



# โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพ  
(The study of optimal conditions for biosynthesis of gold nanoparticles)

**ชื่อนิสิต** นางสาววิจิตา จันยะมิตรี เลขประจำตัวนิสิต 6032348423


**ภาควิชา** จุลชีววิทยา

**ปีการศึกษา** 2563


หัวข้อโครงการ การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพ  
โดย นางสาววิธิตา จันยะมิตรี เลขประจำตัวนิสิต 6032348423  
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ อาจารย์ ดร. สรริสา ณ ป้อมเพ็ชร  
ปีการศึกษา 2563

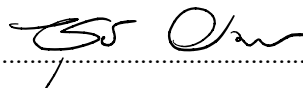
---

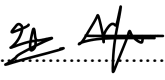
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

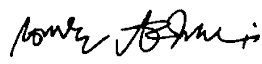
  
..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา  
(ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)


คณะกรรมการสอบโครงการงาน

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

  
..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชูลี ยมภักดี)

  
..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. นราพร สมบูรณ์นะ)

  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวนิชย์)

  
..... กรรมการ  
(อาจารย์ ดร. ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ)

# โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

## ชื่อโครงการ

การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำโนด้วยวิธีการทางชีวภาพ  
(The study of optimal conditions for biosynthesis of gold nanoparticles)

## ชื่อนิสิต

นางสาววิธิตา จันยะมิตรี

เลขประจำตัวนิสิต 6032348423

## อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ ดร. สิริสา ณ ป้อมเพ็ชร

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2563

**ชื่อโครงการ:** การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพ  
**นิสิตหัวหน้าโครงการ:** นางสาววิธิดา จันยะมิตรี เลขประจำตัวนิสิต 6032348423  
**อาจารย์ที่ปรึกษา:** อาจารย์ ดร. สรริสา ฦ ป้อมเพ็ชร

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2563

### บทคัดย่อ

การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน (gold nanoparticle, AuNP) ด้วยวิธีการทางชีวภาพเป็นที่นิยมอย่างมากในปัจจุบันเนื่องจากเป็นวิธีการที่คุ้มค่า เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และไม่มีความเป็นพิษ ซึ่งในกระบวนการสังเคราะห์นั้นพารามิเตอร์ของปฏิกิริยาทางเคมีฟิสิกส์มีอิทธิพลอย่างมากกับรูปร่างและขนาดของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจากเชื้อรา *Aspergillus niger* MSCU 0361 และศึกษาพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ โดยเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 สามารถสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนได้เมื่อถูกเติมด้วยกรดเตตระคลอโรอริก ( $\text{HAuCl}_4$ ) การเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนให้ได้ปริมาณสูงสุดทำได้โดยใช้ชีวมวลเชื้อรา (fungal biomass) 30 กรัม ความเข้มข้นของกรดเตตระคลอโรอริก ( $\text{HAuCl}_4$ ) 0.02 โมลาร์ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ (acetate buffer) pH 4.70 และบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง จากการศึกษาด้วย UV-Vis spectrophotometer พบการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำนาโนในช่วงความยาวคลื่น 530-570 นาโนเมตร ซึ่งเป็นผลมาจากคุณสมบัติการดูดกลืนแสงที่จำเพาะของอนุภาคทองคำนาโน และจากการวิเคราะห์ลักษณะ รูปร่าง และการกระจายตัวของอนุภาคทองคำนาโนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีการกระจายตัวแบบโพลีดีสเพอร์ชัน (polydisperse distribution) ด้วยรูปร่างที่แตกต่างกัน เช่น ทรงกลม สามเหลี่ยม หลายเหลี่ยม และรูปร่างไม่แน่นอน และเมื่อวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธี dynamic light scattering (DLS) พบว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 35.37 นาโนเมตร นอกจากขนาดแล้วการวิเคราะห์ด้วยวิธี DLS ยังสามารถบอกการกระจายตัวของอนุภาคทองคำนาโนได้จากค่า polydispersity index (PDI) พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.655 ซึ่งสามารถบอกได้ว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีการกระจายตัวไม่สม่ำเสมอ ส่วนผลของการวิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) พบว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีค่าศักย์ซีต้าเท่ากับ -17.5 มิลลิโวลต์ จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 สามารถสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนได้ผ่านการเพิ่มประสิทธิภาพด้วยการปรับเปลี่ยนพารามิเตอร์ของปฏิกิริยาทางเคมีฟิสิกส์ อย่างไรก็ตามเนื่องจากในปัจจุบันยังไม่ทราบถึงกลไกที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่แน่ชัดจึงอาจจะมีปัจจัยอื่น ๆ นอกเหนือจากที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาและทดลองเพิ่มเติมเพื่อให้ได้เงื่อนไขการสังเคราะห์ที่เหมาะสมที่สุดต่อไป

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

**Project title:** The study of optimal conditions for biosynthesis of gold nanoparticles

**Name of student:** Miss Withida Junyamitree Student ID: 6032348423

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

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

---

### Abstract

Biosynthesis of gold nanoparticles (AuNPs) is environmental friendly, non-toxic, and cost-effective. In the biosynthetic process, parameters of the physicochemical reaction greatly influenced with respect to shape and size. Thus, in this study, we aimed to biosynthesize AuNPs using *Aspergillus niger* MSCU 0361 and optimize the parameters related to the biosynthesis. This fungus was able to synthesize AuNPs when challenged with tetra-chloroauric acid ( $\text{HAuCl}_4$ ). The optimal condition for AuNP synthesis was 30 g of fungal biomass, 0.02 M of  $\text{HAuCl}_4$  in acetate buffer solution pH 4.70, and room temperature incubation. The UV-vis spectra of AuNPs showed unique optical characteristics at 530-570 nm, and the transmission electron microscopy (TEM) images revealed that the AuNPs were found to be polydispersed with different shapes such as spherical, triangular, polygonal, and uncertain shapes. The hydrodynamic diameter and the size distribution of AuNPs were observed by dynamic light scattering (DLS) technique. The average size measured by DLS was 35.37 nm. In addition, DLS analysis was able to determine the distribution of AuNPs reported as polydispersity index (PDI), which showed the PDI value of 0.655. The zeta potential measurement of AuNPs was -17.5 mV. In summary, this research demonstrated that *A. niger* MSCU 0361 could synthesize AuNPs through optimization and modification of the physicochemical parameters of the reaction. However, the mechanism for the biosynthesis of AuNPs is unclear, and it may also involve with other relevant factors. Therefore, further studies are needed to obtain optimal biosynthetic conditions.

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

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาจาก อาจารย์ ดร. สรริสา ณ ป้อมเพ็ชร อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ อีกทั้งยังได้สอนวิธีการปฏิบัติงาน การใช้อุปกรณ์ต่างๆภายในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นในระหว่างการดำเนินงาน ทำให้งานวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้ความรู้และคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์จากงบประมาณของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้อนุเคราะห์เงินทุนสนับสนุนในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณนางสาวศิริประภา เหล่ามุลและนายอัมรินทร์ อะโน เพื่อนร่วมห้องปฏิบัติการ 1804/13 ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาในการทำงานวิจัยครั้งนี้ และเป็นกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

ขอขอบคุณเพื่อนๆและรุ่นน้องทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

ผลจากการทำงานวิจัยครั้งนี้ ข้าพเจ้านำความรู้และประสบการณ์ที่ได้รับในการทำงานวิจัยครั้งนี้ไปแนะนำและถ่ายทอดสู่อาจารย์ เพื่อนนิสิต และรุ่นน้อง ตลอดจนนำไปประยุกต์ใช้ในการปฏิบัติงานในอนาคตต่อไป

นางสาววิธิดา จันยะมิตรี

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญกราฟ	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 นาโนเทคโนโลยี	1
1.2 อนุภาคของนาโน	1
1.3 การสังเคราะห์อนุภาคของนาโน	2
1.4 เชื้อรา <i>Aspergillus niger</i>	5
1.5 การสังเคราะห์อนุภาคของนาโนด้วยเชื้อรา	7
1.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคของนาโน	9
บทที่ 2 เครื่องมือ วัสดุ เคมีภัณฑ์	11
2.1 เครื่องมือ	11
2.2 วัสดุ	12
2.3 เคมีภัณฑ์	13
2.4 น้ำ	13
2.5 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ขนาดและรูปร่าง	13
2.6 เชื้อรา	13
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง	15
3.1 การสังเคราะห์อนุภาคของนาโน	15
3.2 การทดสอบปัจจัยต่างๆที่อาจมีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคของนาโน	17
3.3 การตรวจสอบลักษณะของอนุภาคของนาโนที่สังเคราะห์ได้	18
บทที่ 4 ผลการทดลอง	20
4.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา <i>Aspergillus niger</i> MSCU 0361	20
4.2 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อรา	20
4.3 การสังเคราะห์อนุภาคของนาโน	21

## สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
4.4 การทดสอบปัจจัยต่างๆที่อาจมีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคทองนาโน	23
4.5 การวิเคราะห์ลักษณะ รูปร่าง และการกระจายตัวของอนุภาคทองนาโนที่สังเคราะห์ได้ด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)	33
4.6 การวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคทองนาโนที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี dynamic light scattering (DLS)	33
4.7 การวิเคราะห์ความเสถียรของอนุภาคทองนาโนที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี zeta potential	34
บทที่ 5 สรุป วิเคราะห์ผลการทดลอง และแผนการทดลองในอนาคต	36
เอกสารอ้างอิง	
ภาษาอังกฤษ	42
ภาคผนวก	45
ภาคผนวก ก	46
ภาคผนวก ข	47
ภาคผนวก ค	49



## สารบัญกราฟ

เรื่อง	หน้า
<p><b>กราฟที่ 4.1</b> การดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนในสารละลาย acetate buffer pH 4.70 (A) ชุดควบคุมที่ 1 น้ำเลี้ยงเชื้อรา (B) ชุดควบคุมที่ 2 สารละลาย <math>\text{HAuCl}_4</math> (C) ชุดการทดลองน้ำเลี้ยงเชื้อราผสมสารละลาย <math>\text{HAuCl}_4</math></p>	23
<p><b>กราฟที่ 4.2</b> การดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนในสารละลาย บัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ (A) ชุดควบคุมที่ 1 น้ำเลี้ยงเชื้อรา (B) ชุดควบคุมที่ 2 สารละลาย <math>\text{HAuCl}_4</math> (C) ชุดการทดลองน้ำเลี้ยงเชื้อราผสมสารละลาย <math>\text{HAuCl}_4</math> ที่ pH 2.04 (D) ที่ pH 4.70 (E) ที่ pH 6.71 และ (F) ที่ pH 11.52</p>	29
<p><b>กราฟที่ 4.3</b> การดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนในสารละลาย acetate buffer pH 4.70 (A) ชุดควบคุมที่ 1 น้ำเลี้ยงเชื้อรา (B) ชุดควบคุมที่ 2 สารละลาย <math>\text{HAuCl}_4</math> (C) ชุดการทดลองน้ำเลี้ยงเชื้อราผสมสารละลาย <math>\text{HAuCl}_4</math> เมื่อปัมป์ปฏิกริยาในที่มืดและ (D) เมื่อปัมป์ปฏิกริยาในที่มืดและมีแสง</p>	30
<p><b>กราฟที่ 4.4</b> การดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนในสารละลาย acetate buffer pH 4.70 (A) ชุดควบคุมที่ 1 น้ำเลี้ยงเชื้อรา (B) ชุดควบคุมที่ 2 สารละลาย <math>\text{HAuCl}_4</math> (C) ชุดการทดลองน้ำเลี้ยงเชื้อราผสมสารละลาย <math>\text{HAuCl}_4</math> เมื่อใช้ปริมาณชีวมวลเชื้อรา 30 กรัมและ (D) 60 กรัม</p>	31
<p><b>กราฟที่ 4.5</b> การดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนในสารละลาย acetate buffer pH 4.70 (A) ชุดควบคุมที่ 1 น้ำเลี้ยงเชื้อรา (B) ชุดควบคุมที่ 2 สารละลาย <math>\text{HAuCl}_4</math> (C) ชุดการทดลองน้ำเลี้ยงเชื้อราผสมสารละลาย <math>\text{HAuCl}_4</math> เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลาย 0.01 M <math>\text{HAuCl}_4</math> (D) 0.02 M <math>\text{HAuCl}_4</math> และ (E) 0.03 M <math>\text{HAuCl}_4</math></p>	32
<p><b>กราฟที่ 4.6</b> การดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนในสารละลาย acetate buffer pH 4.70 เมื่อปัมป์ปฏิกริยาเป็นระยะเวลานาน 1 เดือน (A) ชุดควบคุมที่ 1 น้ำเลี้ยงเชื้อรา (B) ชุดควบคุมที่ 2 สารละลาย <math>\text{HAuCl}_4</math> (C) ชุดการทดลองน้ำเลี้ยงเชื้อราผสมสารละลาย <math>\text{HAuCl}_4</math> เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลาย 0.01 M <math>\text{HAuCl}_4</math> (D) 0.02 M <math>\text{HAuCl}_4</math> และ (E) 0.03 M <math>\text{HAuCl}_4</math></p>	32
<p><b>กราฟที่ 4.7</b> การกระจายตัวของขนาดอนุภาคทองนาโนที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา <i>A. niger</i> MSCU 0361 ที่ถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M <math>\text{HAuCl}_4</math> ในสารละลาย acetate buffer pH 4.70</p>	34
<p><b>กราฟที่ 4.8</b> การกระจายตัวศักย์ซีต้าของอนุภาคทองนาโนที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา <i>A. niger</i> MSCU 0361 ที่ถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M <math>\text{HAuCl}_4</math> ในสารละลาย acetate buffer pH 4.70</p>	35

## สารบัญรูปลูกภาพ

เรื่อง	หน้า
รูปที่ 1.1 ขนาดสัมพัทธ์ของอนุภาคนาโนเมื่อเทียบกับสิ่งของต่างๆ	1
รูปที่ 1.2 การประยุกต์ใช้นาโนเทคโนโลยีทางการแพทย์ ขนาดและความสามารถในการปรับแต่งของอนุภาคนาโนอาจนำไปสู่การใช้งานทางการแพทย์ที่หลากหลาย	2
รูปที่ 1.3 การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนแบ่งตามหลักการ Top-down approach และ Bottom-up approach และวิธีการสังเคราะห์อนุภาคทองนาโน 3 วิธี ได้แก่ วิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ	3
รูปที่ 1.4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา <i>A. niger</i>	5
รูปที่ 1.5 วงชีวิต (life cycle) ของเชื้อรา <i>A. niger</i>	6
รูปที่ 1.6 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนโลหะภายนอกเซลล์โดยเชื้อรา	7
รูปที่ 1.7 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนโลหะภายในเซลล์โดยเชื้อรา	8
รูปที่ 1.8 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนโลหะบนพื้นผิวเซลล์โดยเชื้อรา	8
รูปที่ 3.1 จำนวนช่องและตำแหน่งสำหรับการนับจำนวนสปอร์	16
รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา <i>A. niger</i> MSCU 0361 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA	20
รูปที่ 4.2 ลักษณะชีวมวลเชื้อรา <i>A. niger</i> MSCU 0361 ในน้ำเลี้ยงเชื้อรา	21
รูปที่ 4.3 การเปลี่ยนสีของน้ำเลี้ยงเชื้อรา <i>A. niger</i> MSCU 0361 ที่ผสมอยู่กับสารละลาย acetate buffer pH 4.70 เมื่อถูกเติมด้วยสารละลาย H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub> (I) ที่ 0 นาที (II) ที่ 60 นาที (III) ที่ 80 นาที; (A) ชุดควบคุมที่ 1 น้ำเลี้ยงเชื้อรา (B) ชุดควบคุมที่ 2 สารละลาย H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub> (C) ชุดการทดลองน้ำเลี้ยงเชื้อราผสมสารละลาย H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub>	22
รูปที่ 4.4 การเปลี่ยนสีของน้ำเลี้ยงเชื้อรา <i>A. niger</i> MSCU 0361 ที่ผสมอยู่กับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ และถูกเติมด้วยสารละลาย H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub> (I) หลังการบ่มที่ 55 นาที (II) ที่ 65 นาที; (A) ชุดควบคุมที่ 1 น้ำเลี้ยงเชื้อรา (B) ชุดควบคุมที่ 2 สารละลาย H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub> (C) ชุดการทดลองน้ำเลี้ยงเชื้อราผสมสารละลาย H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub> ที่ pH 2.04 (D) ที่ pH 4.70 (E) ที่ pH 6.71 และ (F) ที่ pH 11.52	24
รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนสีของน้ำเลี้ยงเชื้อรา <i>A. niger</i> MSCU 0361 ที่ผสมอยู่กับสารละลาย acetate buffer pH 4.70 เมื่อถูกเติมด้วยสารละลาย H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub> (I) ที่ 0 นาที (II) ที่ 10 นาที (III) ที่ 20 นาที (IV) ที่ 30 นาที; (A) ชุดควบคุมที่ 1 น้ำเลี้ยงเชื้อรา (B) ชุดควบคุมที่ 2 สารละลาย H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub> (C) ชุดการทดลองน้ำเลี้ยงเชื้อราผสมสารละลาย H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub> เมื่อใช้ปริมาณชีวมวลเชื้อรา 30 กรัมและ (D) 60 กรัม	26

## สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

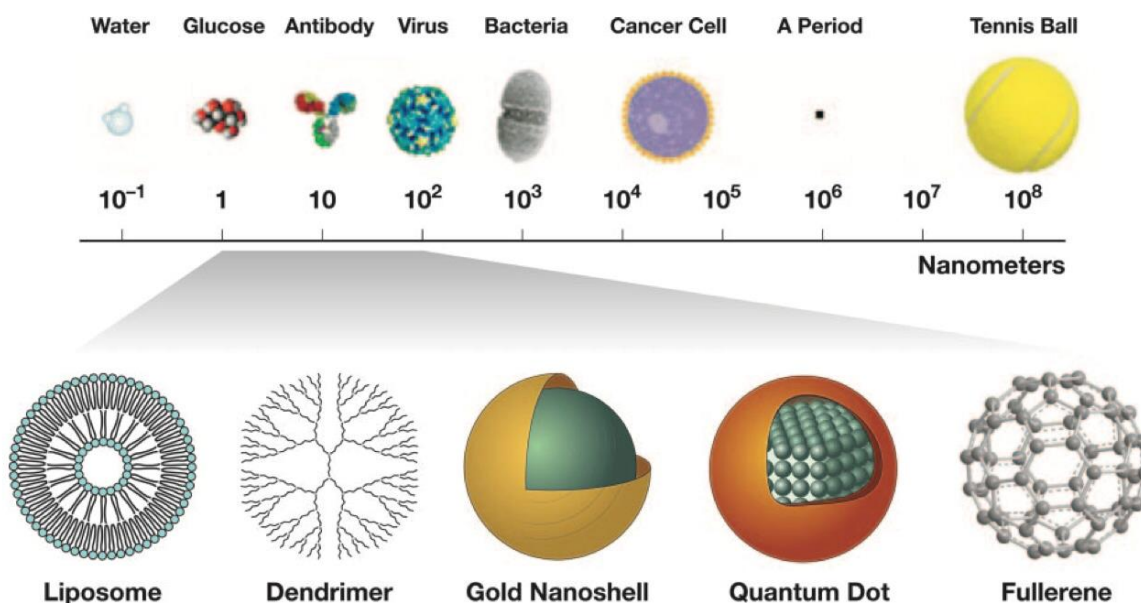
เรื่อง	หน้า
<b>รูปที่ 4.6</b> การเปลี่ยนสีของน้ำเลี้ยงเชื้อรา <i>A. niger</i> MSCU 0361 ที่ผสมอยู่กับสารละลาย acetate buffer pH 4.70 เมื่อถูกเติมด้วยสารละลาย H <sub>AuCl</sub> <sub>4</sub> (I) ที่ 0 นาที (II) ที่ 30 นาที (III) ที่ 50 นาที (IV) ที่ 70 นาที; (A) ชุดควบคุมที่ 1 น้ำเลี้ยงเชื้อรา (B) ชุดควบคุมที่ 2 สารละลาย H <sub>AuCl</sub> <sub>4</sub> (C) ชุดการทดลองน้ำเลี้ยงเชื้อราผสมสารละลาย H <sub>AuCl</sub> <sub>4</sub> ที่ความเข้มข้นสารละลาย 0.01 M H <sub>AuCl</sub> <sub>4</sub> (D) 0.02 M H <sub>AuCl</sub> <sub>4</sub> และ (E) 0.03 M H <sub>AuCl</sub> <sub>4</sub>	28
<b>รูปที่ 4.7</b> ภาพจาก TEM ของอนุภาคทองคำโนที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา <i>A. niger</i> MSCU 0361 ที่ถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M H <sub>AuCl</sub> <sub>4</sub> ในสารละลาย acetate buffer pH 4.70	33

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology)

นาโนเทคโนโลยี หมายถึง การวิจัยและการพัฒนาเทคโนโลยีในระดับของอะตอม โมเลกุล และโมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งนำไปสู่การควบคุมและศึกษาโครงสร้างของวัสดุหรืออุปกรณ์ที่มีขนาดเล็กในช่วงประมาณ 1 ถึง 100 นาโนเมตร โดยวัสดุในระดับนี้ เช่น “อนุภาคนาโน (nanoparticle, NP)” ซึ่งจะส่งผลให้วัสดุหรืออุปกรณ์ต่างๆ มีคุณสมบัติและหน้าที่ใหม่ๆ ที่พิเศษขึ้นทั้งทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพ ที่แตกต่างจากวัสดุขนาดใหญ่อย่างเห็นได้ชัดคือมีขนาดเล็ก ดังแสดงในรูปที่ 1.1 มีความสามารถในการปรับแต่งพื้นผิว มีความสามารถในการละลาย และมีความสามารถในการใช้งานที่หลากหลาย (McNeil, 2005) ทำให้มีประโยชน์ต่อผู้ใช้สอยและเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจได้

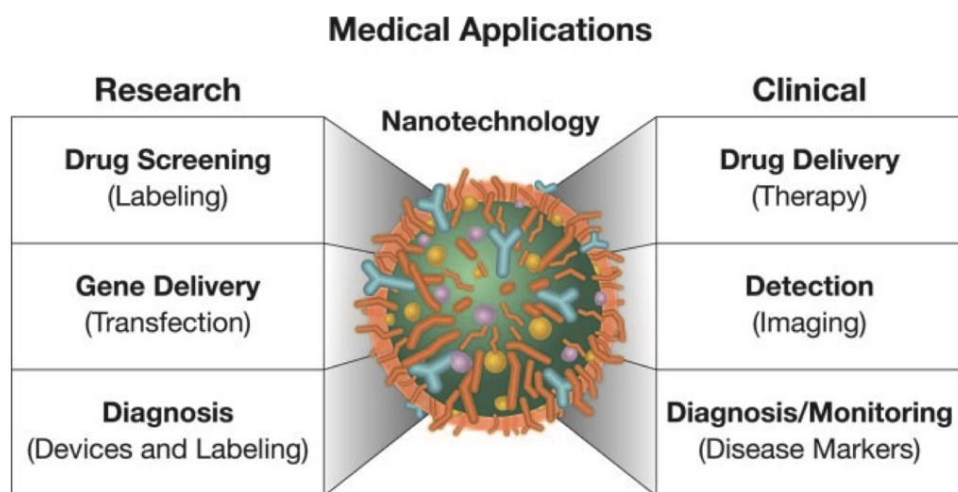


รูปที่ 1.1 ขนาดสัมพัทธ์ของอนุภาคนาโนเมื่อเทียบกับสิ่งของต่างๆ (McNeil, 2005)

#### 1.2 อนุภาคทองคำนาโน (Gold nanoparticle)

อนุภาคทองคำนาโน (gold nanoparticle, AuNP) คืออนุภาคทองขนาดเล็กในระดับนาโนเมตรและด้วยขนาดที่เล็กในระดับนาโนเมตรนี้จึงทำให้อนุภาคทองคำนาโนมีคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่แตกต่างไปจากโลหะทองปกติคือจะมีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูงทำให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมีได้ดี อนุภาคทองคำนาโน

สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หลากหลายโดยเฉพาะงานทางด้านชีววิทยาและทางการแพทย์ ดังแสดงในรูปที่ 1.2 (McNeil, 2005) เช่น การตรวจจับสัญญาณ (Sensing) การถ่ายภาพ (Imaging) การจัดส่งยา (Drug delivery) รวมถึงการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และการวินิจฉัยทางการแพทย์ (Daraee et al., 2014) เช่น การวินิจฉัยและการรักษาโรคมะเร็ง เอ็ดส์ วัณโรค และโรคอื่นๆ (Silva et al., 2016) นอกจากนี้อนุภาคของนาโนยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านสิ่งแวดล้อมได้ เช่น การใช้อนุภาคของนาโนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายสีย้อมที่ปนเปื้อนมาจากน้ำเสีย (Qu et al., 2017)



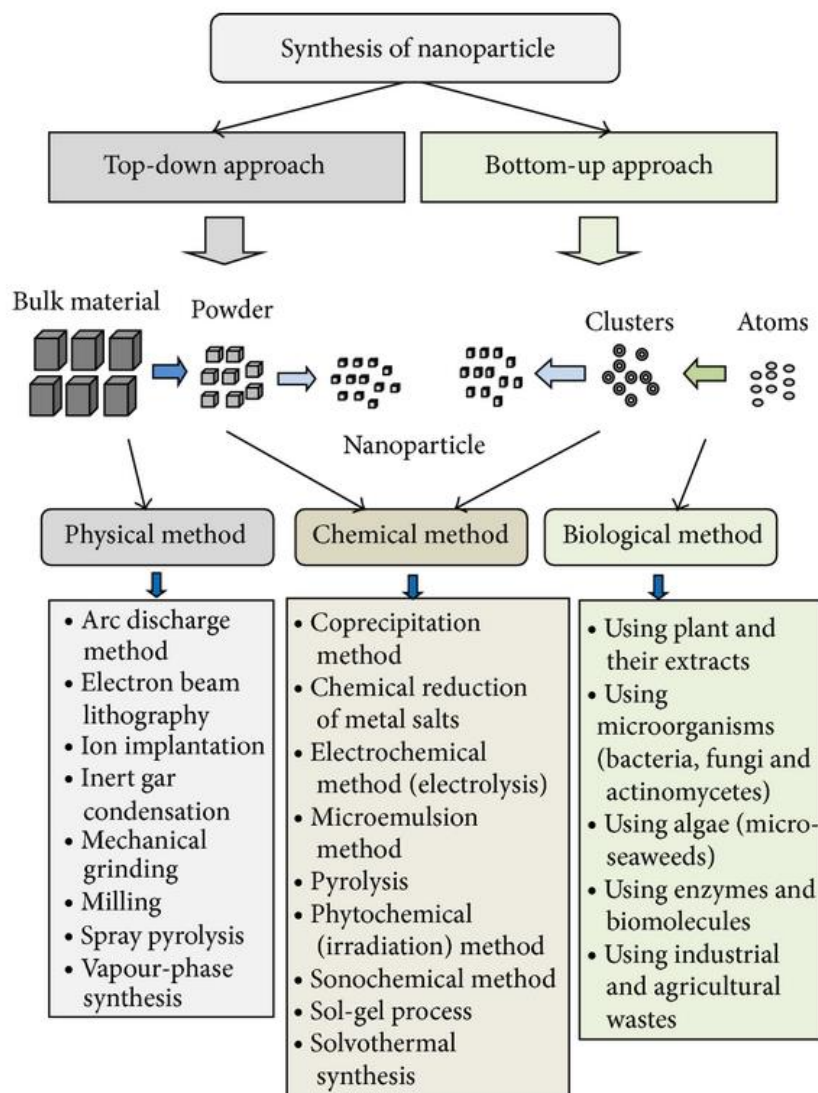
รูปที่ 1.2 การประยุกต์ใช้นาโนเทคโนโลยีทางการแพทย์ ขนาดและความสามารถในการปรับแต่งของอนุภาคนาโน อาจนำไปสู่การใช้งานทางการแพทย์ที่หลากหลาย (McNeil, 2005)

### 1.3 การสังเคราะห์อนุภาคของนาโน

1.3.1 การสังเคราะห์อนุภาคของนาโนจะแบ่งออกเป็น 2 วิธีตามหลักการ ดังแสดงในรูปที่ 1.3 (Patra et al., 2014) ได้แก่

1.3.1.1 หลักการจากบนลงล่าง (Top-down approach) วิธีนี้วัสดุทองที่เหมาะสมจำนวนมากจะแตกตัวเป็นอนุภาคทองขนาดเล็กผ่านการใช้เทคนิคต่างๆ เช่น การบด การสับเตอริง หรือการกัดวัสดุด้วยใบมีด เป็นต้น

1.3.1.2 หลักการจากล่างขึ้นบน (Bottom-up approach) วิธีนี้จะสร้างอนุภาคของนาโนผ่านการรวมตัวของอะตอมทองเป็นนิวเคลียสและจะขยายต่อไปเป็นอนุภาคทองที่มีขนาดในระดับนาโนเมตร



**รูปที่ 1.3** การสังเคราะห์อนุภาคของนาโนแบ่งตามหลักการ Top-down approach และ Bottom-up approach และวิธีการสังเคราะห์อนุภาคของนาโน 3 วิธี ได้แก่ วิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ (Patra et al., 2014)

1.3.2 นอกจากนี้การสังเคราะห์อนุภาคของนาโนยังแบ่งออกเป็น 3 วิธีตามวิธีการสังเคราะห์ ดังแสดงใน **รูปที่ 1.3** (Patra et al., 2014) ได้แก่

1.3.2.1 วิธีการสังเคราะห์ทางกายภาพ (physical method) อนุภาคของนาโนที่สังเคราะห์ด้วยวิธีนี้จะมี ความบริสุทธิ์สูงเนื่องจากไม่มีการปนเปื้อนของตัวทำละลาย และอนุภาคของนาโนที่สังเคราะห์ได้จะมีการกระจาย ตัวสม่ำเสมอ สามารถควบคุมขนาดและรูปร่างได้ง่าย (Pal et al., 2019) การสังเคราะห์อนุภาคของนาโนด้วย วิธีการทางกายภาพ เช่น การฉายรังสี การใช้ความร้อน หรือการรีดักชันโดยใช้แสง เป็นต้น (Alaqad et al., 2016)

1.3.2.2 วิธีการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical method) เป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด เนื่องจากสามารถสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนได้ในปริมาณมาก สามารถควบคุมขนาดและรูปร่างได้ง่าย แต่ข้อเสียที่สำคัญคือ สารเคมีที่ใช้มีความเป็นพิษและผลพลอยได้ที่เกิดขึ้นไม่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม โดยการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางเคมีจะอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารเคมี ซึ่งจะประกอบด้วยสารตั้งต้นหรือสารละลายโลหะไอออนของทอง ( $Au^{3+}$ ) โดยส่วนใหญ่มักจะใช้กรดเตตระคลอโรอริก ( $HAuCl_4$ ) เป็นสารตั้งต้นและอาจใช้ไอโนซิทอล เฮกซะคิสฟอสเฟต (inositol hexakisphosphate, IP6) (Alaqad et al., 2016) สารละลายอีเทอร์ (ether solution) กรดอะมิโนซีสเทอีน (cysteine) โซเดียมซิเตรต (sodium citrate) หรือกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เป็นตัวรีดิวซ์ (reducing agent) ที่จะช่วยรีดิวซ์ไอออนของทอง ( $Au^{3+}$ ) ให้กลายเป็นอนุภาคทองคำนาโน ( $Au^0$ , AuNP) (Souza et al., 2019) นอกจากนี้อาจใช้วิธีโซล-เจล (sol-gel method) หรือการเคลือบผิวด้วยไอเคมี เป็นต้น (Pal et al., 2019)

1.3.2.3 วิธีการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (biological method) วิธีนี้จะใช้พืชหรือจุลินทรีย์ เช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา หรือยีสต์ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโน โดยการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจะประกอบด้วยสารตั้งต้นหรือสารละลายโลหะไอออนของทอง ( $Au^{3+}$ ) และตัวรีดิวซ์ทางชีวภาพ (biological reducing agent) เช่น เอนไซม์หรือเมทาบอลิต์ที่พืชหรือจุลินทรีย์สร้างขึ้นมาใช้เป็นตัวรีดิวซ์ในปฏิกิริยารีดักชัน และตัวรีดิวซ์ทางชีวภาพเหล่านี้นอกจากจะทำหน้าที่ในการรีดิวซ์ไอออนของทองให้กลายเป็นอนุภาคทองคำนาโนแล้ว ยังสามารถทำหน้าที่เป็นสารคงตัวที่ทำให้อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีความเสถียร (Pal et al., 2019) เป็นพิษลดลงและสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิตได้ (Giljohann et al., 2010) แต่ปัญหาของการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพคือยังไม่สามารถควบคุมขนาด รูปร่าง และการกระจายตัวของอนุภาคทองคำนาโนให้เป็นไปตามที่ต้องการได้ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาและทดลองเพิ่มเติมเพื่อให้ได้เงื่อนไขการสังเคราะห์ที่เหมาะสมที่สุดและเพื่อให้ได้อนุภาคทองคำนาโนที่มีขนาด รูปร่าง และการกระจายตัวที่ดีเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้งานต่อไป

ถึงแม้ว่าการสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางกายภาพและทางเคมีจะเป็นวิธีการสังเคราะห์ที่ง่ายและได้อนุภาคทองคำนาโนในปริมาณมาก รวมถึงสามารถควบคุมขนาดและรูปร่างของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ตามความต้องการ แต่การสังเคราะห์ด้วยวิธีทั้งสองนี้มีความกังวลเกี่ยวกับผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมที่อาจเกิดขึ้นได้ เนื่องจากอาจมีสารตกค้างหลงเหลือจากกระบวนการสังเคราะห์ ต้องใช้ความร้อนสูง ใช้สารเคมีและตัวทำละลายที่เป็นพิษ ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายจากเครื่องมือหรือสารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ได้ นอกจากนี้ยังมีต้นทุนในการสังเคราะห์หรือการผลิตที่สูงเนื่องจากอุปกรณ์หรือสารเคมีที่ใช้มีราคาสูงและต้องใช้พื้นที่จำนวนมาก ในทางตรงกันข้ามวิธีการสังเคราะห์ทางชีวภาพมีความคุ้มค่า ช่วยลดต้นทุนในการผลิต และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่า เพราะไม่ทำให้เกิดสารตกค้างในสิ่งแวดล้อมจึงเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในปัจจุบัน (Pal et al., 2019)

#### 1.4 เชื้อรา *Aspergillus niger*

เชื้อรา *A. niger* เป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญที่ใช้ในเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม สามารถผลิตเอนไซม์ เช่น อะไมเลส ไลเปส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายได้ด้วยน้ำ (hydrolytic enzyme) และสามารถผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดซิตริก กรดกลูโคนิก นอกจากนี้เชื้อรา *A. niger* ยังมีความปลอดภัยถูกจัดเป็น GRAS (generally regarded as safe) โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา เชื้อรา *A. niger* จัดเป็นราสายใย (filamentous fungi) ที่มีผนังกั้น (Abarca et al., 2003) ซึ่งจัดอยู่ในอนุกรมวิธาน (Taxonomy) ดังนี้ Kingdom: Fungi

Phylum: Ascomycota

Class: Eurotiomycetes

Order: Eurotiales

Family: Trichocomaceae

Genus: *Aspergillus*

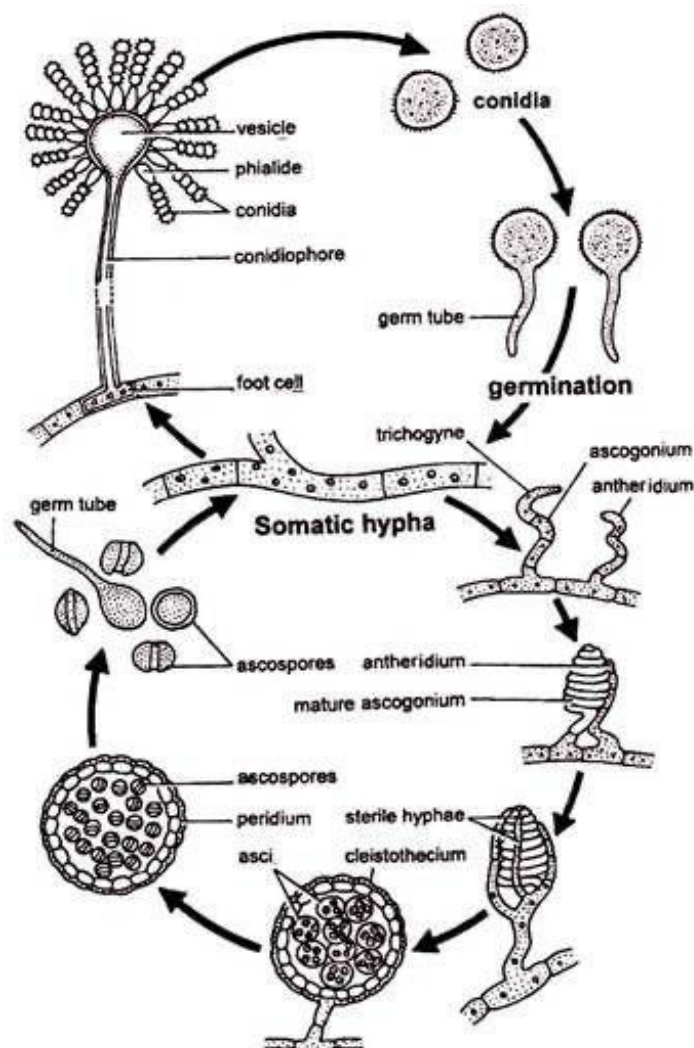
Species: *A. niger*

ลักษณะเฉพาะของเชื้อรา *A. niger* คือมีสายใยสีขาว โคลนีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ดังแสดงในรูปที่ 1.4 (Alchetron, 2020) ซึ่งเป็นส่วนของสปอร์ราที่สร้างมาจากโคนิเดีย (conidia) จึงทำให้ถูกเรียกว่า “ราดำ (black aspergilli)” การสืบพันธุ์ของเชื้อรา *A. niger* จะแบ่งออกเป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยจะสร้างสปอร์ที่เรียกว่า “conidiospore” ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะสร้างสปอร์ที่เรียกว่า “ascospore” อยู่ภายในถุงแอสคัส (ascus) และอยู่ใน ascocarp ดังรูปที่ 1.5 (El-Sheikh, 2016)



รูปที่ 1.4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *A. niger* (Alchetron, 2020)





รูปที่ 1.5 วงชีวิต (life cycle) ของเชื้อรา *A. niger* (El-Sheikh, 2016)

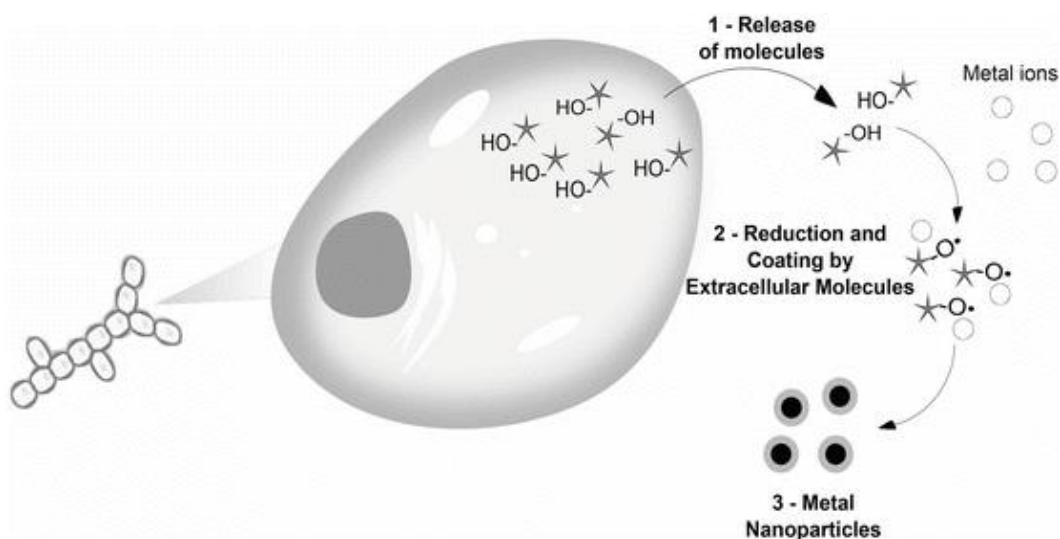
เชื้อรา *A. niger* สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิกว้างตั้งแต่ 6–47 องศาเซลเซียส โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 35–37 องศาเซลเซียส ชีตจำกัดของปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้สำหรับการเจริญเติบโตและการเกิดปฏิกิริยาเคมีต่างๆ (water activity,  $a_w$ ) คือ 0.88 ซึ่งค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์อื่นๆ นอกจากนี้ *A. niger* ยังสามารถเจริญเติบโตได้ในช่วง pH ที่กว้างมากตั้งแต่ pH 1.4–9.8 ความสามารถเหล่านี้และการผลิต conidiospores จำนวนมากซึ่งสามารถแพร่กระจายได้ทางอากาศจึงทำให้ *A. niger* แพร่หลายโดยพบมากในที่ที่อบอุ่นและชื้น (Schuster et al., 2002)

## 1.5 การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนด้วยเชื้อรา

เชื้อราเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอตและสร้างอาหารเองไม่ได้ (heterotrophic) จะได้รับสารอาหารจากการย่อยอาหารนอกเซลล์เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่หลั่งออกมาสู่สิ่งแวดล้อมโดยรอบ นอกจากนี้เชื้อรายังมีความสามารถในการดูดซึมสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์และไอออนจากสารละลายที่เจือจางจากสิ่งแวดล้อมได้ผนังเซลล์เป็นส่วนประกอบที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต การแปรสัณฐาน และการอยู่รอดของเชื้อรา โดยส่วนประกอบของผนังเซลล์ ได้แก่ กลูแคน ไคติน ไคโตซาน แมนแนน และ/หรือกาแลคโตแมนแนน และไกลโคโปรตีน ดังนั้นจึงเป็นโครงสร้างแบบไดนามิกที่เป็นเกราะป้องกันการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม เช่น ความร้อน ความเย็น ความเครียดออกซิเดติก จุลินทรีย์ และโลหะ (Silva et al., 2016) นอกจากนี้เชื้อรามีการเจริญเติบโตได้เร็วกว่าจุลินทรีย์อื่นๆจึงใช้เวลาในการสังเคราะห์สั้น ให้ผลผลิตสูง และง่ายต่อการจัดการจึงนิยมใช้ภายในห้องปฏิบัติการ (Qu et al., 2017; Pal et al., 2019) ยิ่งไปกว่านั้นเชื้อรายังสามารถทนต่อความเข้มข้นของโลหะสูงๆ และสามารถหลั่งเอนไซม์ที่มีความหลากหลายในปริมาณสูงได้ (Silva et al., 2016) จึงทำให้กระบวนการสังเคราะห์มีประสิทธิภาพ นำเชื้อถือและปรับขนาดได้ ด้วยเหตุผลเหล่านี้จึงทำให้เชื้อราจัดเป็นแหล่งจุลินทรีย์ที่ดีสำหรับการสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพ

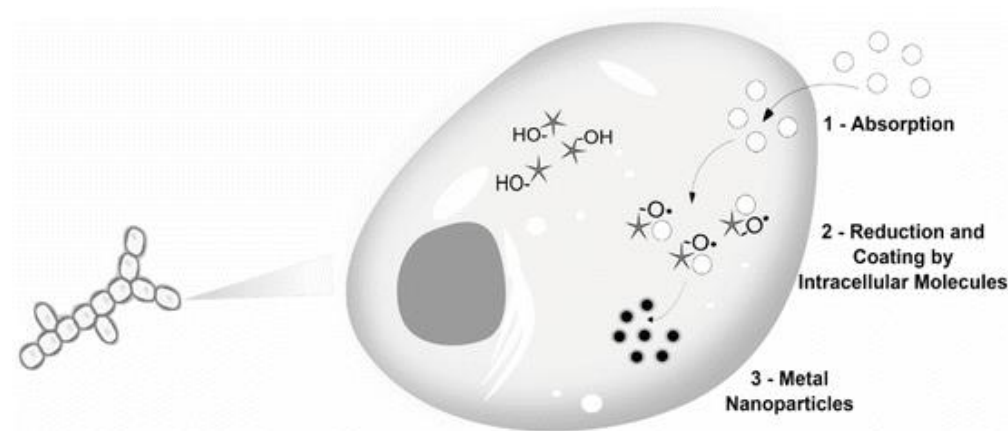
การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนด้วยเชื้อราจะแบ่งออกเป็น 3 วิธี ได้แก่

1.5.1 การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนภายนอกเซลล์ (extracellular synthesis) เชื้อราสามารถหลั่งโมเลกุล เช่น เอนไซม์หรือเมทาบอลไลต์จำนวนมากออกมาภายนอกเซลล์เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันในการเปลี่ยนไอออนของทอง ( $Au^{3+}$ ) ให้กลายเป็นอนุภาคทองนาโน ( $Au^0$ , AuNP) ดังแสดงในรูปที่ 1.6 การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนภายนอกเซลล์สามารถทำได้โดยใช้สารสกัดจากเซลล์ ของเหลวเหนือตะกอนเซลล์ หรือชีวมวล เป็นต้น (Silva et al., 2016)



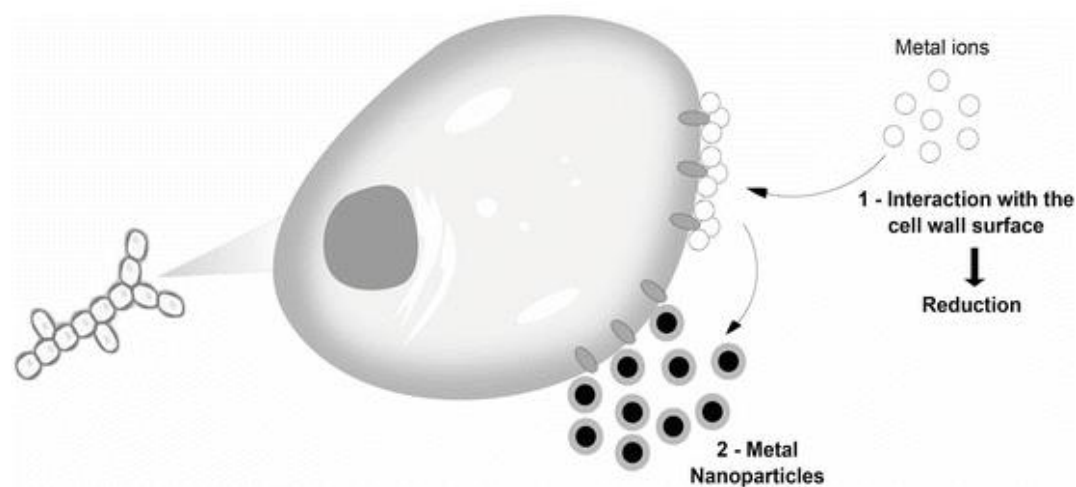
รูปที่ 1.6 การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนโลหะภายนอกเซลล์โดยเชื้อรา (Silva et al., 2016)

1.5.2 การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนภายในเซลล์ (intracellular synthesis) เชื้อราสามารถดูดซึมไอออนของทอง ( $\text{Au}^{3+}$ ) ผ่านผนังเซลล์เข้ามาภายในเซลล์ จากนั้นเอนไซม์หรือเมทาบอลไลต์จำนวนมากที่อยู่ภายในเซลล์จะทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันในการเปลี่ยนไอออนของทอง ( $\text{Au}^{3+}$ ) ให้กลายเป็นอนุภาคทองคำนาโน ( $\text{Au}^0$ , AuNP) ที่อยู่ภายในเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 1.7 การสังเคราะห์ด้วยวิธีนี้จะทำให้อนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเล็กเนื่องจากถูกจำกัดด้วยขนาดของเซลล์ (Silva et al., 2016)



รูปที่ 1.7 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนโลหะภายในเซลล์โดยเชื้อรา (Silva et al., 2016)

1.5.3 การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนบนพื้นผิวเซลล์ ไอออนของทอง ( $\text{Au}^{3+}$ ) สามารถยึดติดกับผนังเซลล์ของเชื้อราได้ จากนั้นเอนไซม์หรือเมทาบอลไลต์ที่อยู่ในผนังเซลล์จะทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันในการเปลี่ยนไอออนของทอง ( $\text{Au}^{3+}$ ) ให้กลายเป็นอนุภาคทองคำนาโน ( $\text{Au}^0$ , AuNP) ที่ติดอยู่ที่ผิวเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 1.8 (Silva et al., 2016)



รูปที่ 1.8 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนโลหะบนพื้นผิวเซลล์โดยเชื้อรา (Silva et al., 2016)

การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยเชื้อราส่วนใหญ่จะนิยมใช้การสังเคราะห์ภายนอกเซลล์ เนื่องจากการสังเคราะห์ด้วยวิธีนี้ทำได้เร็วและง่ายกว่าการสังเคราะห์ภายในเซลล์ ไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกเพื่อแยกอนุภาคทองคำนาโนออกมา จึงทำให้อนุภาคทองคำนาโนที่ได้มีความบริสุทธิ์ไม่มีปัญหาการปนเปื้อนของโปรตีนหรือสารประกอบอื่นๆที่ไม่ต้องการ

## 1.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน

1.6.1 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพ โดยความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน ( $H^+$ ) ที่แตกต่างกันอาจนำไปสู่ความแตกต่างในขนาดและรูปร่างของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ ดังนั้นจึงสามารถควบคุมขนาดและรูปร่างของอนุภาคทองคำนาโนได้โดยการปรับเปลี่ยน pH ของสารละลายที่ใช้ในการสังเคราะห์ (Patra et al., 2014; Pal et al., 2019)

1.6.2 แสง มีงานวิจัยหลายงานที่สังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนโดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชันด้วยแสง (Photoreduction) เช่น การฉายรังสี UV ที่ความยาวคลื่นแตกต่างกันเพื่อสร้างตัวรีดิวซ์ในการเปลี่ยนไอออนของทอง ( $Au^{3+}$ ) ให้กลายเป็นอนุภาคทองคำนาโน ( $Au^0$ , AuNP) ที่มีขนาดและรูปร่างเฉพาะแตกต่างกัน (Dong et al., 2007)

1.6.3 ความเข้มข้นของชีวมวล (biomass) เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพ โดยความเข้มข้นของชีวมวลที่แตกต่างกันอาจนำไปสู่ความแตกต่างในขนาดและรูปร่างของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ ดังนั้นการควบคุมขนาด รูปร่าง และการกระจายตัวของอนุภาคทองคำนาโนสามารถทำได้โดยการหาความเข้มข้นของชีวมวลที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์ (Qu et al., 2017)

1.6.4 ความเข้มข้นของกรดเตตระคลอโรอริก ( $HAuCl_4$ ) เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพ โดยความเข้มข้นของกรดเตตระคลอโรอริกที่แตกต่างกันอาจนำไปสู่ความแตกต่างในขนาดและรูปร่างของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ ดังนั้นการควบคุมขนาด รูปร่าง และการกระจายตัวของอนุภาคทองคำนาโนสามารถทำได้โดยการหาความเข้มข้นของกรดเตตระคลอโรอริกที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์ (Qu et al., 2017)

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆที่ไม่ได้กล่าวถึงในงานวิจัยนี้แต่อาจส่งผลต่อการสังเคราะห์ ลักษณะ และการประยุกต์ใช้อนุภาคทองคำนาโนได้ เช่น วิธีการหรือเทคนิคที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน อุณหภูมิ ความดัน เวลา เป็นต้น (Patra et al., 2014; Pal et al., 2019)

ในโครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยต้องการศึกษาวิธีการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยเชื้อรา *A. niger* ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์หรือเมทาบอลิต์ต่างๆที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ได้ โดยในงานวิจัยนี้จะศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่เกิดจากปฏิกิริยารีดักชันระหว่างเอนไซม์หรือเมทาบอลิต์ที่เชื้อราสร้างขึ้นในน้ำเลี้ยงเชื้อรา (fungal filtrate) กับสารละลายกรดเตตระคลอโรอริก ( $\text{HAuCl}_4$ ) เพื่อให้เกิดการรีดิวซ์ไอออนของทอง ( $\text{Au}^{3+}$ ) ให้กลายเป็นอนุภาคทองคำนาโน ( $\text{Au}^0$ , AuNP) และจะศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยเชื้อรา *A. niger* ปัจจัยต่างๆที่แตกต่างกัน ไม่ว่าจะเป็นความเป็นกรด-ด่าง (pH) แสง ปริมาณชีวมวลเชื้อรา (fungal biomass) และความเข้มข้นของกรดเตตระคลอโรอริก ( $\text{HAuCl}_4$ ) อาจส่งผลต่อขนาด รูปร่าง และการกระจายตัวของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อคุณสมบัติของวัสดุนาโน ดังนั้นการควบคุมการสังเคราะห์และความเสถียรของอนุภาคทองคำนาโนจึงมีความสำคัญมาก โดยจะได้รับการตรวจสอบเพื่อให้ได้เงื่อนไขการสังเคราะห์ที่เหมาะสมที่สุดและเพื่อให้ได้อนุภาคทองคำนาโนที่มีขนาด รูปร่าง และการกระจายตัวที่ดีเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้งานต่อไป ลักษณะของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จะถูกตรวจสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-Vis spectrophotometer ส่วนการวัดขนาด รูปร่าง การกระจายตัว และความเสถียรของอนุภาคทองคำนาโนจะถูกตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) Dynamic Light Scattering (DLS) และ Zeta potential (Nadhe et al., 2020)

### วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361
2. เพื่อศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) แสง ปริมาณชีวมวลเชื้อรา (fungal biomass) และความเข้มข้นของกรดเตตระคลอโรอริก ( $\text{HAuCl}_4$ ) ที่อาจจะมีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361

## บทที่ 2

### เครื่องมือ วัสดุ เคมีภัณฑ์

#### 2.1 เครื่องมือ

- 1) กรวยแก้ว
- 2) กระจกบอกลงปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- 3) กระจกบอกลงปริมาตร 500 มิลลิลิตร
- 4) แท่งแก้วสามเหลี่ยม (spreader)
- 5) ปากคีบ (forceps)
- 6) ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ของบริษัท ISO Laborgerate GmbH ประเทศเยอรมัน
- 7) ขวดใส่สารเคมีขนาด 500 มิลลิลิตรและ 1000 มิลลิลิตร ของบริษัท DWK Life Science ประเทศเยอรมัน
- 8) เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) 30 องศาเซลเซียส รุ่น INNOVA 4330 ของบริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 9) เครื่องชั่งหยาบแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น PG 2002-s ของบริษัท Metler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 10) เครื่องชั่งหยาบขนาดเล็ก ของบริษัท Camry
- 11) เครื่องอบฆ่าเชื้อขนาดเล็ก (autoclave) รุ่น ES-215 ของบริษัท TOMY Seiko ประเทศญี่ปุ่น
- 12) เครื่องอบฆ่าเชื้อขนาดใหญ่ (autoclave) รุ่น ES-315 ของบริษัท TOMY Seiko ประเทศญี่ปุ่น
- 13) เครื่องปั่นเหวี่ยงสารตกตะกอนขนาดเล็ก microcentrifuge (spin down) รุ่น KUBOTA 3700 ของบริษัท KUBOTA ประเทศญี่ปุ่น
- 14) เครื่องปั่นเหวี่ยงสารตกตะกอนขนาดกลาง (floor top refrigerated centrifuge with rotors) รุ่น KUBOTA 5922 ของบริษัท KUBOTA ประเทศญี่ปุ่น
- 15) เครื่องทำความร้อนชนิดตั้งโต๊ะ (heat plate) รุ่น MS-H280-Pro ของบริษัท Scilogex ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 16) เครื่องมีอนับจำนวนเซลล์ (hemocytometer) ของบริษัท LW Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 17) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) รุ่น CH30RF200 ของบริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น

- 18) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 19) เครื่องนาโนดรอป (NanoDrop spectrophotometer) รุ่น Nanodrop 2000c ของบริษัท Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 20) ตู้ชีวนิรภัย (biosafety cabinet) ของบริษัท LabMicrotech ประเทศไทย
- 21) ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U71V ของบริษัท Sanyo Electric Co. ประเทศญี่ปุ่น
- 22) ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Contherm Digital Series
- 23) ไมโครปิเปตต์ปริมาตร 10 100 และ 1000 ไมโครลิตร ของบริษัท Capp Bravo ประเทศเยอรมัน
- 24) อุปกรณ์นับจำนวน (hand tally counter) ของบริษัท GOGO for digit ประเทศจีน
- 25) ปิเปตต์อัตโนมัติ (automatic pipette) ของบริษัท DLAB Levo Plus
- 26) เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น K-550 GE ของบริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 27) เครื่องเขย่าสารใช้เสียงความถี่สูง (ultrasonic sonicator) ของบริษัท Elma ประเทศเยอรมัน
- 28) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำแบบตั้งโต๊ะ (pH meter)

## 2.2 วัสดุ

- 1) งานอาหารเพาะเชื้อพลาสติก (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) หลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ของบริษัท Kirgen
- 5) กระดาษกรองเบอร์ 1 (whatman no.1 filter paper) ของบริษัท GE Healthcare
- 6) ฟิวเตอร์ (filter) ขนาด 0.2 ไมครอน ของบริษัท GE Healthcare
- 7) หลอดฉีดยา (syringe) ขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nipro ประเทศไทย
- 8) ปิเปตต์พลาสติก (plastic pipette) ขนาด 5 10 และ 25 มิลลิลิตร ของบริษัท SPL LifeScience
- 9) ผ้าก๊อต
- 10) อลูมิเนียมฟอยล์

### 2.3 เคมีภัณฑ์

- 1) 85% กลีเซอรอล (85% glycerol) ของบริษัท Himedia
- 2) ผงอาหารเลี้ยงราสำเร็จรูปโปเตโต้เด็กโตส (potato dextrose broth) ของบริษัท Himedia
- 3) ผงวุ้น (agar) ของบริษัท Himedia
- 4) Tween20 ของบริษัท Life Science
- 5) Gold (III) chloride, AuCl<sub>3</sub>
- 6) Sodium acetate trihydrate
- 7) Acetic acid
- 8) Phosphoric acid
- 9) Sodium hydrogen phosphate dihydrate
- 10) Disodium hydrogen phosphate
- 11) Trisodium phosphate

### 2.4 น้ำ

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

### 2.5 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ขนาดและรูปร่าง

- 1) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) รุ่น JEM-2100 ของบริษัท Jeol ประเทศญี่ปุ่น เครื่องมือจากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 2) เครื่องมือวัดขนาดด้วยแสงตกกระทบ (Dynamic Light Scattering, DLS) ของบริษัท Malvern Instruments ประเทศอังกฤษ เครื่องมือจากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 2.6 เชื้อรา

เชื้อราที่ใช้ในการทดลองนี้ได้รับมาจาก Microbial Culture Collection ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเชื้อราที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในโครงการวิจัยนี้ได้แก่ *Aspergillus niger* MSCU 0361



Kingdom: Fungi

Phylum: Ascomycota

Class: Eurotiomycetes

Order: Eurotiales

Family: Trichocomaceae

Genus: *Aspergillus*

Species: *A. niger*

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการทดลอง

#### 3.1 การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโน

##### 3.1.1 การเตรียมเชื้อสำหรับการสังเคราะห์อนุภาคทองนาโน

นำเชื้อรา *Aspergillus niger* MSCU 0361 จาก Microbial Culture Collection ที่คัดแยกมาจากดิน โดยห้องปฏิบัติการของรองศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เรืองสำราญ ที่เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 96 ชั่วโมง (4 วัน) เมื่อเชื้อราเจริญเต็มที่แล้วจะเห็นลักษณะโคโลนีของ *A. niger* MSCU 0361 ที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีน้ำตาลเข้มและมีการสร้างสปอร์สีดำ

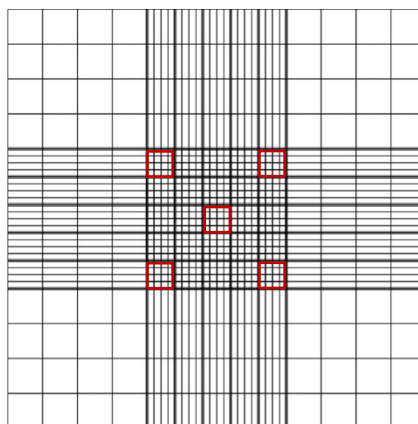
##### 3.1.2 การเก็บสปอร์และการนับจำนวนสปอร์

เมื่อเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 เจริญเต็มที่แล้วจะเก็บสปอร์โดยการเติม 0.2% Tween20 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราเจริญอยู่ จากนั้นจะใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม (spreader) ที่ฆ่าเชื้อด้วย 95% เอทานอล ขูดเบาๆบริเวณโคโลนีเพื่อทำให้สปอร์หลุดออก แล้วใช้ปิเปตต์ดูดส่วนสารละลายที่มีสปอร์รวมอยู่กรองผ่านผ้าก๊อตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่วางอยู่บนหลอดปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเส้นใยที่อาจปนเปื้อนมาออกก่อน จากนั้นจะชะด้วย 0.2% Tween20 ปริมาตร 300 ไมโครลิตรเพื่อล้างสปอร์ที่อาจหลงเหลืออยู่บนผ้าก๊อต เจือจางสปอร์ด้วย 0.2% Tween20 ในอัตราส่วนของการเจือจาง 1:5 จากนั้นจะนำสปอร์ไปนับจำนวนด้วย hemocytometer โดยใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายที่มีสปอร์อยู่ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นค่อยๆปล่อยให้สารละลายไหลผ่านกระจกปิดสไลด์ (cover slip) เข้าไปยังช่องว่างที่มีเส้นตาราง (counting chamber grid) อยู่จนเต็มช่อง ทำแบบเดียวกันกับอีกด้านหนึ่งโดยระมัดระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศเพราะจะทำให้เกิดความผิดพลาดในการนับได้ วิธีการนับสปอร์จะทำโดยการมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่าจะสังเกตเห็นช่องตารางตรงกลางจะมีทั้งหมด 25 ช่องใหญ่แต่จะนับเพียง 5 ช่องใหญ่เท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 3.1 และทำซ้ำเช่นเดียวกันกับอีกด้านหนึ่ง จากนั้นจะนำจำนวนสปอร์ที่นับได้จากทั้ง 2 ด้านรวมกันและหาค่าเฉลี่ยแล้วนำมาคิดตามสูตรคำนวณด้านล่างนี้

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

ซึ่ง df = dilution factor

n = จำนวนค่าเฉลี่ยของสปอร์ที่นับได้



### รูปที่ 3.1 จำนวนช่องและตำแหน่งสำหรับการนับจำนวนสปอร์

ที่มา : <https://www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber/>

#### 3.1.3 การเก็บเชื้อราสายพันธุ์ (stock culture)

นำสปอร์ของเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่อยู่ในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ได้จากขั้นตอน 3.1.2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตรและ 40% กลีเซอรอลปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด cryotube จากนั้นเก็บหลอด cryotube ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

#### 3.1.4 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อรา (fungal filtrate)

นำสปอร์ของเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่อยู่ในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ได้จากขั้นตอน 3.1.2 ตามปริมาตรที่คำนวณได้เพื่อให้มีจำนวนสปอร์  $10^6$  สปอร์ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรและบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน เมื่อครบ 4 วันแล้วนำมากรองเพื่อเก็บชีวมวลเชื้อรา (fungal biomass) ด้วยกระดาษกรอง whatman no.1 เพื่อแยกส่วนของชีวมวลเชื้อรา ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อก่อน หลังจากนั้นจะล้างชีวมวลเชื้อรากับน้ำปราศจากเชื้อ 3 ครั้งครั้งละ 50 มิลลิลิตร เพื่อล้างส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อาจติดอยู่กับชีวมวลเชื้อราออก ทิ้งไว้สะกักเพื่อให้ น้ำกรองออกจนหมด และนำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งตั้งโต๊ะขนาดเล็กให้มีน้ำหนักของชีวมวลเชื้อราเท่ากับ 30 กรัม จากนั้นนำชีวมวลเชื้อราใส่ลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร และเติมน้ำปราศจากเชื้อลงไป 60 มิลลิลิตร สุดท้ายนำไปบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน เมื่อครบ 4 วันแล้วนำ ชีวมวลเชื้อรามากรองออกด้วยกระดาษกรอง whatman no.1 เพื่อเก็บส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อราไว้ใช้ในขั้นตอนของการสังเคราะห์อนุภาคทองคำต่อไป

#### 3.1.5 การสังเคราะห์อนุภาคทองคำ

การสังเคราะห์อนุภาคทองคำจะทำโดยการเตรียมชุดควบคุมและชุดการทดลองดังนี้

##### 3.1.5.1 ชุดควบคุมที่ 1

เติมน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย acetate buffer (pH 4.70) ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตรที่ผสมอยู่กับน้ำปราศจากเชื้อปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดทดลองที่มีสารละลายทั้งสามดังกล่าวผสมอยู่เก็บไว้ในที่มืดโดยหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์และสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

### 3.1.5.2 ชุดควบคุมที่ 2

เติมสารละลาย 0.02 M กรดเตตระคลอโรอริก ( $\text{HAuCl}_4$ ) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย acetate buffer (pH 4.70) ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตรที่ผสมอยู่กับน้ำปราศจากเชื้อปริมาตร 2.25 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดทดลองที่มีสารละลายทั้งสามดังกล่าวผสมอยู่เก็บไว้ในที่มืดโดยหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์และสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

### 3.1.5.3 ชุดการทดลอง

เติมสารละลาย 0.02 M กรดเตตระคลอโรอริก ( $\text{HAuCl}_4$ ) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตรที่ผสมอยู่กับสารละลาย acetate buffer (pH 4.70) ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดทดลองที่มีสารละลายทั้งสามดังกล่าวผสมอยู่เก็บไว้ในที่มืดโดยหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์และสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

### 3.1.6 การแยกอนุภาคของนาโนที่สังเคราะห์ได้ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา

นำอนุภาคของนาโนที่สังเคราะห์ได้จากขั้นตอน 3.1.5.3 ใส่ในหลอดไมโครเซ็นติพิวีก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที หรือทำซ้ำจนกว่าสารละลายจะใสหรือพบว่าอนุภาคของนาโนตกตะกอนลงก้นหลอดจนหมด จากนั้นค่อยๆดูดส่วนของเหลวออกให้ได้มากที่สุดโดยระมัดระวังอย่าให้อนุภาคของนาโนที่ก้นหลอดฟุ้ง และทำให้แห้ง (Air-dry) ในตู้ชีวนิรภัย จากนั้นทำให้อนุภาคของนาโนละลายด้วยการเติมน้ำปราศจากเชื้อปริมาตร 1000 ไมโครลิตรแล้วทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการ resuspend หรือ vortex และเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น

## 3.2 การทดสอบปัจจัยต่างๆที่อาจมีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคของนาโน

การทดสอบปัจจัยต่างๆในโครงการวิจัยนี้จะทดสอบทีละปัจจัย (Single factor)

### 3.2.1 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

เติมสารละลาย 0.02 M กรดเตตระคลอโรอริก ( $\text{HAuCl}_4$ ) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตรที่ผสมอยู่กับสารละลาย acetate buffer (pH 4.70) และ phosphate buffer (pH 2.04, 6.71 และ 11.52) ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดทดลองที่มีสารละลายทั้งสามดังกล่าวผสมอยู่เก็บไว้ในที่มืดโดยหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์และสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

### 3.2.2 แสง

เติมสารละลาย 0.02 M กรดเตตระคลอโรอริก ( $\text{HAuCl}_4$ ) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตรที่ผสมอยู่กับสารละลาย acetate buffer (pH 4.70) ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดทดลองที่มีสารละลายทั้งสามดังกล่าวผสมอยู่เก็บไว้ในที่มืดโดยหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เปรียบเทียบกับหลอดทดลองที่ไม่ได้หุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์บ่มที่อุณหภูมิห้องและสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

### 3.2.3 ปริมาณของชีวมวลเชื้อรา (fungal biomass)

ศึกษาผลของปริมาณชีวมวลเชื้อราโดยการชั่งชีวมวลเชื้อราให้มีปริมาณ 30 กรัมและ 60 กรัม จากนั้นนำชีวมวลเชื้อราใส่ลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร และเติมน้ำปราศจากเชื้อลงไป 60 มิลลิลิตร สุดท้ายนำไปบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นทำตามขั้นตอนที่ 3.1.4 และ 3.1.5.3 ตามลำดับ

### 3.2.4 ความเข้มข้นของกรดเตตระคลอโรอริก ( $\text{HAuCl}_4$ )

เติมสารละลายกรดเตตระคลอโรอริก ( $\text{HAuCl}_4$ ) 0.01 M, 0.02 M และ 0.03 M ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตรที่ผสมอยู่กับสารละลาย acetate buffer (pH 4.70) ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดทดลองที่มีสารละลายทั้งสามดังกล่าวผสมอยู่เก็บไว้ในที่มืดโดยหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์และสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

## 3.3 การตรวจสอบลักษณะของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้

### 3.3.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-Vis spectrophotometer

นำอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 200-800 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Nanodrop2000 ซึ่งเป็นวิธีพื้นฐานเพื่อยืนยันการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน โดยอนุภาคทองคำนาโนจะมีค่าการดูดกลืนแสงจำเพาะระหว่าง 500-550 นาโนเมตร โดยขั้นตอนการวัดค่าการดูดกลืนแสงจะใช้น้ำเป็น blank จากนั้นจะวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในสภาวะที่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

### 3.3.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการทำ Dynamic Light Scattering (DLS) และ Zeta potential

นำสารละลายของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จากขั้นตอน 3.1.5.3 มาเจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วนการเจือจาง 1:5 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) ปิดฝาหลอดด้วยพาราฟินและห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อไม่ให้สารละลายโดนแสง จากนั้นส่งตัวอย่างไปที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.3.3 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการทำ Transmission Electron Microscopy (TEM)

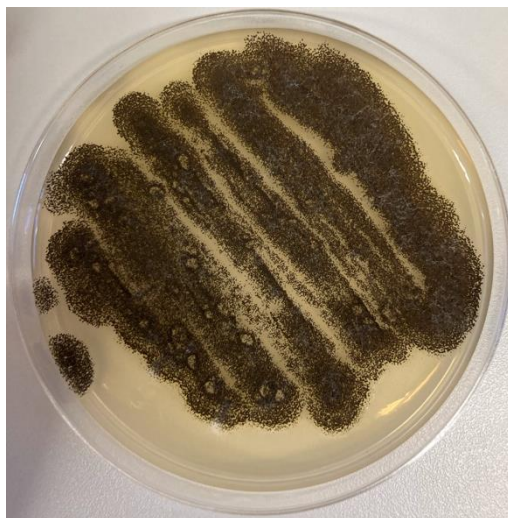
นำสารละลายของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จากขั้นตอน 3.1.5.3 มาเจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วนการเจือจาง 1:9 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) ปิดฝาหลอดด้วยพาราฟินและห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อไม่ให้สารละลายโดนแสง จากนั้นส่งตัวอย่างไปที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* MSCU 0361

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ได้จาก Microbial Culture Collection ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 96 ชั่วโมง (4 วัน) พบว่าโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ของเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ในระยะแรกโคโลนีจะมีสีน้ำตาลแต่เมื่อเชื้อราเจริญได้เต็มที่จะมีการสร้างสปอร์สีดำเกิดขึ้นจึงทำให้สีของโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและมีบริเวณที่มีสีดำซึ่งเป็นบริเวณที่รามีการสร้างสปอร์เกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.1



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

#### 4.2 การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อรา (fungal filtrate)

จากการเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อราในขั้นตอนที่ 3.1.4 โดยการนำสปอร์ของเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่อยู่ในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ได้จากขั้นตอน 3.1.2 ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth (PDB) และบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน จะได้ชีวมวลเชื้อรา (fungal biomass) ที่มีลักษณะเป็นก้อนกลมสีเหลืองอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB จากนั้นจะนำมารองเพื่อเก็บชีวมวลเชื้อราปริมาณ 30 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่และเติมน้ำปราศจากเชื้อลงไป 60 มิลลิลิตร สุดท้ายนำไปบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน เมื่อครบ 4 วันแล้วจะได้ชีวมวลเชื้อราที่มีลักษณะเป็นก้อนกลมสีเหลืองอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อราที่มีลักษณะเป็นสารละลายสีเหลืองใส ดังแสดงในรูปที่ 4.2



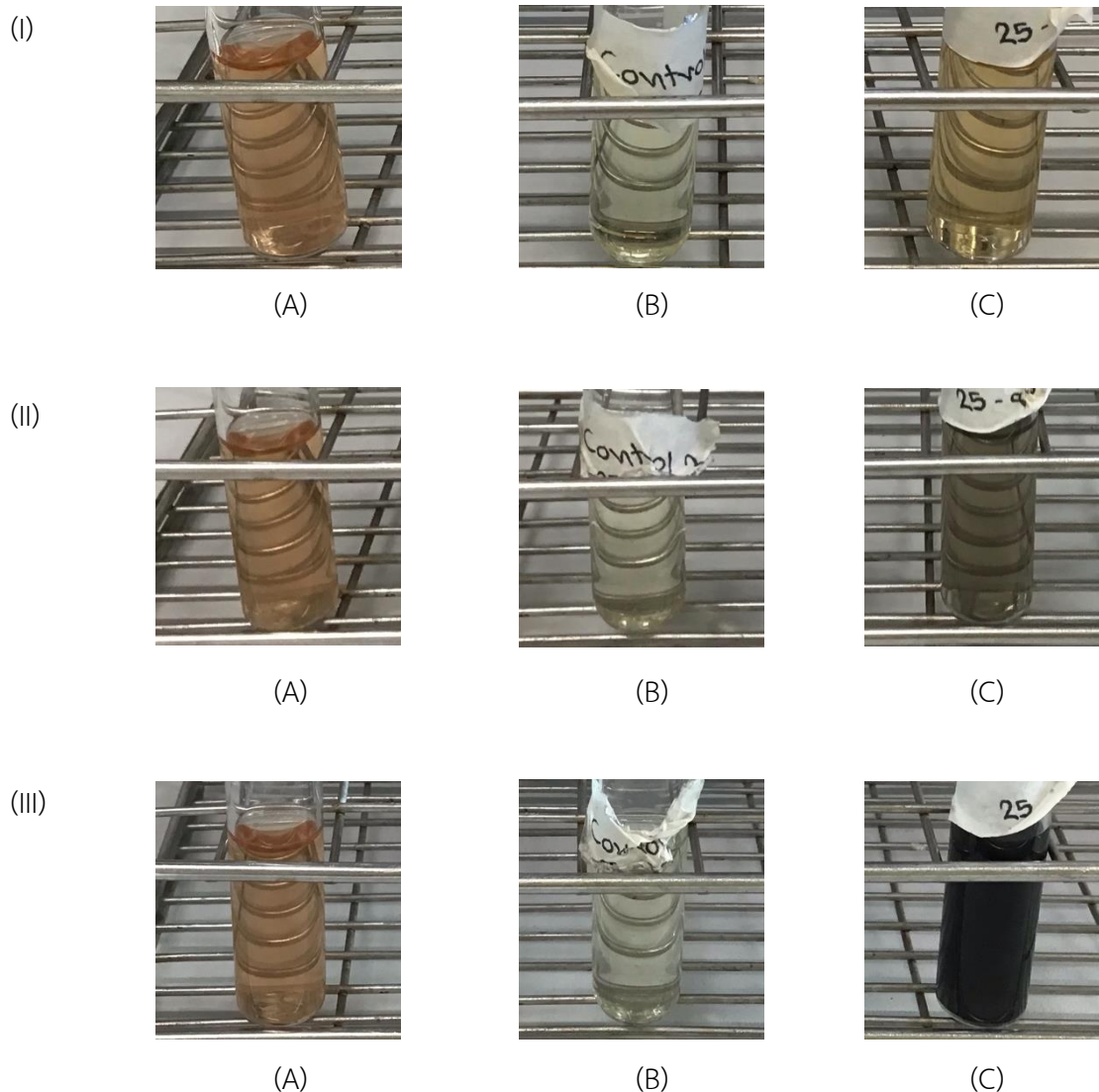
รูปที่ 4.2 ลักษณะชีวมวลเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ในน้ำเลี้ยงเชื้อรา

### 4.3 การสังเคราะห์อนุภาคทองนาโน

#### 4.3.1 การเปลี่ยนสีของสารละลาย

จากการสังเคราะห์อนุภาคทองนาโนในขั้นตอนที่ 3.1.5.3 พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ผสมอยู่กับสารละลาย acetate buffer pH 4.70 แล้วถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M กรดเตตระคลอโรอริก ( $\text{HAuCl}_4$ ) แล้วนำไปบ่มปฏิกิริยาในที่มืดที่อุณหภูมิห้องโดยหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์และสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายจะพบว่าสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลือง (รูปที่ 4.3 C, I) เป็นสีม่วงเมื่อระยะเวลาผ่านไป 60 นาที (รูปที่ 4.3 C, II) แล้วสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้มเมื่อระยะเวลาผ่านไป 80 นาที (รูปที่ 4.3 C, III) ซึ่งเป็นผลที่เกิดจากคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองนาโนที่แสดงให้เห็นถึงการเกิดปฏิกิริยารีดักชันภายในสารละลาย (Mukherjee et al., 2002) ในขณะที่ชุดควบคุมที่ 1 ซึ่งเป็นชุดควบคุมที่ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ในสารละลาย acetate buffer pH 4.70 แต่ไม่ได้ใส่สารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  (รูปที่ 4.3 A, I-III) และชุดควบคุมที่ 2 ซึ่งเป็นชุดควบคุมที่ใส่สารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  ในสารละลาย acetate buffer pH 4.70 แต่ไม่ได้ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อรา (รูปที่ 4.3 B, I-III) เมื่อนำไปบ่มปฏิกิริยาในที่มืดที่อุณหภูมิห้องจะไม่เกิดการเปลี่ยนสีของสารละลาย



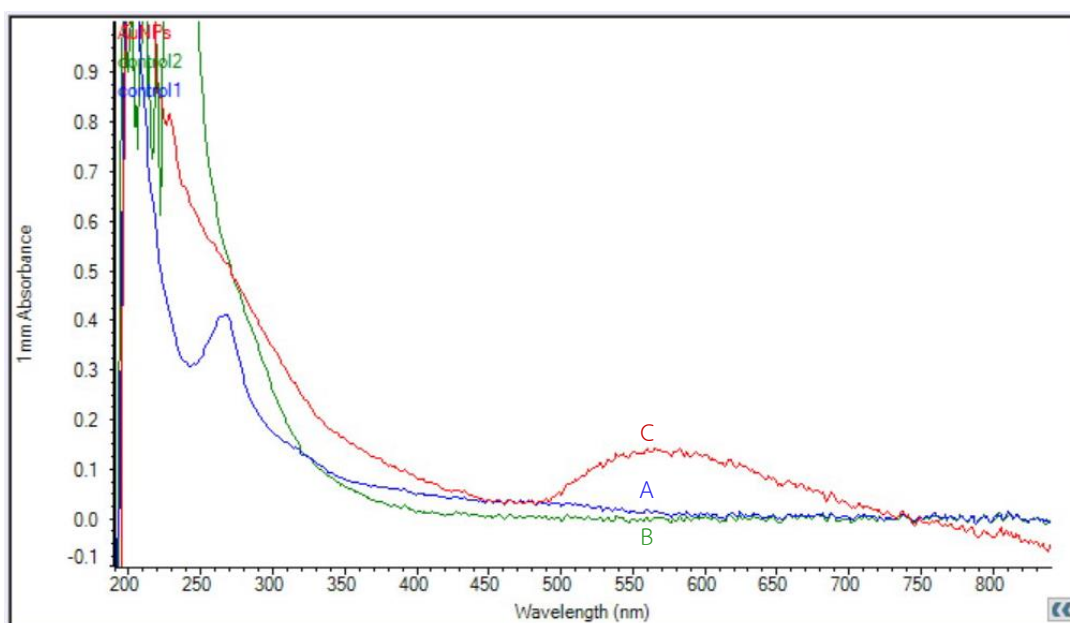


**รูปที่ 4.3** การเปลี่ยนสีของน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ผสมอยู่กับสารละลาย acetate buffer pH 4.70 เมื่อถูกเติมด้วยสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  (I) ที่ 0 นาที (II) ที่ 60 นาที (III) ที่ 80 นาที; (A) ชุดควบคุมที่ 1 น้ำเลี้ยงเชื้อรา (B) ชุดควบคุมที่ 2 สารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  (C) ชุดการทดลองน้ำเลี้ยงเชื้อราผสมสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$

#### 4.3.2 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำนาโนด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry

การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนนอกจากจะสังเกตจากการเปลี่ยนสีของสารละลายแล้วยังสามารถวิเคราะห์ได้จากค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry ที่ช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 200-800 นาโนเมตร ซึ่งเป็นวิธีพื้นฐานเพื่อยืนยันการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน โดยอนุภาคทองคำนาโนจะมีค่าการดูดกลืนแสงจำเพาะระหว่างช่วงความยาวคลื่น 500-550 นาโนเมตร (Ahmed et al., 2016) และจากการสังเคราะห์

อนุภาคทองคำนาโนในขั้นตอนที่ 3.1.5.3 เมื่อนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (NanoDrop2000) พบว่าชุดการทดลองที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ผสมอยู่กับสารละลาย acetate buffer pH 4.70 และสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 0.137 ที่ความยาวคลื่น 569 นาโนเมตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ 1 ซึ่งเป็นการควบคุมน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 และชุดควบคุมที่ 2 ซึ่งเป็นการควบคุมความเข้มข้นของสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  ที่ไม่พบการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 500-550 นาโนเมตร เมื่อพิจารณารูปของชุดควบคุมที่ 1 ซึ่งเป็นการควบคุมน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 จะพบว่ามี การดูดกลืนแสงเกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ซึ่งอาจเกิดจากการดูดกลืนแสงของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนหรือเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเชื้อรา ดังแสดงในกราฟที่ 4.1



กราฟที่ 4.1 การดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในสารละลาย acetate buffer pH 4.70 (A) ชุดควบคุมที่ 1 น้ำเลี้ยงเชื้อรา (B) ชุดควบคุมที่ 2 สารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  (C) ชุดการทดลองน้ำเลี้ยงเชื้อราผสมสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$

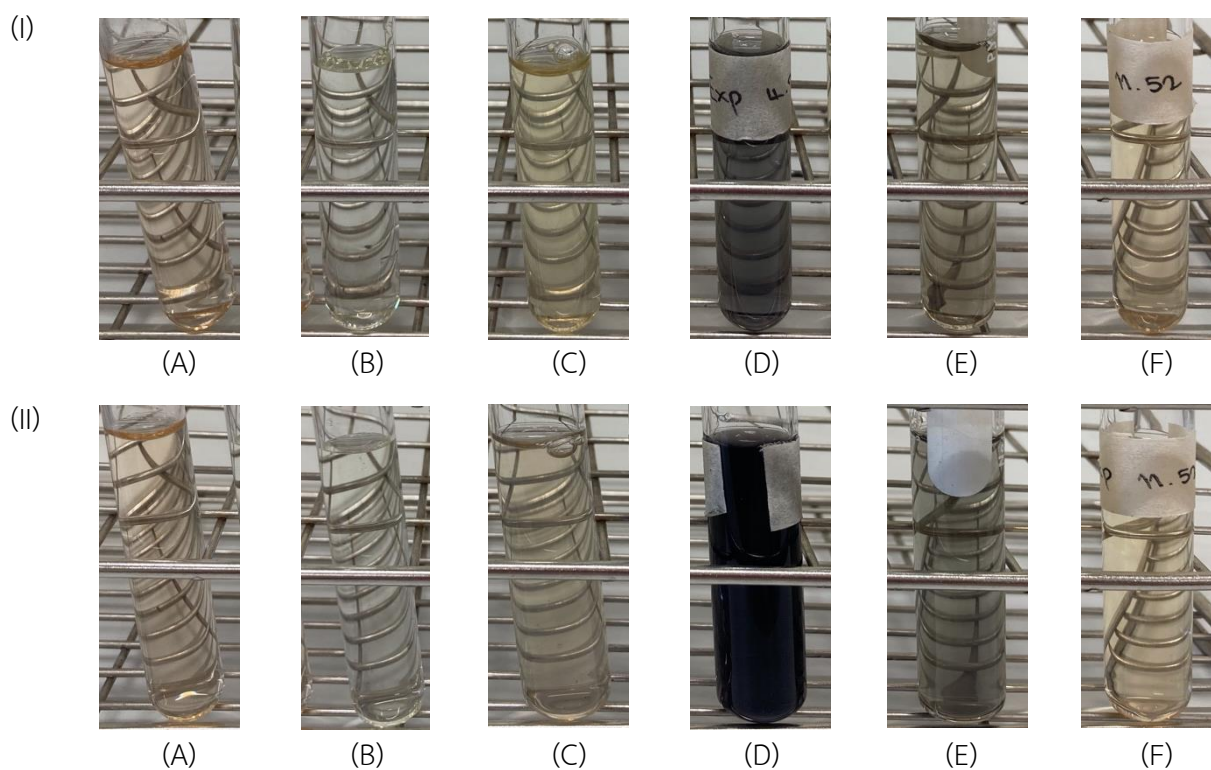
#### 4.4 การทดสอบปัจจัยต่างๆที่อาจมีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน

##### 4.4.1 การเปลี่ยนสีของสารละลาย

##### 1) ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในขั้นตอนที่ 3.2.1 พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ผสมอยู่กับสารละลาย acetate buffer pH 4.70 แล้วถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  เมื่อนำหลอด

ทดลองไปบ่มปฏิกิริยาในที่มีดที่อุณหภูมิห้องโดยหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์และสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายจะพบว่าสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงเมื่อระยะเวลาผ่านไป 55 นาที (รูปที่ 4.4 D, I) แล้วสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้มเมื่อระยะเวลาผ่านไป 65 นาที (รูปที่ 4.4 D, II) ซึ่งเป็นผลที่เกิดจากคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำนาโนที่แสดงให้เห็นถึงการเกิดปฏิกิริยารีดักชันภายในสารละลาย ในขณะที่น้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ผสมอยู่กับสารละลาย phosphate buffer pH 6.71 แล้วถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  พบว่าสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงจางๆเมื่อระยะเวลาผ่านไป 65 นาที (รูปที่ 4.4 E, I-II) แต่เมื่อพิจารณาน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ผสมอยู่กับสารละลาย phosphate buffer pH 2.04 (รูปที่ 4.4 C, I-II) และที่ pH 11.52 (รูปที่ 4.4 F, I-II) เมื่อถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  แล้วบ่มปฏิกิริยาในที่มีดไม่พบการเปลี่ยนสีของสารละลายแม้ระยะเวลาจะผ่านไป 55 นาทีและ 65 นาทีหลังการบ่ม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีปฏิกิริยารีดักชันเกิดขึ้นภายในสารละลาย



**รูปที่ 4.4** การเปลี่ยนสีของน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ผสมอยู่กับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ และถูกเติมด้วยสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  (I) หลังการบ่มที่ 55 นาที (II) ที่ 65 นาที; (A) ชุดควบคุมที่ 1 น้ำเลี้ยงเชื้อรา (B) ชุดควบคุมที่ 2 สารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  (C) ชุดการทดลองน้ำเลี้ยงเชื้อราผสมสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  ที่ pH 2.04 (D) ที่ pH 4.70 (E) ที่ pH 6.71 และ (F) ที่ pH 11.52

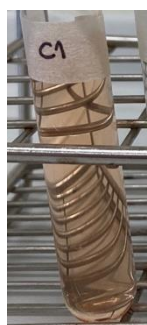
## 2) แสง

จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในขั้นตอนที่ 3.2.2 พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ผสมอยู่กับสารละลาย acetate buffer pH 4.70 แล้วถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  เมื่อนำหลอดทดลองไปบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในที่มืดโดยหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เปรียบเทียบกับหลอดทดลองที่ไม่ได้หุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์และสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลาย พบว่าการเปลี่ยนสีของสารละลายเมื่อบ่มปฏิกิริยาในที่มืดและที่มีแสงให้การเปลี่ยนสีของสารละลายไม่แตกต่างกัน โดยสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงเมื่อระยะเวลาผ่านไป 55 นาที แล้วสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้มเมื่อระยะเวลาผ่านไป 65 นาที ซึ่งเป็นผลที่เกิดจากคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำนาโนที่แสงให้เห็นถึงการเกิดปฏิกิริยารีดักชันภายในสารละลาย

## 3) ปริมาณของชีวมวลเชื้อรา

จากการศึกษาผลของปริมาณชีวมวลในขั้นตอนที่ 3.2.3 พบว่าเมื่อชั่งชีวมวลเชื้อราให้มีปริมาณ 30 กรัม และ 60 กรัม จากนั้นนำไปสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ผสมอยู่กับสารละลาย acetate buffer pH 4.70 แล้วถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  เมื่อนำหลอดทดลองไปบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องและสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลาย พบว่าเมื่อใช้ปริมาณชีวมวลเชื้อรา 60 กรัม สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงเมื่อระยะเวลาผ่านไป 10 นาที แล้วสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้มเมื่อระยะเวลาผ่านไป 20 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ในขณะที่เมื่อใช้ปริมาณชีวมวลเชื้อรา 30 กรัม สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงเมื่อระยะเวลาผ่านไป 15 นาที แล้วสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้มเมื่อระยะเวลาผ่านไป 30 นาที ซึ่งเป็นผลที่เกิดจากคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำนาโนที่แสงให้เห็นถึงการเกิดปฏิกิริยารีดักชันภายในสารละลาย

(I)



(A)



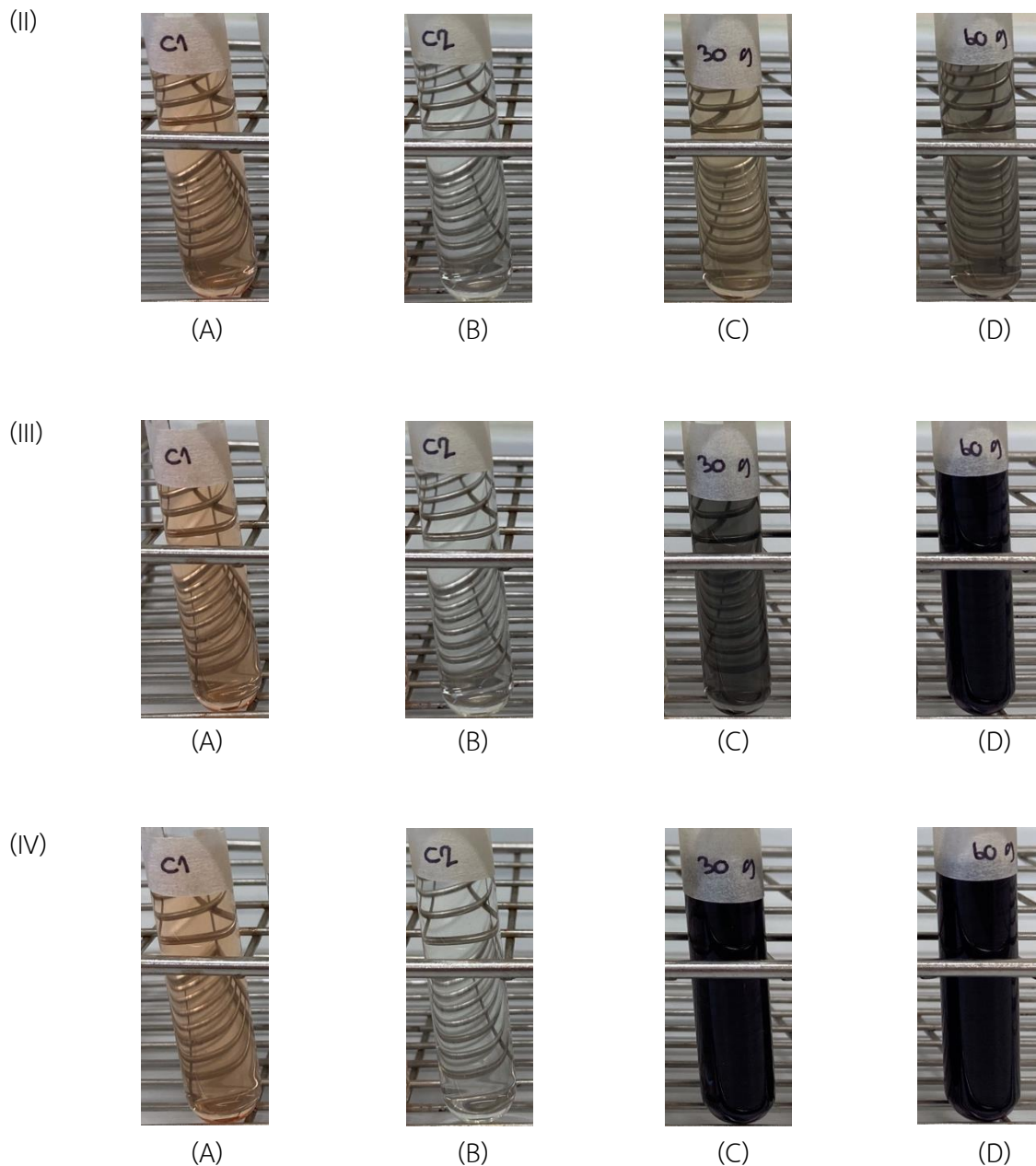
(B)



(C)



(D)



**รูปที่ 4.5** การเปลี่ยนสีของน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ผสมอยู่กับสารละลาย acetate buffer pH 4.70 เมื่อถูกเติมด้วยสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  (I) ที่ 0 นาที (II) ที่ 10 นาที (III) ที่ 20 นาที (IV) ที่ 30 นาที; (A) ชุดควบคุมที่ 1 น้ำเลี้ยงเชื้อรา (B) ชุดควบคุมที่ 2 สารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  (C) ชุดการทดลองน้ำเลี้ยงเชื้อราผสมสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  เมื่อใช้ปริมาณชีวมวลเชื้อรา 30 กรัมและ (D) 60 กรัม

#### 4) ความเข้มข้นของกรดเตตระคลอโรอริก ( $\text{HAuCl}_4$ )

จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในขั้นตอนที่ 3.2.4 พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ผสมอยู่กับสารละลาย acetate buffer pH 4.70 แล้วถูกเติมด้วยสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อนำหลอดทดลองไปปั่นปฏิบัติการที่อุณหภูมิห้องและสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลาย พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลาย 0.01 M  $\text{HAuCl}_4$  สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงเมื่อระยะเวลาผ่านไป 10 นาที แล้วสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้มเมื่อระยะเวลาผ่านไป 30 นาที ในขณะที่เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงเมื่อระยะเวลาผ่านไป 30 นาที แล้วสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้มเมื่อระยะเวลาผ่านไป 40 นาที แต่เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลาย 0.03 M  $\text{HAuCl}_4$  สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงเมื่อระยะเวลาผ่านไป 50 นาที แล้วสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้มเมื่อระยะเวลาผ่านไป 70 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ซึ่งเป็นผลที่เกิดจากคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำนาโนที่แสดงให้เห็นถึงการเกิดปฏิกิริยารีดักชันภายในสารละลาย

(I)



(A)



(B)



(C)



(D)



(E)

(II)



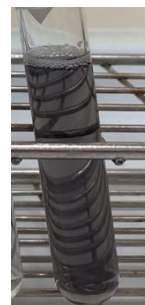
(A)



(B)



(C)

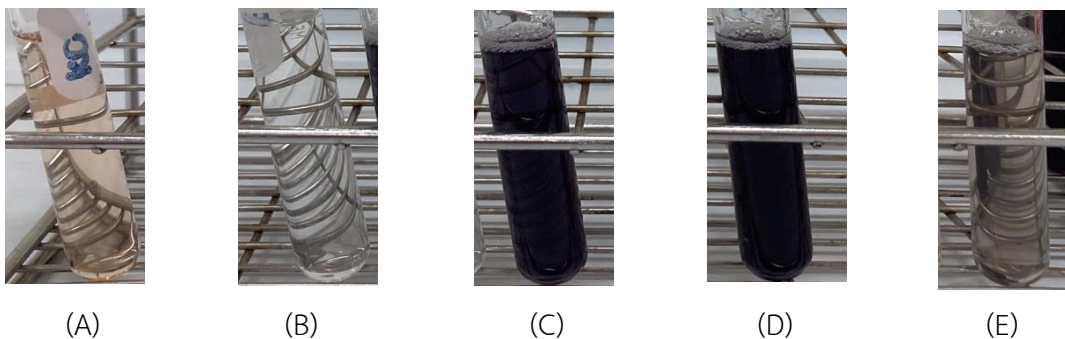


(D)

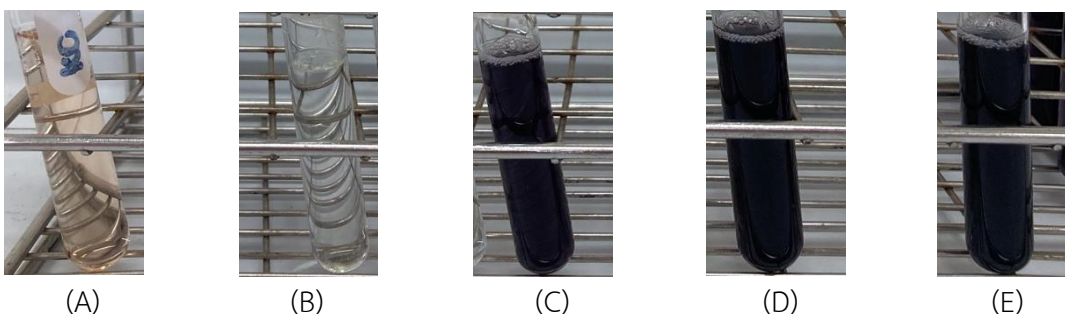


(E)

(III)



(IV)



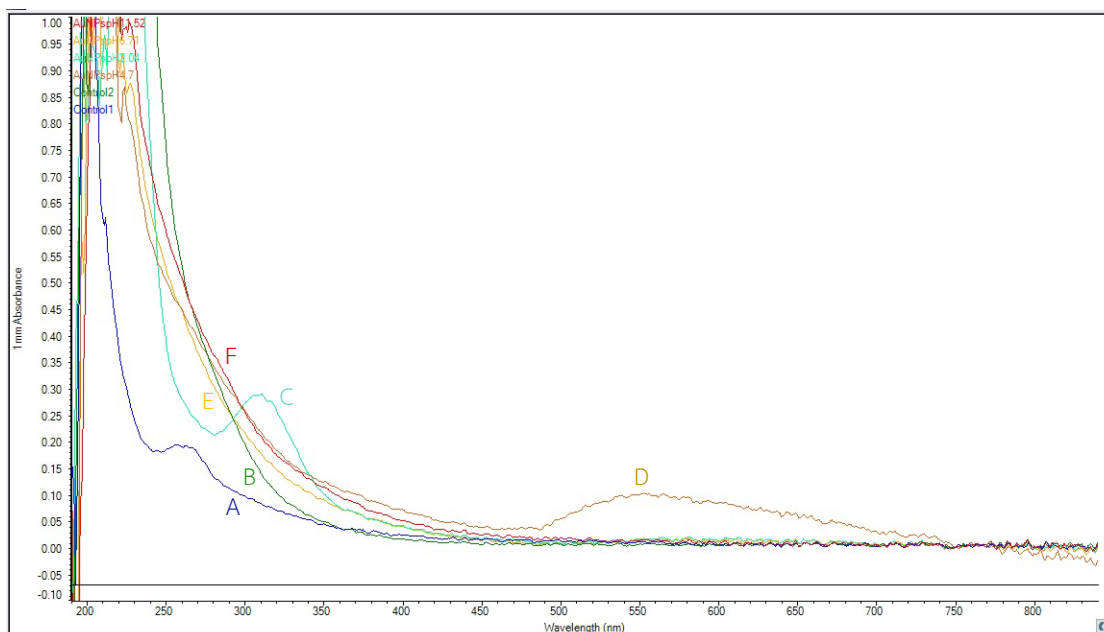
**รูปที่ 4.6** การเปลี่ยนสีของน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ผสมอยู่กับสารละลาย acetate buffer pH 4.70 เมื่อถูกเติมด้วยสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  (I) ที่ 0 นาที (II) ที่ 30 นาที (III) ที่ 50 นาที (IV) ที่ 70 นาที; (A) ชุดควบคุมที่ 1 น้ำเลี้ยงเชื้อรา (B) ชุดควบคุมที่ 2 สารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  (C) ชุดการทดลองน้ำเลี้ยงเชื้อราผสมสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  ที่ความเข้มข้นสารละลาย 0.01 M  $\text{HAuCl}_4$  (D) 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  และ (E) 0.03 M  $\text{HAuCl}_4$

#### 4.4.2 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำนาโนด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry

##### 1) ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในขั้นตอนที่ 3.2.1 เมื่อนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (NanoDrop2000) พบว่าชุดการทดลองที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  ในสารละลาย acetate buffer pH 4.70 จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 0.103 ที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร ในขณะที่ชุดการทดลองที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  ในสารละลาย phosphate buffer ที่ pH 2.04 ที่ pH 6.71 และที่ pH 11.52 จะไม่พบการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 500-550 นาโนเมตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ 1 ซึ่งเป็นชุดควบคุมน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 และชุดควบคุมที่ 2 ซึ่งเป็นชุดควบคุมความเข้มข้นของสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  ที่จะไม่พบการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 500-550 นาโนเมตรเช่นกัน เมื่อพิจารณารูปภาพของชุด

การทดลองในสารละลาย phosphate buffer ที่ pH 2.04 จะพบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ซึ่งอาจเกิดจากการดูดกลืนแสงของ nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (McComb et al., 1976) ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหายใจในระดับเซลล์ของจุลินทรีย์ ดังแสดงในกราฟที่ 4.2

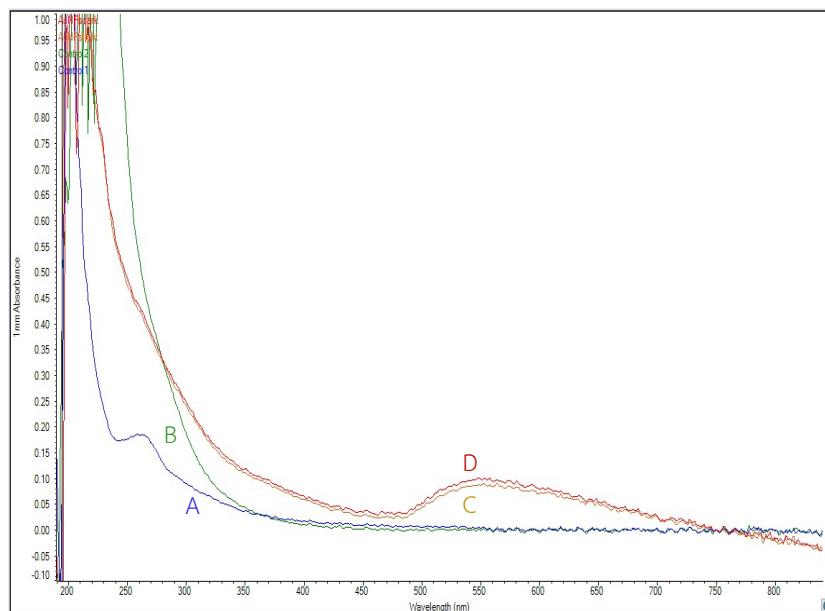


กราฟที่ 4.2 การดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ (A) ชุดควบคุมที่ 1 น้ำเลี้ยงเชื้อรา (B) ชุดควบคุมที่ 2 สารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  (C) ชุดการทดลองน้ำเลี้ยงเชื้อราผสมสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  ที่ pH 2.04 (D) ที่ pH 4.70 (E) ที่ pH 6.71 และ (F) ที่ pH 11.52

## 2) แสง

จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในขั้นตอนที่ 3.2.2 เมื่อนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (NanoDrop2000) พบว่าชุดการทดลองที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  ในสารละลาย acetate buffer pH 4.70 เมื่อนำหลอดทดลองไปบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในที่มืดโดยหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เปรียบเทียบกับหลอดทดลองที่ไม่ได้หุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์พบว่ามีการดูดกลืนแสงไม่ค่อยแตกต่างกัน โดยการบ่มปฏิกิริยาในที่มืดจะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 0.103 ที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร ในขณะที่เมื่อบ่มปฏิกิริยาในที่มืดโดยหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์จะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 0.076 ที่ความยาวคลื่น 552 นาโนเมตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ 1 ซึ่งเป็นชุดควบคุมน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 และชุดควบคุมที่ 2 ซึ่งเป็นชุดควบคุมความเข้มข้นของสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  ที่จะไม่พบการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 500-550 นาโนเมตร ดังแสดงในกราฟที่ 4.3

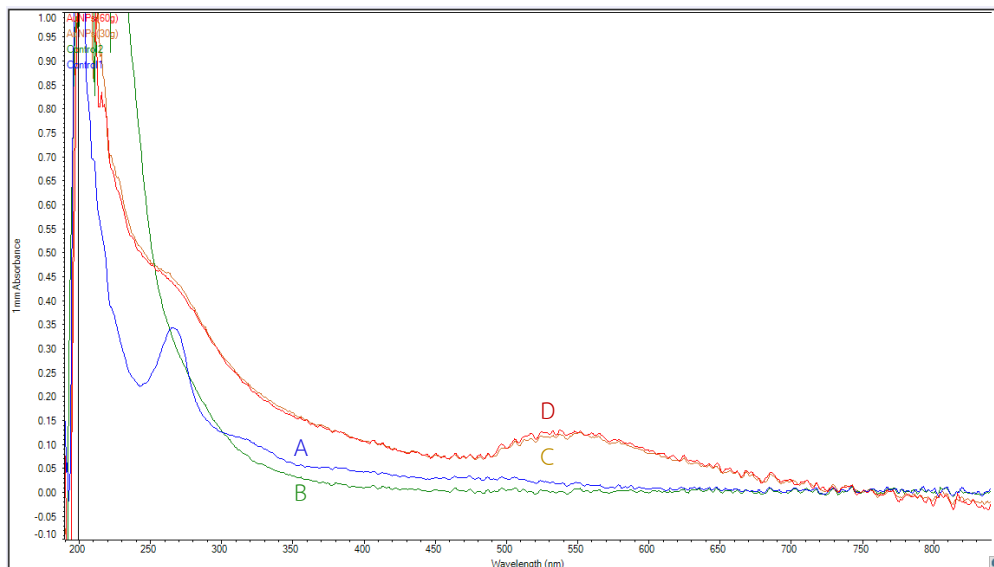




**กราฟที่ 4.3** การดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในสารละลาย acetate buffer pH 4.70 (A) ชุดควบคุมที่ 1 น้ำเลี้ยงเชื้อรา (B) ชุดควบคุมที่ 2 สารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  (C) ชุดการทดลองน้ำเลี้ยงเชื้อราผสมสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  เมื่อบ่มปฏิกิริยาในที่มืดและ (D) เมื่อบ่มปฏิกิริยาในที่มืด

### 3) ปริมาณของชีวมวลเชื้อรา

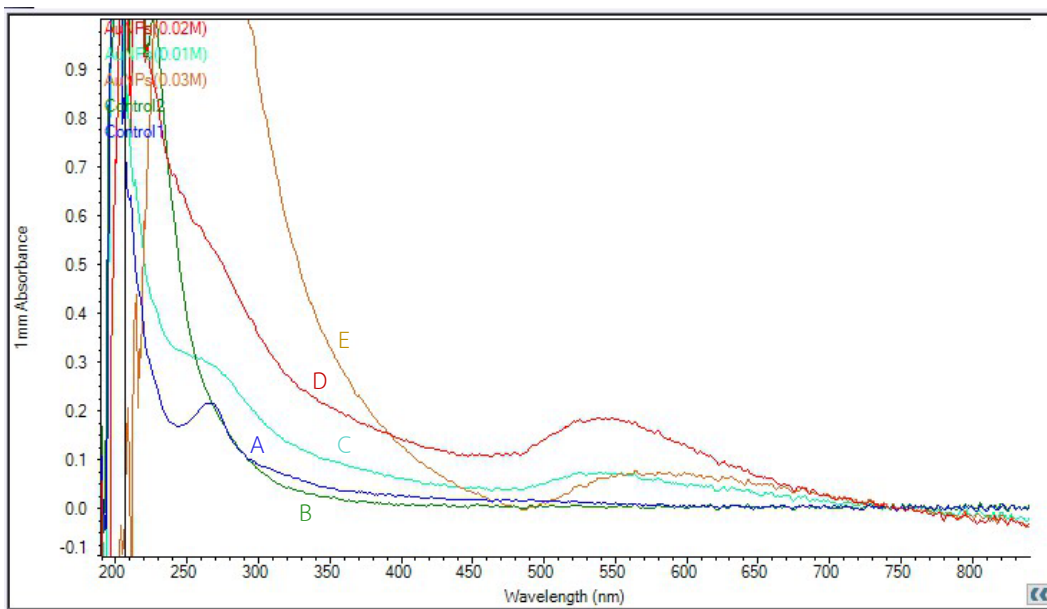
จากการศึกษาผลของปริมาณชีวมวลเชื้อราในขั้นตอนที่ 3.2.3 เมื่อนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (NanoDrop2000) พบว่าชุดการทดลองที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ได้จากชีวมวลเชื้อราปริมาณ 30 กรัมและ 60 กรัม เมื่อถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  ในสารละลาย acetate buffer pH 4.70 จะมีค่าการดูดกลืนแสงไม่แตกต่างกัน โดยมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 0.135 ที่ความยาวคลื่น 534 นาโนเมตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ 1 ซึ่งเป็นชุดควบคุมน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 และชุดควบคุมที่ 2 ซึ่งเป็นชุดควบคุมความเข้มข้นของสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  ที่จะไม่พบการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 500-550 นาโนเมตร ดังแสดงในกราฟที่ 4.4



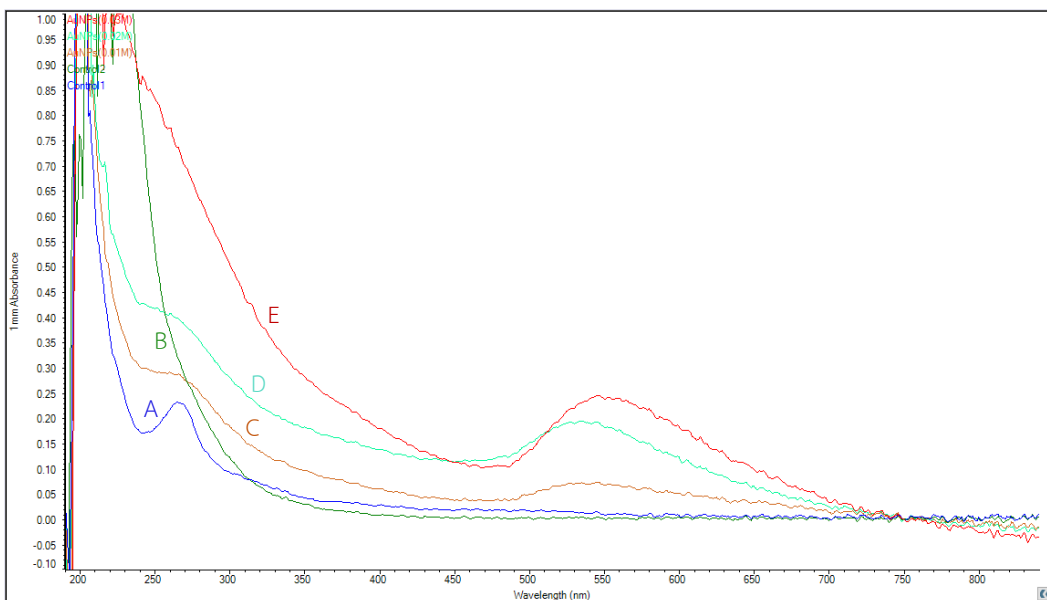
กราฟที่ 4.4 การดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในสารละลาย acetate buffer pH 4.70 (A) ชุดควบคุมที่ 1 น้ำเลี้ยงเชื้อรา (B) ชุดควบคุมที่ 2 สารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  (C) ชุดการทดลองน้ำเลี้ยงเชื้อราผสมสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  เมื่อใช้ปริมาณชีวมวลเชื้อรา 30 กรัม และ (D) 60 กรัม

#### 4) ความเข้มข้นของกรดเตตระคลอโรอริก ( $\text{HAuCl}_4$ )

จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในขั้นตอนที่ 3.2.4 เมื่อนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (NanoDrop2000) พบว่าชุดการทดลองที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  ในสารละลาย acetate buffer pH 4.70 จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 0.141 ที่ความยาวคลื่น 545 นาโนเมตร ในขณะที่ชุดการทดลองที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ถูกเติมด้วยสารละลาย 0.01 M  $\text{HAuCl}_4$  และ 0.03 M  $\text{HAuCl}_4$  ให้ค่าการดูดกลืนแสงไม่แตกต่างกัน โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่าสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  ดังแสดงในกราฟที่ 4.5 แต่เมื่อบ่มปฏิกิริยาทิ้งไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงใหม่อีกครั้งจะพบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลาย 0.03 M  $\text{HAuCl}_4$  จะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 0.247 ที่ความยาวคลื่น 546 นาโนเมตร ในขณะที่ความเข้มข้นของสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  จะให้ค่าการดูดกลืนแสงรองลงมาและความเข้มข้นของสารละลาย 0.01 M  $\text{HAuCl}_4$  จะให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุด ดังแสดงในกราฟที่ 4.6



กราฟที่ 4.5 การดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในสารละลาย acetate buffer pH 4.70 (A) ชุดควบคุมที่ 1 น้ำเลี้ยงเชื้อรา (B) ชุดควบคุมที่ 2 สารละลาย HAuCl<sub>4</sub> (C) ชุดการทดลองน้ำเลี้ยงเชื้อราผสมสารละลาย HAuCl<sub>4</sub> เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลาย 0.01 M HAuCl<sub>4</sub> (D) 0.02 M HAuCl<sub>4</sub> และ (E) 0.03 M HAuCl<sub>4</sub>

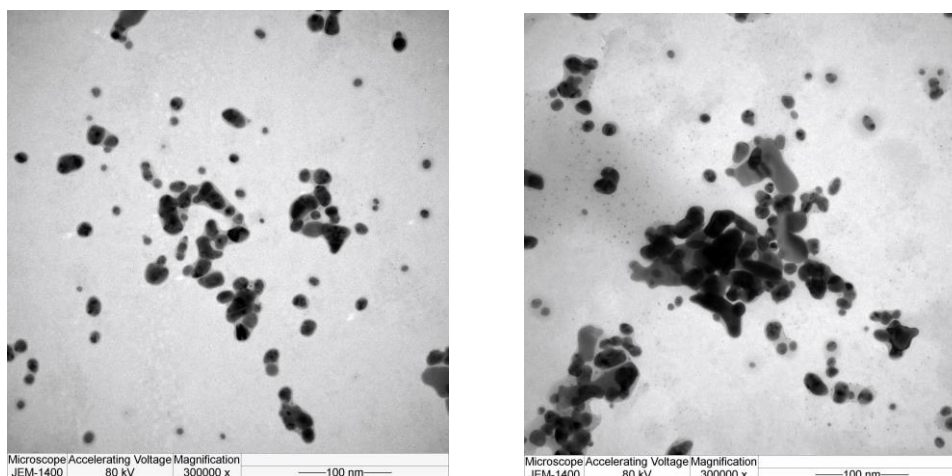


กราฟที่ 4.6 การดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในสารละลาย acetate buffer pH 4.70 เมื่อบ่มปฏิกิริยาเป็นระยะเวลา 1 เดือน (A) ชุดควบคุมที่ 1 น้ำเลี้ยงเชื้อรา (B) ชุดควบคุมที่

2 สารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  (C) ชุดการทดลองน้ำเลี้ยงเชื้อราผสมสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลาย 0.01 M  $\text{HAuCl}_4$  (D) 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  และ (E) 0.03 M  $\text{HAuCl}_4$

#### 4.5 การวิเคราะห์ลักษณะ รูปร่าง และการกระจายตัวของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

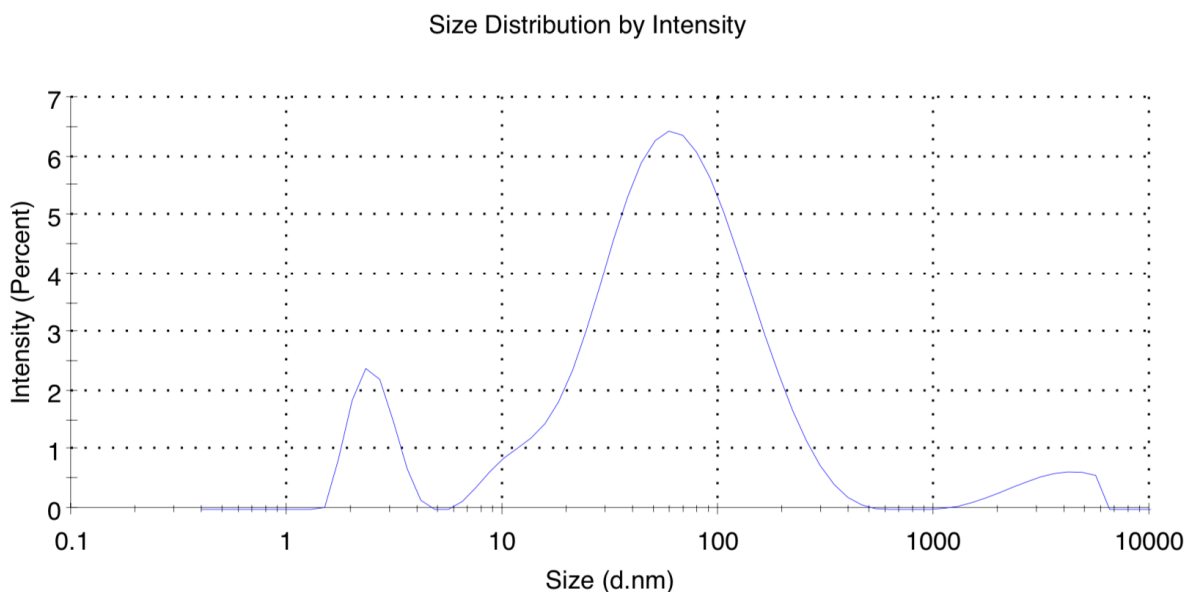
จากการวิเคราะห์ลักษณะ รูปร่าง และการกระจายตัวของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  ในสารละลาย acetate buffer pH 4.70 เมื่อนำมาส่องด้วยกล้อง TEM พบว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จะมีการกระจายตัวแบบโพลีดีสเพอร์ส (polydisperse) กล่าวคืออนุภาคทองคำนาโนจะมีการเกาะกลุ่มกันด้วยรูปร่างที่แตกต่างกัน เช่น ทรงกลม สามเหลี่ยม หกเหลี่ยม และมีรูปร่างไม่แน่นอน ดังแสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 ภาพจาก TEM ของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  ในสารละลาย acetate buffer pH 4.70

#### 4.6 การวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี dynamic light scattering (DLS)

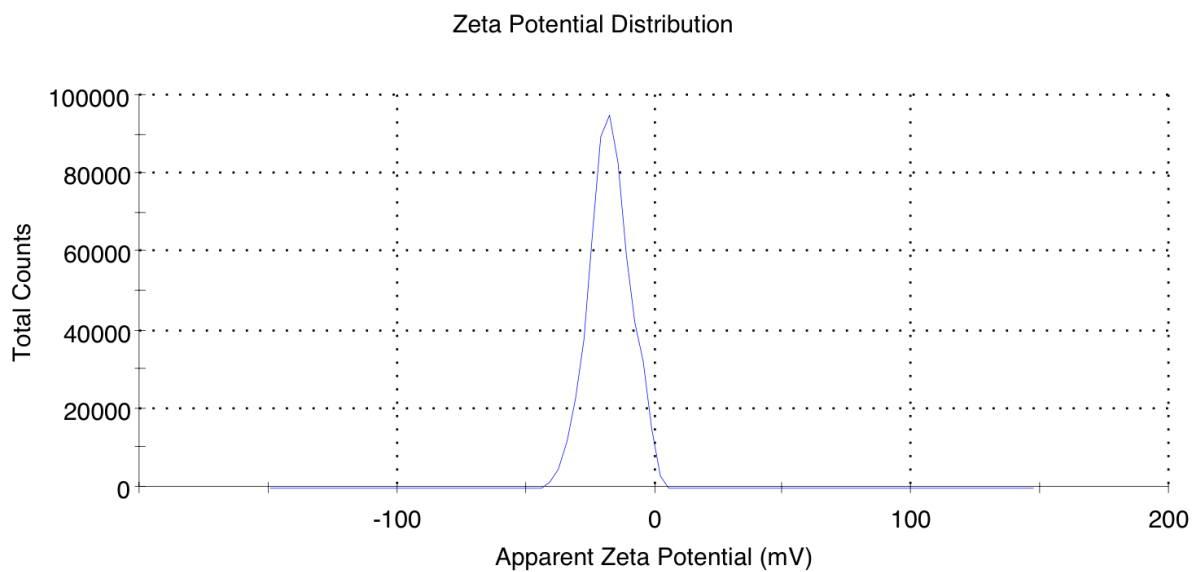
จากการวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  ในสารละลาย acetate buffer pH 4.70 เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย DLS ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้วัดขนาดของอนุภาคที่แขวนลอยและเคลื่อนที่อยู๋ภายในตัวกลางที่เป็นของเหลวโดยใช้แสงเลเซอร์ พบว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ส่วนใหญ่จะมีขนาดอยู่ในช่วง 10-300 นาโนเมตร ดังแสดงในกราฟที่ 4.7 โดยมีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 35.37 นาโนเมตรและมีค่า polydispersity index (PDI) เท่ากับ 0.655



กราฟที่ 4.7 กราฟการกระจายตัวของขนาดอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M HAuCl<sub>4</sub> ในสารละลาย acetate buffer pH 4.70

#### 4.7 การวิเคราะห์ความเสถียรของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี zeta potential

จากการวิเคราะห์ความเสถียรของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M HAuCl<sub>4</sub> ในสารละลาย acetate buffer pH 4.70 เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย zeta potential ซึ่งเป็นการวัดค่าความแตกต่างของประจุไฟฟ้าระหว่างชั้นความหนาแน่นของไอออนที่อยู่รอบๆ อนุภาคทองคำนาโนและประจุในของเหลวที่อยู่ล้อมรอบอนุภาคทองคำนาโน (มีหน่วยเป็นมิลลิโวลต์) โดยปกติแล้วอนุภาคทองคำนาโนจะมีความเสถียรเมื่อศักย์ซีต้ามีค่าเป็นบวกมากกว่า +20 มิลลิโวลต์หรือเป็นลบมากกว่า -20 มิลลิโวลต์ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ด้วย zeta potential พบว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จะมีค่าศักย์ซีต้าเท่ากับ -17.5 มิลลิโวลต์ ดังแสดงในกราฟที่ 4.8 ซึ่งสามารถแปลผลได้ว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีความเสถียรน้อย โดยศักย์ซีต้าที่อยู่ระหว่าง -15 มิลลิโวลต์และ +15 มิลลิโวลต์มักจะแสดงการรวมตัวของอนุภาคทองคำนาโน



กราฟที่ 4.8 กราฟการกระจายตัวศักย์ซีต้าของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M HAuCl<sub>4</sub> ในสารละลาย acetate buffer pH 4.70

## บทที่ 5

### สรุป วิเคราะห์ผลการทดลอง และแผนการทดลองในอนาคต

ในโครงการวิจัยนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับวิธีการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์หรือเมทาบอลไลต์ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ได้ โดยในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่เกิดจากปฏิกิริยารีดักชันระหว่างเอนไซม์หรือเมทาบอลไลต์ที่เชื้อราสร้างขึ้นแล้วหลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อรา (fungal filtrate) กับสารละลายกรดเตตระคลอโรอริก ( $\text{HAuCl}_4$ ) เพื่อให้เกิดการรีดิวซ์ไอออนของทอง ( $\text{Au}^{3+}$ ) ให้กลายเป็นอนุภาคทองคำนาโน ( $\text{Au}^0$ , AuNP) และได้ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ปัจจัยต่างๆที่แตกต่างกันไม่ว่าจะเป็นความเป็นกรด-ด่าง (pH) แสง ปริมาณชีวมวลเชื้อรา (fungal biomass) และความเข้มข้นของ  $\text{HAuCl}_4$  ล้วนส่งผลต่อขนาด รูปร่าง และการกระจายตัวของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ ดังนั้นการควบคุมการสังเคราะห์และความเสถียรของอนุภาคทองคำนาโนจึงมีความสำคัญมาก โดยจากผลการทดลองพบว่าในงานวิจัยนี้สามารถสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนได้โดยสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ผสมอยู่กับสารละลาย acetate buffer pH 4.70 เมื่อถูกเติมด้วยสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  พบว่าสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงและเมื่อระยะเวลาผ่านไปสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้ม และจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry ที่ช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 200-800 นาโนเมตร ซึ่งเป็นวิธีพื้นฐานเพื่อยืนยันการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในเบื้องต้นได้โดยอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จะมีค่าการดูดกลืนแสงจำเพาะอยู่ระหว่างช่วงความยาวคลื่น 530-570 นาโนเมตร ซึ่งเกิดจากอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีปรากฏการณ์เชิงแสงที่เรียกว่า surface plasmon resonance (SPR) จึงเป็นเหตุให้คุณสมบัติการดูดกลืนแสงของสารละลายเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเกิดการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนขึ้นภายในสารละลาย (El-Brolossy et al., 2008)

จากการศึกษาปัจจัยต่างๆที่อาจส่งผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพพบว่า pH ของสารละลายมีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน โดยการเปลี่ยนสีของน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ผสมอยู่กับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างกันเมื่อถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  จะให้การเปลี่ยนสีของสารละลายที่ต่างกันอีกทั้งยังใช้เวลาในการเปลี่ยนสีของสารละลายแตกต่างกันอีกด้วย โดยสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนเมื่อใช้สารละลาย acetate buffer ที่ pH 4.70 จะพบการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีเหลืองเป็นสีม่วงเมื่อระยะเวลาผ่านไป 55 นาที ในขณะที่เมื่อใช้สารละลาย phosphate buffer ที่ pH 6.71 จะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงจางๆเมื่อระยะเวลาผ่านไป 65 นาที ส่วนสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนเมื่อใช้สารละลาย phosphate buffer ที่ pH 2.04 และที่ pH 11.52 พบว่าสารละลายไม่มีการเปลี่ยนสี แต่เมื่อนำสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่ผสมอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH

แตกต่างกันไปวัดค่าการดูดกลืนแสงพบว่าสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนเมื่อใช้สารละลาย acetate buffer ที่ pH 4.70 จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 0.103 ที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร ในขณะที่เมื่อใช้สารละลาย phosphate buffer ที่ pH 2.04 ที่ pH 6.71 และ ที่ pH 11.52 จะไม่พบการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 500-550 นาโนเมตร เมื่อนำผลของการเปลี่ยนสีของสารละลายและการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาประกอบกันจึงสามารถสรุปได้ว่าการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนสามารถเกิดขึ้นได้เมื่อใช้สารละลาย acetate buffer pH 4.70 ที่ผลการทดลองเป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากมีรายงานว่าเชื้อรา *A. niger* มี pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 4-6.5 (Passamani et al., 2014) ซึ่งในที่นี้ pH 4.70 อาจเป็น pH ที่เหมาะสมที่ทำให้โปรตีน เอนไซม์ หรือเมทาบอลิต์ต่างๆที่ราผลิตและหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ได้มีความเสถียรจึงทำให้มีการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนได้เมื่อเทียบกับ pH อื่นๆที่ไม่มีการสังเคราะห์ นอกจากนี้ความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนที่แตกต่างกันจะนำไปสู่ความแตกต่างในขนาดและรูปร่างของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ โดยมีการรายงานว่า การสังเคราะห์อนุภาคขนาดใหญ่จะเกิดขึ้นที่ pH ที่ต่ำมากกว่า pH ที่สูง (Pal et al., 2019) จะเห็นได้ว่า pH เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพซึ่งจะมีผลต่อขนาดและรูปร่างของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ ดังนั้นจึงควรทำการทดลองซ้ำโดยพิจารณาช่วง pH ที่เป็นช่วงกว้างก่อนแล้วค่อยพิจารณาช่วงที่แคบลงจะทำให้ได้ช่วง pH ที่เหมาะสม

อีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพคือความเข้มข้นของสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  (Qu et al., 2017) พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลาย 0.01 M  $\text{HAuCl}_4$  สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงเมื่อระยะเวลาผ่านไป 10 นาที ในขณะที่เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงเมื่อระยะเวลาผ่านไป 30 นาที และเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลาย 0.03 M  $\text{HAuCl}_4$  สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงเมื่อระยะเวลาผ่านไป 55 นาที เมื่อนำสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่ความเข้มข้นของสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  แตกต่างกันไปวัดค่าการดูดกลืนแสงพบว่าสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  จะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 0.141 ที่ความยาวคลื่น 545 นาโนเมตร ในขณะที่เมื่อใช้สารละลาย 0.01 M  $\text{HAuCl}_4$  และ 0.03 M  $\text{HAuCl}_4$  จะให้ค่าการดูดกลืนแสงไม่แตกต่างกันโดยจะให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่าสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  แต่เมื่อบ่มปฏิกิริยาทิ้งไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงใหม่อีกครั้งจะพบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลาย 0.03 M  $\text{HAuCl}_4$  จะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 0.247 ที่ความยาวคลื่น 546 นาโนเมตร ในขณะที่ความเข้มข้นของสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  จะให้ค่าการดูดกลืนแสงรองลงมาและความเข้มข้นของสารละลาย 0.01 M  $\text{HAuCl}_4$  จะให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุด ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกันสามารถบอกได้ว่าปริมาณของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้แตกต่างกัน จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  ทุกความเข้มข้นสามารถสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนได้ แต่การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนจะเกิดขึ้นได้ต่ำเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลาย 0.01 M  $\text{HAuCl}_4$  ที่ผล



การทดลองเป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากที่ความเข้มข้นของสารละลาย  $0.01 \text{ M HAuCl}_4$  เป็นความเข้มข้นที่มีปริมาณไอออนทองคำเกินไปถึงทำให้การเกิดปฏิกิริยารีดักชันเกิดขึ้นได้น้อย ในขณะที่เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของสารละลาย  $0.03 \text{ M HAuCl}_4$  จะพบว่าเมื่อบ่มปฏิกิริยาทิ้งไว้เป็นระยะเวลานาน 1 เดือนจะทำให้เกิดการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในปริมาณมากขึ้นโดยสังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารละลาย  $0.03 \text{ M HAuCl}_4$  อาจมีความเข้มข้นของไอออนทองคำที่สูงเกินกว่าความสามารถของโปรตีนหรือเมทาบอลไลท์ที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อราจะควบคุมอัตราการเกิดปฏิกิริยารีดักชันได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นปฏิกิริยาจึงเกิดขึ้นได้ช้าและต้องใช้เวลาในการสังเคราะห์นานทำให้อะตอมที่เกิดขึ้นรวมตัวกันจับเป็นก้อนขนาดใหญ่ส่งผลให้อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีขนาดใหญ่และตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดทดลอง แต่เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของสารละลาย  $0.02 \text{ M HAuCl}_4$  จะพบว่าเมื่ออัตราการเกิดปฏิกิริยารีดักชันที่เหมาะสมที่ความสามารถของโปรตีนหรือเมทาบอลไลท์ที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อราจะควบคุมได้เมื่อเทียบกับอีกสองความเข้มข้นที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญที่ส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ ขนาด รูปร่าง รวมถึงปริมาณของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้

เมื่อพิจารณาปริมาณของชีวมวล (Qu et al., 2017) ซึ่งเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพ เชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ 30 กรัม และ 60 กรัม พบว่าเมื่อใช้ปริมาณชีวมวลเชื้อรา 60 กรัม สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงเมื่อระยะเวลาผ่านไป 10 นาที ในขณะที่เมื่อใช้ปริมาณชีวมวลเชื้อรา 30 กรัม สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงเมื่อระยะเวลาผ่านไป 15 นาที และเมื่อนำสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนเมื่อใช้ปริมาณชีวมวลเชื้อรา 30 กรัม และ 60 กรัม จะให้ค่าการดูดกลืนแสงไม่แตกต่างกัน โดยมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 0.135 ที่ความยาวคลื่น 534 นาโนเมตร ที่ผลการทดลองเป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อปริมาณชีวมวลเชื้อราเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้เอนไซม์หรือเมทาบอลไลท์ที่เชื้อราสร้างขึ้นแล้วหลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อราซึ่งเป็นตัวรีดิวซ์ไอออนทองคำมีปริมาณมากขึ้น ดังนั้นอัตราการเกิดปฏิกิริยารีดักชันจึงเกิดขึ้นได้เร็ว ในทางตรงกันข้ามเมื่อความเข้มข้นของตัวรีดิวซ์น้อยจะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาช้า และเมื่อใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยานานอะตอมที่เกิดขึ้นจะรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่ทำให้อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีขนาดใหญ่ แต่เนื่องจากในงานวิจัยนี้ปริมาณของชีวมวลเชื้อราที่เลือกมาทำการทดลองอาจไม่ค่อยแตกต่างกันมากนักจึงทำให้ผลของการเปลี่ยนสีและการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าไม่แตกต่างกัน ดังนั้นอาจจะต้องทำการทดลองใหม่โดยพิจารณาปริมาณชีวมวลเชื้อราที่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนเพื่อที่จะได้สรุปผลการทดลองได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

นอกจาก pH ความเข้มข้นของสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  และปริมาณของชีวมวลแล้ว แสงเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ต้องพิจารณาเนื่องจากสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  มีความไวต่อแสงซึ่งจะส่งผลต่อความเสถียรและความไวในการเกิดปฏิกิริยา (Thermo Fisher Scientific, 2018) โดยมีสมมติฐานคือสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  จะเสถียรภาพเมื่อสัมผัส

กับแสงซึ่งถ้าสารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  เสื่อมสภาพจะส่งผลให้การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนไม่สามารถเกิดขึ้นได้ เนื่องจากไม่มีสารตั้งต้นเพื่อให้เกิดการรีดิวซ์ไอออนทอง ( $\text{Au}^{3+}$ ) ให้กลายเป็นอนุภาคทองคำนาโน ( $\text{Au}^0$ , AuNP) นอกจากนี้มีงานวิจัยที่ได้ออกมาว่าการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนสามารถเกิดขึ้นได้โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชันด้วยแสง (Photoreduction) (Dong et al., 2007) จากการนำหลอดทดลองที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ผสมอยู่กับสารละลาย acetate buffer pH 4.70 แล้วถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  ไปบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในที่มืดโดยหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เปรียบเทียบกับหลอดทดลองที่ไม่ได้หุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ พบว่าการเปลี่ยนสีของสารละลายเมื่อบ่มปฏิกิริยาในที่มืดและที่มีแสงให้การเปลี่ยนสีของสารละลายไม่แตกต่างกันแสดงว่าแสงจากอุณหภูมิห้องไม่ได้ส่งผลให้สารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  เสื่อมสภาพ โดยสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงเมื่อระยะเวลาผ่านไป 55 นาที และเมื่อนำสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงพบว่าสารละลายทั้งสองให้ค่าการดูดกลืนแสงแทบจะแตกต่างกัน โดยการบ่มปฏิกิริยาในที่มืดจะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 0.103 ที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร ในขณะที่เมื่อบ่มปฏิกิริยาในที่มืดโดยหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์จะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด 0.076 ที่ความยาวคลื่น 552 นาโนเมตร ที่ผลการทดลองเป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องโดยการเปรียบเทียบระหว่างหลอดทดลองที่หุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์กับหลอดทดลองที่ไม่ได้หุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์อาจจะทำให้ความเข้มแสงที่ได้ไม่แตกต่างกันมากพอที่จะเห็นความแตกต่างได้ ดังนั้นอาจจะต้องทำการทดลองใหม่โดยพิจารณาความเข้มแสงที่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนเพื่อที่จะได้สรุปผลการทดลองได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

จากการวิเคราะห์ลักษณะ รูปร่าง และการกระจายตัวของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 ที่ผสมอยู่กับสารละลาย acetate buffer pH 4.70 แล้วถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  เมื่อนำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) พบว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้จะมีการกระจายตัวแบบโพลีดีสเพอร์ส (polydisperse) กล่าวคืออนุภาคทองคำนาโนมีการเกาะกลุ่มกันด้วยรูปร่างที่แตกต่างกัน เช่น ทรงกลม สามเหลี่ยม หกเหลี่ยม และมีรูปร่างไม่แน่นอน นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ขนาดเฉลี่ยของอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี dynamic light scattering (DLS) พบว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 35.37 นาโนเมตร นอกจากขนาดแล้วการวิเคราะห์ด้วยวิธี DLS ยังสามารถบอกการกระจายตัวของอนุภาคทองคำนาโนได้จากค่า polydispersity index (PDI) พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.655 ซึ่งสามารถบอกได้ว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีการกระจายตัวไม่สม่ำเสมอ ส่วนผลของการวิเคราะห์ด้วย zeta potential พบว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีค่าศักย์ซีต้าเท่ากับ -17.5 มิลลิโวลต์ ซึ่งเป็นค่าที่ไม่ได้อยู่ในช่วงที่เป็นบวกมากกว่า +20 มิลลิโวลต์ หรือเป็นลบมากกว่า -20 มิลลิโวลต์ (Thilagam et al., 2020) จึงสามารถสรุปได้ว่าอนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ยังไม่มีเสถียร โดยศักย์ซีต้าที่มีค่าเป็นลบน้อยกว่า -15 มิลลิโวลต์หรือเป็นบวกน้อยกว่า +15 มิลลิโวลต์ มักจะหมายถึงจุดเริ่มต้นของการรวมตัวของอนุภาคทองคำนาโน ทั้งนี้ในงานวิจัยนี้ได้นำเฉพาะสารละลายที่สังเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A.*

*niger* MSCU 0361 ที่ผสมอยู่กับสารละลาย acetate buffer pH 4.70 แล้วถูกเติมด้วยสารละลาย 0.02 M  $\text{HAuCl}_4$  มาวิเคราะห์ด้วย TEM DLS และ zeta potential แต่ไม่ได้นำสารละลายที่สังเคราะห์ได้จากสภาวะอื่นๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้นมาวิเคราะห์ด้วย จึงไม่สามารถบอกได้ว่าที่สภาวะใดให้การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่มีขนาด รูปร่าง และการกระจายตัวที่ดีเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้งานต่อไป ซึ่งอนุภาคทองคำนาโนที่ดีควรมีขนาดเฉลี่ยเท่าๆกันและควรมีรูปร่างเป็นแบบเดียวกันเพื่อที่จะได้นำไปใช้งานต่อได้ง่าย โดยถ้าสามารถสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่เป็นทรงกลมได้จะยิ่งดี เนื่องจากทรงกลมจะมีพื้นที่ผิวมากกว่ารูปร่างอื่นๆ ทำให้เมื่อนำอนุภาคทองคำนาโนไปใช้ร่วมกับสารอื่นในการช่วยเร่งปฏิกิริยาต่างๆทำได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้ควรมีการกระจายตัวแบบสม่ำเสมอ

จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 มีความสามารถในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนโดยการผลิตโปรตีนหรือเมทาบอลไลต์ต่างๆที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ได้ เพื่อทำให้เกิดการรีดิวซ์ไอออนของทอง ( $\text{Au}^{3+}$ ) ให้กลายเป็นอนุภาคทองคำนาโน ( $\text{Au}^0$ , AuNP) โดยใช้สารละลาย  $\text{HAuCl}_4$  เป็นสารตั้งต้นที่จะให้ไอออนของทอง ( $\text{Au}^{3+}$ ) ซึ่งการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนแบบนี้จัดเป็นการสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางชีวภาพ ซึ่งปัญหาของการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพคือยังไม่สามารถควบคุมขนาด รูปร่าง และการกระจายตัวของอนุภาคทองคำนาโนให้เป็นไปตามที่ต้องการได้ โดยอนุภาคทองคำนาโนที่ได้จากการสังเคราะห์ในสภาวะทดลองที่แตกต่างกันจะให้อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีปริมาณ ขนาด รูปร่าง การกระจายตัวและคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก pH แสง ปริมาณชีวมวลเชื้อรา และความเข้มข้นของ  $\text{HAuCl}_4$  ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามเนื่องจากในปัจจุบันยังไม่ทราบถึงกลไกที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนที่แน่ชัดจึงอาจจะมีปัจจัยอื่นนอกเหนือจากที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาและทดลองซ้ำหรือทดลองเพิ่มเติมเพื่อให้ได้เงื่อนไขการสังเคราะห์ที่เหมาะสมที่สุด และเนื่องจากในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาถึงปัจจัยต่างๆที่อาจส่งผลกระทบต่อ การสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนโดยศึกษาที่ละปัจจัยเนื่องจากง่ายต่อการศึกษาโดยเฉพาะการสังเคราะห์ที่ใช้วิธีการทางชีวภาพซึ่งมีความซับซ้อน แต่ข้อเสียของการศึกษาที่ละปัจจัยคือเมื่อทำการทดลองจริงแล้วอาจจะมีปัจจัยหลายๆปัจจัยที่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกันซึ่งอาจจะทำให้ผลการทดลองที่ได้ไม่เป็นไปในแบบที่คาดการณ์ไว้ ซึ่งข้อเสนอแนะคืออาจจะสร้างแบบจำลองเพื่อศึกษาหลายปัจจัยร่วมกันโดยใช้คณิตศาสตร์ในการคำนวณแล้วค่อยทำการทดลองจริงก็จะช่วยลดความผิดพลาดจากวิธีการศึกษาที่ละปัจจัยได้ และเนื่องจากในงานวิจัยนี้ยังไม่ทราบว่าเชื้อรา *A. niger* MSCU 0361 สามารถผลิตโปรตีนหรือเมทาบอลไลต์ที่สามารถหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ได้บ้าง ดังนั้นจึงควรนำน้ำเลี้ยงเชื้อราไปวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งเป็นเทคนิคการแยกองค์ประกอบของสารผสมโดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของแต่ละองค์ประกอบของสารผสมบนเฟสคงที่ (stationary phase) ภายใต้การพาของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) นอกจากนี้ควรนำสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนไปวิเคราะห์ด้วย Fourier Transform Infrared

Spectroscopy (FTIR) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารโดยการวัดการดูดกลืนแสงของสารในช่วง Infrared (IR) ซึ่งสามารถระบุหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโนที่เกิดขึ้นได้เพื่อตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโน และควรนำสารละลายที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนในสถานะทดลองที่แตกต่างกันไปวิเคราะห์ด้วย TEM DLS และ zeta potential จะทำให้สามารถบอกได้ว่าปัจจัยใดที่มีผลต่อการสังเคราะห์อนุภาคทองคำนาโนและทำให้อนุภาคทองคำนาโนที่สังเคราะห์ได้มีขนาด รูปร่าง และการกระจายตัวเหมาะสมที่สุด

## เอกสารอ้างอิง

### หนังสือ

El-Sheikh, D. T. M. a. E. G. a. D. H. H. (2016). Mycology OMICS Group eBooks.

Pal, G., Rai, P., & Pandey, A. (2019). Chapter 1 - Green synthesis of nanoparticles: A greener approach for a cleaner future. In: Shukla, A. K., & Iravani, S. (editors). Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles. Micro and Nano Technologies. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-08-102579-6.00001-0

Silva, L. P., Bonatto, C. C., & Polez, V. L. P. (2016). Green Synthesis of Metal Nanoparticles by Fungi: Current Trends and Challenges. In: Prasad, R. (editor) Advances and Applications Through Fungal Nanobiotechnology. Fungal Biology. Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-319-42990-8\_4

### เว็บไซต์

Alchetron (2020). *Aspergillus niger*. Retrieved April 9, 2021. From

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

Thermo Fisher Scientific (2018). *Safety data sheet*. Retrieved May 13, 2021. From

<https://www.fishersci.com/store/msds?partNumber=AC411070250&productDescription=HYDROGEN+TETRACHLOROAURO+25GR&vendorId=VN00032119&countryCode=US&language=en>

### งานวิจัย

Abarca, M. L., Accensi, F., Cano, J., & Cabañes, F.J. (2004). Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86, 33-49.

Ahmed, S., Annu, Ikram, S., & Yudha, S. S. (2016). Biosynthesis of gold nanoparticles: A green approach. *J Photochem Photobiol B*, 161, 141-153. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.04.034

Alaqad, K., & Saleh, T.A. (2016). Gold and Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Characterization Routes and Applications towards Drugs. *J Environ Anal Toxicol*, 6(4), 1-10. doi:10.4172/2161-0525.1000384

- Daraee, H., Eatemadi, A., Abbasi, E., Aval, S. F., Kouhi, M., & Akbarzadeh, A. (2016). Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, *44*, 410-422. doi:10.3109/21691401.2014.955107
- Dong, S. A., & Zhou, S. P. Photochemical synthesis of colloidal gold nanoparticles. (2017). *Mater Sci Eng B*, *140*, 153-159. doi:10.1016/j.mseb.2007.03.020
- 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. *Eur Phys J Special Topics*, *153*, 361-364. doi:10.1140/epjst/e2008-00462-0
- Giljohann, D. A., Seferos, D. S., Daniel, W. L., Massich, M. D., Patel, P. C., & Mirkin, C. A. (2010). Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angew Chem Int Ed*, *49*, 3280-3294. doi:10.1002/anie.200904359
- McComb, R. B., Bond, L. W., Burnett, R. W., Keech, R. C., & Bowers, G. N. (1976). Determination of the molar absorptivity of NADH. *Clin Chem*, *22*(2), 141-150. doi:10.1093/clinchem/22.2.141
- McNeil, S. E. (2005). Nanotechnology for the biologist. *J Leukocyte Biol*, *78*, 585-594. doi:10.1189/jlb.0205074
- Molnár, Z., Bódai, V., Szakacs, G., Erdélyi, B., Fogarassy, Z., Sáfrán, G., Varga, T., Kónya, Z., Tóth-Szeles, E., Szűcs R., & Lagzi, I. (2018). Green synthesis of gold nanoparticles by thermophilic filamentous fungi. *Sci Rep*, *8*, 3943. DOI:10.1038/s41598-018-22112-3
- Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Ahmad, A., Khan, M. I., Kumar, R., & Sastry, M. (2002). Extracellular Synthesis of Gold Nanoparticles by the Fungus *Fusarium oxysporum*. *ChemBioChem*, *3*(5), 461-463. doi: 10.1002/1439-7633(20020503)3:5<461::AID-CBIC461>3.0.CO;2-X
- Nadhe, S. B., Wadhvani, S. A., Singh, R., & Chopade, B. A. (2020). Green Synthesis of AuNPs by *Acinetobacter* sp. GWRVA25: Optimization, Characterization, and Its Antioxidant Activity. *Front Chem*, *8*, 474. doi:10.3389/fchem.2020.00474

- Passamani, F. R. F., Hernandes, T., Lopes, N. A., Bastos, S. C., Santiago, W. D., Cardoso, M. D. G., Batista, L. R. (2014). Effect of Temperature, Water Activity, and pH on Growth and Production of Ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian Grapes. *J Food Prot*, 77(11), 1947-1952. doi:10.4315/0362-028X.JFP-13-495
- Patra, J. K., & Baek, K. H. (2014). Green Nanobiotechnology: Factors Affecting Synthesis and Characterization Techniques. *J Nanomater*, 1-12. doi:10.1155/2014/417305
- 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*, 88, 133-141. doi:10.1016/j.physe.2017.01.010
- Qu, Y., Shen, W., Pei, X., Ma, F., You, S., Li, S., Wang, J., & Zhou, J. (2017). Biosynthesis of gold nanoparticles by *Trichoderma* sp. WL-Go for azo dyes decolorization. *J Environ Sci*, 56, 79-86. doi:10.1016/j.jes.2016.09.007
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C., & van Dijck, P. W. M. (2002). On the safety of *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59, 426-435. doi:10.1007/s00253-002-1032-6
- Shedbalkar, U., Singh, R., Wadhvani, S., Gaidhani, S., & Chopade, B. A. (2014). Microbial synthesis of gold nanoparticles: Current status and future prospects. *Adv Colloid Interface Sci*, 209, 40-48. doi:10.1016/j.cis.2013.12.011
- Souza, C. D. D., Nogueira, B. R., & Rostelato, M. E. C. M. (2019). Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction. *J Alloys Compd*, 798, 714-740. doi:10.1016/j.jallcom.2019.05.153
- 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

## ภาคผนวก



## ภาคผนวก ก

### สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1. อาหารเลี้ยงเชื้อราเหลว Potato dextrose broth (PDB)

ผงอาหารสำเร็จรูป Potato dextrose 24 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 2. อาหารเลี้ยงเชื้อราแข็ง Potato dextrose agar (PDA)

ผงอาหารสำเร็จรูป Potato dextrose 12 กรัม

ผงวุ้น 10 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาเทในจานอาหารเพาะเชื้อ

## ภาคผนวก ข

### วิธีการเตรียมสารเคมี

#### 1. 0.01 M Chloroauric acid solution 5 มิลลิลิตร

Gold (III) chloride 0.017 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อไม่ให้สารละลายโดนแสง จากนั้นนำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 2. 0.02 M Chloroauric acid solution 5 มิลลิลิตร

Gold (III) chloride 0.034 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อไม่ให้สารละลายโดนแสง จากนั้นนำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 3. 0.03 M Chloroauric acid solution 5 มิลลิลิตร

Gold (III) chloride 0.051 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อไม่ให้สารละลายโดนแสง จากนั้นนำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 4. Acetate buffer (pH 4.70) 1 ลิตร

Distilled water 800 มิลลิลิตร

Sodium acetate trihydrate 6.80 กรัม

Acetic acid 2.87 มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วปรับ pH ด้วยเครื่องวัด pH meter ให้ได้ pH เท่ากับ 4.70 จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

### 5. Phosphate buffer (pH 2.04) 500 มิลลิลิตร

Distilled water	400 มิลลิลิตร
Phosphoric acid	1.71 มิลลิลิตร
Sodium hydrogen phosphate dihydrate	3.90 กรัม

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน และปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นวัด pH ด้วยเครื่องวัด pH meter จะได้ pH เท่ากับ 2.04

### 6. Phosphate buffer (pH 6.71) 500 มิลลิลิตร

Distilled water	400 มิลลิลิตร
Sodium hydrogen phosphate dihydrate	2.39 กรัม
Disodium hydrogen phosphate	1.37 กรัม

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน และปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นวัด pH ด้วยเครื่องวัด pH meter จะได้ pH เท่ากับ 6.71

### 7. Phosphate buffer (pH 11.52) 500 มิลลิลิตร

Distilled water	400 มิลลิลิตร
Disodium hydrogen phosphate	2.45 กรัม
Trisodium phosphate	2.95 กรัม

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน และปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นวัด pH ด้วยเครื่องวัด pH meter จะได้ pH เท่ากับ 11.52

## ภาคผนวก ค

### อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง

#### เครื่องนาโนดรอป (NanoDrop2000)

ลักษณะและองค์ประกอบของเครื่องนาโนดรอป (NanoDrop2000) ของบริษัท Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา เครื่องนาโนดรอปที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงนี้ทำการวัดที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียสตลอดการทดลอง



#### ขั้นตอนการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องนาโนดรอป (NanoDrop2000) มีดังนี้

1. คลิ๊กโปรแกรม NanoDrop2000 ที่ PC หรือ Notebook
2. เลือกวิธีการวัดเป็น UV-visible
3. ตั้งค่าพารามิเตอร์ต่างๆที่ต้องการวัด เช่น ความยาวคลื่น
4. ทำความสะอาดแท่นวัด (pedestal) ด้วยน้ำกลั่นก่อนใช้งานทุกครั้ง
5. หยดสารละลาย blank ที่แท่นวัดและคลิกที่ปุ่ม “Blank” เพื่อวัด
6. หยดสารละลาย blank ออกด้วยกระดาดเข็มและหยดตัวอย่าง (sample) ปริมาตรไม่เกิน 10 ไมโครลิตรลงบนแท่นวัด จากนั้นคลิก “Measure” เพื่อวัดค่า
7. อ่านผลการวัดที่หน้าจอคอมพิวเตอร์

#### คำแนะนำ

1. ควรทำการ Re-blank ทุก 30 นาที
2. ทำความสะอาดหัวอ่านด้วยน้ำกลั่นทุกครั้งเมื่อเปลี่ยนตัวอย่าง
3. ห้ามนำของแข็งไปจุดแท่นวัด