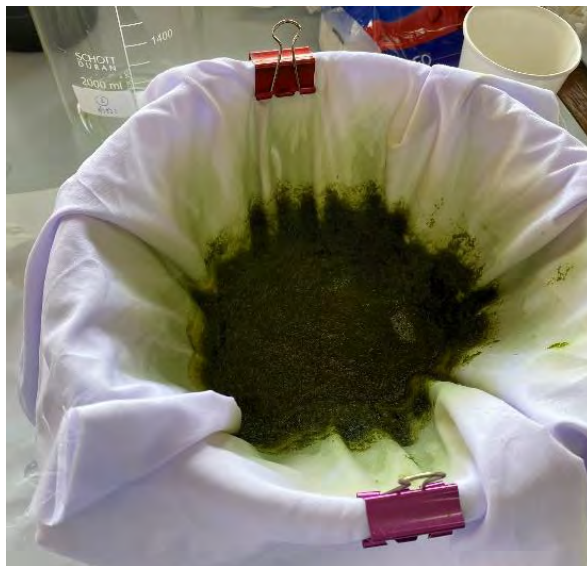
(4) ทำการต้มสารที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเริ่มทำการจับเวลาเมื่ออุณหภูมิของสารละลายเพิ่มสูงขึ้นจนถึง 80 องศาเซลเซียส และพยายามรักษาระดับของอุณหภูมิให้คงที่ในระหว่างการต้ม ให้อยู่ระหว่าง  $85 \pm 2$  องศาเซลเซียส



ภาพที่ 3-5 การต้มเยื่อ



(5) เมื่อครบ 2 ชั่วโมงแล้ว นำสารละลายเยื่อมาตั้งพักไว้ซักครู่เพื่อคลายความร้อน ก่อนจะนำมากรองสารละลายต่างออกด้วยผ้ากรองที่ถูกติดตั้งบนถังพลาสติก จากนั้นชะล้างเยื่อด้วยน้ำกลั่นให้ทั่วประมาณ 3-5 ครั้ง เพื่อให้เยื่อมีความเป็นกลาง แล้วทำการบิดผ้ากรองเพื่อคั้นน้ำออกจากเยื่อ



ภาพที่ 3-6 เยื่อที่ผ่านการกรองสารละลายต่างออกและถูกชะล้างด้วยน้ำกลั่น



ภาพที่ 3-7 เยื่อที่ผ่านการคั้นน้ำออกแล้ว

- (6) ทำซ้ำ (ข้อ (1) – (5)) จนครบ 3 ครั้ง
- (7) เก็บตัวอย่างของสารละลายต่างที่ได้จากการต้มแต่ละครั้งไว้ในโหลแก้ว



ภาพที่ 3-8 ตัวอย่างการเก็บสารละลายต่างที่ผ่านการต้มเยื่อในแต่ละรอบ

ข. การฟอกเยื่อ (bleaching)

(1) นำเยื่อที่ได้จากข้อ ก. และแบ่งแม่เหล็กกวนสารมาบรรจุลงในบีกเกอร์ปริมาตรเท่าเดิม ซึ่งการทดลองในขั้นตอนนี้จะมีลักษณะคล้ายกับขั้นตอนของการต้มเยื่อ แต่การฟอกเยื่อจะใช้สารละลายฟอกขาวที่มีส่วนผสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 4% w/v, โซเดียมซัลไฟต์ 2% w/v และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10% w/v แทน

(2) ปรับสารละลายให้อยู่ภายใต้สภาวะความเป็นกรดต่าง (pH) ที่ประมาณ 10-11 ด้วยการหยดสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และทำการทดสอบด้วยกระดาษวัดค่า pH

(3) ฟอกเยื่อที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง และทดสอบ pH ทุก ๆ 15 นาที พยายามรักษาอุณหภูมิและค่า pH ของสารละลายให้คงที่ตลอดการฟอกเยื่อ



ภาพที่ 3-9 การฟอกเยื่อ



(4) เมื่อครบ 1.5 ชั่วโมงแล้ว นำสารละลายเขี่ยมาตั้งพักไว้ซักครู่เพื่อคลายความร้อน ก่อนจะนำมากรองสารละลายออกด้วยผ้ากรองที่ถูกติดตั้งบนถังพลาสติก จากนั้นชะล้างเยื่อด้วยน้ำกลั่นให้ทั่วประมาณ 3-5 ครั้ง เพื่อให้เยื่อมีความเป็นกลาง แล้วทำการบิดผ้ากรองเพื่อคั้นน้ำออกจากเยื่อ พร้อมเก็บตัวอย่างของสารละลายที่ได้จากการฟอกไว้ในโหลแก้ว



ภาพที่ 3-10 เยื่อที่ผ่านการฟอก กรองสารละลายออก และถูกชะล้างด้วยน้ำกลั่น

### 3.3.4 การทดลองผลิตนาโนเซลลูโลส

(1) จัดเตรียมเยื่อก่อนนำไปผลิตเป็นนาโนเซลลูโลส โดยนำไปปั่นกับน้ำด้วยเครื่องปั่นความเร็วรอบสูง กำหนดให้มีความเข้มข้น 0.2% w/v ในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ทำการปั่นรอบละ 120 วินาที ทั้งหมด 7 รอบ (ดัดแปลงจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ [25])



ภาพที่ 3-11 ปั่นเยื่อกับน้ำด้วยเครื่องปั่นความเร็วรอบสูง

(2) นำน้ำเชื้อที่ได้ไปเข้าเครื่องบดผสมแรงดันสูงเพื่อลดขนาดของเส้นใย โดยแยกไมโครไฟบริลให้ออกจากกันด้วยแรงเฉือนและแรงกระแทกภายใต้แรงดันสูง ให้ผ่านเครื่องที่จำนวนรอบทั้งหมด 20 รอบต่อพันธุ์ และระหว่างที่ทำการบดให้สังเกตจำนวนรอบที่เริ่มมองไม่เห็นเส้นใยด้วยตาเปล่า



ภาพที่ 3-12 การผลิตนาโนเซลลูโลส

(3) ทำการเก็บรักษานาโนเซลลูโลสจากใบไผ่ที่แขวนลอยในน้ำ ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 8 – 10 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบการต้านเชื้อจุลินทรีย์และการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่อไป

### 3.4 การวิเคราะห์

3.4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy, SEM)

(1) จัดเตรียมตัวอย่างที่จะนำไปใช้ทดสอบ โดยนำเชื้อในแต่ละสภาวะที่ต้องการวิเคราะห์มากระจายลงบนกระจกปิดสไลด์ผสมกับน้ำ 1-2 หยด แล้วนำไปใส่ไว้ใน desiccator เพื่อให้น้ำระเหยออกเหลือเพียงตัวอย่างเชื้ออยู่บนกระจก

(2) หักกระจกปิดสไลด์ให้มีขนาดเล็กลงเท่ากับตัวรองรับสำหรับบรรจุลงในเครื่อง โดยใช้กาวสองหน้าเป็นตัวยึดติด แล้วนำตัวอย่างไปเคลือบผิวด้วยทองเพื่อให้มีการนำไฟฟ้า

(3) เลือกบันทึกภาพ ณ ตำแหน่งของเชื้อที่ต้องการด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ทำงานร่วมกับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

### 3.4.2 ปริมาณผลผลิต

นำเชื้อที่บดแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยในทุก ๆ 2 ชั่วโมงให้นำออกมาชั่งน้ำหนักจนกว่าน้ำหนักที่ได้จะคงที่ และทำแบบเดียวกันนี้กับเชื้อที่ผ่านการต้มและฟอกแล้ว

$$\text{คำนวณจาก } \% \text{ Yield} = \frac{\text{น้ำหนักเชื้อที่ได้}}{\text{น้ำหนักเชื้อที่ใช้}} \times 100 \%$$

### 3.4.3 ความยาวของเส้นใย ด้วยเครื่องวิเคราะห์เส้นใย (fiber quality analyzer, FQA)

(1) ทำการเปิดบีมลม โดยต้องรอให้เข็มของบีมลมนั้นถึงขีดเต็มก่อน แล้วจึงเปิดวาล์วบริเวณด้านขวา จากนั้นทำการเสียบปลั๊กเครื่อง และเปิดเครื่องกรองน้ำ

(2) เปิดก๊อกน้ำเพื่อให้ น้ำหมุนเวียนเข้ามาในระบบ

(3) เปิดสวิทซ์สีแดงบริเวณหลังเครื่อง เพื่อทำการเปิดเครื่อง

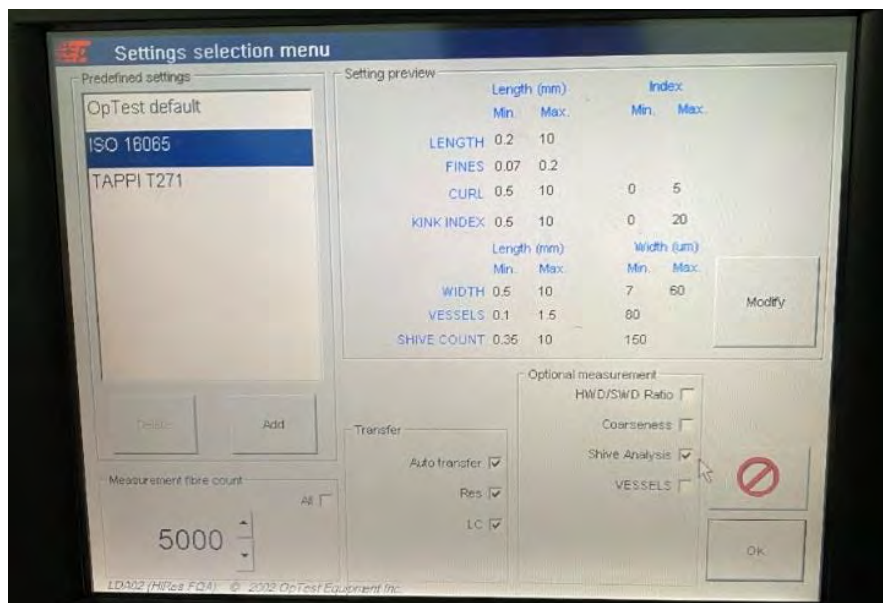
(4) ระหว่างวอร์มเครื่อง ให้ล้างทำความสะอาดบีกเกอร์ที่ใช้สำหรับเครื่อง FQA เท่านั้นเตรียมเอาไว้ แล้วจึงเติมน้ำลงไป 400 มิลลิลิตรให้เท่ากันในทุก ๆ บีกเกอร์

(5) สำหรับการใช้งานครั้งแรก ให้นำบีกเกอร์ที่มีน้ำเปล่าบรรจุอยู่ติดตั้งลงไปบนเครื่องเพื่อทำการเช็คระบบของเครื่องทั้งหมด แล้วกดปุ่ม check บนหน้าจอกอมพิวเตอร์

(6) เมื่อเสร็จเรียบร้อยแล้วให้เทน้ำทิ้ง แล้วเปลี่ยนน้ำใหม่ก่อนนำไปใช้วัดค่าจริง

(7) เมื่อจะเริ่มทำการทดลอง ให้กดปุ่ม measure และตั้งค่าชื่อไฟล์ที่ต้องการ

(8) เลือก iso เป็น 5000, เลือกค่าที่ต้องการวัดเป็นทั้งหมด และ shive



ภาพที่ 3-13 การตั้งค่าเครื่อง FQA

(9) ใส่เชื้อเปียกลงไปในบีกเกอร์ที่มีน้ำบรรจุอยู่ประมาณ 1 ปลายช้อน คนให้เข้ากัน พยายามประมาณการปริมาณเชื้อให้เหมาะสม หากมี fiber frequency อยู่ที่ 60-100 จะทำให้เครื่องใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่น้อยที่สุด

(10) ติดตั้งบีกเกอร์ลงบนเครื่อง แล้วกด start



ภาพที่ 3-14 เครื่อง FQA เริ่มทำการวิเคราะห์

(11) เมื่อเครื่องทำงานเสร็จสิ้นแล้ว ให้กด result เครื่องจะทำการบันทึกข้อมูลเอาไว้ตามชื่อไฟล์ที่เราได้กำหนด

(12) เทน้ำที่เหลือจากในบีกเกอร์ทิ้ง แล้วนำบีกเกอร์เปล่ากลับมาติดตั้งบนเครื่องอีกครั้ง กด perge เพื่อทำการกรองและล้างระบบทั้งหมด โดยจะต้องทำเช่นนี้ทุกครั้งก่อนเริ่มทำการวิเคราะห์ตัวอย่างใหม่

- กดปุ่ม back > new measurement

- ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง

#### 3.4.4 การต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial activity)

(1) ทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์แบบหา % reduction โดยดัดแปลงจาก ASTM E2149-10 และใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการทดสอบ 2 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก

(2) ใช้ปริมาณเชื้อและปริมาณตัวอย่าง อย่างละ 2 มิลลิลิตร สภาวะในการบ่ม 37 องศาเซลเซียส, ไม่มีแสง, ความชื้น 90% และนำไปเพาะในจานที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

#### ตารางที่ 3-1 วิธีการและสภาวะที่ใช้ในการทดสอบการต้านเชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์	วิธีการทดสอบ	สภาวะการบ่ม	ปริมาณเชื้อ/ ปริมาณตัวอย่าง
<i>Escherichia coli</i>	ดัดแปลงจาก ASTM E2149-10	37°C, ไม่มีแสง, ความชื้น 90%, 24 ชั่วโมง	2 มล./2 มล.
<i>Staphylococcus aureus</i>	ดัดแปลงจาก ASTM E2149-10	37°C, ไม่มีแสง, ความชื้น 90%, 24 ชั่วโมง	2 มล./2 มล.

(3) สังเกตการเปลี่ยนแปลงโดยนับจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ เพื่อคำนวณร้อยละการลดลงจากสูตร ดังนี้

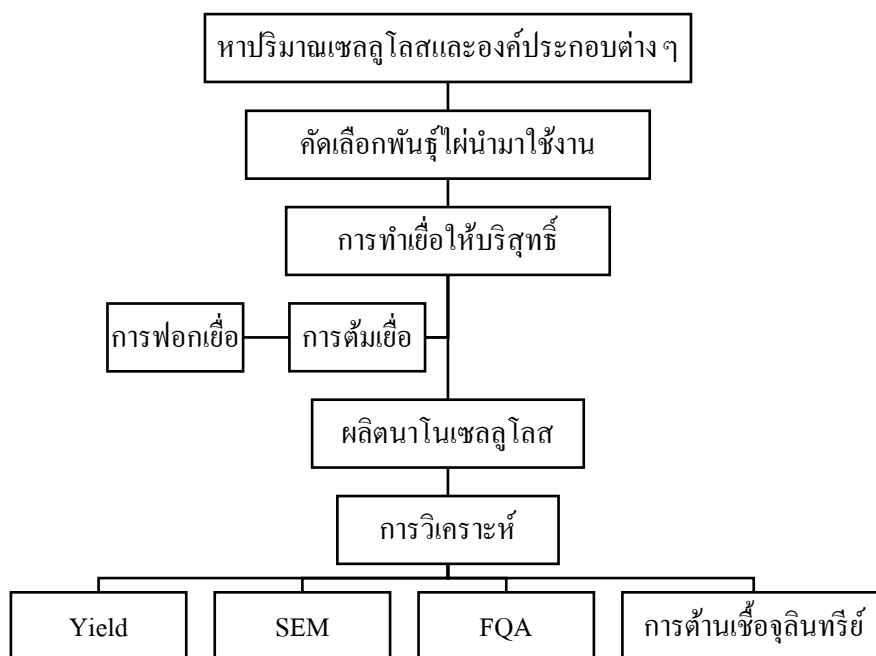
$$\% \text{ reduction} = \frac{B-A}{B} \times 100 \%$$

เมื่อ A = Log CFU per milliliter ของแบคทีเรียหลังการทดสอบ (ชั่วโมงที่ 24)

B = Log CFU per milliliter ของแบคทีเรียก่อนการทดสอบ (ชั่วโมงที่ 0)

(4) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

### 3.5 วิเคราะห์ผลการทดลองและสรุปผล



ภาพที่ 3-15 แผนภาพแสดงขั้นตอนต่างๆ ในการทดลอง

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

ผลการทดลองในบทที่ 4 ประกอบไปด้วย การหาปริมาณเซลลูโลสและองค์ประกอบอื่น ๆ ตามวิธีของ Goering & Van Soest (1970) โดยทำการวิเคราะห์ใบไม้ 5 พันธุ์ ได้แก่ ใผ่ดำ (ชาว), ใผ่เป่า (แม่ตะวอ), ใผ่ซางหม่น (นวลราชินี), ใผ่ข้าวหลาม (กาบแดง) และใผ่บง (ใหญ่) หลังจากนั้นจึงคัดเลือกใบไม้ 2 พันธุ์ ที่มีปริมาณเซลลูโลสสูงสุดมาผ่านกระบวนการทำเชื้อให้บริสุทธิ์ แล้วทำการวิเคราะห์หาค่าปริมาณผลผลิต (yield) หลังการฟอกเชื้อ ตามด้วยการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy, SEM) และการหาความยาวของเส้นใย ด้วยเครื่องวิเคราะห์เส้นใย (fiber quality analyzer, FQA) แล้วจึงทำการแปลงสภาพเส้นใยของใผ่ทั้งสองชนิดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กระดับนาโนเมตร เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของนาโนเซลลูโลสจากใผ่เป็นขั้นตอนสุดท้าย โดยมีผลการทดลองแต่ละส่วนดังต่อไปนี้

#### 4.1 ปริมาณเซลลูโลสและองค์ประกอบอื่น ๆ

ตารางที่ 4-1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบในตัวอย่าง

พันธุ์ใผ่	ปริมาณองค์ประกอบ (% (w/w))				
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เถ้า	อื่น ๆ
ดำ (ชาว)	26.53±0.94	28.16±0.35	11.52±0.05	4.11±0.36	29.68±0.15
เป่า (แม่ตะวอ)	24.63±1.34	20.26±0.88	12.94±0.97	5.27±0.39	36.91±0.25
ซางหม่น (นวลราชินี)	23.33±0.18	29.27±0.82	10.59±0.30	6.10±0.12	30.71±0.19
ข้าวหลาม (กาบแดง)	29.87±0.90	27.22±0.36	13.48±0.85	2.87±0.14	26.55±0.01
บง (ใหญ่)	25.92±1.29	23.21±0.24	10.67±0.66	7.18±0.28	33.02±0.07

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของใบไม้ทั้งหมด 5 พันธุ์ ได้แก่ ใผ่ดำ (ชาว), ใผ่เป่า (แม่ตะวอ), ใผ่ซางหม่น (นวลราชินี), ใผ่ข้าวหลาม (กาบแดง) และใผ่บง (ใหญ่) พบว่าพันธุ์ที่มีปริมาณเซลลูโลสมากที่สุด คือ ใผ่ข้าวหลาม (กาบแดง) ซึ่งมีค่าอยู่ที่ 29.87±0.90 %w/w โดยลำดับถัดมาจะเป็นใผ่ดำ (ชาว), ใผ่บง (ใหญ่) และใผ่เป่า (แม่ตะวอ) ซึ่งมีปริมาณเซลลูโลสอยู่ที่ 26.53±0.94, 25.92±1.29 และ 24.63±1.34 ตามลำดับ ในขณะที่พันธุ์ใผ่ซึ่งมีปริมาณเซลลูโลสน้อยที่สุด คือ ใผ่ซางหม่น (นวลราชินี) มีปริมาณเซลลูโลสอยู่ที่ 23.33±0.18 %w/w

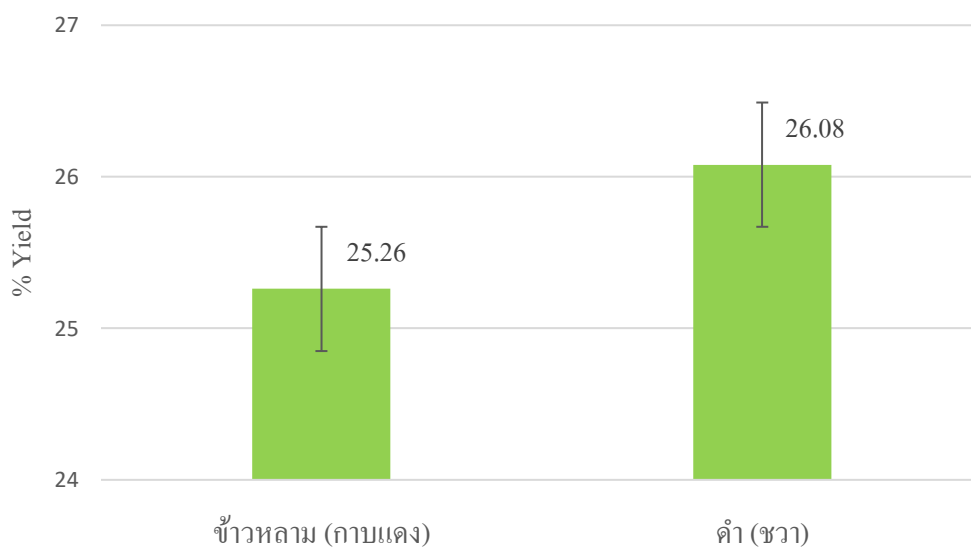
ดังนั้นจึงได้ทำการคัดเลือกพันธุ์ไม้สำหรับนำมาใช้ในการทดลองและกระบวนการวิเคราะห์อื่น ๆ ต่อไป โดยมีเกณฑ์ในการคัดเลือกจากพันธุ์ที่มีปริมาณเซลลูโลสสูงที่สุด 2 อันดับแรก ได้แก่ ไม้ข้าวหลาม (กาบแดง) และ ไม้ดำ (ชวา) เนื่องจากในขั้นตอนการทดลองต่อไป ไม้ไผ่จะถูกผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์เพื่อกำจัดเฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และองค์ประกอบอื่น ๆ ออก แล้วคงเซลลูโลสไว้เพื่อนำไปแปลงสภาพเป็นนาโนเซลลูโลสต่อไป

#### 4.2 ปริมาณผลผลิต (yield)

ปริมาณผลผลิต (yield) เป็นปริมาณผลผลิตของไม้ไผ่ก่อนและหลังกระบวนการทำให้บริสุทธิ์และกระบวนการฟอกเชื้อ เพื่อดูว่าปริมาณผลผลิตที่ได้สอดคล้องกับปริมาณเซลลูโลสในหัวข้อที่ 4.1 หรือไม่

ตารางที่ 4-2 น้ำหนักเชื้อก่อน-หลังจากการต้มและฟอกเชื้อของไม้แต่ละพันธุ์

ชนิดเชื้อ	น้ำหนัก (กรัม)	
	ไม้ข้าวหลาม (กาบแดง)	ไม้ดำ (ชวา)
ก่อนทำ	40.609±0.001	40.017±0.004
หลังทำ	10.257±0.002	10.435±0.002



ภาพที่ 4-1 % Yield ภายหลังจากการต้มและฟอกเชื้อของไม้แต่ละพันธุ์

จากตารางที่ 4-2 ใช้น้ำหนักไม้ไผ่บ่มแห้งของข้าวหลาม (กาบแดง) และดำ (ชวา) เท่ากับ 40.609 และ 40.017 กรัม ตามลำดับ เมื่อนำไปผ่านกระบวนการต้มเชื้อ 3 ครั้งและฟอกเชื้ออีก 1 ครั้งตามการทดลองในข้อ 3.3.3 นำเชื้อที่ได้ไปอบแห้งแล้วจึงนำมาชั่งน้ำหนัก จะได้เชื้อแห้งของข้าวหลาม (กาบแดง) และดำ (ชวา) เท่ากับ 10.257 และ 10.435 กรัม

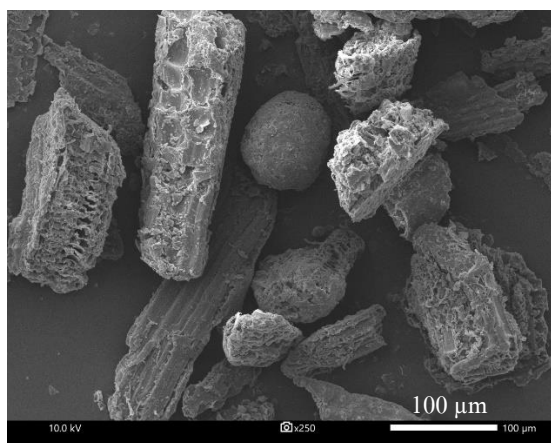


ซึ่งคิดเป็น yields ได้เท่ากับ 25.26 และ 26.08 % ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4-1 จากผลใน 4.1 จะเห็นได้ว่า ผลไม้เป็นไปตามทฤษฎี คือ ปริมาณเซลลูโลสในใบไม้ข้าวหลาม (กาบแดง) มากกว่าปริมาณเซลลูโลสในใบไม้ดำ (ชวา) แต่ yield ที่ได้กลับสวนทาง อาจมีผลมาจากชนิดของผ้าขาวที่นำมาใช้ในการกรองนั้นแตกต่างกัน และในระหว่างการทดลองเกิดความผิดพลาดในขณะที่ชะล้างเยื่อออกจากผ้ากรอง ทำให้ปริมาณเยื่อบางส่วนสูญหายไป ส่วนปัจจัยอื่น ๆ ที่อาจมีผล เช่น อุณหภูมิในการต้มและพอกเยื่อ เนื่องจากการใช้ hot plate ที่ต่างกัน 2 เครื่องในการทำการทดลอง อาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนของอุณหภูมิที่ใช้ประมาณ  $\pm 5$  องศาเซลเซียส เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ปริมาณผลผลิตที่ได้ขึ้นอยู่กับในช่วง 25-30 % ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเซลลูโลสที่หาได้ใน 4.1

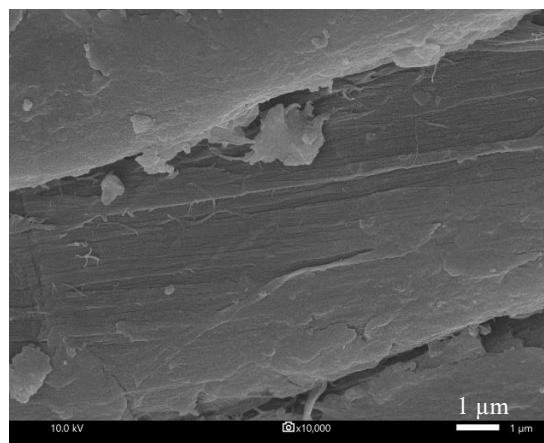
### 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เมื่อนำใบไม้พันธุ์ข้าวหลาม (กาบแดง) และ ดำ (ชวา) ที่สภาวะก่อนและหลังการทำเยื่อให้บริสุทธิ์ (ในระหว่างขั้นตอนการต้มเยื่อกับสารละลายด่างและการพอกเยื่อ) รวมทั้งหลังการแปลงสภาพเยื่อให้เป็นนาโนเซลลูโลสมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy, SEM) ที่กำลังขยายต่ำและสูง พบว่า ใบไม้ทั้งสองชนิดมีลักษณะที่แตกต่างกันดังนี้

#### (1) ใบไม้ข้าวหลาม (กาบแดง)

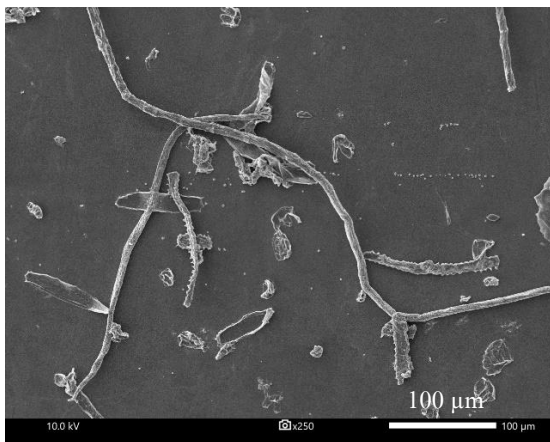


(ก)

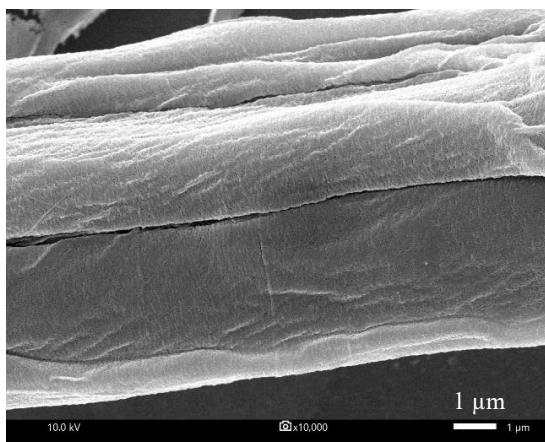


(ข)

ภาพที่ 4-2 (ก) และ (ข) ข้าวหลาม (กาบแดง) ก่อนต้มเยื่อ ที่กำลังขยาย 250x และ 10,000x ตามลำดับ

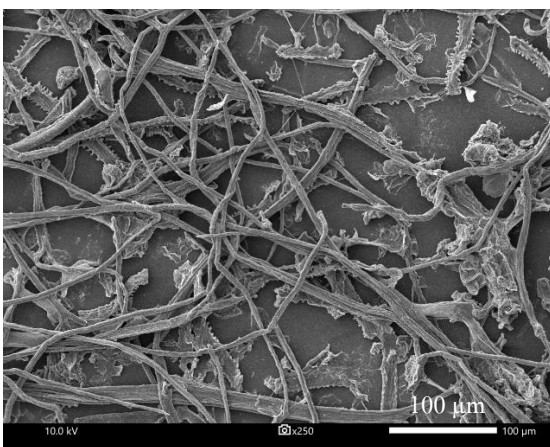


(ก)

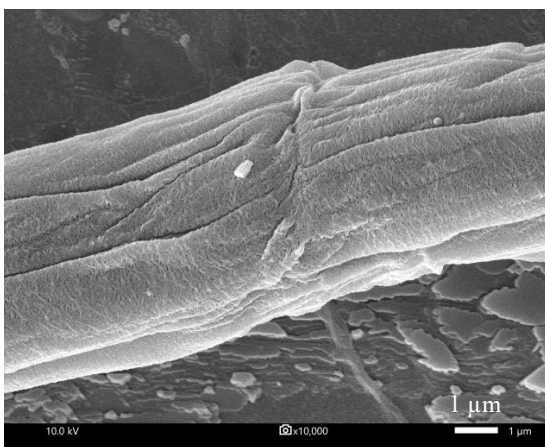


(ข)

ภาพที่ 4-3 (ก) และ (ข) ข้าวหลาม (กาบแดง) หลังต้มเชื้อ ที่กำลังขยาย 250x และ 10,000x ตามลำดับ

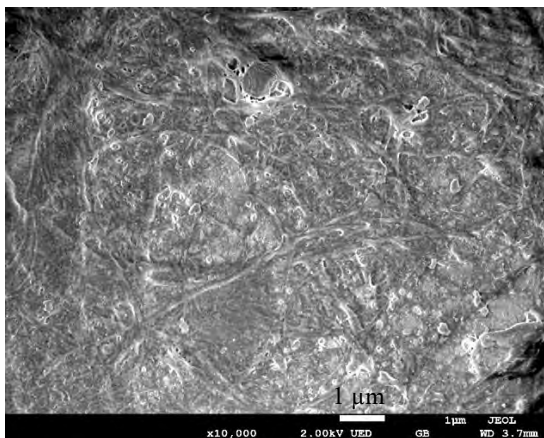


(ก)

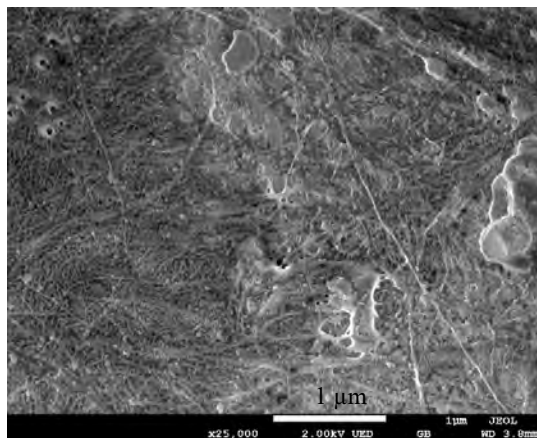


(ข)

ภาพที่ 4-4 (ก) และ (ข) ข้าวหลาม (กาบแดง) หลังฟอกเชื้อ ที่กำลังขยาย 250x และ 10,000x ตามลำดับ



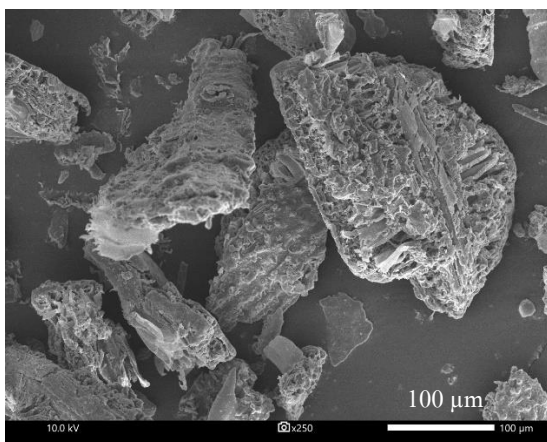
(ก)



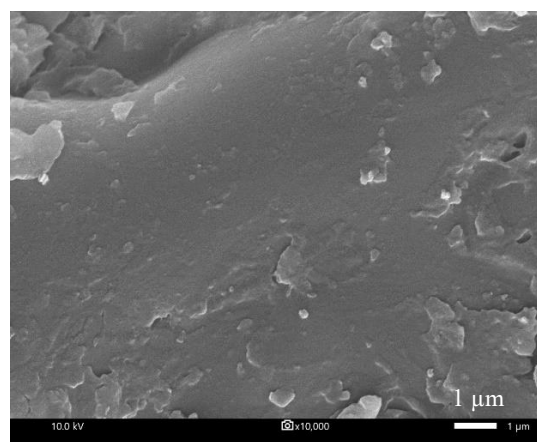
(ข)

ภาพที่ 4-5 (ก) และ (ข) นาโนเซลลูโลสจากใยไม้ข้าวหลาม (กาบแดง) ที่กำลังขยาย 10,000x และ 25,000x ตามลำดับ

(2) คำ(ขวา)

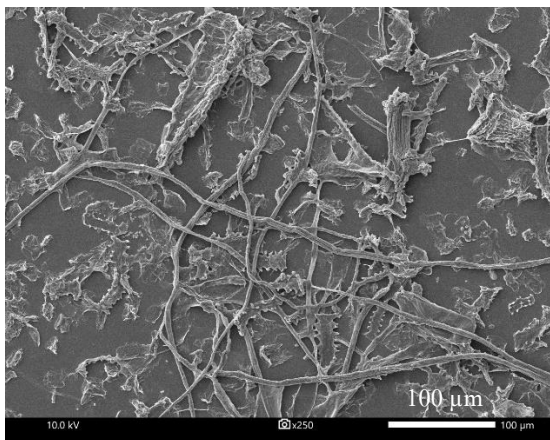


(ก)

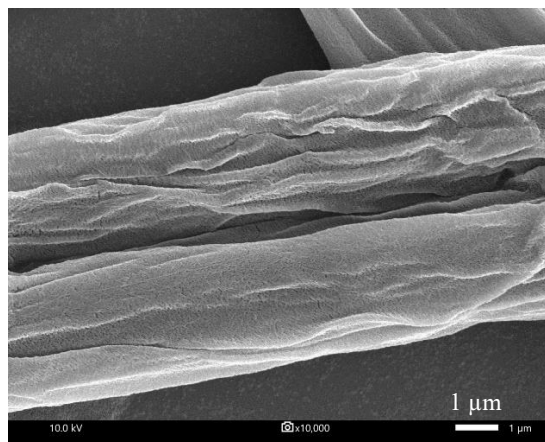


(ข)

ภาพที่ 4-6 (ก) และ (ข) คำ (ขวา) ก่อนต้มเยื่อ ที่กำลังขยาย 250x และ 10,000x ตามลำดับ

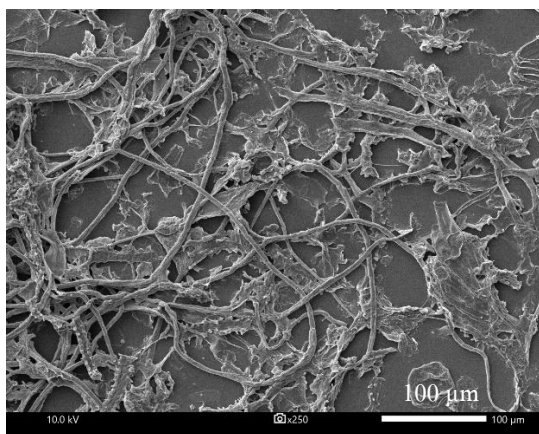


(ก)

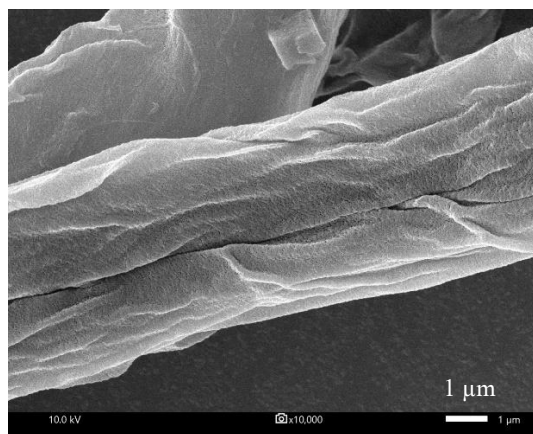


(ข)

ภาพที่ 4-7 (ก) และ (ข) คำ (ขวา) หลังต้มเชื้อ ที่กำลังขยาย 250x และ 10,000x ตามลำดับ

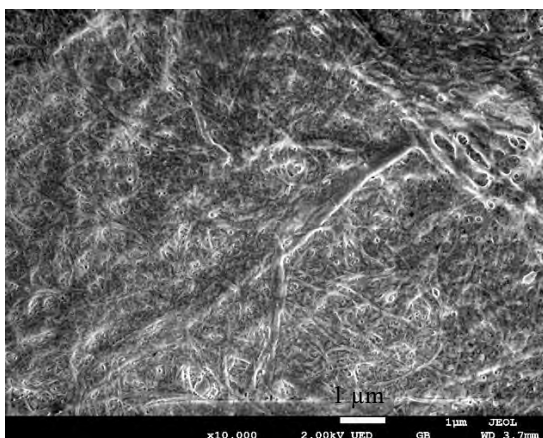


(ก)

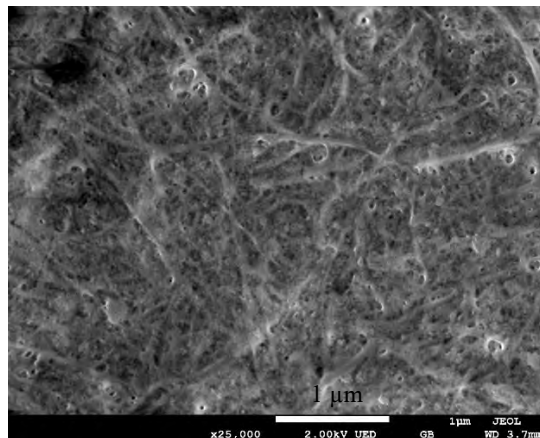


(ข)

ภาพที่ 4-8 (ก) และ (ข) คำ (ขวา) หลังฟอกเชื้อ ที่กำลังขยาย 250x และ 10,000x ตามลำดับ



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4-9 (ก) และ (ข) นาโนเซลลูโลสจากใบไผ่ดำ (ขวา) ที่กำลังขยาย 10,000x และ 25,000x ตามลำดับ

จากภาพที่ 4-2 (ก) และ 4-6 (ก) ซึ่งใช้กำลังขยาย 250 เท่า ที่สภาวะก่อนนำไปต้มเยื่อของใบไผ่ทั้งสองพันธุ์ พบว่ามีลักษณะที่ใกล้เคียงกัน คือ ยังมีการจับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนของผง เนื่องมาจากการถูกบด ซึ่งยังไปเปลี่ยนแปลงสภาพของลักษณะเส้นใย โดยเมื่อเปลี่ยนมาสังเกตที่กำลังขยาย 10,000 เท่า ในภาพที่ 4-2 (ข) และ 4-6 (ข) จะเห็นว่าพื้นผิวของไผ่ดำ (ขวา) นั้นมีความเรียบมากกว่าไผ่ข้าวหลาม (ภาพแดง) ในสภาวะถัดมา เมื่อนำเส้นใยไปต้มสำหรับทำ alkali treatment แล้ว พบว่า เส้นใยของไผ่ทั้งสองพันธุ์มีการกระจายตัวออกจากกันเป็นเส้นใยเดี่ยว ไม่เกิดการจับกลุ่มกันเป็นก้อนเช่นเดิม รูปร่างที่พบเป็นเส้นเรียวยาวที่มีขนาดเล็ก โดยจะเห็นว่าเส้นใยมีการแตกตัวจากกันเนื่องจากการสูญเสียเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ซึ่งทำหน้าที่ยึดแต่ละเส้นใยไว้ ดังจะเห็นได้ชัดจากภาพ 4-8 (ก) ที่กำลังขยาย 250 เท่าของไผ่ดำ (ขวา) ภายหลังจากการฟอกเยื่อด้วย  $H_2O_2$  แล้ว เมื่อเปรียบเทียบระหว่างภาพกำลังขยาย 250 เท่าของสภาวะก่อนและหลังจากการฟอกเยื่อ พบว่าผนังเส้นใยของไผ่ทั้งสองพันธุ์เกิดการแตกออกมากขึ้น นอกจากนี้ เมื่อสังเกตที่ภาพกำลังขยาย 10,000 เท่าแล้ว ก็จะพบว่าพื้นผิวของเส้นใยภายหลังจากการฟอกเยื่อมีความหยาบมากขึ้น แต่อาจเห็นถึงความเปลี่ยนแปลงได้ไม่ชัดเจนนักเนื่องจากผ่านทำการฟอกเส้นใยเพียงครั้งเดียวและความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ในการฟอกไม่สูง และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะของเส้นใยนาโนเซลลูโลสจากทั้ง 2 พันธุ์กับเส้นใยที่สภาวะอื่น ๆ พบว่า นาโนเซลลูโลสที่ได้จากใบไผ่ยังคงมีลักษณะของเส้นใยยาว ซึ่งจากภาพที่ 4-5 และ 4-9 จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่านาโนเซลลูโลสนั้นมีขนาดของเส้นใยที่เล็ก ละเอียดย และบางมาก

ตารางที่ 4-3 เส้นผ่านศูนย์กลางของเยื่อใบไผ่ในแต่ละพันธุ์ที่สภาวะต่าง ๆ

พันธุ์ไผ่	สภาวะ	เส้นผ่านศูนย์กลาง ( $\mu\text{m}$ )						Std.
		1	2	3	4	5	เฉลี่ย	
ข้าวหลาม (กาบแดง)	ก่อนดัมเยื่อ	84	79	77	76	71	77	5
	หลังดัมเยื่อ	7	9	8	8	8	8	1
	หลังฟอกเยื่อ	6	6	6	8	6	6	1
		เส้นผ่านศูนย์กลาง (nm)						
	นาโนเซลลูโลส	74	80	84	72	74	77	5
		เส้นผ่านศูนย์กลาง ( $\mu\text{m}$ )						
ดำ (ขวา)	ก่อนดัมเยื่อ	122	108	98	76	64	94	24
	หลังดัมเยื่อ	6	5	5	6	5	5	1
	หลังฟอกเยื่อ	5	5	5	5	5	5	0
		เส้นผ่านศูนย์กลาง (nm)						
	นาโนเซลลูโลส	53	67	76	72	63	66	9

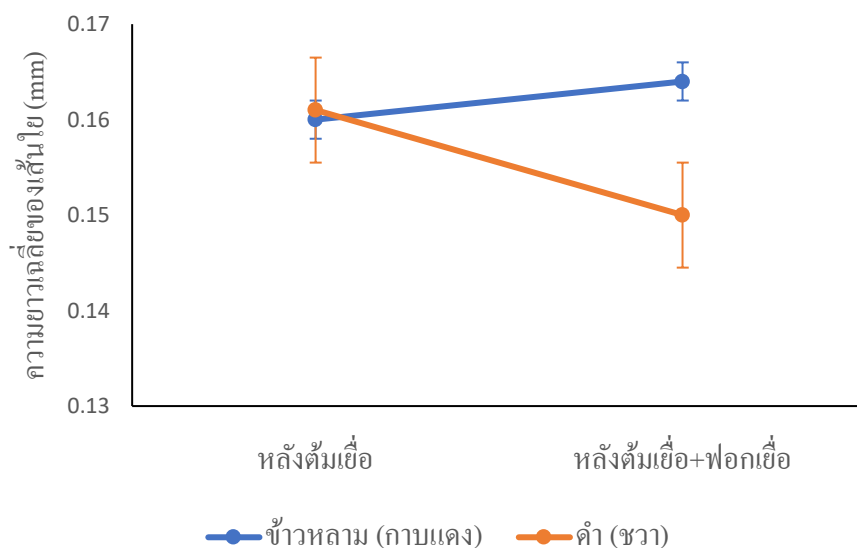
จากตารางที่ 4-3 จะเห็นได้ว่า เส้นผ่านศูนย์กลางของไผ่ข้าวหลาม (กาบแดง) ก่อนนำไปผ่านกระบวนการดัมเยื่อ จะมีขนาดเล็กกว่าไผ่ดำ (ขวา) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ  $77 \mu\text{m}$  มีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 5 ในขณะที่ไผ่ดำ (ขวา) มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ  $94 \mu\text{m}$  และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 24 เมื่อผ่านการดัมเยื่อแล้ว ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของไผ่ข้าวหลาม (กาบแดง) เท่ากับ  $8 \mu\text{m}$  และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 1 ไผ่ดำ (ขวา) จะมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ  $5 \mu\text{m}$  และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 1 อันเป็นผลมาจากการดัมเยื่อที่ทำให้เส้นใยซึ่งจับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนเกิดการกระจายตัวเป็นเส้นใยเดี่ยวที่มีขนาดเล็กลง ขณะที่ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของไผ่ข้าวหลาม (กาบแดง) หลังการฟอกเยื่อเท่ากับ  $6 \mu\text{m}$  มีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 1 และไผ่ดำ (ขวา) มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ  $5 \mu\text{m}$  และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0 ในส่วนของนาโนเซลลูโลสซึ่งเป็นสภาวะที่เส้นใยมีเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กที่สุด อันเนื่องมาจากกระบวนการลดขนาดของเส้นใยโดยการนำเยื่อไปปั่นผสมกับน้ำด้วยเครื่องบดผสมแรงดันสูง ทำให้ไผ่ข้าวหลาม (กาบแดง) มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเท่ากับ  $77 \text{ nm}$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 5 และไผ่ดำ (ขวา) มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ  $66 \text{ nm}$  และมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 9 ซึ่งจะเห็นว่าไผ่ดำ (ขวา) ยังคงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่เล็กกว่าไผ่ข้าวหลาม (กาบแดง) เช่นเดิม ดังนั้น ในสภาวะที่เหมือนกันในการลดขนาดด้วยเครื่องบดผสมแรงดันสูง พบว่าเส้นใยไผ่พันธุ์ดำ (ขวา) สามารถถูกลดขนาดหรือแปลงสภาพให้เป็นนาโนเซลลูโลสได้ง่ายกว่า

#### 4.4 ความยาวของเส้นใย

ความยาวของเส้นใยหาได้โดยใช้เครื่องวิเคราะห์เส้นใย (fiber quality analyzer, FQA) นำเชื้อจากใบไม้ทั้งสองชนิดหลังผ่านกระบวนการต้มเชื้อและหลังผ่านทั้งกระบวนการต้มและฟอกเชื่อมาวัดความยาวของเส้นใย เพื่อสังเกตว่าเส้นใยมีความยาวเหมาะสมพอที่จะใช้งานต่อไปได้หรือไม่ ซึ่งมีผลดังต่อไปนี้

ตารางที่ 4-4 ความยาวเฉลี่ยของเส้นใยของแต่ละพันธุ์ไม้ในแต่ละสภาวะ

ชนิดเชื้อ	ความยาวเฉลี่ยของเส้นใย (mm)							
	ใบไม้ข้าวหลาม (กาบแดง)				ใบไม้ดำ (ชวา)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1. หลังการต้มเชื้อ	0.187	0.152	0.142	0.160	0.152	0.168	0.164	0.161
2. หลังการต้มและฟอกเชื้อ	0.159	0.166	0.166	0.164	0.162	0.135	0.154	0.150



ภาพที่ 4-10 ความสัมพันธ์ของความยาวเฉลี่ยเส้นใยแต่ละพันธุ์ไม้ที่สภาวะต่าง ๆ

จากตารางที่ 4-4 จะได้ว่าความยาวเฉลี่ยเส้นใยทั้ง 3 ครั้งของใบไม้ข้าวหลาม (กาบแดง) เมื่อผ่านการต้มเชื้อเท่ากับ 0.187, 0.152 และ 0.142 mm ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.160 mm ในขณะที่ใบไม้ดำ (ชวา) จะมีความยาวเฉลี่ยเส้นใยทั้ง 3 ครั้ง เท่ากับ 0.152, 0.168 และ 0.164 mm ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.161 mm เมื่อนำเส้นใยที่ผ่านการต้มแล้วไปฟอก ความยาวเส้นใยเฉลี่ยทั้ง 3 ครั้งของไม้ข้าวหลาม (กาบแดง) จะได้เท่ากับ 0.159, 0.166 และ

0.166 mm ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.164 mm ในส่วนของไผ่ดำ (ขวา) ความยาวเส้นใยเฉลี่ยทั้ง 3 ครั้ง เท่ากับ 0.162, 0.135 และ 0.154 mm ตามลำดับ โดยมีความยาวเส้นใยเฉลี่ยเป็น 0.150 mm

จากภาพที่ 4-10 จะเห็นว่าเมื่อนำเชื้อที่ผ่านการต้มแล้วไปฟอกต่อ ความยาวเส้นใยเฉลี่ยของใบไผ่ดำ (ขวา) นั้นมีแนวโน้มลดลง ในขณะที่ความยาวเส้นใยเฉลี่ยของใบไผ่ข้าวหลาม (กาบแดง) มีความยาวใกล้เคียงกับสภาวะก่อนฟอกเชื้อ อาจกล่าวได้ว่าขั้นตอนในการฟอกเชื้อไม่ส่งผลต่อความยาวของเส้นใยในใบไผ่ข้าวหลาม (กาบแดง) แต่ส่งผลต่อความยาวของเส้นใยในใบไผ่ดำ (ขวา) ซึ่งสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ที่ใช้ฟอกอาจมีผลทำให้ความยาวเส้นใยลดลงได้

#### 4.5 การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของนาโนเซลลูโลส

ในการทดลองนี้ ได้ทำการทดลองหาความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีการทดสอบยับยั้งจุลินทรีย์แบบ % reduction ดังที่ได้กล่าวไปแล้วในข้อ 3.4.4 ซึ่งได้ใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน 2 ชนิดในการทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก โดยมีผลการทดลองเป็นดังนี้

ตารางที่ 4-5 ข้อมูลดิบของผลการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและลบ

ตัวอย่าง	เวลา (วัน)	แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml)				SD	
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย		
ควบคุม (Control)	0	<i>S.aureus</i>	$1.49 \times 10^6$	$1.49 \times 10^6$	$1.58 \times 10^6$	$1.52 \times 10^6$	$5.20 \times 10^4$	
	1		$4.90 \times 10^3$	$5.30 \times 10^3$	$5.40 \times 10^3$	$5.20 \times 10^3$	$2.65 \times 10^2$	
นาโนเซลลูโลสข้าวหลาม (กาบแดง)	0		$1.58 \times 10^6$	$1.58 \times 10^6$	$1.60 \times 10^6$	$1.59 \times 10^6$	$1.15 \times 10^4$	
	1		$6.70 \times 10^4$	$7.00 \times 10^4$	$8.60 \times 10^4$	$7.43 \times 10^4$	$1.02 \times 10^4$	
นาโนเซลลูโลสดำ (ขวา)	0		$1.49 \times 10^6$	$1.58 \times 10^6$	$1.64 \times 10^6$	$1.57 \times 10^6$	$7.55 \times 10^4$	
	1		$1.09 \times 10^5$	$1.29 \times 10^5$	$1.35 \times 10^5$	$1.24 \times 10^5$	$1.36 \times 10^4$	
ควบคุม (Control)	0		<i>E.coli</i>	$1.14 \times 10^6$	$1.30 \times 10^6$	$1.37 \times 10^6$	$1.27 \times 10^6$	$1.18 \times 10^5$
	1			$2.66 \times 10^6$	$2.74 \times 10^6$	$2.80 \times 10^6$	$2.73 \times 10^6$	$7.02 \times 10^4$
นาโนเซลลูโลสข้าวหลาม (กาบแดง)	0			$1.23 \times 10^6$	$1.37 \times 10^6$	$1.37 \times 10^6$	$1.32 \times 10^6$	$8.08 \times 10^4$
	1			$>300 \times 10^3$	$>300 \times 10^3$	$>300 \times 10^3$	$>300 \times 10^3$	0
นาโนเซลลูโลสดำ (ขวา)	0	$1.19 \times 10^6$		$1.23 \times 10^6$	$1.40 \times 10^6$	$1.27 \times 10^6$	$1.12 \times 10^5$	
	1	$>300 \times 10^3$		$>300 \times 10^3$	$>300 \times 10^3$	$>300 \times 10^3$	0	



ตารางที่ 4-6 การยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกของแต่ละพันธุ์ไฟ

พันธุ์ไฟ	<i>Staphylococcus aureus</i>					
	CFU/ml		% Reduction*	Log CFU/ml		% Reduction
	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง		0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	
นาโนเซลลูโลสข้าว หลาม (กาบแดง)	$1.59 \times 10^6 \pm 1.15 \times 10^4$	$7.43 \times 10^4 \pm 1.02 \times 10^4$	95.32	$6.20 \pm 0.00$	$4.87 \pm 0.06$	21.48
นาโนเซลลูโลสดำ (ขวา)	$1.57 \times 10^6 \pm 7.55 \times 10^4$	$1.24 \times 10^5 \pm 1.36 \times 10^4$	92.08	$6.20 \pm 0.02$	$5.09 \pm 0.05$	17.80

ตารางที่ 4-7 การยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบของแต่ละพันธุ์ไฟ

พันธุ์ไฟ	<i>Escherichia coli</i>					
	CFU/ml		% Reduction*	Log CFU/ml		% Reduction
	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง		0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	
นาโนเซลลูโลสข้าว หลาม (กาบแดง)	$1.32 \times 10^6 \pm 8.08 \times 10^4$	>300 โคโลนี	ไม่มีการยับยั้ง	$6.14 \pm 0.04$	>300 โคโลนี	ไม่มีการยับยั้ง
นาโนเซลลูโลสดำ (ขวา)	$1.27 \times 10^6 \pm 1.12 \times 10^5$	>300 โคโลนี	ไม่มีการยับยั้ง	$6.10 \pm 0.02$	>300 โคโลนี	ไม่มีการยับยั้ง

คำนวณ % Reduction ของแบคทีเรียได้จากสูตร  $R = ((B-A) \times 100) / B$

เมื่อ  $R = \% \text{ Reduction}$

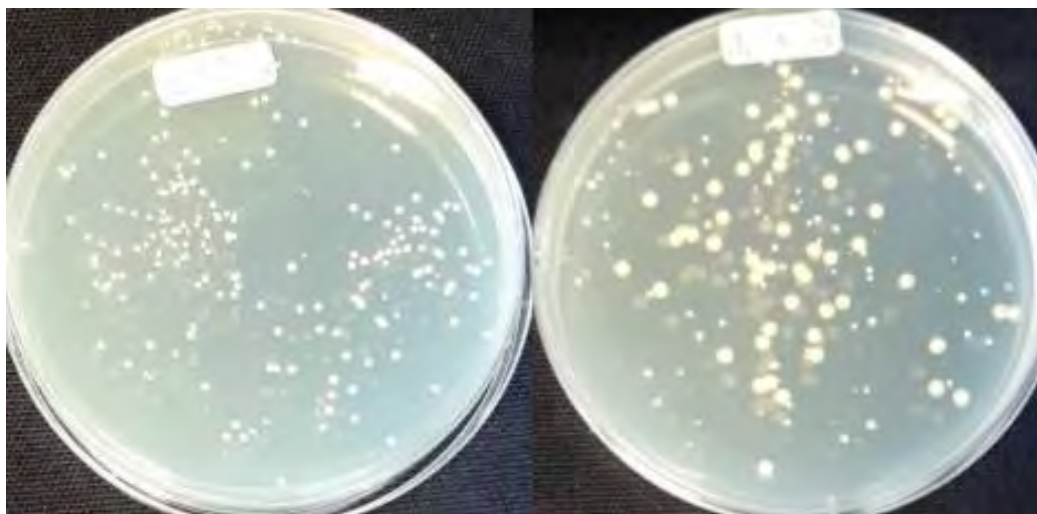
$A = \text{Log CFU per milliliter ของแบคทีเรียหลังการทดสอบ (ชั่วโมงที่ 24)}$

$B = \text{Log CFU per milliliter ของแบคทีเรียก่อนการทดสอบ (ชั่วโมงที่ 0)}$

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

หมายเหตุ

\* จากการทดลอง พบความผิดปกติของนาโนเซลลูโลสจากใบไม้ทั้ง 2 พันธุ์ คือ เมื่อนำตัวอย่างผ่านการ UV เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งเป็นสาเหตุให้ผล % reduction มีค่าน้อยกว่าความเป็นจริง หรือ ไม่มีการยับยั้ง

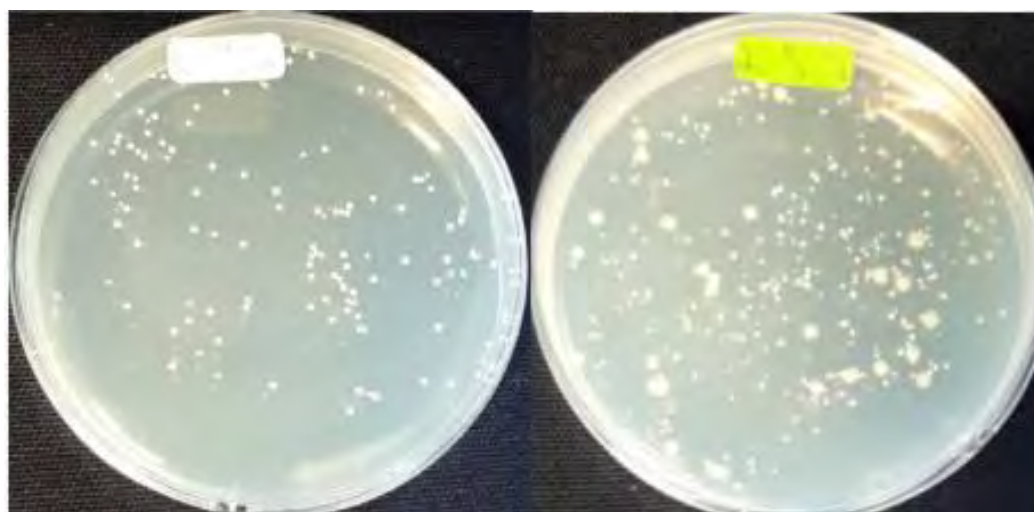


(A)

(B)

ภาพที่ 4-11 จำนวนแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ในนาโนเซลล์โลสจากใบไผ่ข้าวหลาม (กาบแดง)

ที่เวลา 0 ชั่วโมง ที่การเจือจาง  $10^{-3}$  (A) และ 24 ชั่วโมง ที่การเจือจาง  $10^{-2}$  (B)

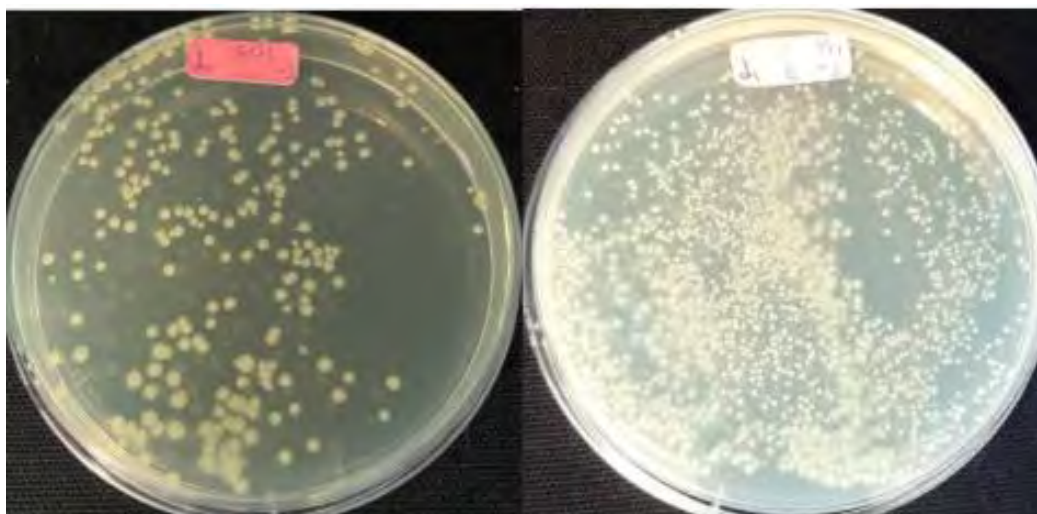


(A)

(B)

ภาพที่ 4-12 จำนวนแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ในนาโนเซลล์โลสจากใบไผ่ดำ (ชวา)

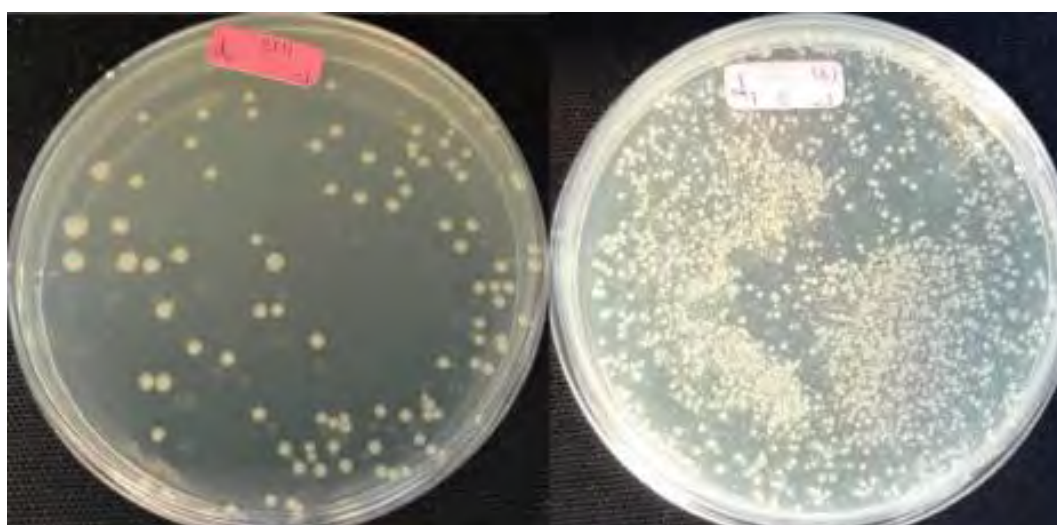
ที่เวลา 0 ชั่วโมง ที่การเจือจาง  $10^{-3}$  (A) และ 24 ชั่วโมง ที่การเจือจาง  $10^{-2}$  (B)



(A)

(B)

ภาพที่ 4-13 จำนวนแบคทีเรีย *Escherichia coli* ในนาโนเซลล์โลสจากใบไผ่ข้าวหลาม (กาบแดง)  
 ที่เวลา 0 ชั่วโมง ที่การเจือจาง  $10^{-3}$  (A) และ 24 ชั่วโมง ที่การเจือจาง  $10^{-3}$  (B)



(A)

(B)

ภาพที่ 4-14 จำนวนแบคทีเรีย *Escherichia coli* ในนาโนเซลล์โลสจากใบไผ่ดำ (ชวา)  
 ที่เวลา 0 ชั่วโมง ที่การเจือจาง  $10^{-3}$  (A) และ 24 ชั่วโมง ที่การเจือจาง  $10^{-3}$  (B)

จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ของนาโนเซลลูโลสจากใบไม้ข้าวหลาม (กาบแดง) และดำ (ชวา) พบว่า % Reduction ของไม้ทั้งสองพันธุ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* เท่ากับ 21.48 และ 17.80 ตามลำดับ (จากตารางที่ 4-6) ในขณะที่ *Escherichia coli* ไม่เกิดฤทธิ์ในการยับยั้งจากไม้ทั้งสองพันธุ์ (จากตารางที่ 4-7) จึงสรุปได้ว่า ข้าวหลาม (กาบแดง) และดำ (ชวา) ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวก นาโนเซลลูโลสจากใบไม้ข้าวหลาม (กาบแดง) จะสามารถยับยั้งได้ แต่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่น้อย เนื่องจากในระหว่างทำการทดสอบได้พบเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ เจริญอยู่ในนาโนเซลลูโลสของไม้ทั้งสองพันธุ์ ส่งผลให้จำนวนโคโลนีที่ได้นั้นมีจำนวนมากว่าที่ควรจะเป็นและพบจุลินทรีย์นอกเหนือไปจากแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกที่ใช้ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนของสารตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ เนื่องจากห้องปฏิบัติการซึ่งใช้ในการจัดเตรียมตัวอย่างสารนั้นเป็นระบบเปิดจึงจำเป็นต้องเปิดหน้าต่างเพื่อให้อากาศมีการถ่ายเท ส่งผลให้ภายในห้องมีฝุ่นมากโดยเฉพาะบริเวณ โต๊ะซึ่งตั้งอยู่ติดกับหน้าต่าง และมีการจัดวางเครื่องมือในการทดลองอยู่บน โต๊ะบริเวณนั้น แม้จะมีการทำความสะอาดเบื้องต้นและนำกระดาษมาใช้วางรองก่อนทำการทดลองแล้ว อาจยังไม่สะอาดและกำจัดสิ่งสกปรกได้ไม่มากพอ นอกจากนี้ ผู้ทำการทดลองเองบางครั้งได้หลงลืมที่จะสวมหน้ากากอนามัยระหว่างทำการทดลอง และใช้ถุงมือในการหยิบจับอุปกรณ์หลายอย่างที่อยู๋ภายในห้องปฏิบัติการ จึงอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนได้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์โลสและองค์ประกอบอื่น ๆ ของใบไม้ 5 พันธุ์ที่เพาะปลูกในประเทศไทย พบว่า มีปริมาณเซลล์โลสเรียงจากมากไปน้อย ได้แก่ ไม้ข้าวหลาม (กาบแดง), ไม้ดำ (ชวา), ไม้บง (ใหญ่), ไม้เปาะ (แม่ตะวอ) และไม้ซางหม่น (นวลราชินี) ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 29.87%, 26.53%, 25.92%, 24.63% และ 23.33% ตามลำดับ ซึ่งการทดลองนี้ได้คัดเลือกพันธุ์ไม้ 2 อันดับแรกมาใช้ โดยเริ่มจากการทำเชื้อให้บริสุทธิ์และผลิตเป็นนาโนเซลล์โลสด้วยเครื่องบดผสมแรงดันสูง จากการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าหลังจากผ่านกระบวนการทำเชื้อให้บริสุทธิ์ เส้นใยของใบไม้ข้าวหลาม (กาบแดง) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่าและความยาวเส้นใยที่ยาวกว่าเส้นใยจากใบไม้ดำ (ชวา) ซึ่งส่งผลให้นาโนเซลล์โลสจากใบไม้ข้าวหลาม (กาบแดง) มีขนาดใหญ่กว่าใบไม้ดำ (ชวา) เช่นกัน โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยนาโนเซลล์โลส เท่ากับ 77 นาโนเมตร และ 66 นาโนเมตร ตามลำดับ และจากการทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของนาโนเซลล์โลสที่อยู่ในรูปสารแขวนลอยในน้ำ พบว่านาโนเซลล์โลสจากใบไม้ข้าวหลาม (กาบแดง) สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*Staphylococcus aureus*) ได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli*) ได้ ในขณะที่นาโนเซลล์โลสจากใบไม้ดำ (ชวา) ไม่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและลบ โดยคาดว่าประสิทธิภาพการต้านเชื้อจุลินทรีย์อาจน้อยกว่าความเป็นจริง เนื่องจากตรวจพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นในนาโนเซลล์โลสของใบไม้ทั้ง 2 พันธุ์ อย่างไรก็ตาม ข้อมูลข้างต้นสามารถใช้เป็นแนวทางในการต่อยอดงานวิจัยเกี่ยวกับใบไม้ได้ในอนาคต

#### 5.2 ข้อเสนอแนะ

- 5.2.1 ควรมีการทดลองดัมเชื้อและฟอกเชื้อในสภาวะที่หลากหลายมากขึ้น ทั้งในส่วนของความเข้มข้นและสารเคมีที่ใช้ เพื่อนำมาใช้เปรียบเทียบและหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเตรียมเชื้อใบไม้
- 5.2.2 จัดหาแนวทางในการจัดการทางด้านสุขอนามัยเพิ่มเติมสำหรับการทดลอง ทั้งผู้ทำการทดลองเอง จะต้องมีความระมัดระวังและรักษาความสะอาดมากขึ้น เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อนหรือมีโอกาสนำมาซึ่งการเกิดเชื้อขึ้นน้อยที่สุด ทั้งนี้ เพื่อไม่ให้เกิดข้อผิดพลาดสำหรับการทดลองความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของตัวอย่างที่เตรียมขึ้น

## เอกสารอ้างอิง

- [1] รศ.ชัยพิสิฐ พวงจิก. (2560). ไม้ พืชมากประโยชน์ “ขายหน่อ-ไม้ไฟ” ปลูกครั้งเดียว อยู่นานหลายสิบปี (ออนไลน์). สืบค้นจาก: [https://www.sentangsedtee.com/farming-trendy/article\\_46453](https://www.sentangsedtee.com/farming-trendy/article_46453)
- [2] Nirmala, C., et al., Bamboo: A rich source of natural antioxidants and its applications in the food and pharmaceutical industry. *Trends in Food Science & Technology*, 2018. 77: p. 91-99.
- [3] Sahoo, A., et al., Nutritional evaluation of bamboo cultivars in sub-Himalayan region of India by chemical composition and in vitro ruminal fermentation. *Grassland Science*, 2010. 56(2): p. 116-125.
- [4] Azeez, M.A. and J.I. Orege, Bamboo, Its Chemical Modification and Products, in *Bamboo - Current and Future Prospects*. UK: Intech Open Limited, 2018.
- [5] Afrin, T., et al., The origin of the antibacterial property of bamboo. *The Journal of The Textile Institute*, 2012. 103(8): p. 844-849.
- [6] Xiao, Z., et al., Structural characterization, antioxidant and antimicrobial activity of water-soluble polysaccharides from bamboo (*Phyllostachys pubescens* Mazel) leaves. *Int J Biol Macromol*, 2020. 142: p. 432-442.
- [7] Cui, T., et al., Mechanism of Action of Essential Oils Extracted from Bamboo (*Phyllostachys heterocycla* cv. *pubescens*) Leaves: Chemical Composition and Antimicrobial Activity against Four Food-related Microorganisms. *BioResources*, 2019. 14(1): p. 1419-1434.
- [8] สุภาวดี เลหาศิริ. (2527). ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไม้. ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- [9] สุทัศน์ เล้าสกุล และคณะ. (2557). ไม้ในสวนสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ฯ. สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. กรุงเทพฯ.
- [10] วิรัช ชื่นวาริน. (2519). ลักษณะโครงสร้างและองค์ประกอบของลำไม้ไผ่สามชนิด. คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- [11] Sunasee, R. and U. Hemraz, Synthetic Strategies for the Fabrication of Cationic Surface-Modified Cellulose Nanocrystals. *Fibers*, 2018. 6(1).
- [12] Liang, J, et al., Lignin-based grinding wheels with aluminum oxide: Synthesis and characterization. *BioResources*, 2018. 13: p. 1388-1400.
- [13] อ.ดร.กุนทีนี้ สุวรรณกิจ. (2561). การผลิตเชื้อกระดาษและการฟอกเยื่อ. เอกสารประกอบการสอนวิชา เทคโนโลยีเยื่อและกระดาษ. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

- [14] จิระศักดิ์ ชัยสนธิ. (2541). การฟอกเยื่อกระดาษด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์. กรมวิทยาศาสตร์บริการ.
- [15] ธัญญ์นลิน วิญญูประสิทธิ์ และคณะ. (2560). นาโนเซลลูโลส: การประยุกต์ใช้ในอาหารและความปลอดภัยอาหาร วารสารพิษวิทยาไทย. สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 67-79.
- [16] Nasir, M., et al., Nanocellulose, in Cellulose-Reinforced Nanofibre Composites. 2017. p. 261-276.
- [17] Phanthong, P., et al., Nanocellulose: Extraction and application. Carbon Resources Conversion, 2018. 1(1): p. 32-43.
- [18] Chitbanyong, K., et al., Characterization of Bamboo Nanocellulose Prepared by TEMPO-mediated Oxidation, 2018. 13(2): p. 4440-4454.
- [19] Goering, H.K. and P.J. Van Soest, Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications). Agriculture Handbook No. 379, USDA-ARS, Washington DC, 1970.
- [20] ณรงค์ศักดิ์ บุญขาว. (2559). การกำจัดและการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์. วิทยาลัยพยาบาลบรมราชชนนีนนทบุรี.
- [21] กุลกานต์ ชูชัยยะ. (2548). สารต้านจุลชีพ. การพัฒนาชุดตรวจสอบฟูราโซลิโคนในอาหารสัตว์ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. หน้า 6-9.
- [22] สุนีย์ แวมะ และอาอิเซาะส์ เบ็ญหาวัน. (2559). แบคทีเรียก่อโรคในอาหารและการทดสอบฤทธิ์ของการสกัดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์. ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากเปลือกลูกหยี. คณะวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. ยะลา. หน้า 11-23.
- [23] Menchavez, M., et al., Antibacterial Properties of Bambusa vulgaris (Bamboo) Leaves and Eryngium foetidum (Culantro) Leaves against Staphylococcus aureus and Escherichia coli bacteria. Journal of medicinal plant research, 2018. p. 6-13.
- [24] Fan, B., et al., Natural cellulose nanofiber extracted from cell wall of bamboo leaf and its derived multifunctional aerogel. Polym. Compos., 2018. 39: p. 3869-3876.
- [25] Pacaphol, K. and D. Aht-ong, Preparation of hemp nanofibers from agricultural waste by mechanical defibrillation in water. Journal of Cleaner Production, 2016. p. 142.