



โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การชักนำการหลังเอนไซม์ในเตรทรีดักเทสและผลต่อกระบวนการ
ผลิตอนุภาคนาโนเงินของเชื้อรา

ชื่อบิลิต นางสาวเมษศิริรินทร์ คนแรง รหัสประจำตัว 5932347323

ภาควิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การชักนำการหลั่งเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสและผลต่อกระบวนการผลิตอนุภาคนาโนเงินของเชื้อรา

Induction of Nitrate Reductase and Its Effect on Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Fungi

ชื่อนิสิต นางสาวเมษศิริินทร์ คนแรง **เลขประจำตัว** 5932347323

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ

การชักนำการหลั่งเอนไซม์ไนเตรดรีดักเตสและ
ผลต่อกระบวนการผลิตอนุภาคนาโนเงินของเชื้อรา
(Induction of Nitrate Reductase and Its Effect on
Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Fungi)

นิสิตในโครงการ

นางสาวเมษศิริรินทร์ คนแรง

เลขประจำตัวนิสิต 5932347323

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

อาจารย์ ดร.สรริสา ณ ป้อมเพ็ชร

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

ชื่อโครงการ: การชักนำการหลั่งเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสและผลต่อกระบวนการผลิตอนุภาคนาโนเงินของเชื้อรา

นิสิตหัวหน้าโครงการ: นางสาวเมษศิริรินทร์ คนแรง รหัสนิสิต 5932347323

อาจารย์ที่ปรึกษา: อาจารย์ ดร.สรวิสา ฦ ป้อมเพ็ชร

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

เอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส (nitrate reductase) มีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงิน (Silver nanoparticles, AgNPs) ทางชีวภาพ ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจไปที่การชักนำการหลั่งเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสและผลของการชักนำต่อกระบวนการผลิตอนุภาคนาโนเงินของเชื้อรา *Aspergillus niger* เริ่มจากการศึกษาความเหมือนกันของยีนไนเตรทรีดักเทสของ *A. niger* กับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ พบว่าไนเตรทรีดักเทสมีตำแหน่งอนุรักษ์ (conserved sequence) ที่พบได้ทั้งในเชื้อราและแบคทีเรีย โดยไนเตรทรีดักเทสของ *A. niger* มีความเหมือนกันกับไนเตรทรีดักเทสจาก *Fusarium oxysporum* มากที่สุดตามด้วย *Aspergillus clavatus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus clausii* ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ายีนที่ถอดรหัสให้เอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสในเชื้อราต่างชนิดกันมีตำแหน่งอนุรักษ์ (conserved sequence) ที่เหมือนกันมากกว่าในแบคทีเรีย การชักนำการหลั่งเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสโดยใช้สารละลายโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) สามารถตรวจสอบได้โดยวิธี enzyme assay ซึ่งผลที่ได้คือสารละลายโพแทสเซียมไนเตรทความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ สามารถชักนำการหลั่งเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสได้มากที่สุดและเมื่อตรวจสอบผลของการชักนำการหลั่งเอนไซม์ที่เกิดขึ้นต่อการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินของเชื้อราโดยวัดปริมาณอนุภาคนาโนเงินที่ผลิตได้โดยใช้เทคนิค UV-visible spectrometry พบว่าสารละลายโพแทสเซียมไนเตรทความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ สามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินได้มากที่สุดโดยอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ได้มีค่าการดูดกลืนแสง 400 นาโนเมตร จึงสรุปได้ว่าสารละลายโพแทสเซียมไนเตรทสามารถชักนำการหลั่งเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสได้และส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินที่มากขึ้นอีกด้วย

คำสำคัญ: ไนเตรทรีดักเทส, อนุภาคนาโนเงิน, วิธีการสังเคราะห์ทางชีวภาพ, *Aspergillus niger*

Project title: Induction of Nitrate Reductase and Its Effect on Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Fungi

Name of student: Miss Metsirin Khonrang Student ID: 5932347323

Project Advisor: Dr. Sarisa Na Pombejra

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

Abstract

Nitrate reductase has been reported to be involved in the biosynthesis of silver nanoparticles (AgNPs). In this study, we focused on the induction of nitrate reductase in *Aspergillus niger* that might affect the synthesis of silver nanoparticles. First, the multiple alignment analysis of nitrate reductase gene in *A. niger* with other microbes showed many conserved sequences among fungi and bacteria. Nitrate reductase of *A. niger* was the most similar to *Fusarium oxysporum*, followed by *Aspergillus clavatus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacillus clausii*, respectively. Next, we examined the effect of potassium nitrate (KNO_3) on the induction of nitrate reductase secretion by enzyme assay. The result showed that 25 mM of KNO_3 was the most effective concentration for the induction of nitrate reductase. Then the study of an effect of KNO_3 -inducing nitrate reductase on the biosynthesis of silver nanoparticles showed that 20 mM of KNO_3 was the most effective concentration for the biosynthesis of silver nanoparticles. In summary, KNO_3 could induce nitrate reductase secretion and lead to a higher level of silver nanoparticles production than the uninduced condition.

Keywords: nitrate reductase, biosynthesis, silver nanoparticles, *Aspergillus niger*

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยโครงการเสริมประสบการณ์นี้จะสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีไม่ได้ หากไม่ได้รับความช่วยเหลืออย่างดีจากอาจารย์ ดร.สรริสา ณ ป้อมเพ็ชร ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่คอยให้ความรู้ ความช่วยเหลือ คำแนะนำและความคิดเห็นต่าง ๆ พร้อมทั้งสอนวิธีการปฏิบัติ การใช้อุปกรณ์ต่าง ๆ ภายในห้องปฏิบัติการ และเป็นกำลังใจที่ดีในการทำโครงการวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนพัฒนาและปรับปรุงข้อบกพร่องต่าง ๆ ทำให้รายงานฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

ขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่มอบความรู้และคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้และต่อตัวผู้วิจัยในอนาคต

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำและช่วยอำนวยความสะดวกทั้งด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยด้วยดีตลอดระยะเวลาการศึกษาและการทำวิจัย

ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จากงบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้อนุเคราะห์เงินทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณนางสาวคณิตตา มานาดีและนายฉัตรวรเชษฐ์ แซ่โก้ว เพื่อนห้องปฏิบัติการ 1804/13 และเพื่อนนิสิตประจำห้องปฏิบัติการนี้ที่คอยให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับอุปกรณ์ รวมทั้งให้คำปรึกษาในการทำงานวิจัยและเป็นกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการ 1904/15 และเพื่อนนิสิตประจำห้องปฏิบัติการนี้ที่คอยให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนและรุ่นน้อง รวมไปถึงรุ่นพี่บัณฑิตภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคนที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอ

ขอขอบคุณศิลปินวงก็อตเซเว่น (GOT7) เอ็นซีที (NCT) วอนनावัน (WANNAONE) และยูซอนโฮ สำหรับเพลงและสื่อที่ให้ความบันเทิง ผ่อนคลายความเครียดและเป็นกำลังใจที่สำคัญตลอดระยะเวลาการศึกษา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา สมาชิกในครอบครัวและเพื่อน ๆ ทุกคนที่เป็นกำลังใจ ให้คำปรึกษา คำแนะนำต่าง ๆ และให้การสนับสนุนมาตลอดจนสำเร็จการศึกษา

นางสาวเมษศิริรินทร์ คนแรง

(Metsirin Khonrang)

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
-อนุภาคนาโนเงิน	1
-การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงิน	2
-การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินจากเชื้อรา	4
บทที่ 2 เครื่องมือ วัสดุ เคมีภัณฑ์	7
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	10
บทที่ 4 ผลการทดลอง	14
บทที่ 5 สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง	22
เอกสารอ้างอิง	
ภาษาอังกฤษ	25
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	29
ภาคผนวก ข	30
ภาคผนวก ค	32
ภาคผนวก ง	33

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินจากแบคทีเรีย เชื้อราและพืช	3
ตารางที่ 4.1 แสดงยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินของแบคทีเรียและเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ	14
ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบปริมาณความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนในยีนไนเตรรีดักเทสจาก <i>A. niger</i> กับเชื้อราต่างชนิดและแบคทีเรียโดยวิธี pairwise sequence alignment ด้วยโปรแกรม Emboss Needle	16
ตารางที่ 6.1 แสดงปริมาณการชักนำการหลั่งเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสของ <i>A. niger</i> เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับชุดควบคุมจากการทดลองครั้งที่ 1	33
ตารางที่ 6.2 แสดงปริมาณการชักนำการหลั่งเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสของ <i>A. niger</i> เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับชุดควบคุมจากการทดลองครั้งที่ 2	33
ตารางที่ 6.3 แสดงปริมาณการชักนำการหลั่งเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสของ <i>A. niger</i> เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับชุดควบคุมจากการทดลองครั้งที่ 3	34
ตารางที่ 6.4 แสดงปริมาณการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินของ <i>A. niger</i> เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับชุดควบคุมจากการทดลองครั้งที่ 1	34
ตารางที่ 6.5 แสดงปริมาณการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินของ <i>A. niger</i> เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับชุดควบคุมจากการทดลองครั้งที่ 2	35
ตารางที่ 6.6 แสดงปริมาณการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินของ <i>A. niger</i> เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับชุดควบคุมจากการทดลองครั้งที่ 3	35

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 การนำอนุภาคนาโนเงินไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ	1
รูปที่ 1.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินแบบ top down และ bottom up	2
รูปที่ 1.3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินจากเชื้อราภายในเซลล์ (intracellular synthesis) และภายนอกเซลล์ (extracellular synthesis)	5
รูปที่ 3.1 ตำแหน่งสำหรับนับจำนวนสปอร์	11
รูปที่ 4.1 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ในตระกูลดีทอกซิแคสของแบคทีเรียและเชื้อรา โดยวิธี multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega โดยกรอบสีแดงแสดงถึงลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันและกรอบสีน้ำตาลแสดงถึงลำดับกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกันอย่างมาก	15
รูปที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของ <i>A. niger</i> MSCU 0361 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	17
รูปที่ 4.3 ลักษณะ fungal filtrate ของ <i>A. niger</i> MSCU 0361 ที่เลี้ยงใน KNO_3 ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยแบ่งเป็นชุดควบคุม, 5 มิลลิโมลาร์, 10 มิลลิโมลาร์, 15 มิลลิโมลาร์, 20 มิลลิโมลาร์ และ 25 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ	18
รูปที่ 4.4 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ fungal filtrate ของ <i>A. niger</i> เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ในตระกูลดีทอกซิแคส	19
รูปที่ 4.5 กราฟแสดงปริมาณการชักนำการหลั่งเอนไซม์ในตระกูลดีทอกซิแคสของ <i>A. niger</i> เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับชุดควบคุม	19
รูปที่ 4.6 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์จาก <i>A. niger</i> เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	20
รูปที่ 4.7 กราฟแสดงปริมาณการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินของ <i>A. niger</i> เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับชุดควบคุม	21

สารบัญรูปภาพ

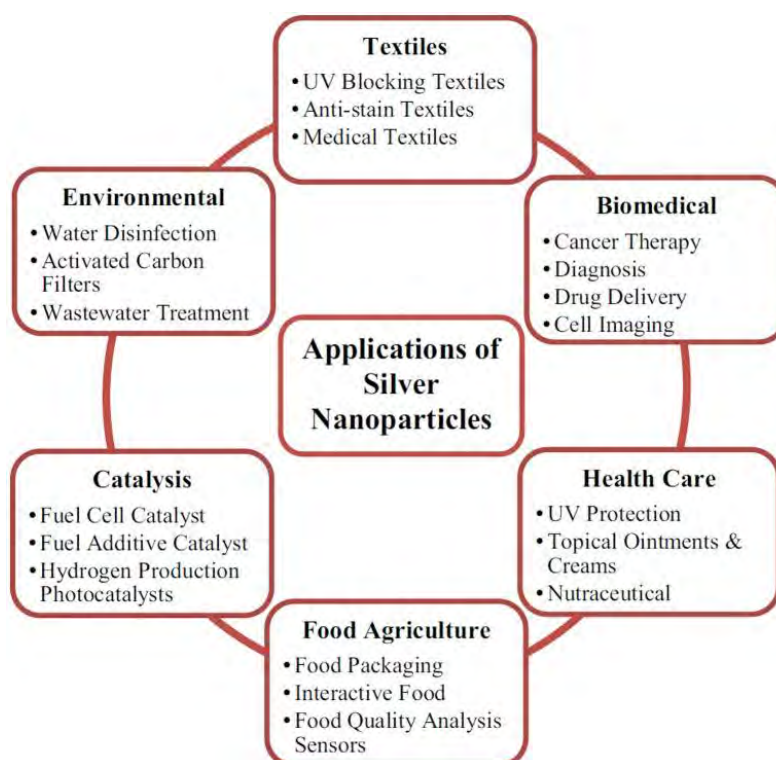
	หน้า
รูปที่ 6.1 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ fungal filtrate ของ <i>A. niger</i> เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสจากการทดลองครั้งที่ 1	36
รูปที่ 6.2 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ fungal filtrate ของ <i>A. niger</i> เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสจากการทดลองครั้งที่ 2	36
รูปที่ 6.3 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ fungal filtrate ของ <i>A. niger</i> เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสจากการทดลองครั้งที่ 3	37
รูปที่ 6.4 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์จาก <i>A. niger</i> เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากการทดลองครั้งที่ 1	37
รูปที่ 6.5 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์จาก <i>A. niger</i> เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากการทดลองครั้งที่ 2	38
รูปที่ 6.6 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์จาก <i>A. niger</i> เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากการทดลองครั้งที่ 3	38

บทที่ 1

บทนำ

1.1 อนุภาคนาโนเงิน

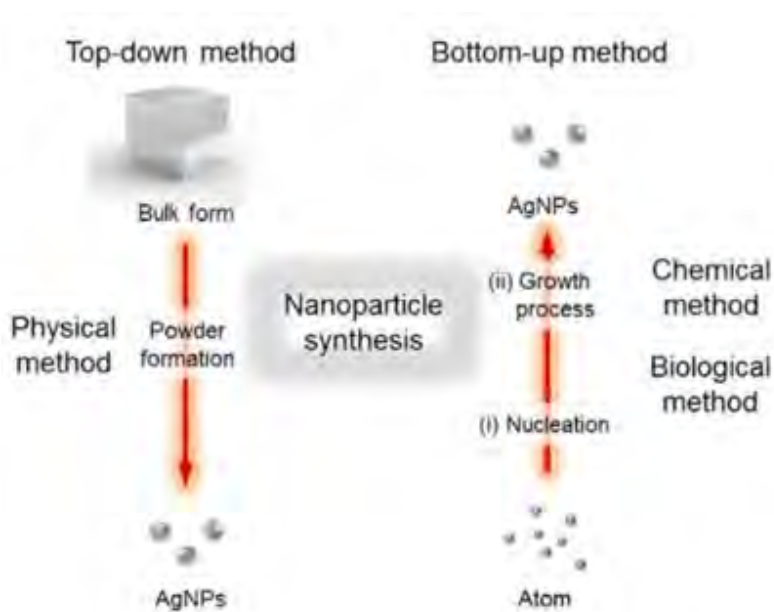
อนุภาคนาโนเงิน (silver nanoparticles) เป็นอนุภาคในระดับนาโนซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 1 - 100 นาโนเมตร อนุภาคนาโนเป็นรากฐานสำคัญของวัสดุนาโนจำนวนมาก ดังนั้นการสังเคราะห์อนุภาคนาโนจึงเป็นส่วนสำคัญในการวิจัยทางด้าน nanoscience และ nanoengineering (Emeka et al., 2014) ซึ่งอนุภาคนาโนเงินเป็นหนึ่งในอนุภาคนาโนที่มีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในด้านต่าง ๆ มากมาย เช่น biolabeling, sensors, filters, microelectronics และ catalysis เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 1.1 เนื่องจากคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์และคุณสมบัติทางชีวภาพของอนุภาคนาโนเงิน นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนเงินในการแพทย์ เช่น ใช้เป็นตัวนำพายา ใช้ในการวินิจฉัยโรค เนื่องจากอนุภาคนาโนเงินเหล่านี้ไม่มีผลกระทบที่เป็นพิษต่อมนุษย์ที่ความเข้มข้นต่ำแต่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ไวรัส และจุลินทรีย์ยูคาริโอตอื่น ๆ นอกจากนี้ยังมีต้นทุนในการผลิตที่ค่อนข้างต่ำ (Zomorodian et al., 2016)



รูปที่ 1.1 การนำอนุภาคนาโนเงินไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ (Calderón-Jiménez et al., 2017)

1.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงิน

โดยทั่วไปการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินแบ่งเป็น 2 แบบ คือ top down และ bottom up ซึ่งหลักการของการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินแบบ top down นั้น คือการสลายสารโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ให้เล็กลงจนกลายเป็นโครงสร้างในระดับนาโน และหลักการของการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินแบบ bottom up คือการรวมกันของอะตอมหรือโมเลกุลเดี่ยวที่มีขนาดเล็กให้กลายเป็นโครงสร้างที่ใหญ่ขึ้นในระดับนาโน ดังแสดงในรูปที่ 1.2 (Lee et al., 2019)



รูปที่ 1.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินแบบ top down และ bottom up (Lee et al., 2019)

ในปัจจุบันการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินที่ใช้กันโดยทั่วไปมีด้วยกันทั้งหมด 3 วิธี ได้แก่ วิธีการสังเคราะห์ทางกายภาพ วิธีการสังเคราะห์ทางเคมีและวิธีการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (Lee et al., 2019)

1.2.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินโดยวิธีทางกายภาพ

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินโดยวิธีทางกายภาพ เช่น วิธีการระเหยและควบแน่นและวิธีการระเหยโดยใช้เลเซอร์ ซึ่งวิธีการระเหยและควบแน่นนั้นจะใช้เตาเผาที่มีรูปร่างคล้ายท่อเพื่อทำให้วัสดุตั้งต้นที่อยู่ตรงกลางของเตาระเหยกลายเป็นไอที่ความดันบรรยากาศ ส่วนวิธีการระเหยโดยใช้เลเซอร์นั้นจะใช้เลเซอร์เป็นแหล่งพลังงานในการทำให้เกิดการระเหยของของแข็งให้กลายเป็นอะตอมและรวมตัวกันเป็นอนุภาคนาโน (De Matteis et al., 2018) ข้อดีของการสังเคราะห์ด้วยวิธีนี้คือเร็วและไม่มีสารเคมีอันตรายมาเกี่ยวข้อง แต่มีข้อจำกัดคือได้ผลผลิตต่ำและใช้พลังงานสูง (Zhang et al., 2016)

1.2.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินโดยวิธีทางเคมี

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินโดยวิธีทางเคมีนั้นจะใช้น้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ในการสังเคราะห์ ซึ่งในกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีนั้นจะมีองค์ประกอบหลัก 3 ส่วน คือ สารตั้งต้น ตัวรีดิวซ์ และสารให้ความเสถียร (Zhang et al., 2016) โดยตัวรีดิวซ์จะทำหน้าที่รีดิวซ์ Ag^+ (silver ion) ให้เป็น Ag^0 (metallic silver) และรวมตัวกันเป็นอนุภาค (Irvani et al., 2014) สารให้ความเสถียรจะช่วยให้อนุภาคนาโนเงินที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นคงตัวอยู่ได้ สารตั้งต้นที่นิยมนำมาใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงิน ได้แก่ ซิลเวอร์ไนเตรท (silver nitrate) (Nakamura et al., 2019) ตัวรีดิวซ์ ได้แก่ โซเดียมซิเตรท (sodium citrate), แอสคอเบต (ascorbate), โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (sodium borohydride, $NaBH_4$) และสารให้ความเสถียร ได้แก่ โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (poly(vinyl alcohol), PVA), โพลีไวนิลไพร์โรลิโดน (poly(vinyl pyrrolidone), PVP), โพลีเอทิลีนไกลคอล (poly(ethyleneglycol), PEG) เป็นต้น (De Matteis et al., 2018) ข้อดีของการสังเคราะห์ด้วยวิธีนี้คือได้ผลผลิตสูงและใช้ต้นทุนต่ำ แต่มีข้อเสียคือสารเคมีที่ใช้เป็นตัวรีดิวซ์นั้นเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต (Zhang et al., 2016)

1.2.3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินโดยวิธีทางชีวภาพ

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินโดยวิธีทางชีวภาพเป็นการสังเคราะห์แบบ bottom up ซึ่งส่วนมากจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยารีดักชันและออกซิเดชัน ในกระบวนการสังเคราะห์นี้มีองค์ประกอบหลัก 3 ส่วน คือ สารตั้งต้น ตัวรีดิวซ์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและสารให้ความเสถียรที่ไม่เป็นพิษ สารตั้งต้นที่นิยมนำมาใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินคือซิลเวอร์ไนเตรท (silver nitrate) (Prabhu et al., 2012) โดยมีสารสกัดจากแบคทีเรีย เชื้อราและพืชทำหน้าที่เป็นทั้งตัวรีดิวซ์และสารให้ความเสถียร ดังแสดงในตารางที่ 1.1 ข้อดีของการสังเคราะห์ด้วยวิธีนี้คือเป็นวิธีที่ง่าย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและมีความคุ้มค่า (Siddiqi et al., 2018)

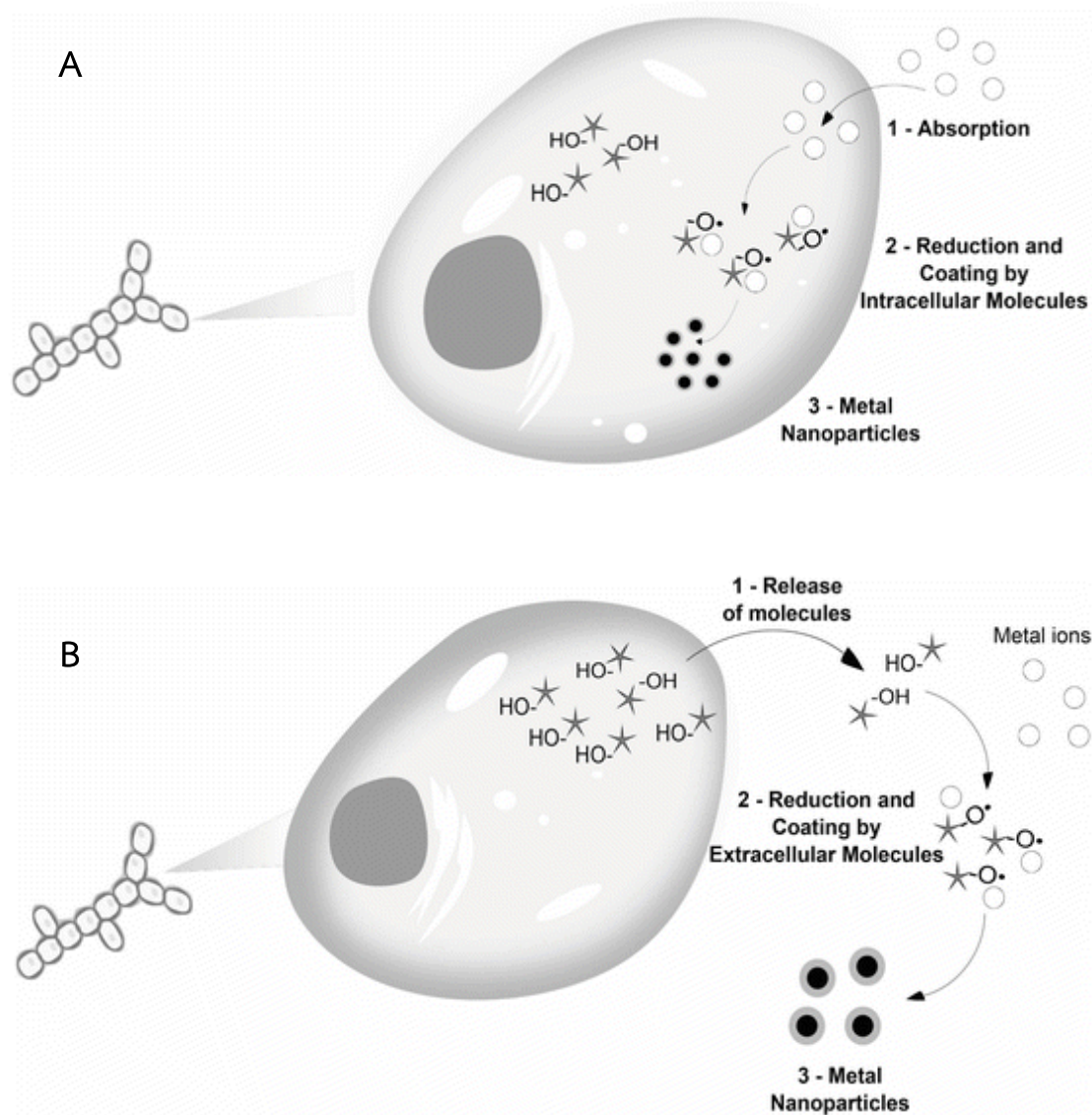
ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินจากแบคทีเรีย เชื้อราและพืช

	ชื่อสิ่งมีชีวิต	ขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโนเงิน	เอกสารอ้างอิง
แบคทีเรีย	<i>Enterobacter aerogenes</i>	25–35 nm; spherical	Karthik et al., 2012
	<i>Escherichia coli</i>	42.2–89.6 nm; spherical	Gurunathan et al., 2009
	<i>Bacillus licheniformis</i> Dahb1	18.69–63.42 nm; spherical	Shanthi et al., 2016
	<i>Proteus mirabilis</i>	10–20 nm; spherical	Samadi et al., 2009

	ชื่อสิ่งมีชีวิต	ขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโนเงิน	เอกสารอ้างอิง
เชื้อรา	<i>Aspergillus flavus</i>	8.92 nm; spherical	Vigneshwaran et al., 2007
	<i>Penicillium brevicompactum</i>	58.35 ± 17.88 nm	Shaligram et al., 2009
	<i>Trichoderma asperellum</i>	13–18 nm; nanocrystalline	Mukherjee et al., 2008
	<i>Fusarium oxysporum</i>	20–50 nm; spherical	Durán et al., 2005
พืช	<i>Rubus glaucus</i>	12–50 nm; spherical	Kumar et al., 2017
	<i>Piper nigrum</i>	10–60 nm; rod shaped	Mohapatra et al., 2015
	<i>Hydrocotyle asiatica</i>	21 nm; spherical	Devi et al., 2016
	<i>Pedaliium murex</i>	50 nm; spherical	Anandalakshmi et al., 2016

1.3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินจากเชื้อรา

เชื้อราเป็นตัวเลือกที่มีประสิทธิภาพสำหรับการสังเคราะห์ทางชีวภาพของอนุภาคนาโนเงินเนื่องจากเชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ง่ายบนอาหารหลายชนิด (Ahmad et al., 2003) มีความทนทานต่อโลหะสูงและมีความสามารถในการสะสมโลหะซึ่งเป็นผลดีต่อการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงิน (Ottoni et al., 2017) และมีการหลั่งเอนไซม์ที่มากกว่าเมื่อเทียบกับแบคทีเรีย (Prabhu et al., 2012) เชื้อราต้องการไนโตรเจนในปริมาณที่มากที่สุดในการบรรดาแร่ธาตุ ดังนั้นไนโตรเจนจึงเป็นปัจจัยจำกัดสำหรับการเจริญของเชื้อรา เชื้อราหลายชนิดสามารถเปลี่ยนไนเตรทที่เป็นแหล่งไนโตรเจนเดียวไปเป็นแอมโมเนียมได้โดยใช้เอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส (nitrate reductase) (Zomorodian et al., 2016) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีรายงานว่าสามารถทำปฏิกิริยารีดักชันกับสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (AgNO_3) โดยรีดิวซ์ไอออนเงิน (Ag^+) ให้กลายเป็นอนุภาคนาโนเงิน (Ag^0) (Singh et al., 2015) โดยการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินจากเชื้อราสามารถทำได้โดยอาศัยเอนไซม์และเมทาบอลิต์ที่ราผลิตขึ้นภายในเซลล์ หรือหลั่งออกนอกเซลล์เป็นตัวรีดิวซ์เปลี่ยนไอออนเงิน (Ag^+) เป็นอนุภาคนาโนเงิน (Ag^0) ดังแสดงในรูปที่ 1.3 (Silva et al., 2016)



รูปที่ 1.3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินจากเชื้อรา (A) ภายในเซลล์ (intracellular synthesis) (B) ภายนอกเซลล์ (extracellular synthesis) (Silva et al., 2016)

กลไกในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินด้วยวิธีทางชีวภาพนั้นยังไม่ชัดเจน จากงานวิจัยที่มีการรายงานไว้ก่อนหน้าคาดว่าเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสมีบทบาทสำคัญในการเกิดรีดักชันของ Ag^+ (Lee et al., 2019) โดยมี NADH (Li et al., 2012) หรือ NADPH (Anil Kumar et al., 2007) เป็น cofactor เอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสจะได้รับอิเล็กตรอนจาก NADH และออกซิไดซ์เป็น NAD^+ จากนั้นไนเตรท (nitrate) จะถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรท์ (nitrite) และเกิดการส่งผ่านอิเล็กตรอนทำให้ไอออนเงินถูกรีดิวซ์เป็นอนุภาคนาโนเงิน (Singh et al., 2015)

โดยการศึกษาที่มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการชักนำการหลั่งเอนไซม์ในไตรทีดักเทสโดยใช้สารละลายโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) และศึกษาผลของการชักนำการหลั่งเอนไซม์ที่เกิดขึ้นต่อการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินของเชื้อรา *Aspergillus niger* ซึ่งเป็นราเส้นใยที่มีลักษณะของโคโลนี่เป็นสีเขียวเข้มจนถึงดำ สามารถแยกได้จากหลายแหล่ง เช่น ถั่วต่าง ๆ อาหารแห้ง อาหารรมควันและผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์ในไตรทีดักเทสซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินได้ (Zomorodian et al., 2016) โดยมีวิธีการคือเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* ในอาหาร potato dextrose broth (PDB) จากนั้นกรองเพื่อเก็บ fungal biomass มาเลี้ยงร่วมกับสารละลายโพแทสเซียมไนเตรทที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อชักนำการหลั่งเอนไซม์ในไตรทีดักเทสของเชื้อรา จากนั้นนำ fungal biomass ที่เลี้ยงร่วมกับสารละลายโพแทสเซียมไนเตรทที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ไปกรองด้วยกระดาษกรอง และแบ่ง fungal filtrate ที่ได้มาตรวจสอบเอนไซม์ในไตรทีดักเทสด้วยวิธี enzyme assay (Harley et al., 1993) และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-visible spectrometry ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นนำ fungal filtrate อีกส่วนหนึ่งมาเติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) เพื่อศึกษาผลของการชักนำการหลั่งเอนไซม์ในไตรทีดักเทสที่เกิดขึ้นต่อกระบวนการผลิตอนุภาคนาโนเงินของเชื้อรา *A. niger* โดยตรวจสอบอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-visible spectrometry ซึ่งอนุภาคนาโนเงินจะมีช่วงการดูดกลืนแสงอยู่ระหว่างความยาวคลื่น 400 - 450 นาโนเมตร นอกจากนี้ยังศึกษาเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินของจุลินทรีย์โดยค้นคว้าจากงานวิจัยที่เคยมีรายงานมาก่อน จากนั้นสืบค้นลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์แต่ละชนิดจากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) และนำไปวิเคราะห์ multiple sequence alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal Omega และ pairwise sequence alignment ด้วยโปรแกรม Emboss Needle เพื่อศึกษาความคล้ายกันของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินของจุลินทรีย์

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ที่เหมาะสมต่อการชักนำการหลั่งเอนไซม์ในไตรทีดักเทสและผลที่เกิดขึ้นต่อการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินของเชื้อรา *Aspergillus niger*

บทที่ 2

เครื่องมือ วัสดุ เคมีภัณฑ์

2.1 เครื่องมือ วัสดุ และเคมีภัณฑ์

เครื่องมือ

1. กรวยแก้ว
2. กระจกตวงปริมาตร 100 มิลลิลิตร
3. กระจกตวงปริมาตร 500 มิลลิลิตร
4. แท่งแก้ว spreader
5. หลอดแก้วฝาเกลียว ของบริษัท DWK Life Science ประเทศเยอรมัน
6. ขวด Erlenmeyer flask 250 มิลลิลิตร ของบริษัท ISO Laborgerate GmbH ประเทศเยอรมัน
7. ขวดใส่สารเคมี ขนาด 250 มิลลิลิตร 500 มิลลิลิตร และ 1000 มิลลิลิตร ของบริษัท DWK Life Science ประเทศเยอรมัน
8. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) 30 องศาเซลเซียส รุ่น INNOVA 4330 ของบริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. เครื่องชั่งหยาบ แบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น PG 2002-s ของบริษัท Metler Toledo ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
10. เครื่องชั่งหยาบขนาดเล็ก ของบริษัท Camry
11. เครื่องอบฆ่าเชื้อขนาดเล็ก (Autoclave) รุ่น ES-215 ของบริษัท TOMY Seiko ประเทศญี่ปุ่น และเครื่องอบฆ่าเชื้อขนาดใหญ่ (Autoclave) รุ่น ES-315 ของบริษัท TOMY Seiko ประเทศญี่ปุ่น
12. เครื่องทำความร้อนชนิดตั้งโต๊ะ (heat plate) รุ่น MS-H280-Pro ของบริษัท Scilogex ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. เครื่องนับจำนวนเซลล์ (hemocytometer) ของบริษัท LW Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscopy) รุ่น CH30RF200 ของบริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น
15. เครื่องนาโนดรอป (NanoDrop spectrophotometer) รุ่น Nanodrop 2000c ของบริษัท Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
16. ตู้ชีวนิรภัย (biosafety cabinet) ของบริษัท LabMicrotech ประเทศไทย

17. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U71V ของบริษัท Sanyo Electric Co. ประเทศญี่ปุ่น
18. ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Contherm Digital Series
19. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (incubator) ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน
20. ไมโครปิเปตต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร 100 ไมโครลิตร และ 1000 ไมโครลิตร ของบริษัท Capp Bravo ประเทศเยอรมัน
21. อุปกรณ์นับจำนวน (Hand tally counter) ของบริษัท GOGO for digit ประเทศจีน
22. Automatic pipette ของบริษัท DLAB Levo Plus
23. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น K-550 GE ของบริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา

วัสดุ

1. เพลตพลาสติก (plastic plate) ของบริษัท Bioscan
2. ทิปขนาดเล็ก (pipette tip) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร 100 ไมโครลิตร และ 1000 ไมโครลิตร ของบริษัท Kirgen
3. microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ของบริษัท Kirgen
4. กระดาษกรอง เบอร์ 1 (Whatman No.1) ของบริษัท GE Healthcare
5. ผ้าก๊อซ
6. ปิเปตพลาสติก (plastic pipette) ขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท SPL LifeScience
7. พาสเจอร์ปิเปต (pasteur pipette) ของบริษัท Volac
8. อลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium foil) ของบริษัท Reynolds metals ประเทศสหรัฐอเมริกา

เคมีภัณฑ์

1. 85% กลีเซอรอล (85% glycerol) ของบริษัท Himedia
2. ผงอาหารเลี้ยงราสำเร็จรูป โปเตโตเด็คทริกโทรส (potato dextrose broth) ของบริษัท Himedia
3. ผงวุ้น (agar) ของบริษัท Himedia
4. Tween-20 ของบริษัท Life science
5. ซิลเวอร์ไนเตรท (silver nitrate, AgNO_3) ของบริษัท POCH ประเทศโปแลนด์
6. โพแทสเซียมไนเตรท (potassium nitrate, KNO_3) ของบริษัท Ajax Finechem ประเทศออสเตรเลีย
7. โซเดียมไนเตรท (sodium nitrate, NaNO_3) ของบริษัท Ajax Finechem ประเทศออสเตรเลีย

8. โพรพานอล (propanol, C_3H_8O)
9. ซัลฟานิลาไมด์ (sulfanilamide, $C_6H_8N_2O_2S$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
10. N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NEED) ของบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4)
12. โมโนโซเดียมฟอสเฟต (monosodium phosphate, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) ของบริษัท CARLO ERBA ประเทศอิตาลี

น้ำ

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

เชื้อรา

เชื้อราที่ใช้ในการทดลองจาก MSCU microbial culture collection ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเชื้อราที่ใช้ในการสังเคราะห์หอนุภาคนาโนเงิน ได้แก่

1. *Aspergillus niger* MSCU 0361

Kingdom Fungi

Division Ascomycota

Class Eurotiomycetes

Order Trichocomaceae

Genus *Aspergillus*

Species *Aspergillus niger*

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 วิธีดำเนินการทดลอง

3.1.1 การศึกษายีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้อง

ศึกษางานวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์ในไตรคิตเทศที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินของจุลินทรีย์ จากนั้นสืบค้นลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์แต่ละชนิดจากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) และนำไปวิเคราะห์ multiple sequence alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal Omega และ pairwise sequence alignment ด้วยโปรแกรม Emboss Needle เพื่อศึกษาความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินของจุลินทรีย์

3.1.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงิน

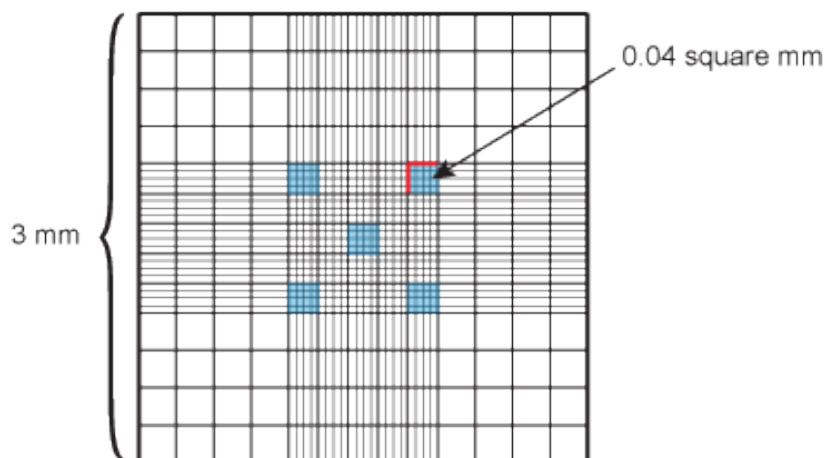
3.1.2.1 การเตรียมเชื้อสำหรับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงิน

นำเชื้อรา *Aspergillus niger* MSCU 0361 ที่ได้จาก MSCU Microbial Culture Collection มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตลักษณะโคโลนีของ *A. niger* โดยเมื่อเจริญเต็มที่จะมีโคโลนีสีเขียวเข้มและมีการสร้างสปอร์สีดำเกิดขึ้น

3.1.2.2 การเก็บสปอร์และนับจำนวนสปอร์

เมื่อเชื้อราเจริญเต็มที่แล้วจะเก็บสปอร์โดยเติม 0.2% Tween20 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วใช้ spreader ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขูดเบา ๆ บริเวณโคโลนีให้สปอร์หลุดออกมาแล้วดูดสารละลายที่มีสปอร์กรองผ่านผ้าก๊อซที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อนำเส้นใยที่ยังปนอยู่ออกมา จากนั้นนำสปอร์ไปนับจำนวนด้วย hemocytometer โดยดูดสารละลายที่มีสปอร์อยู่ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นค่อย ๆ ปล่อยให้ไหลผ่านแผ่นปิดเพลทแก้ว (cover slip) เข้าไปยังช่องว่างที่มีเส้นตาราง (counting chamber grid) อยู่จนเต็มช่อง และทำเช่นเดียวกันกับอีกด้านหนึ่ง ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศเนื่องจากจะทำให้เกิดความผิดพลาดในการนับได้ วิธีการนับสปอร์จะทำได้โดยใช้การมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า จะสังเกตเห็นช่องตารางตรงกลาง ซึ่งมีทั้งหมด 25 ช่องใหญ่ แต่จะนับเพียง 5 ช่องใหญ่เท่านั้น ดังแสดงรูปที่ 3.1 และทำซ้ำกับอีกด้านด้วยวิธีเดียวกัน หากจำนวนสปอร์มากเกินไปจะนับได้

ให้นำมาเจือจางด้วย sterile deionized water ก่อน นำจำนวนสปอร์ที่นับได้จากทั้ง 2 ด้านมารวมกันและหาค่าเฉลี่ย จากนั้นคำนวณโดยใช้สูตรคำนวณด้านล่าง



รูปที่ 3.1 ตำแหน่งสำหรับนับจำนวนสปอร์

ที่มา : <http://microbebrewer.blogspot.com/2014/01/yeast-cell-counting-and-viability.html>

สูตรคำนวณ จำนวนสปอร์เริ่มต้น (spores/mL) = $df \times 5 \times 10^4 \times n$

โดย df = dilution factor

n = จำนวนสปอร์ที่นับได้

3.1.2.3 การเตรียม fungal filtrate

ใส่สปอร์ที่นับแล้วตามขั้นตอน 3.1.2.2 จำนวน 10^6 สปอร์ ลงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นนำ *A. niger* ที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออกจาก fungal biomass ต่อมาจึงล้าง fungal biomass ของเราด้วย sterile deionized water 3 ครั้ง ครั้งละ 50 มิลลิลิตร เพื่อล้างส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อาจยังหลงเหลืออยู่กับ fungal biomass ออก ที่ซึ่งไว้สัปดาห์เพื่อให้ น้ำถูกกรองออกจนหมดจึงนำไปซึ่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง ตั้งโต๊ะขนาดเล็กให้มีน้ำหนักของ fungal biomass เท่ากับ 30 กรัม เตรียมสารละลายโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 60 มิลลิลิตร เติมลงในขวด flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ตามลำดับ และเตรียม sterile deionized water ปริมาตร 60 มิลลิลิตร เติมลงในขวด flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม จากนั้นนำ fungal biomass ที่ซึ่งไว้ใส่ลงในขวด flask ที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบ

ต่อมาที่ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เมื่อครบแล้วจึงนำมากรองส่วน fungal biomass ออกด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อเก็บส่วน fungal filtrate ไว้ใช้ในขั้นตอนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงิน และการทดสอบเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสต่อไป

3.1.2.4 สังเคราะห์อนุภาคนาโนเงิน

นำ fungal filtrate ที่ได้จากขั้นตอน 3.1.2.3 แบ่งใส่หลอดฝาเกลียวหลอดละ 4.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (AgNO_3) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ จากนั้นหุ้มหลอดฝาเกลียวด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ และนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อมาที่ เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 200 - 800 นาโนเมตร โดยใช้เทคนิค UV-visible spectrometry โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

3.1.3 การทดสอบเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส

3.1.3.1 กราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ (NaNO_2) ความเข้มข้น 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 และ 0.00625 มิลลิโมลาร์ ใส่ในหลอดฝาเกลียวหลอดละ 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม sulfanilamide solution ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และ N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride solution (NEED) ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ตามลำดับ จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนสีของสารละลายเป็นสีชมพู นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของไนไตรท์ (nitrite)

3.1.3.2 การทดสอบเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส

นำ fungal filtrate ที่ได้จากขั้นตอน 3.1.2.3 แบ่งใส่หลอดฝาเกลียวหลอดละ 2.5 มิลลิลิตร โดยมีชุดควบคุมเป็น sterile deionized water ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม assay medium ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงไป ห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์และนำไปป้อนที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบแล้วจึงนำมาเติม sulfanilamide solution ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และ N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride solution (NEED) ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ตามลำดับ จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนสีของสารละลายเป็นสีชมพู นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

3.1.4 การวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-visible Spectrometry

3.1.4.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อตรวจสอบอนุภาคนาโนเงิน

นำสารตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.1.2.4 มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-visible spectrometry ที่ช่วงความยาวคลื่น 200 - 800 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง NanoDrop2000 ซึ่งเป็นวิธีพื้นฐานเพื่อยืนยันการเกิดอนุภาคนาโนเงิน ในขั้นตอนการวัดค่าจะใช้ sterile deionized water เป็น blank จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างทั้งหมด

3.1.4.2 การวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อตรวจสอบเอนไซม์ในเตรทรีดักเทส

นำสารตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.1.3.2 มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค UV-visible spectrometry ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง NanoDrop2000 ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบปริมาณไนโตรทซึ่งเป็นผลผลิตของเอนไซม์ในเตรทรีดักเทส ในขั้นตอนการวัดค่าจะใช้ชุดควบคุมเป็น sterile deionized water ที่เติมสารทดสอบซึ่งเตรียมจากข้อ 3.1.3.2 จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างทั้งหมด

บทที่ 4

ผลการทดลอง

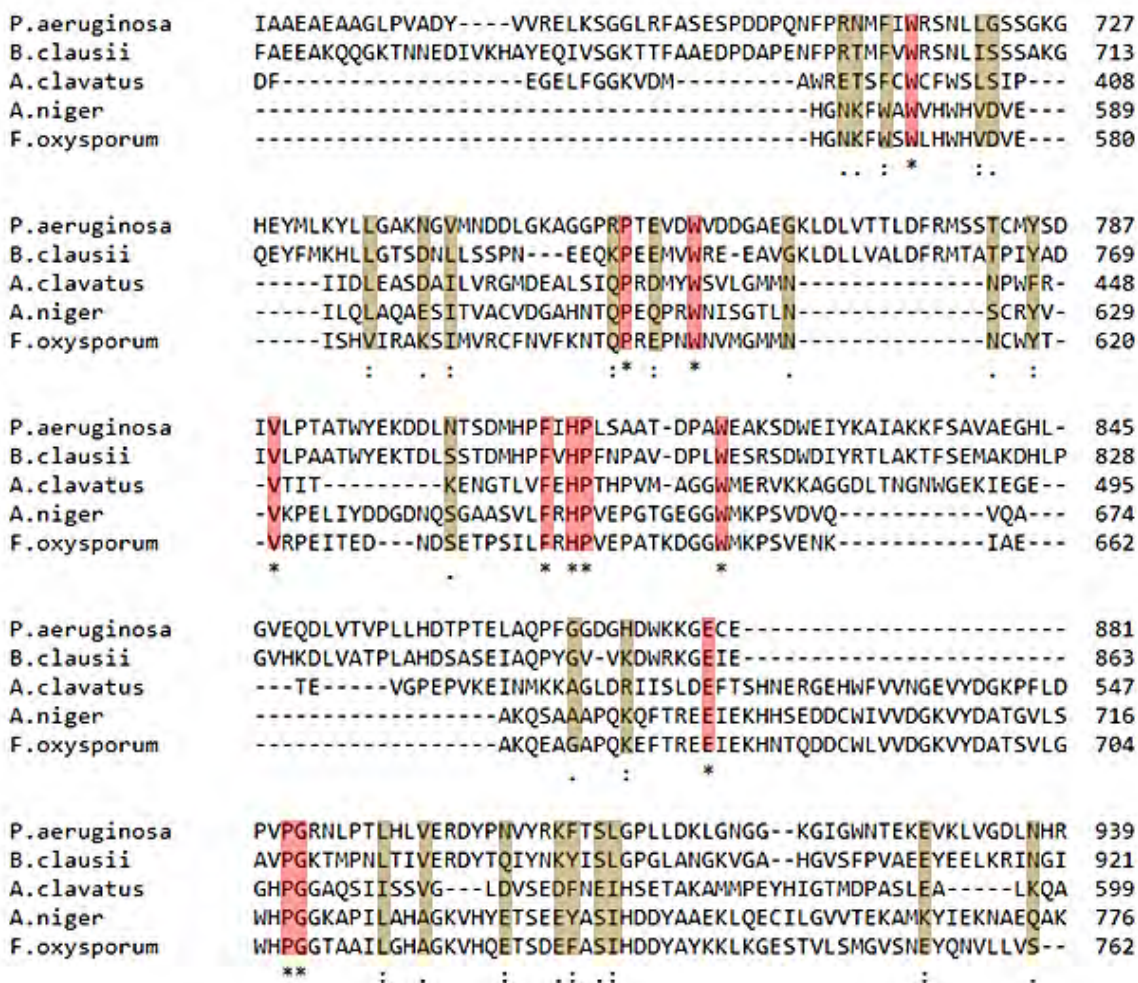
4.1 ยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้อง

จากการค้นคว้านงานวิจัยที่เคยมีรายงานมาก่อนพบว่าเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินทั้งในเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งยีนที่ถอดรหัสให้เอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสในจุลินทรีย์แต่ละชนิดนั้นจะแตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และเมื่อนำยีนดังกล่าวที่พบใน *A. niger*, *A. clavatus*, *F. oxysporum*, *P. aeruginosa* และ *B. clausii* มาศึกษาความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนโดยใช้วิธี multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega พบว่ายีนทั้งห้ามีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันถึง 23 ตำแหน่งและพบลำดับกรดอะมิโนที่มีความคล้ายกันอย่างมากอีก 77 ตำแหน่ง ดังแสดงในรูป 4.1 แสดงให้เห็นว่ายีนที่ถอดรหัสให้เอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสมีตำแหน่งอนุรักษ์ (conserved sequence) ที่พบได้ทั้งในเชื้อราและแบคทีเรีย ดังนั้นเพื่อเปรียบเทียบปริมาณความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนในยีนไนเตรทรีดักเทสจาก *A. niger* กับเชื้อราต่างชนิดและแบคทีเรีย จึงทำ pairwise sequence alignment ด้วยโปรแกรม Emboss Needle พบว่าลำดับกรดอะมิโนในยีนไนเตรทรีดักเทสจาก *A. niger* มีความเหมือนกันกับยีนไนเตรทรีดักเทสจาก *F. oxysporum* มากที่สุด ตามด้วย *A. clavatus*, *P. aeruginosa* และ *B. clausii* ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 แสดงยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินของแบคทีเรียและเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ

ชื่อยีน	ชื่อสิ่งมีชีวิต	เอกสารอ้างอิง
ANI_1_2090064	<i>Aspergillus niger</i>	Zomorodian et al., 2016
ACLA_022640	<i>Aspergillus clavatus</i>	Zomorodian et al., 2016
FOYG_01082	<i>Fusarium oxysporum</i>	Hamedi et al.,2016
narG	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kumar et al.,2011
ABC_RS03765	<i>Bacillus clausii</i>	Mukherjee et al.,2018

P.aeruginosa	VYTAKTYGPDRIAGFTPIIPAMSMVSYAAGARYLSL---IGGVCLSFYDWYCDLPPASPQI	231
B.clausii	IYTIRKYGPDRIAGFTPIIPAMSMISYASGSRFISL---LGGEMLSFYDWYADLPPASPQI	229
A.clavatus	-TITRVRTQTET-----VLPKSLSVKANQITVDEFSTVNASDI-----PLPPPSKIPT	49
A.niger	EKSENELSLEEI-----SLLRAVR--HEEAVIENLKQNNQGR-----SSAPE-NPYI	241
F.oxysporum	PKLSDKYTPAEI-----ALLRALE--HEKNIQHLKENNGKRK-----SPQHKNLQTI	231
	. : : : .	
P.aeruginosa	WGEQ-----TDVPESADWYISSYIIAWGSNVPQTRTPDAHFFTEVRYKGTKTVSITPD	284
B.clausii	WGEQ-----TDVPESADWYIAGYLIMWGSNVPLTRTPDAHFMTEVRYKGTQVSVVAPD	282
A.clavatus	EILSQDKGTPDHSVPRDPRILRLTGTVHPFIVEPPLTALFNEGFLTS-----	95
A.niger	TIDEADQFTADNHWPRSPDLVRLTGKLPNAEPQLSKLFNAGLVTP-----	287
F.oxysporum	SIDEQDQFSPDNWLRSPDLIRLTGKHPLNAEAPLRLYEAGLVTP-----	277
	. : * . . : : : : *	
P.aeruginosa	YSEVAKLTDLWLNPKQGTDAALGMAFGHVILKEFHLDLDRPSAYFVDYCRQYTDMPMLVLL-	343
B.clausii	YAENVKPADNWLAPNPGTDAAIQAQAMTHVILNEYHHRQEPMLDYAKQYTDMPFLILL-	341
A.clavatus	-----P-----ELFYVRNHGVPVPLVRDED	114
A.niger	-----N-----ELHYVRNHGVPVPLVWVFEF	306
F.oxysporum	-----N-----ELHYVRNHGVPVPRILWVFEF	296
	: * : : : * :	
P.aeruginosa	----EEHAGGAFKPTRYLRAADLADNLGQDNNPEWKTIAVDERSGGLVSPGTGAIGYRWGE	399
B.clausii	----EEFEDG-YKAGRFLRASDLGET---SPHAEWKPVLI DETTEEVLVNGTGMQRWEE	393
A.clavatus	IPNWEISIEGLVERPVVLFNRQILQQFNQITAPI-TLVCAGNRRKEQNTVRKSKGFSWGA	173
A.niger	-HEIDIE----GGRVKLGMDELTKNFKAINIPI-LLACDNTRRKELNMIKRTTGFNMGF	359
F.oxysporum	-HELEITYD---GKTQTL SMDDL-KEFDTINIIV-ALACDGNRRKELNMIKSKGFSWGA	350
	: : * : : . : : : * *	
P.aeruginosa	SGKWNIAELDGRSGDQTRLQLSLLDGPEHACEVAFPYFAGQEHPHFKGVANDEVLLRRVP	459
B.clausii	GKQWNLILER-EDGSVISPALSVEPHGEAFQTIYFPFDNAGSG-----TFKRVIP	443
A.clavatus	AGLSTALFTGPLMADVLRYAKPL-----RRAKYVCMEGADKLPNG-----HYGTSVK	220
A.niger	GGVSCAYWKGPLLRDVL LAAGVPERMPDQDNQRYWIHFEGADEPNEA-----KYATSIP	413
F.oxysporum	GGASCAYWKGPLLRDVL LANGVPEKPPGLGKRYWVNEEGTDDLSEG-----KYATSIP	404
	. : : . :	
P.aeruginosa	FREIVAADGKRLRVATVYDLQMANYSIDRGLGGDNVATSYEDADTPYTPAWQERITGVPA	519
B.clausii	VRTIQLADGKRLAATVYDLMLSQYGIQR-IGSEWEADGYEDET SKYTPAWQESITGVKA	502
A.clavatus	LNNAMPNRL-----IMLAHKMNGEPLRPDHRPLRAVV-	254
A.niger	FDHVM DPRND-----VILAYEMNDRPLPDHGYPRVRII-	447
F.oxysporum	FEHAMSPNND-----VILAYEMNDVPLPDHGYPRVII-	438
	. : : * : :	
P.aeruginosa	ARATQVAREFADSADKTRGKA-----MVIIGAAMNHWHYHMDMNYRAVINMLMCGCIGQ	573
B.clausii	SVVVQIAREFAQNSLDTGGRS-----MIIMGAGINHWFNSDTIYRAILNLVILTASQGV	556
A.clavatus	-----PGQIGGRSVKWIKKLILTDAPSONWYHIYDNRV-LPTMV--APE---	295
A.niger	-----PGYVGRGCVKWLKSIWTSNKENNSYYHLHONRM-LPSSV--TDT---	488
F.oxysporum	-----PGYVGRNVKWLKKIWVSEKENDSYYHIWONRV-LPSFV--TEK---	479
	* : : : : : :	
P.aeruginosa	SGGGWAHYVYGQEKLRPQTGWAPLAFGLDWSRPPRQMNNGTSFFYLHSSQWRHEKLSMHEVL	633
B.clausii	NGGGWAHYVYGQEKCRPIEGWSTVAFKDWQGPQRQNNATSFFYFATDQWKYEEMDTESLK	616
A.clavatus	-----MAAQEPMWRDER-----YAIYDLNMSAA	320
A.niger	-----ESQLAKLFFTHPD-----TACYEQLNSVI	513
F.oxysporum	-----DGPFAEALFHHPD-----TACNEQLNSII	504
	. : . :	
P.aeruginosa	S-PLADASRF---AEHALDYNT-----QAERLGLWLPSPQLNRNPLR	671
B.clausii	S-PTGGETRY---THPADYNV-----LAARLGLWLPSPYQFNKSSLA	653
A.clavatus	VYPQHNEVLDL--ATAGPSYTVKGYAYAGGRRVNRVEISLDKGGKSWRLADIQYADDKYR	378
A.niger	ARPAQGEKISVSNARKGKTYRIAGFAYSQSGHPVRRVEISLNNKSWLYCIREFPDRPIR	573
F.oxysporum	VKPAQGERIPLGRAKKGENYRIEGYAYDGGGHEVQRVEVSLDDGATWLYCIRKFPDYPPIR	564
	* . * : * . :	



รูปที่ 4.1 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไนโตรทรีดักเทสของแบคทีเรียและเชื้อราโดยวิธี multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega โดยกรอบสีแดงแสดงถึงลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันและกรอบสีน้ำตาลแสดงถึงลำดับกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกันอย่างมาก

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบปริมาณความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนในยีนไนโตรทรีดักเทสจาก *A. niger* กับเชื้อราต่างชนิดและแบคทีเรียโดยวิธี pairwise sequence alignment ด้วยโปรแกรม Emboss Needle

ชื่อสิ่งมีชีวิต	<i>Aspergillus niger</i>	
	% identity	% similarity
<i>Aspergillus clavatus</i>	26.20%	40.80%
<i>Fusarium oxysporum</i>	40.80%	52.30%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12.90%	19.40%
<i>Bacillus clausii</i>	9.50%	15.70%

4.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

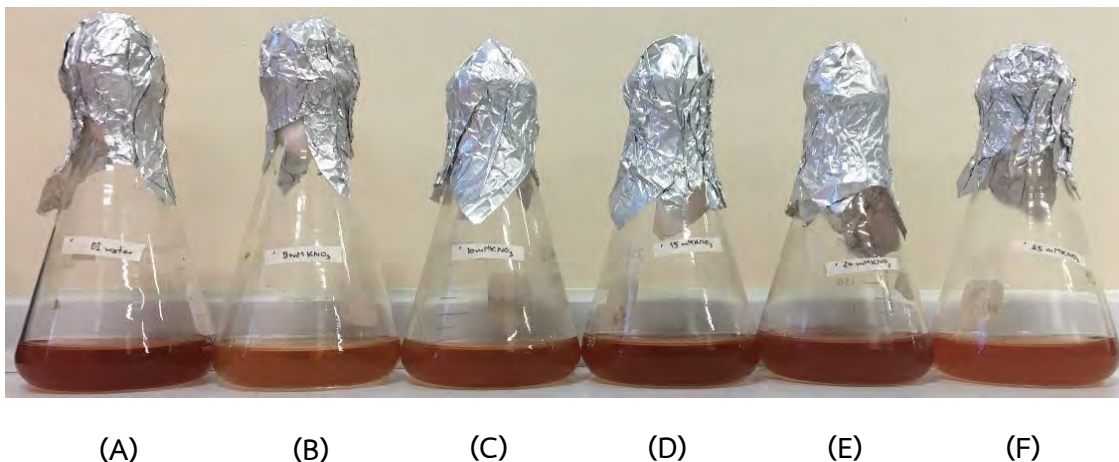
จากการเลี้ยงเชื้อ *A. niger* MSCU 0361 ที่ได้จาก Microbial Culture Collection จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ของ *A. niger* MSCU 0361 ในระยะแรกมีสีเขียว แต่เมื่อเจริญเต็มที่สีของโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มและมีบริเวณที่มีสีดำซึ่งเป็นบริเวณที่มีการสร้างสปอร์เกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของ *A. niger* MSCU 0361 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.3 ลักษณะของ fungal filtrate

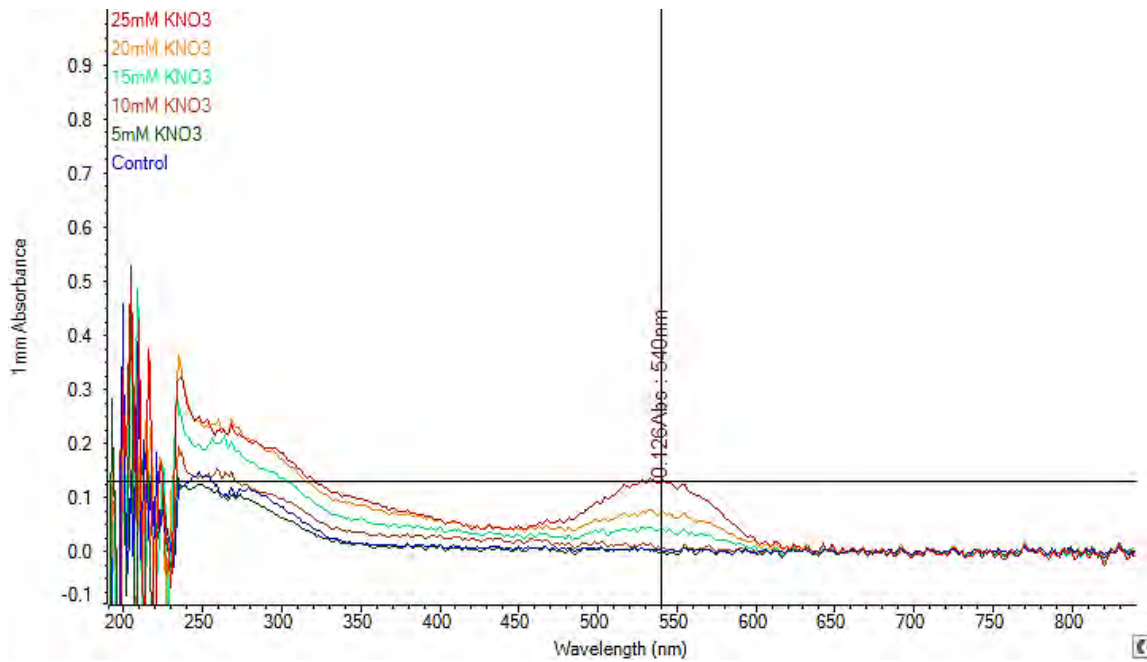
จากการทดลองเมื่อเลี้ยง *A. niger* MSCU 0361 ในสารละลายโพแทสเซียมไนเตรทความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า fungal filtrate ของ *A. niger* มีสีน้ำตาลเข้ม ดังแสดงในรูปที่ 4.3



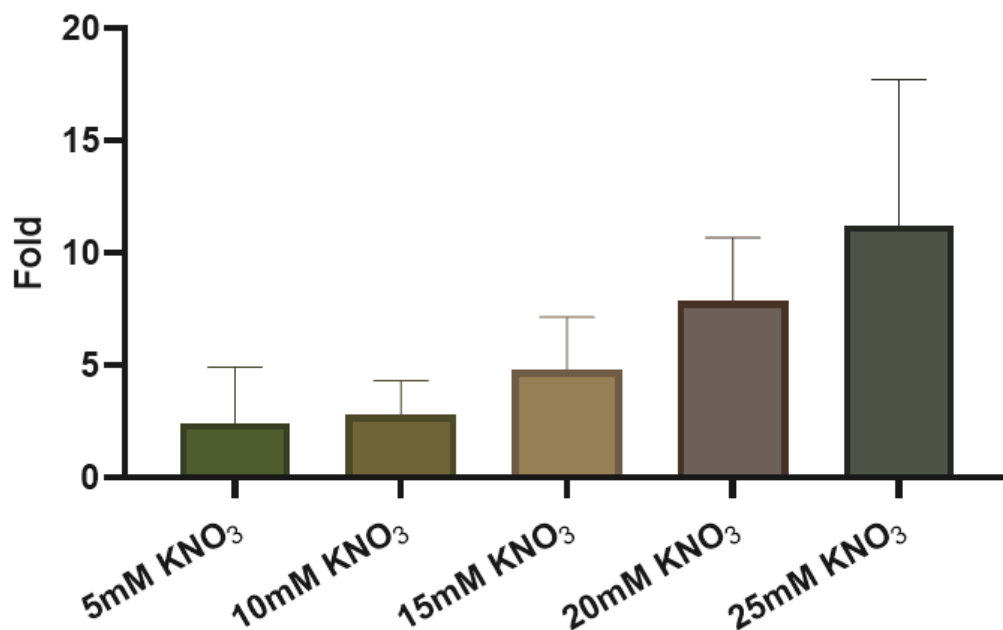
รูปที่ 4.3 ลักษณะ fungal filtrate ของ *A. niger* MSCU 0361 ที่เลี้ยงในสารละลายโพแทสเซียมไนเตรท ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) ชุดควบคุม (B) 5 มิลลิโมลาร์ (C) 10 มิลลิโมลาร์ (D) 15 มิลลิโมลาร์ (E) 20 มิลลิโมลาร์ (F) 25 มิลลิโมลาร์

4.4 ผลของการชักนำการหลั่งเอนไซม์

การชักนำการหลั่งเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสที่เกิดขึ้นสามารถวิเคราะห์ได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.4 และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงไปวิเคราะห์พบว่า *A. niger* MSCU 0361 ที่เลี้ยงในสารละลายโพแทสเซียมไนเตรทความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ชักนำการหลั่งเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสได้ 2.44 ± 2.49 เท่า ที่ 10 มิลลิโมลาร์ สามารถชักนำได้ 2.81 ± 1.51 เท่า ที่ 15 มิลลิโมลาร์ สามารถชักนำได้ 4.81 ± 2.34 เท่า ที่ 20 มิลลิโมลาร์ สามารถชักนำได้ 7.87 ± 2.83 เท่า และที่โพแทสเซียมไนเตรทความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ สามารถชักนำการหลั่งเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสได้สูงที่สุด โดยชักนำได้สามารถชักนำให้มีการหลั่งเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสได้มากถึง 11.22 ± 6.50 เท่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารละลายโพแทสเซียมไนเตรท ดังแสดงในรูปที่ 4.5



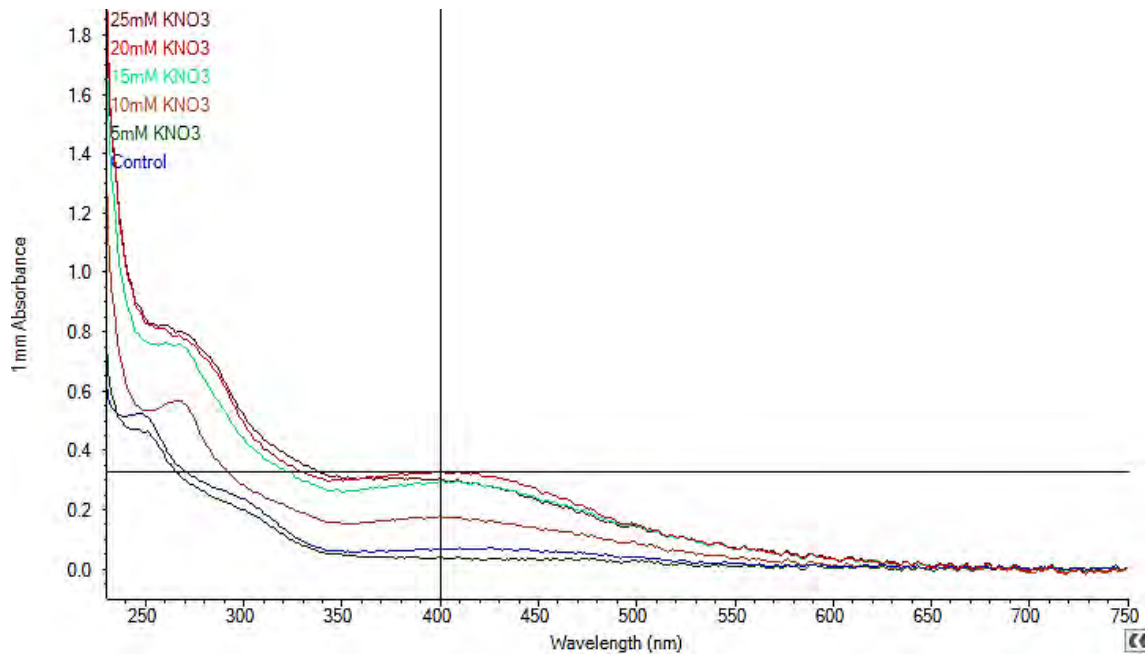
รูปที่ 4.4 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ fungal filtrate ของ *A. niger* เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทส



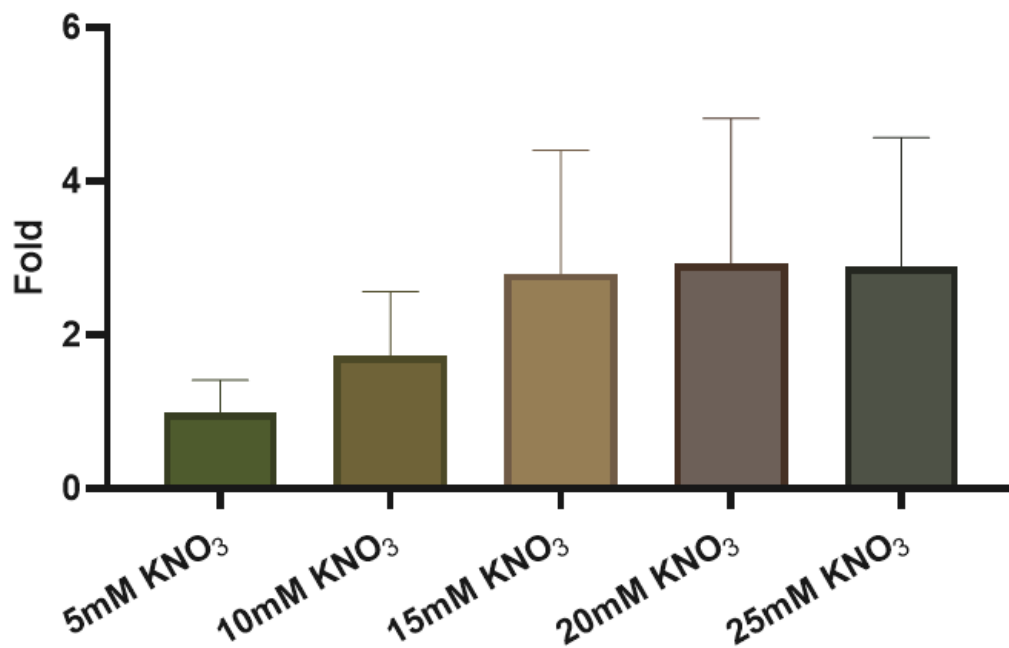
รูปที่ 4.5 กราฟแสดงปริมาณการชักนำการหลั่งเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสของ *A. niger* เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับชุดควบคุม

4.5 ผลค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนเงิน

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินที่เกิดขึ้นสามารถวิเคราะห์ได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 200 - 800 นาโนเมตร โดยมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 400 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.6 และจากการวิเคราะห์พบว่า *A. niger* MSCU 0361 ที่เลี้ยงในโพแทสเซียมไนเตรทความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ สามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินได้ 0.98 ± 0.43 เท่า ที่ 10 มิลลิโมลาร์ สังเคราะห์ได้ 1.73 ± 0.83 เท่า ที่ 15 มิลลิโมลาร์ สังเคราะห์ได้ 2.80 ± 1.61 เท่า ที่ 20 มิลลิโมลาร์ สังเคราะห์ได้ 2.92 ± 1.89 เท่า และที่ 25 มิลลิโมลาร์ สังเคราะห์ได้ 2.89 ± 1.68 เท่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมโพแทสเซียมไนเตรท ซึ่งความเข้มข้นของโพแทสเซียมไนเตรทที่สามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินได้มากที่สุดคือ 20 มิลลิโมลาร์ ดังแสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์จาก *A. niger* เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงปริมาณการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินของ *A. niger* เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับชุดควบคุม

บทที่ 5

สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาเอ็นที่มีมีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินของจุลินทรีย์ ซึ่งเอ็นที่ถอดรหัสให้เอ็นไซม์ไนเตรทรีดักเทสในจุลินทรีย์แต่ละชนิดนั้นจะแตกต่างกันไป จึงนำมาศึกษาเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนของเอ็นไซม์ไนเตรทรีดักเทสในเชื้อรา ได้แก่ *A. niger*, *A. clavatus* และ *F. oxysporum* และแบคทีเรีย ได้แก่ *P. aeruginosa* และ *B. clausii* โดยการทำการ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega พบว่าเอ็นจากจุลินทรีย์ทั้งห้ามีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันถึง 23 ตำแหน่งและพบลำดับกรดอะมิโนที่มีความคล้ายกันอย่างมาอีก 77 ตำแหน่ง แสดงให้เห็นว่าเอ็นที่ถอดรหัสให้เอ็นไซม์ไนเตรทรีดักเทสมีตำแหน่งอนุรักษ์ (conserved sequence) ที่พบได้ทั้งในเชื้อราและแบคทีเรีย ดังนั้นเพื่อเปรียบเทียบปริมาณความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนในเอ็นไนเตรทรีดักเทสจาก *A. niger* กับเชื้อราต่างชนิดและแบคทีเรียจึงทำการ pairwise sequence alignment ด้วยโปรแกรม Emboss Needle พบว่าลำดับกรดอะมิโนในเอ็นไนเตรทรีดักเทสจาก *A. niger* มีความเหมือนกันกับเอ็นไนเตรทรีดักเทสจาก *F. oxysporum* มากที่สุด ตามด้วย *A. clavatus*, *P. aeruginosa* และ *B. clausii* ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเอ็นที่ถอดรหัสให้เอ็นไซม์ไนเตรทรีดักเทสในเชื้อราต่างชนิดกันมีตำแหน่งอนุรักษ์ (conserved sequence) ที่เหมือนกันมากกว่าในแบคทีเรีย

การชักนำการหลั่งเอ็นไซม์ไนเตรทรีดักเทสโดยใช้สารละลายโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) และศึกษาผลของการชักนำการหลั่งเอ็นไซม์ที่เกิดขึ้นต่อการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินของเชื้อรา *A. niger* โดยในการสังเคราะห์จะเลี้ยง *A. niger* ในสารละลายโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อชักนำให้เชื้อราเกิดการหลั่งเอ็นไซม์ไนเตรทรีดักเทสในปริมาณที่สูงขึ้นเพื่อนำแหล่งไนโตรเจนเหล่านี้ไปใช้ เชื้อราจะผลิตเอ็นไซม์และสารเมทาบอลิต์ออกมานอกเซลล์ (Zomorodian et al., 2016) การตรวจสอบผลของการชักนำการหลั่งเอ็นไซม์นี้จึงทำได้โดยนำ fungal filtrate มาทดสอบด้วยวิธี enzyme assay ซึ่งเป็นการตรวจสอบไนไตรท์ (nitrite) ที่เกิดขึ้นจากการที่เอ็นไซม์ไนเตรทรีดักเทสจะเปลี่ยนไนเตรท (nitrate) ให้เป็นไนไตรท์ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารเชิงซ้อนสีชมพูที่เกิดจากการเติมสารทดสอบไป ทำปฏิกิริยากับไนไตรท์ที่มีความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้น (Harley et al., 1993) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการชักนำการหลั่งเอ็นไซม์จากการใช้สารละลายโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าสารละลายโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ สามารถชักนำการหลั่งเอ็นไซม์ไนเตรทรีดักเทสได้มากที่สุด ซึ่งเกิดจากการที่มีแหล่งไนโตรเจนมากขึ้น เชื้อราจึงมีการหลั่งเอ็นไซม์ไนเตรทรีดักเทสในปริมาณที่สูงขึ้นเพื่อนำแหล่งไนโตรเจนเหล่านี้ไปใช้ และการชักนำโดยใช้สารละลาย

โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ความเข้มข้นที่ลดลงตามลำดับ ปริมาณการชักนำการหลั่งเอนไซม์ก็ลดลงตามลำดับเช่นกัน

การศึกษาผลของการชักนำการหลั่งเอนไซม์ที่เกิดขึ้นต่อการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินของเชื้อรา *A. niger* สามารถทำได้โดยนำ fungal filtrate ซึ่งมีเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสที่ถูกชักนำโดยใช้สารละลายโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) มาเติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (AgNO_3) เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงิน เอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสจะเร่งปฏิกิริยารีดักชันของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (AgNO_3) โดยรีดิวซ์ไอออนเงิน (Ag^+) ให้เป็นอนุภาคนาโนเงิน (Ag^0) (Silva et al., 2016) สามารถตรวจสอบการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินได้โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 200 – 800 นาโนเมตร โดยจะพบ specific peak ของอนุภาคนาโนเงินขึ้นมาในช่วงความยาวคลื่น 400 – 450 นาโนเมตร ซึ่งจากการศึกษาพบว่า มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 400 นาโนเมตร และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงิน พบว่าการใช้สารละลายโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์สามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินได้มากที่สุด การที่ความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ที่ทำให้เกิดการชักนำการหลั่งเอนไซม์มากที่สุดและสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินได้มากที่สุดต่างกันนั้นอาจเกิดจากการที่สารละลายโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการชักนำนั้นเมื่อใช้ในความเข้มข้นที่สูงทำให้เอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสจะไปทำปฏิกิริยากับสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (AgNO_3) เพื่อเปลี่ยนไอออนเงิน (Ag^+) ให้กลายเป็นอนุภาคนาโนเงิน (Ag^0) นั้นถูกแบ่งมาทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) แทนส่งผลให้ปริมาณการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินลดลง

จากงานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่ายีนที่ถอดรหัสให้เอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสในเชื้อราต่างชนิดกันมีตำแหน่งอนุรักษ์ (conserved sequence) ที่คล้ายคลึงกันมากกว่าในแบคทีเรีย นอกจากนี้สารละลายโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) สามารถทำให้เกิดการชักนำการหลั่งเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสได้และยังส่งผลให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินจากเชื้อรา *A. niger* สูงขึ้นอีกด้วย ซึ่งหากงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้ในเชื้อราชนิดอื่นที่มีเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสที่คล้ายคลึงกัน คาดว่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินได้เช่นกัน

อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่แสดงในงานวิจัยนี้ยังไม่สามารถบอกได้ว่าการเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินโดยใช้สารละลายโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงควรนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติเพิ่มเติมเพื่อยืนยันว่าสารละลายโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) สามารถทำให้เกิดการชักนำการหลั่งเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสได้และส่งผลให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินจากเชื้อรา *A. niger* มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้เพื่อยืนยันว่าสารละลายโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) สามารถชักนำการหลั่งเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสได้จริง อาจทำ

การทดลองอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น การทำ PCR เพื่อตรวจสอบปริมาณ mRNA ที่เพิ่มขึ้น และการทำ western blot เพื่อตรวจสอบการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ในเตรทรีดักเทส และเนื่องจากขนาด รูปร่าง และคุณสมบัติของอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ได้ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ รวมไปถึงสภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์ (Siddiqi et al., 2018) จึงควรศึกษาเพิ่มเติมถึงขนาด และรูปร่างของอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ได้เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของอนุภาคนาโนเงินจะนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ต่อไป

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินนั้นอย่างชัดเจน ดังนั้นจึงมีปัจจัยต่าง ๆ ที่ควรได้รับการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาประสิทธิภาพในการผลิตอนุภาคนาโนด้วยวิธีการทางชีวภาพต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Ahmad, A., et al. (2003). "Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **28**(4): 313-318.
- Anandalakshmi, K., et al. (2016). "Characterization of silver nanoparticles by green synthesis method using *Petalium murex* leaf extract and their antibacterial activity." Applied Nanoscience **6**(3): 399-408.
- Anil Kumar, S., et al. (2007). "Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO_3 ." Biotechnology Letters **29**(3): 439-445.
- Calderón-Jiménez, B., et al. (2017). "Silver Nanoparticles: Technological Advances, Societal Impacts, and Metrological Challenges." Frontiers in chemistry **5**: 6-6.
- De Matteis, V., et al. (2018). "Silver Nanoparticles: Synthetic Routes, In Vitro Toxicity and Theranostic Applications for Cancer Disease." Nanomaterials (Basel, Switzerland) **8**(5): 319.
- Devi, T. A., et al. (2016). "Photobiological synthesis of noble metal nanoparticles using *Hydrocotyle asiatica* and application as catalyst for the photodegradation of cationic dyes." Journal of Nanostructure in Chemistry **6**(1): 75-92.
- Durán, N., et al. (2005). "Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains." Journal of Nanobiotechnology **3**: 8-8.
- Emeka, E. E., et al. (2014). "Evaluation of antibacterial activities of silver nanoparticles green-synthesized using pineapple leaf (*Ananas comosus*)." Micron **57**: 1-5.
- Gurunathan, S., et al. (2009). "Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **74**(1): 328-335.
- Hamedi, S., et al. (2017). "Controlled biosynthesis of silver nanoparticles using nitrate reductase enzyme induction of filamentous fungus and their antibacterial evaluation." Artif Cells Nanomed Biotechnol **45**(8): 1588-1596.
- Harley, S. M. (1993). "Use of a Simple, Colorimetric Assay to Demonstrate Conditions for Induction of Nitrate Reductase in Plants." **55**(3): 161-164.

- Iravani, S., et al. (2014). "Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods." Research in pharmaceutical sciences **9**(6): 385-406.
- Karthik, C. and K. Radha (2012). "Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using enterobacter aerogenes: A kinetic approach." Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures **7**: 1007-1014.
- Kumar, B., et al. (2017). "Green synthesis of silver nanoparticles using Andean blackberry fruit extract." Saudi journal of biological sciences **24**(1): 45-50.
- Kumar, C. G. and S. K. Mamidyala (2011). "Extracellular synthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of Pseudomonas aeruginosa." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **84**(2): 462-466.
- Lee, S. H. and B.-H. Jun (2019). "Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine." International Journal of Molecular Sciences **20**(4): 865.
- Li, G., et al. (2012). "Fungus-Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Aspergillus terreus." International Journal of Molecular Sciences **13**(1).
- Mikhailov, O. V. and E. O. Mikhailova (2019). "Elemental Silver Nanoparticles: Biosynthesis and Bio Applications." Materials (Basel, Switzerland) **12**(19): 3177.
- Mohapatra, B., et al. (2015). "Rapid green synthesis of silver nanoparticles and nanorods using Piper nigrum extract." Journal of Alloys and Compounds **637**: 119-126.
- Mukherjee, K., et al. (2018). "Synthesis of silver nanoparticles by Bacillus clausii and computational profiling of nitrate reductase enzyme involved in production." Journal, genetic engineering & biotechnology **16**(2): 527-536.
- Mukherjee, P., et al. (2008). "Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a non- pathogenic and agriculturally important fungusT. asperillum." Nanotechnology **19**(7): 075103.
- Nakamura, S., et al. (2019). "Synthesis and Application of Silver Nanoparticles (AgNPs) for the Prevention of Infection in Healthcare Workers." International Journal of Molecular Sciences **20**(15): 3620.
- Otoni, C. A., et al. (2017). "Screening of filamentous fungi for antimicrobial silver nanoparticles synthesis." AMB Express **7**(1): 31-31.

- Prabhu, S. and E. K. Poulouse (2012). "Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects." International Nano Letters **2**(1): 32.
- Samadi, N., et al. (2009). "Intra/Extracellular Biosynthesis of Silver Nanoparticles by an Autochthonous Strain of *Proteus mirabilis* Isolated from Photographic Waste." Journal of Biomedical Nanotechnology **5**(3): 247-253.
- Shaligram, N. S., et al. (2009). "Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract from the compactin producing fungal strain." Process Biochemistry **44**(8): 939-943.
- Shanthi, S., et al. (2016). "Biosynthesis of silver nanoparticles using a probiotic *Bacillus licheniformis* Dab1 and their antibiofilm activity and toxicity effects in *Ceriodaphnia cornuta*." Microbial Pathogenesis **93**: 70-77.
- Siddiqi, K. S., et al. (2018). "A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties." Journal of Nanobiotechnology **16**(1): 14-14.
- Silva, L. P., et al. (2016). Green Synthesis of Metal Nanoparticles by Fungi: Current Trends and Challenges. Advances and Applications Through Fungal Nanobiotechnology. R. Prasad. Cham, Springer International Publishing: 71-89.
- Singh, R., et al. (2015). "Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications." Appl Microbiol Biotechnol **99**(11): 4579-4593.
- Velmurugan, P., et al. (2014). "Biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus subtilis* EWP-46 cell-free extract and evaluation of its antibacterial activity." Bioprocess and Biosystems Engineering **37**(8): 1527-1534.
- Vigneshwaran, N., et al. (2007). "Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*." Materials Letters **61**(6): 1413-1418.
- Zhang, X.-F., et al. (2016). "Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches." International Journal of Molecular Sciences **17**(9): 1534.
- Zomorodian, K., et al. (2016). "Biosynthesis and Characterization of Silver Nanoparticles by *Aspergillus* Species." Biomed Res Int **2016**: 5435397-5435397.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงราเหลว Potato dextrose broth (PDB)

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

ค่าความเป็นกรด-ด่าง (25°C) 5.1 ± 0.2

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

2. อาหารเลี้ยงราแข็ง Potato dextrose agar (PDA)

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

ผงวุ้น	15.0	กรัม
--------	------	------

ค่าความเป็นกรด-ด่าง (25°C) 5.1 ± 0.2

ละลายลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. Silver nitrate solution ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

Silver nitrate	0.85	กรัม
----------------	------	------

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ใช้คลูมิเนียมฟอสเฟตหุ้มหลอดเก็บรักษาในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. 0.8 M phosphate buffer pH 7.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

disodium hydrogen phosphate	9.544	กรัม
-----------------------------	-------	------

monosodium phosphate	1.764	กรัม
----------------------	-------	------

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เมื่อต้องการใช้ 0.1 M phosphate buffer ให้เจือจาง 0.8 M phosphate buffer กับน้ำในอัตราส่วน 1:8

3. Assay medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Potassium nitrate	0.3033	กรัม
-------------------	--------	------

Propanol	5	มิลลิลิตร
----------	---	-----------

เติม 0.1 mM phosphate buffer ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ใช้คลูมิเนียมฟอสเฟตหุ้มหลอดเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

4. 58 mM Sulfanilamide solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Sulfanilamide	0.9988	กรัม
---------------	--------	------

ละลายใน 3M HCL 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ใช้คลูมิเนียมฟอสเฟตหุ้มหลอดเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

5. 25 mM Potassium nitrate solution ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Potassium nitrate	2.5275	กรัม
-------------------	--------	------

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

6. 1 mM Sodium nitrite solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Sodium nitrite 0.069 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

7. 0.77 mM N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride solution (NEED)

ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

NEED 0.0199 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ใช้ลูมิเนียมฟอสฟอรัสหุ้มรอบขวดเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ค

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ลักษณะและองค์ประกอบของเครื่องนาโนดรอป (NanoDrop2000) ของบริษัท Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา เครื่องนาโนดรอปที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงนี้วัดที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง



ขั้นตอนการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องนาโนดรอป (NanoDrop2000) มีดังนี้

1. เปิดโปรแกรม NanoDrop 2000 ในคอมพิวเตอร์ที่เชื่อมต่อไว้
2. เลือกวิธีการวัดเป็น UV-visible
3. ตั้งค่าตัวแปรต่าง ๆ ที่ต้องการจะวัด เช่น ความยาวคลื่น
4. ทำความสะอาดแท่นวัด (Pedestal) ด้วยน้ำกลั่นก่อนการใช้งานทุกครั้ง
5. หยดสารละลาย Blank ที่แท่นวัด และคลิกที่ปุ่ม Blank เพื่อตั้งค่า Blank
6. หยดสารละลาย Blank ออกด้วยกระดาษเช็ดทำความสะอาด Kimtech และหยดตัวอย่าง (Sample) ลงบนแท่นวัด จากนั้นคลิก Measure เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง
7. อ่านผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงจากโปรแกรมบนหน้าจอคอมพิวเตอร์

คำแนะนำ

1. ควร Re blank ทุก 30 นาที
2. ทำความสะอาดแท่นวัดด้วยน้ำกลั่นทุกครั้งเมื่อเปลี่ยนตัวอย่าง
3. ห้ามนำของแข็งไปชูดแท่นวัด

ภาคผนวก ง

ข้อมูลจากการทดลอง

ตารางที่ 6.1 แสดงปริมาณการชักนำการหลั่งเอนไซม์ในเตรทรีดักเทสของ *A. niger* เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับชุดควบคุมจากการทดลองครั้งที่ 1

	ค่าการดูดกลืนแสง	ความเข้มข้นของไนไตรท์	จำนวนเท่า
Control	0	0.0024	1.00
5mM KNO_3	-0.004	0.0011	0.47
10mM KNO_3	0.005	0.0041	1.67
15mM KNO_3	0.039	0.0152	6.20
20mM KNO_3	0.069	0.0250	10.20
25mM KNO_3	0.126	0.0436	17.80

ตารางที่ 6.2 แสดงปริมาณการชักนำการหลั่งเอนไซม์ในเตรทรีดักเทสของ *A. niger* เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับชุดควบคุมจากการทดลองครั้งที่ 2

	ค่าการดูดกลืนแสง	ความเข้มข้นของไนไตรท์	จำนวนเท่า
Control	0.007	0.0047	1.00
5mM KNO_3	0.016	0.0077	1.62
10mM KNO_3	0.025	0.0106	2.24
15mM KNO_3	0.023	0.0100	2.10
20mM KNO_3	0.061	0.0224	4.72
25mM KNO_3	0.062	0.0227	4.79

ตารางที่ 6.3 แสดงปริมาณการชักนำการหลั่งเอนไซม์ในเตรทรีดักเทสของ *A. niger* เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับชุดควบคุมจากการทดลองครั้งที่ 3

	ค่าการดูดกลืนแสง	ความเข้มข้นของไนไตรท์	จำนวนเท่า
Control	0.005	0.0041	1.00
5mM KNO_3	0.058	0.0214	5.24
10mM KNO_3	0.049	0.0184	4.52
15mM KNO_3	0.069	0.0250	6.12
20mM KNO_3	0.101	0.0354	8.68
25mM KNO_3	0.131	0.0452	11.08

ตารางที่ 6.4 แสดงปริมาณการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินของ *A. niger* เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับชุดควบคุมจากการทดลองครั้งที่ 1

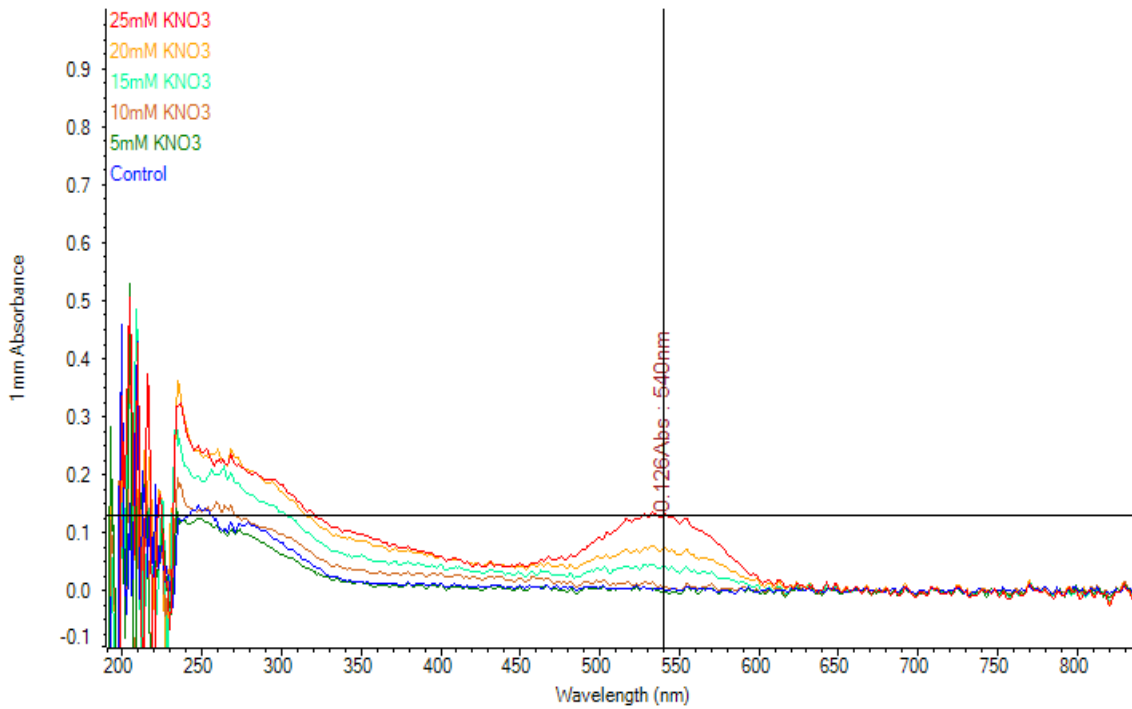
	λ_{max}	ค่าการดูดกลืนแสง	จำนวนเท่า
Control	410	0.065	1.00
5mM KNO_3	400	0.035	0.54
10mM KNO_3	400	0.172	2.65
15mM KNO_3	401	0.292	4.49
20mM KNO_3	401	0.323	4.97
25mM KNO_3	401	0.301	4.63

ตารางที่ 6.5 แสดงปริมาณการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินของ *A. niger* เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับชุดควบคุมจากการทดลองครั้งที่ 2

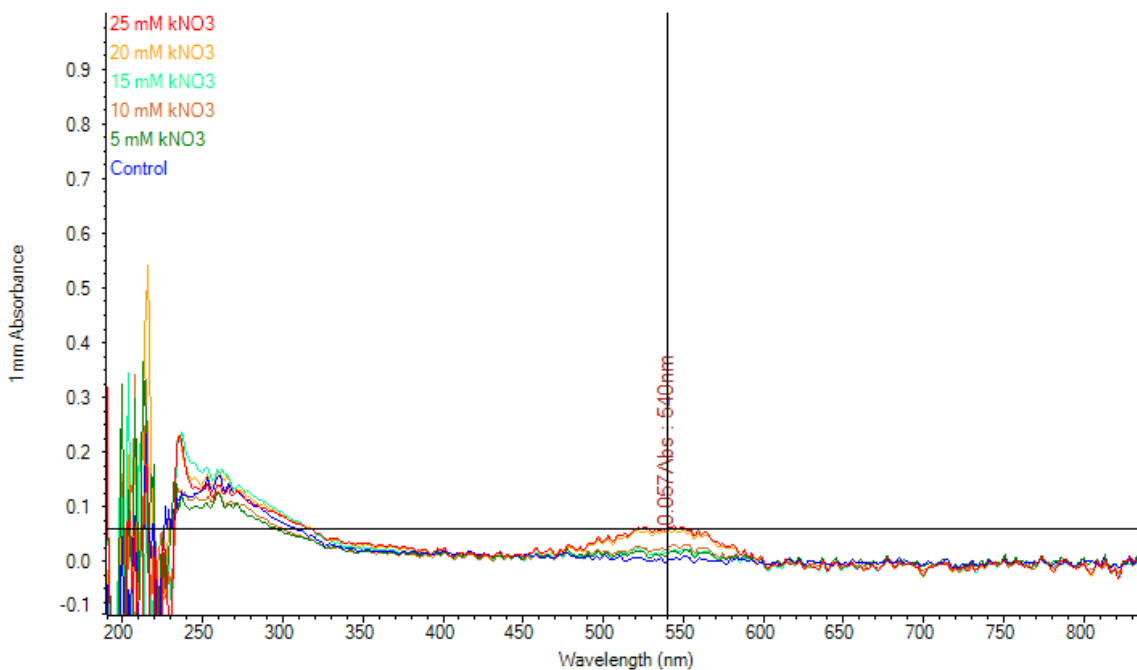
	λ_{\max}	ค่าการดูดกลืนแสง	จำนวนเท่า
Control	402	0.15	1.00
5mM KNO_3	413	0.15	1.00
10mM KNO_3	441	0.152	1.01
15mM KNO_3	416	0.194	1.29
20mM KNO_3	402	0.185	1.23
25mM KNO_3	413	0.193	1.29

ตารางที่ 6.6 แสดงปริมาณการสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินของ *A. niger* เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับชุดควบคุมจากการทดลองครั้งที่ 3

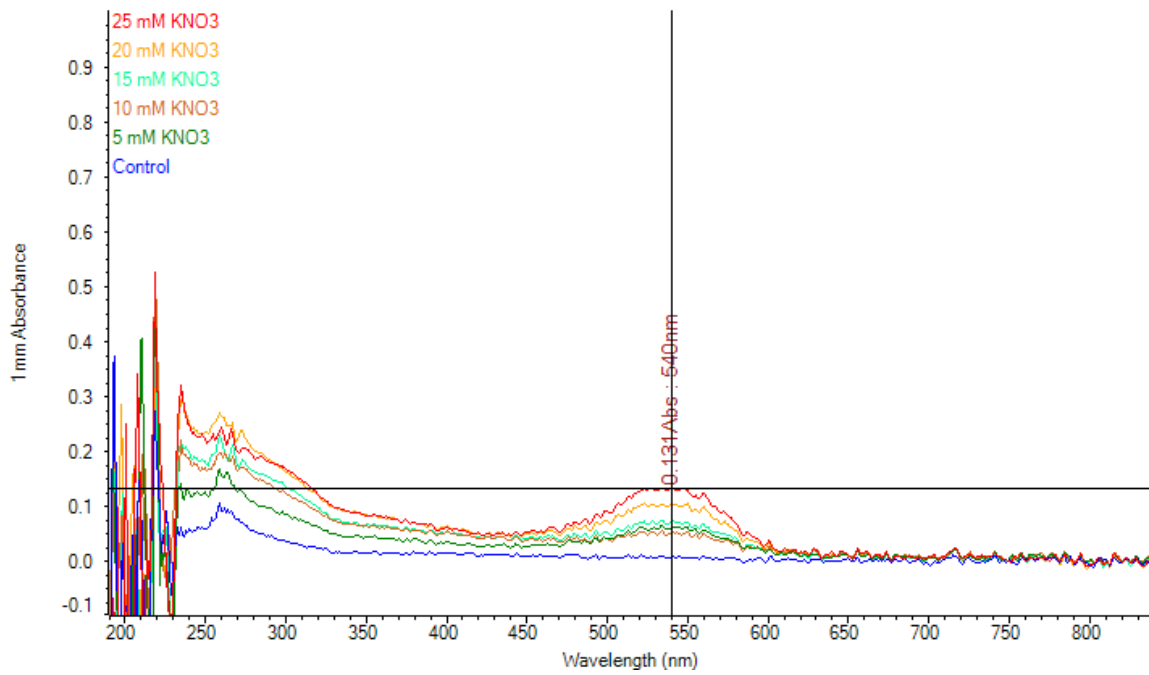
	λ_{\max}	ค่าการดูดกลืนแสง	จำนวนเท่า
Control	446	0.121	1.00
5mM KNO_3	400	0.17	1.40
10mM KNO_3	416	0.185	1.53
15mM KNO_3	414	0.315	2.60
20mM KNO_3	414	0.311	2.57
25mM KNO_3	414	0.333	2.75



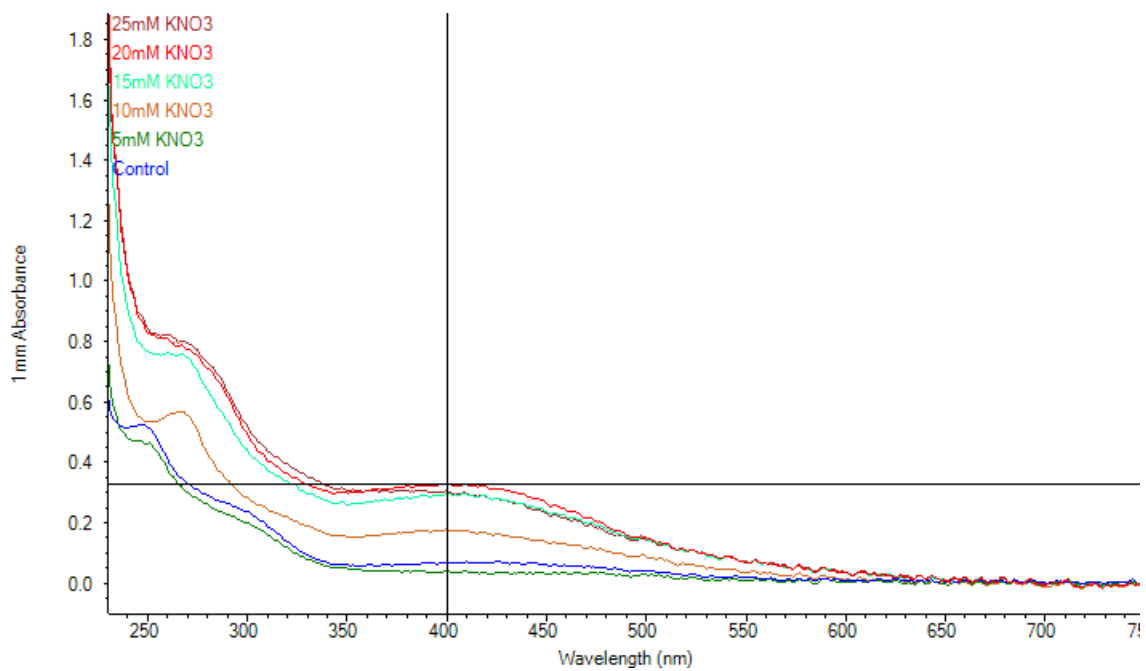
รูปที่ 6.1 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ fungal filtrate ของ *A. niger* เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสจากการทดลองครั้งที่ 1



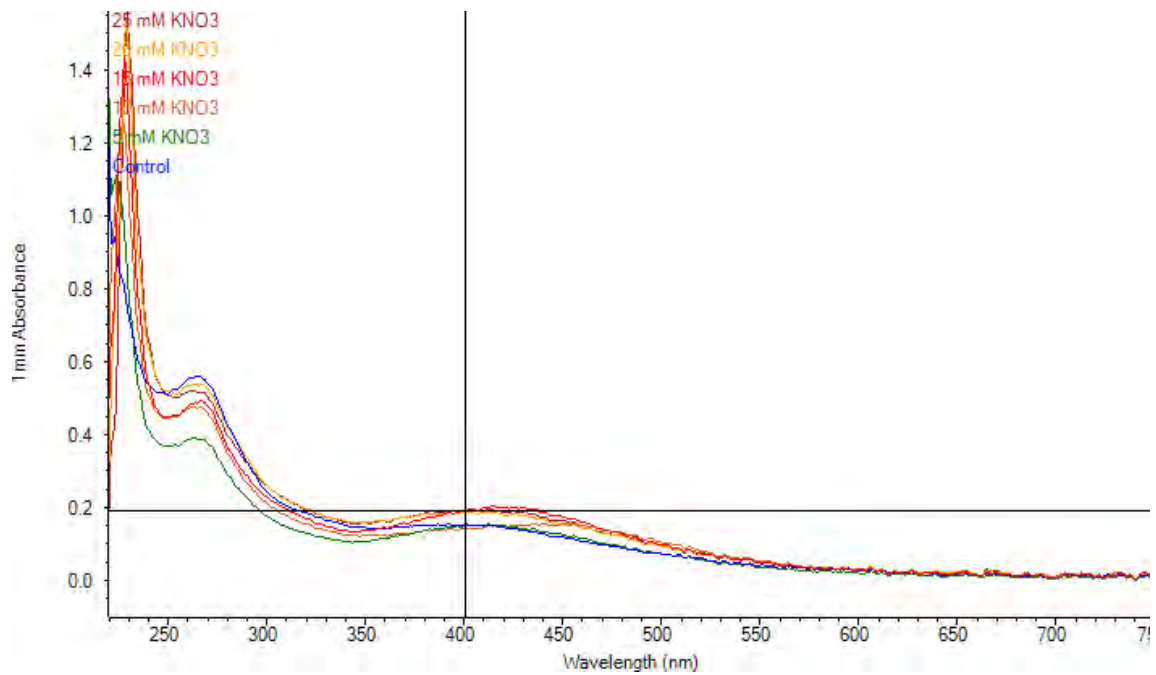
รูปที่ 6.2 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ fungal filtrate ของ *A. niger* เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสจากการทดลองครั้งที่ 2



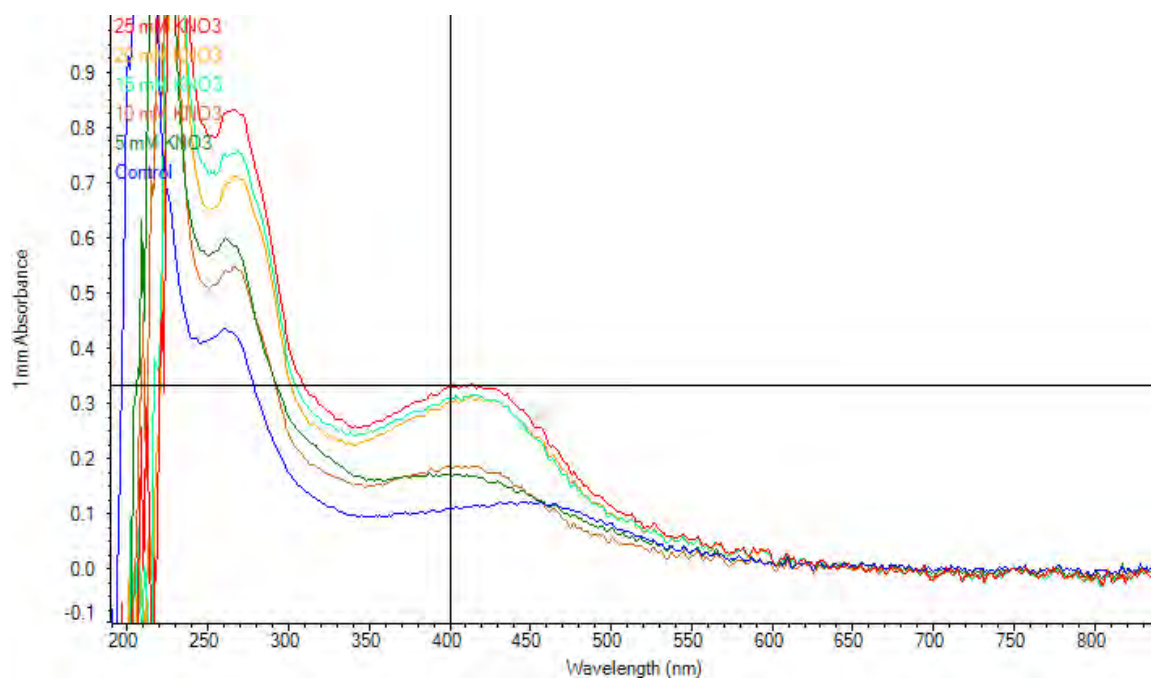
รูปที่ 6.3 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ fungal filtrate ของ *A. niger* เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ไนเตรรีดักเตสจากการทดลองครั้งที่ 3



รูปที่ 6.4 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์จาก *A. niger* เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากการทดลองครั้งที่ 1



รูปที่ 6.5 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์จาก *A. niger* เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากการทดลองครั้งที่ 2



รูปที่ 6.6 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์จาก *A. niger* เมื่อเลี้ยงใน KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากการทดลองครั้งที่ 3