

ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์
ทางชีวภาพจากสารสกัดของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF THE NOVEL
SILVER NANOPARTICLES BIOSYNTHESIS FROM
Cordyceps militaris FRUITING BODY EXTRACT

ธนาวัฒน์ อินตา
ปรียาภรณ์ ใจนันทะ

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์
ทางชีวภาพจากสารสกัดของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF THE NOVEL
SILVER NANOPARTICLES BIOSYNTHESIS FROM
Cordyceps militaris FRUITING BODY EXTRACT

ธนาวัฒน์ อินตา
ปรียาภรณ์ ใจนันทะ

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF THE NOVEL
SILVER NANOPARTICLES BIOSYNTHESIS FROM
Cordyceps militaris FRUITING BODY EXTRACT

THANAWAT INTA
PREEYAPORN JAINANTA

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อโครงการพิเศษ ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพ
 จากสารสกัดของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง
 Antibacterial activities of the novel silver nanoparticles
 biosynthesis from *Cordyceps militaris* fruiting body extract

ชื่อนักศึกษา นายธนาวัฒน์ อินตา รหัสนักศึกษา 57050698
 นางสาวปรียาภรณ์ ใจนันทะ รหัสนักศึกษา 57050724

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
 ภาควิชา ชีววิทยา
 ปีการศึกษา 2560
 อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์อารี ฤทธิบุรณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
 โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขา
 เทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.มารีสา จาคูพรพิพัฒน์ ประธานกรรมการ	
ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ กรรมการ	
รศ.อารี ฤทธิบุรณ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพ จากสารสกัดของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง
ชื่อนักศึกษา	นายธนาวัฒน์ อินตา รหัสนักศึกษา 57050698 นางสาวปรียาภรณ์ ใจนันทะ รหัสนักศึกษา 57050724
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์อารี ฤทธิบุรณ์

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง จากนั้นนำมาสกัดสารคอร์โดเซปินและวิเคราะห์สารคอร์โดเซปินในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง ผลที่ได้จากการทดลองพบว่าปริมาณคอร์โดเซปินเท่ากับ 4.11 มิลลิกรัมต่อ 1 กรัม น้ำหนักแห้งของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาสังเคราะห์เป็นอนุภาคนาโนของเงินและนำมาวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนของเงิน พบว่าอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 74.31 และ 14.21 นาโนเมตร ตามลำดับ สำหรับผลการดูดกลืนสเปกตรัมซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง spectrophotometer พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 418 และ 419 นาโนเมตร ตามลำดับ และเมื่อนำไปศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบนผิวหนังทั้ง 3 ชนิด พบว่าอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 10 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ดี และยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (*P. aeruginosa*) ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ *S. epidermidis*) โดยบริเวณที่มีการยับยั้งมีค่าเท่ากับ 17.37 15.27 และ 14.53 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่อนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 มิลลิโมลาร์ และสารสกัดจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ จากนั้นนำอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 10 มิลลิโมลาร์มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ *S. epidermidis*) คือ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (*P. aeruginosa*) คือ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สุดท้ายนำอนุภาคนาโนของเงินที่ได้ มาใช้ในการทำสบู่อะบบยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย

คำสำคัญ : เห็ดถั่งเช่าสีทอง สารคอร์โดเซปิน อนุภาคนาโนของเงิน แบคทีเรียก่อโรคบนผิวหนัง ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย สบู่

Title	Antibacterial activities of the novel silver nanoparticles biosynthesis from <i>Cordyceps militaris</i> fruiting body extract
Students	Mr.Thanawat Inta Student ID 57050698 Miss Preeyaporn Jainanta Student ID 57050724
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2017
Advisor	Assoc. Prof. Aree Rittiboon

Abstract

In this study, Fruiting body of *C. militaris* was cultivated. The cordycepin was extracted, then it was analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC). The result of experiment, it was found that the cordycepin 4.11 mg/1 g dry weight of *C. militaris*. Then, the extract was synthesize as silver nanoparticles and the specific characteristics were analyzed, found that the silver nanoparticles 1 and 10 mM were prepared from of silver nitrate solution have diameters about 74.31 and 14.21 nm, respectively. The absorption spectrums were analyzed using spectrophotometer found that absorption maximum at 418 and 419 nm, respectively. And to study the antibacterial activity effect three type of Pathogenic bacteria on the skin. Found that the silver nanoparticles 10 mM were prepared from of silver nitrate solution was inhibited the growth of bacteria as well. Moreover, it could inhibit Gram-negative bacteria (*P. aeruginosa*) more than Gram-positive bacteria (*S. aureus* and *S. epidermidis*). The inhibition zone test of silver nanoparticles exhibited excellent activity against was determined as 17.37, 15.27 and 14.53 mm, respectively. Statistically significant. At the same time, the silver nanoparticles 1 mM were prepared from of silver nitrate solution and fruiting body of *C. militaris* extract couldn't inhibit the growth of bacteria. Then the silver nanoparticles 10 mM were prepared from of silver nitrate solution to study the minimal inhibitory concentration found that the minimum concentration could inhibit Gram-positive bacteria (*S. aureus* and *S. epidermidis*) is 1000 µg/ml. and Gram-negative bacteria (*P. aeruginosa*) is 500 µg/ml. Finally, the silver nanoparticles were used to make soap for inhibit the growth of bacteria.

Keywords : *Cordyceps militaris*, cordycepin, silver nanoparticles, Pathogenic bacteria on the skin, Antibacterial activity, Soap

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเล่มนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจาก รศ.อารี ฤทธิบุรณ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ได้ให้คำแนะนำ คำปรึกษา และข้อคิดเห็นต่างๆ ในทุกๆด้าน ตลอดจนแนวทางการแก้ปัญหาต่างๆ อันเป็นประโยชน์อย่างมากในการทำงานโครงการพิเศษเล่มนี้ ทางคณะผู้จัดทำจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.มารีสา จาตุพรพิพัฒน์ และ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการ และกรรมการ อีกทั้งยังคอยให้คำแนะนำ ปรับปรุง แก้ไขในการทำโครงการพิเศษ

ขอขอบพระคุณ นางสาวศันสนีย์ ภูประกิจ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำในเรื่องของการใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง

ขอขอบพระคุณ นายต้นติกร เต็มแก้ว และนางสาวจิราภรณ์ พิมพ์ทอง ที่คอยให้คำปรึกษาแนะนำเรื่องของเครื่องมือในการใช้งานต่างๆ และข้อมูลต่างๆ ที่ใช้ในการทำโครงการพิเศษ

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา นักศึกษาปริญญาโท และเพื่อนๆ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพประจำห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงราที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ จนโครงการพิเศษสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณพ่อ แม่ ผู้ปกครอง ที่สนับสนุน คอยรับฟังปัญหา และให้กำลังใจคณะผู้จัดทำเสมอมาจนกระทั่งโครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ธนาวัฒน์ อินตา
ปรียาภรณ์ ใจนันทะ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ถังเช่าสีทอง (<i>Cordyceps militaris</i>).....	4
2.1.1 อนุกรมวิธานของเห็ดถังเช่าสีทอง.....	4
2.1.2 สรรพคุณของเห็ดถังเช่าสีทอง.....	4
2.2 สารคอร์ไดเซปิน (cordycepin).....	5
2.3 การเพาะเลี้ยงเห็ดถังเช่า.....	5
2.3.1 การเพาะด้วยตัวหนอน.....	5
2.3.2 การเพาะด้วยอาหาร.....	6
2.3.3 แหล่งอาหาร.....	6
2.3.3.1 แหล่งคาร์บอน.....	6
2.3.3.2 แหล่งไนโตรเจน.....	6
2.3.3.3 แหล่งเกลือแร่.....	6
2.3.4 อุณหภูมิ.....	6
2.3.5 ค่าพีเอช.....	7
2.3.6 อายุของหัวเชื้อ.....	7
2.3.7 อากาศและความชื้น.....	7
2.3.8 แสง.....	7
2.3.9 แสงไฟแอลอีดี.....	7
2.4 อนุภาคนาโนของเงิน (Silver Nanoparticles).....	8

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน.....	9
2.5.1 วิธีการทางเคมี (chemical approach)	9
2.5.2 วิธีการทางกายภาพ (physical approach).....	9
2.5.3 วิธีการทางชีวภาพ (biological approach)	10
2.6 กลไกการทำงานของอนุภาคนาโนของเงิน.....	10
2.7 แบคทีเรียก่อโรคบนผิวหนัง.....	12
2.7.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.7.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.7.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	15
2.8 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Antibacterial activity).....	16
2.8.1 Dilution Method.....	16
2.8.2 Diffusion Method.....	16
2.9 สปุ่.....	16
2.9.1 ประเภทของผลิตภัณฑ์สปู่.....	18
2.9.2 ส่วนประกอบที่สำคัญของผลิตภัณฑ์สปู่.....	18
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	18
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	21
3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี.....	21
3.1.1 วัสดุดิบ.....	21
3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์.....	21
3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	21
3.1.4 อุปกรณ์ และเครื่องมือ.....	21
3.1.5 สารเคมี.....	22
3.2 การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	23
3.2.1 การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยหนอนในขวดแก้ว.....	23
3.2.2 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารแข็ง PDA เสริม.....	23
3.2.3 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารเหลว PDB เสริม.....	23
3.2.4 การถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลว PDB เสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแข็ง ที่มีข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นแหล่งคาร์บอน.....	23
3.3 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	23

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.1 การเตรียมตัวอย่าง.....	23
3.3.2 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	23
3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	24
3.4.1 การเตรียมตัวอย่าง.....	24
3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	24
3.5 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน.....	24
3.6 การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้เทคนิค UV-Visible Spectrophotometry.....	24
3.7 การวิเคราะห์ลักษณะ ขนาด และธาตุต่างๆ ของอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้กล้อง จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM).....	24
3.8 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย.....	25
3.8.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย.....	25
3.8.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion.....	25
3.8.3 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย.....	25
3.8.4 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้.....	26
3.9 การนำอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพไปใช้ในการทำสบู่.....	26
3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	26
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	27
4.1 ผลของการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	27
4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	28
4.3 ผลการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินและการวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาค นาโนของเงินโดยใช้เทคนิค UV-Visible Spectrophotometry.....	28
4.4 ผลการวิเคราะห์ลักษณะ ขนาด และธาตุต่างๆ ของอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้กล้อง จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM).....	30
4.5 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion.....	34
4.6 ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย.....	36
4.7 ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้.....	36
4.8 ผลการนำอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพไปใช้ในการทำสบู่.....	36
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	39
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	39

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	39
เอกสารอ้างอิง.....	41
ภาคผนวก.....	45
ภาคผนวก ก สูตรอาหาร.....	45
ภาคผนวก ข ขั้นตอนและรูปภาพการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	48
ภาคผนวก ค ขั้นตอนและรูปภาพการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน.....	52
ภาคผนวก ง ขั้นตอนและรูปภาพการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย.....	53
ภาคผนวก จ ขั้นตอนและรูปภาพการทำสบู่อ.....	56
ภาคผนวก ฉ การวิเคราะห์และการคำนวณ.....	58
ภาคผนวก ช การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	64
ภาคผนวก ซ ผลการทดลอง.....	67

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ปริมาณธาตุๆ ของอนุภาคนาโนของเงิน ที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 และ 10 มิลลิโมลาร์.....	34
4.2 ผลของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่ยับยั้ง (มิลลิเมตร) ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค บนผิวหนังต่างๆ.....	35
4.3 ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย.....	38
4.4 ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้.....	38

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ถังเช่าสีทอง (<i>Cordyceps militaris</i>).....	4
2.2 โครงสร้างสารคอร์ไดเซปิน.....	5
2.3 อนุภาคนาโนของเงิน (Silver Nanoparticles).....	8
2.4 แสดงกลไกการทำงานของอนุภาคนาโนของเงินต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย.....	11
2.5 ลักษณะโครงสร้างของผลึกของอนุภาคนาโนซิลเวอร์.....	11
2.6 จุลินทรีย์บนผิวหนัง.....	13
2.7 ลักษณะเชื้อแบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.8 ลักษณะเชื้อแบคทีเรีย <i>Staphylococcus epidermidis</i>	14
2.9 ลักษณะเชื้อแบคทีเรีย <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
2.10 การเกิดปฏิกิริยาซาฟอนนิฟิเคชัน (saponification).....	17
2.11 สบู่.....	17
4.1 ลักษณะเส้นใยเห็ดถังเช่าสีทองที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA เสริม ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 14 วัน.....	27
4.2 ลักษณะเส้นใยเห็ดถังเช่าสีทองที่เจริญในอาหารเหลว PDB เสริมในที่มืด ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	27
4.3 ลักษณะของเห็ดถังเช่าสีทองในอาหารเหลว PDB เสริม ในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 45 วัน.....	28
4.4 การเปลี่ยนสีของสารละลายก่อนและหลังการเติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์.....	29
4.5 การดูดกลืนสเปกตรัมของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ (ข) การดูดกลืนสเปกตรัมของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์.....	30
4.6 ลักษณะและขนาดของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 มิลลิโมลาร์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ก) ที่กำลังขยาย 40000 เท่า (ข) ที่กำลังขยาย 5000 เท่า.....	31
4.7 ลักษณะและขนาดของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 10 มิลลิโมลาร์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ก) ที่กำลังขยาย 20000 เท่า (ข) ที่กำลังขยาย 5000 เท่า.....	32
4.8 ธาตุต่างๆ ของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	33
4.9 ผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion ของเชื้อแบคทีเรีย.....	35
4.10 ลักษณะภายนอกของสบู่.....	36
4.11 ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย.....	36

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ผิวหนังของมนุษย์เป็นที่อยู่ของจุลินทรีย์มากมายหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศและไม่ต้องการอากาศ จุลินทรีย์ก่อโรคและไม่ก่อโรค รวมทั้งเชื้อราและยีสต์ ซึ่งปกติแล้วจุลินทรีย์เหล่านี้จะไม่ก่ออันตรายต่อผิวหนังเนื่องจากผิวหนังจะมีกลไกการป้องกันตัวเองอยู่แล้ว ยกเว้นหากผิวหนังนั้นเกิดการผดผื่นหรือได้รับบาดเจ็บจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้แทรกซึมตามผิวหนังที่บาดเจ็บเข้าไปในร่างกายทำให้สามารถก่อโรคได้ และโดยทั่วไปแล้วเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis* และ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแทรกซึมแล้วจะก่อให้เกิดการติดเชื้อของผิวหนัง (Walker และคณะ 2004; Bowersox และ John, 1999) ซึ่งจะเห็นได้ว่ายาที่ใช้รักษาการติดเชื้อของผิวหนังมีหลายขนาน อีกทั้งยังมีผลข้างเคียงและราคาค่อนข้างแพง เนื่องจากราคาและช่วงระยะเวลาในการรักษาที่นานทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง และหากมีการรับประทานยาปฏิชีวนะในช่วงอายุที่เร็วเกินไปหรือมีการใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มเดิมๆ อย่างต่อเนื่องโดยไม่จำเป็น อาจส่งผลให้เชื้อเกิดการดื้อต่อยาและเป็นภาวะเสี่ยงต่อการรักษาโรคร้ายแรงอื่นๆได้ในอนาคต ด้วยเหตุนี้เองจึงเป็นการพัฒนาเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อของผิวหนัง

โดยอนุภาคนาโนของเงินได้มีการนำมาใช้ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์และมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง สิ่งทอและทางการแพทย์ ซึ่งได้รับความสนใจและได้พัฒนาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินผ่านสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกัน เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ สาหร่ายหรือพืช เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ พบว่ากระบวนการทางชีวภาพมีข้อดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระหว่างการผลิตอนุภาคนาโนของเงิน องค์ประกอบในสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตจะทำหน้าที่เป็นสาร reducing และรักษาเสถียรภาพ นอกจากนี้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากการสกัดทำให้อนุภาคนาโน (NPS) มีคุณสมบัติเฉพาะและสามารถปรับปรุงลักษณะได้ ดังนั้นการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินจึงเป็นแนวคิดสำหรับการพัฒนาสารที่มีฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Wang และคณะ, 2016)

เชื้อราเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายและสามารถนำไปใช้ได้ทุกสภาพแวดล้อม โดยการใช้เชื้อราที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากเชื้อราที่มีปริมาณเอนไซม์และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูง ซึ่งทำหน้าที่เป็นสาร reducing และสาร capping agents ระหว่างการผลิตอนุภาคนาโน แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีเชื้อราเพียงไม่กี่สายพันธุ์ เช่น *Aspergillus clavatus*, *Penicillium citrinum*, *Pleurotus ostreatus* และ *Schizophyllum commune* ที่มีการนำมาใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน (Wang และคณะ, 2016) โดยเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) เป็นเชื้อราแมลง (Entomopathogenicfungi) ในกลุ่ม Ascomycetes ซึ่งมีฤทธิ์ทางยาและประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิด เช่น โมโนแซคคาไรด์ ไดแซคคาไรด์ โพลีแซคคาไรด์ คอร์โดเซปิน กรดคอร์โดเซปิก อะดีโนซีน กรดอะมิโน วิตามิน และแร่ธาตุหลายชนิด มีงานวิจัยหลายฉบับยืนยันว่าเห็ดถั่งเช่าสีทองมีคุณสมบัติเทียบเท่ากับเห็ดถั่งเช่าทิเบต ซึ่งเส้นใยของเห็ดถั่งเช่าสีทองนั้นยังสามารถผลิตคอร์โดเซปิน ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่มีพื้นฐานมาจากกรดนิวคลีอิกถือว่าเป็นเมแทบอลิต์

ทุติยภูมิ (secondary metabolite) มีสรรพคุณทางยาช่วยต้านการเกิดเนื้องอก ยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็ง ป้องกันไวรัส ต้านการอักเสบ ต้านการสร้างพังผืดที่ตับ ป้องกันการเสื่อมของปอดและมีฤทธิ์ทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (Nurmila และคณะ, 2016) จึงเป็นที่น่าสนใจสำหรับการต้านเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้สารสกัดจากดอกของเห็ดถั่งเช่าสีทองในการสังเคราะห์เป็นอนุภาคนาโนของเงิน

ด้วยเหตุนี้เองจึงได้สนใจที่จะนำดอกของเห็ดถั่งเช่าสีทองซึ่งมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ โดยเฉพาะคอร์โคไคเซปินที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มี การศึกษาการนำอนุภาคนาโนของเงินจากสารสกัดของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองมาใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคบนผิวหนัง จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยได้เล็งเห็นถึงความสำคัญในการนำสมุนไพรมูลค่าดั้งเดิมเข้ามาใช้ในการดูแลรักษาการติดเชื้อของผิวหนัง โดยการนำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคบนผิวหนัง ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และนำมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคบนผิวหนัง ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบของอนุภาคนาโนของเงินจากสารสกัดของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Agar disc diffusion การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal inhibitory concentration, MIC) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC) คาดว่าผลที่ได้จากการศึกษาเบื้องต้นนี้จะประโยชน์ในการนำไปสู่งานวิจัยและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการดูแลการติดเชื้อที่ผิวหนังต่อไป เช่น การนำไปทำสบู่หรือครีมบำรุงผิว เป็นต้น อีกทั้งยังลดปัญหาการดื้อยาของเชื้อ ช่วยเพิ่มมูลค่าและสนับสนุนการใช้สารสกัดของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1.2.1 เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์ปริมาณสารคอร์โคไคเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

1.2.2 เพื่อศึกษาวิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพจากสารสกัดของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

1.2.3 เพื่อศึกษาและวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ ได้แก่ รูปร่าง ขนาด และธาตุต่าง ๆ

1.2.4 เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคบนผิวหนังของอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพจากสารสกัดของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง ด้วยวิธี Agar disc diffusion

1.2.5 เพื่อศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคบนผิวหนัง (Minimal inhibitory concentration, MIC) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคบนผิวหนังได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC)

1.2.6 เพื่อศึกษาการนำอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพไปใช้ในการทำสบู่เพื่อยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยหน่อใหม่ในขวดแก้วจนเกิดเป็นดอกเห็ด จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA เป็นเวลา 14 วัน แล้วนำมาคั่วลงในอาหารเหลว

PDB 3 วัน และสุดท้ายทำการถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลว PDB เสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นแหล่งคาร์บอน

1.3.2 ทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.3.3 นำสารสกัดของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้มาสังเคราะห์เป็นอนุภาคนาโนของเงิน โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ และนำไปวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนของเงิน

1.3.4 ทำการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของเงินด้วยวิธี Agar disc diffusion หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal inhibitory concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC) จากนั้นนำอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพมาทำสบู่

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เพื่อให้ทราบถึงวิธีการเพาะเลี้ยงและกระบวนการสกัดสารคอร์โดเซปินของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

1.4.2 เพื่อให้ทราบถึงวิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินจากสารสกัดของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

1.4.3 สามารถนำอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพไปใช้ในการทำผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่า

1.4.4 เพื่อให้ทราบความเข้มข้นต่ำสุดที่อนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพสามารถยับยั้งได้

1.4.5 เพื่อให้ได้อนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ด้วยกระบวนการทางชีวภาพที่มีความเสถียร และมีคุณสมบัติเฉพาะ

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ถังเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*)

เห็ดถังเช่าสีทอง ดังแสดงในรูปที่ 2.1 เป็นเชื้อราแมลง (Entomopathogenic fungi) ในกลุ่ม Ascomycetes มีฤทธิ์ทางยาประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิด เช่น โมโนแซคคาไรด์ ไดแซคคาไรด์ โพลีแซคคาไรด์ (ปีต้า-กลูแคน) คอร์โดเซปิน กรดคอร์โดเซปิก อะดีโนซีน กรดอะมิโน วิตามิน และแร่ธาตุหลายชนิด มีการเพาะเพื่อการค้ามาหลายสิบปีที่ประเทศจีน ญี่ปุ่น เกาหลี มาเลเซีย และอเมริกา มีการรายงานหลายฉบับยืนยันว่าเห็ดถังเช่าสีทองมีคุณสมบัติเทียบเท่าเห็ดถังเช่าทิเบต (จิโรจน์, 2556)



รูปที่ 2.1 ถังเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*)

ที่มา : <http://www.cordysine.com> (13 มีนาคม 2561)

2.1.1 อนุกรมวิธานของเห็ดถังเช่าสีทอง

อนุกรมวิธาน (Linnaeus และ Fries, 1818)

อาณาจักร	Fungi
ไฟลัม	Ascomycota
ชั้น	Sordariomycetes
อันดับ	Hypocreales
วงศ์	Cordycipitaceae
สกุล	Cordyceps
ชนิด	militaris
ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Cordyceps militaris</i>

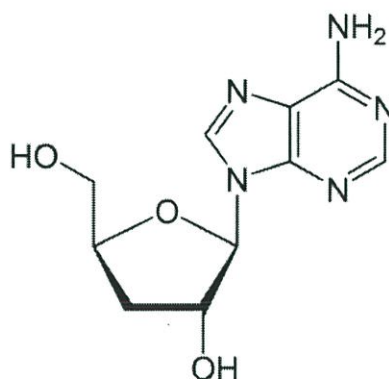
2.1.2 สรรพคุณของเห็ดถังเช่าสีทอง

มีสรรพคุณทางยาช่วยบำรุงร่างกายให้แข็งแรง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน ต้านการเกิดเนื้องอกและเซลล์มะเร็ง เพิ่มการไหลเวียนเลือด ช่วยลดความดันโลหิตสูง ลดอาการอ่อนเพลีย หอบหืด บำรุงระบบประสาท เพิ่มความแข็งแรงของร่างกายให้ต้านทานต่อแบคทีเรีย และไวรัส ช่วยให้อสุจิแข็งแรง เหมาะสำหรับบำรุงกำลังหลังการฟื้นไข้ ลดไขมันในเส้นเลือด

บำรุงตับและไต จึงทำให้เป็นที่ต้องการอย่างมากของตลาดและถูกใช้ในรูปของยาหรืออาหารเสริมสุขภาพ (จารุวรรณ และคณะ, 2558)

2.2 สารคอร์ไดเซปิน (cordycepin)

สารคอร์ไดเซปิน หรือ 3'-ดีออกซีอะดีโนซีน เป็นอนุพันธ์ของนิวคลีโอไซด์ อะดีโนซีนที่แตกต่างกันคือไม่มีหมู่ของไฮดรอกซีในตำแหน่งที่ 3 ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ซึ่งมีสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ $C_{10}H_{13}N_5O_3$ มีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 225.5 องศาเซลเซียส



รูปที่ 2.2 โครงสร้างสารคอร์ไดเซปิน

ที่มา : <https://en.wikipedia.org/wiki/Cordycepin> (13 มีนาคม 2561)

2.2.1 สรรพคุณของคอร์ไดเซปิน

สารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าทำให้การลดคลอเลสเตอรอลและไขมันไตรกลีเซอไรด์ เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยการลดปริมาณของคลอเลสเตอรอลชนิดไม่ดี (Low-density lipoprotein; LDL) และเพิ่มปริมาณคลอเลสเตอรอลชนิดดี (High-density cholesterol; HDL) พร้อมทั้งช่วยขยายหลอดเลือด ลดความหนืดของเลือด (Plasma viscosity) และป้องกันการเกิดลิ่มเลือดในหลอดเลือดแดง (Prevention of anti-thrombosis) ส่งผลให้การไหลเวียนของโลหิตดีขึ้น เลือดจึงส่งไปเลี้ยงหัวใจและสมองได้อย่างมีประสิทธิภาพถือเป็นการป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจและสมองได้เป็นอย่างดี อีกทั้งยังมีฤทธิ์บำรุงและฟื้นฟูระบบการทำงานของไตและปอด ช่วยฟื้นฟูสมรรถนะของไต ช่วยบรรเทาอาการไตอักเสบและนิ่วในไต

2.3 การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่า

2.3.1 การเพาะด้วยตัวหนอน

เป็นวิธีการเพาะเลี้ยงที่เลียนแบบธรรมชาติ โดยนำเชื้อไปใส่ลงในตัวหนอนสกุล *Bombyx* เมื่อหนอนได้รับเชื้อแล้วเส้นใยของเห็ดก็จะงอกออกมาจากตัวหนอน ซึ่งหนอนที่ใช้เพาะเลี้ยงอาจเก็บมาจากธรรมชาติ โดยการเก็บรังไหมมาแล้วนำตัวหนอนออกมาใช้หรืออาจทำการเก็บไข่ผีเสื้อมาทำการเพาะจนได้ตัวหนอน การเพาะด้วยตัวหนอนทำได้ทั้งในสภาพปลอดเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงในขวดแก้ว หรืออาจเพาะในโรงเรือนที่สะอาดและสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมภายในได้ด้วย

2.3.2 การเพาะด้วยอาหาร

หีดถั่งเช่าแต่ละชนิดต้องการอาหารที่ไม่เหมือนกัน ดังนั้นจึงต้องเลือกใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมกับเชื้อหีดถั่งเช่าชนิดนั้นๆ อาหารที่ใช้เพาะเชื้อหีดถั่งเช่านั้นอาจเป็นอาหารวิทยาศาสตร์ที่ได้มาจากการผสมสารเคมีหลายชนิด หรืออาจเป็นวัตถุดิบตามธรรมชาติก็ได้

2.3.3 แหล่งอาหาร

อาหารในการเพาะเลี้ยงหีดถั่งเช่าสีทองมีสูตรอาหารมากมาย โดยหลักๆ แล้วจะประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน ได้แก่ เมล็ดธัญพืช น้ำตาล และแป้ง แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ หนอนไหม ไข่ ดักแด่ ยีสต์สกัด เปปโตน บัฟเฟอร์ กรดซิตริก และวิตามินบี 1 เป็นต้น (ธัญญา, 2555)

2.3.3.1 แหล่งคาร์บอน

เป็นแหล่งอาหารที่ให้พลังงานแก่เซลล์ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและเมแทบอลิซึมของเชื้อจุลินทรีย์ จากการทดลองเพาะเลี้ยงในแหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคส ฟรุคโตส กาแล็กโทส มอลโทส ซูโครส เด็กซ์โทรส แป้ง และเซลลูลูโลส พบว่าใช้เด็กซ์โทรสในการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวทำให้เส้นใยของหีดถั่งเช่าสีทองมีปริมาณคอร์โดเซปินมากที่สุด รองลงมาคือ แป้ง ซูโครส และมอลโทส ตามลำดับ นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่าการใช้เด็กซ์โทรสร้อยละ 4 ในอาหารเหลวจะให้ปริมาณคอร์โดเซปินสูงสุด (Tuli และคณะ, 2014) ในการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งพบว่าการใช้กลูโคสจะให้คุณภาพดอกหีดถั่งเช่าที่ดีที่สุด รวมถึงน้ำหนักแห้ง ปริมาณอะดีโนซีนและคอร์โดเซปิน รองลงมา คือ ซูโครสและมอลโทส (Wen และคณะ, 2014)

2.3.3.2 แหล่งไนโตรเจน

เป็นแหล่งของกรดอะมิโนที่จำเป็นในการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ จากการทดลองเปรียบเทียบระหว่างแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์กับแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ พบว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ให้ปริมาณคอร์โดเซปินสูง ได้แก่ ยีสต์สกัด ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 ในอาหารเหลวเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้สารคอร์โดเซปินมากที่สุด (Tuli และคณะ, 2014) ในการเพาะเลี้ยงดอกหีดถั่งเช่าได้มีการทำงานวิจัยพบว่า การใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงแบบอาหารแข็งจะให้ปริมาณน้ำหนักแห้ง สารอะดีโนซีนและสารคอร์โดเซปินที่สูง แต่การใช้น้ำมันถั่งเช่าจะทำได้ปริมาณคอร์โดเซปินในดอกหีดถั่งเช่าสีทองมากที่สุด (Wen และคณะ, 2014) การใช้ยีสต์สกัดและเปปโตนรวมกันในการเพาะเลี้ยงช่วยในการสังเคราะห์ กัวนีน อะดีโนซีน และคอร์โดเซปิน โดยใช้อัตราส่วนทั้งเปปโตนและยีสต์สกัดร้อยละ 0.3 การใช้แหล่งไนโตรเจนที่ต่างกันส่งผลต่อการสังเคราะห์นิวคลีโอไซด์และสารเมแทบอลิซึมอื่นๆ (Gu และคณะ, 2007)

2.3.3.3 แหล่งเกลือแร่

เกลือแร่ช่วยในการเจริญและพัฒนาของเชื้อราชนิดต่างๆ ดังนั้นแล้วเกลือแร่จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นต้องใส่ในอาหารเพาะเลี้ยง จากงานวิจัยการหาเกลือแร่ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและผลผลิตของหีดถั่งเช่าสีทองพบว่า โพแทสเซียมซัลเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟตช่วยให้มีดอกหีดและสารคอร์โดเซปินในปริมาณที่สูง (Wen และคณะ, 2014)

2.3.4 อุณหภูมิ

เป็นสิ่งที่มีความสำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ เนื่องจากเอนไซม์ของเชื้อแต่ละชนิดจะทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่จำเพาะต่อการเจริญของเชื้อนั้นๆ จากการทดลอง

เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวพบว่าที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ดีที่สุดในการเจริญของเห็ดถั่งเช่าสีทอง (Zhi-Li Yi และคณะ, 2014) และจากการทดลองเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ดีที่สุดคืออุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Byung-Joo Lee และคณะ, 2013)

2.3.5 ค่าพีเอช

พีเอชเป็นสิ่งสำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์โดยเฉพาะกับเชื้อรา กลุ่มแอสโคไมซีตและเบซิโดโอไมซีต โดยทั่วไปแล้วพีเอชที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าจะอยู่ในช่วง 4 ถึง 7 พีเอชที่ต่างกันจะส่งผลต่อการเผาผลาญสารอาหารและการเจริญของเส้นใย ดังนั้นเมื่อทดลองเพาะเลี้ยงในช่วงพีเอช 4 ถึง 7 แล้วพบว่าพีเอชที่ให้ปริมาณคอร์โดเซปินมากที่สุด คือพีเอชที่ 5.5

2.3.6 อายุของหัวเชื้อ

อายุของหัวเชื้อเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญในการผลิตคอร์โดเซปินและสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ จากการทดลองการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อเหลวชั่วโมงที่ 24 ถึง 144 พบว่าหัวเชื้อที่ชั่วโมงที่ 72 จะให้ปริมาณคอร์โดเซปินมากที่สุด (Tuli และคณะ, 2014)

2.3.7 อากาศและความชื้น

อากาศเป็นปัจจัยสำคัญอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะจุลินทรีย์กลุ่มที่ใช้อากาศ มิงานวิจัยที่ยืนยันว่าออกซิเจนเป็นสิ่งที่สำคัญในการเจริญของเส้นใยและทำให้การผลิตสารทางชีวภาพของเชื้อรามีปริมาณสูง (Shih และคณะ, 2007) ความชื้นร้อยละ 70-80 เป็นความชื้นตามธรรมชาติที่เชื้อราเจริญเติบโตได้ดีหากไม่ควบคุมความชื้นภายในขวดเพาะเลี้ยงที่เป็นอาหารแข็งทำให้อาหารแห้งอย่างรวดเร็วส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ

2.3.8 แสง

ในที่มืด เส้นใยของเห็ดถั่งเช่าสีทองจะมีสีขาว แสงจะไปกระตุ้นให้มีการสร้างเม็ดสีและทำให้เกิดการรวมกันของเส้นใยกลายเป็นดอก ช่วยในการปรับปรุงสี เพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ คอร์โดเซปิน แคโรทีนอยด์ และพอลิแซ็กคาไรด์ โดยแคโรทีนอยด์จะทำให้ดอกเห็ดมีสีทองเข้ม ซึ่งเป็นสิ่งที่บ่งบอกถึงคุณภาพทางการค้า นอกจากนี้แสงยังเป็นปัจจัยสำคัญที่จะกำหนดความหนาแน่น เนื้อสัมผัส และสีของเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทอง แสงสีแดงส่งผลให้เกิดการเจริญของเส้นใยและเพิ่มปริมาณอะดีโนซีน ในขณะที่แสงสีฟ้าช่วยในการสังเคราะห์คอร์โดเซปินของเส้นใย แสงสีชมพู (1/3 สีฟ้า + 2/3 สีแดง) ช่วยเพิ่มน้ำหนักแห้งและช่วยให้เกิดการสะสมของแคโรทีนอยด์และคอร์โดเซปิน ขณะที่แสงสีแดงช่วยเพิ่มปริมาณอะดีโนซีนในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง แสดงให้เห็นว่าการให้แสงในการเพาะเลี้ยงนอกจากจะเพิ่มร้อยละผลได้แล้วยังส่งผลกระทบต่อคุณภาพของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองอีกด้วย

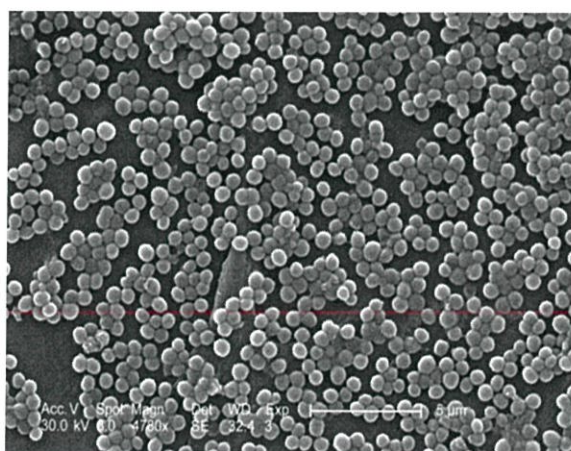
2.3.9 แสงไฟแอลอีดี

เป็นอุปกรณ์จำพวกไดโอดที่สามารถเปล่งแสงได้ในช่วงสเปกตรัมที่แคบ เปล่งแสงได้ในช่วงอัลตราไวโอเล็ตและในช่วงแสงที่มองเห็นได้ ไฟแอลอีดีสามารถปล่อยแสงที่มีความยาวคลื่นหลายความยาวคลื่นผสมกันหรือแสงช่วงความยาวคลื่นใดคลื่นหนึ่งได้ขึ้นกับการผลิต ทำให้สามารถ

เลือกใช้ความยาวคลื่นที่ต้องการในการเพาะเลี้ยงราหรือพืชได้ หลอดไฟแอลอีดียังช่วยลดการใช้พลังงานลงร้อยละ 70 และปล่อยความร้อนเพียงเล็กน้อยทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการควบคุมอุณหภูมิ อีกทั้งมีอายุการใช้งานถึง 50000 ชั่วโมงขึ้นไป เมื่อเทียบกับหลอดไฟธรรมดาที่มีอายุการใช้งานเพียง 200 ชั่วโมง

2.4 อนุภาคนาโนของเงิน (Silver Nanoparticles)

อนุภาคนาโนของเงิน ดังแสดงในรูปที่ 2.3 มีลักษณะและคุณสมบัติเหมือนกันกับซิลเวอร์ทัวไป คือเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำแต่สามารถเปลี่ยนรูปเป็นไอออนซิลเวอร์ที่แตกตัวอยู่ในน้ำได้ ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ต่อไป โดยอนุภาคนาโนของเงินซึ่งเป็นของแข็งที่เป็นโลหะมักจะละลายน้ำ แต่จะอยู่ลักษณะรวมเป็นกลุ่มก้อน หรือในรูปของอนุภาคนาโนของเงินที่ไม่ละลายน้ำ เมื่ออนุภาคนาโนของเงินอยู่ในน้ำจะแตกตัวเป็นไอออนของซิลเวอร์และเกิดการออกซิเดชันที่ผิว ซึ่งจะทำให้ได้ไอออนของโลหะที่ถูกออกซิไดซ์ในรูปของ Ag^+ ที่ล้อมรอบด้วยนาโนซิลเวอร์ที่ยังอยู่ในรูปโลหะหรืออนุภาคนาโนอยู่ในน้ำ อนุภาคนาโนของเงินเมื่ออยู่ในน้ำจึงจะให้ไอออนของซิลเวอร์ด้วย ซึ่งในการพิจารณาทางเคมีของอนุภาคนาโนของเงิน จึงต้องครอบคลุมถึงไอออนของซิลเวอร์ร่วมด้วย ด้วยเหตุที่อนุภาคนาโนของเงินมีขนาดเล็กกว่าซิลเวอร์ทัวไปมาก จึงทำให้มีลักษณะและคุณสมบัติในส่วนของพื้นผิวที่แตกต่างกันไป เช่น มีแนวโน้มที่จะระเบิดได้ซึ่งมาจากการที่สารอนุภาคนาโนของเงินมักมีอนุภาคที่มีขนาดเล็ก และเล็กกว่าซิลเวอร์ทัวไปอย่างมาก การสะสมหรือรวมตัวเป็นฝุ่นของสารอนุภาคนาโนของเงินจึงจะทำให้เกิดการระเบิดได้ นอกจากนี้อนุภาคนาโนของเงินสามารถรวมเป็นก้อนกรานูลได้ ซึ่งเกิดขึ้นจากการที่สารอนุภาคนาโนของเงินมีขนาดเล็กมารวมกัน แต่ยังคงมีขนาดในระดับเล็กมาก เช่น สารอนุภาคนาโนของเงินที่รวมกลุ่มมีขนาดเล็ก 15 หรือ 20 นาโนเมตร เป็นต้น ส่งผลให้มีลักษณะสมบัติอื่นๆ เช่น พื้นผิว ชนิดประจุบนพื้นผิว รวมทั้งลักษณะควอนตัมแตกต่างจากซิลเวอร์ทัวไป ซึ่งส่งผลให้เกิดการนำอนุภาคนาโนของเงินไปเป็นวัสดุสำหรับผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น พลาสติก ผ้า กระดาษ สี และสารเคลือบ ลักษณะและคุณสมบัติเด่นของอนุภาคนาโนของเงินที่นำไปสู่การใช้งานเชิงอุตสาหกรรม ได้แก่ คุณสมบัติการฆ่าเชื้อโรค เป็นต้น (พวงรัตน์ และ จิรภัทร์, 2555)



รูปที่ 2.3 อนุภาคนาโนของเงิน (Silver Nanoparticles)

ที่มา : <http://www.siamchemi.com/ซิลเวอร์นาโน/> (13 มีนาคม 2561)

2.5 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินในปัจจุบัน สามารถสังเคราะห์ได้ 3 วิธีคือ วิธีการทางเคมี (Chemical approach) วิธีการทางกายภาพ (Physical approach) และวิธีการทางชีวภาพ (Biological approach)

2.5.1 วิธีการทางเคมี (chemical approach)

วิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินด้วยวิธีการทางเคมีเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เนื่องจากสามารถสังเคราะห์ได้ในปริมาณมาก ควบคุมขนาดและรูปร่างได้ง่าย ในการสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมี ประกอบไปด้วยส่วนประกอบหลัก 3 ส่วนคือ 1) เกลือของซิลเวอร์ (silver salt) ที่นิยมใช้คือซิลเวอร์ไนเตรต 2) ตัวรีดิวซ์ (reducing agent) เช่น โซเดียมซิเตรท (sodium citrate) แอสคอร์เบต (ascorbate) โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (sodium borohydride) ไฮโดรเจน (elemental hydrogen) โพลีออล (polyol process) และ Tollens reagent เป็นต้น ซึ่งตัวรีดิวซ์มีหน้าที่รีดิวซ์ Ag^+ ในสารละลายให้กลายเป็น Ag^0 3) สารให้ความคงตัว (stabilizer) หรือ capping agent ซึ่งสารให้ความคงตัวจะทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและป้องกันการรวมตัวกันของอนุภาคนาโนของเงิน ตัวอย่างการสังเคราะห์ เช่น การสังเคราะห์โดยเริ่มต้นจากการผสมซิลเวอร์ไนเตรตกับโพลีไวนิล ไพร์โรไลดอน (polyvinyl pyrrolidone) จากนั้นค่อยๆ หยดโซเดียมซิเตรท ลงไปในสารละลายผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว แสดงให้เห็นว่าซิลเวอร์ไอออนถูกเปลี่ยนเป็นอนุภาคนาโนของเงิน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาส่วนอนุภาคนาโนของเงิน ไปศึกษาลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนของเงินต่อไป (Zielinska และคณะ, 2009) นอกจากนี้ยังมีหลายงานวิจัยที่ใช้ตัวทำละลายในขั้นตอนของการสังเคราะห์ เช่น เอทานอล โดเมทิล-ฟอร์มมาไมด์เอทิลีนไกลคอล โทลูอิน และคลอโรฟอร์ม เป็นต้น (Gan และ Li, 2012) ซึ่งจะเห็นว่าการสังเคราะห์ด้วยวิธีนี้ใช้สารเคมีค่อนข้างมาก และสารเคมีเหล่านี้ยังมีความเป็นพิษ ส่งผลอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต สิ่งแวดล้อม และส่งผลให้มีต้นทุนในการผลิตสูง อีกทั้งยังพบว่าสารเคมีบางชนิดมีโอกาสปนเปื้อนที่บริเวณพื้นผิวของอนุภาคนาโนของเงิน ทำให้ไม่เหมาะที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านชีวการแพทย์ (Shankar และคณะ, 2004)

2.5.2 วิธีการทางกายภาพ (physical approach)

วิธีการทางกายภาพเป็นอีกหนึ่งวิธีที่ได้รับความนิยม เนื่องจากอนุภาคนาโนของเงินที่สังเคราะห์ได้มีความบริสุทธิ์สูง สามารถควบคุมขนาด รูปร่าง และปริมาณของอนุภาคนาโนได้ง่าย (Mafune และคณะ, 2002) แต่มีข้อเสีย คือเครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง ทำให้ต้นทุนในการผลิตสูง การสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางกายภาพโดยทั่วไปจะใช้วิธีการระเหยและการควบแน่น (evaporation-condensation) โดยใช้เตาเผาแบบหลอดแก้ว (tube furnace) ที่ความดันบรรยากาศ แต่มีข้อเสียของการใช้เตาเผาแบบหลอดแก้ว คือต้องใช้พลังงานสูงและใช้เวลานานเพื่อทำให้เกิดความเสถียรทางความร้อน ดังนั้นจึงมีการใช้เซรามิกฮีตเตอร์ขนาดเล็ก (small ceramic heater) เนื่องจากไอที่เกิดจากการระเหยจะควบแน่นกลับมาในอัตราเร็วที่เหมาะสม ทำให้พื้นผิวของฮีตเตอร์สามารถถ่ายเทความร้อนได้ดี นอกจากนี้อุณหภูมิที่พื้นผิวของฮีตเตอร์ยังค่อนข้างคงที่ตลอดเวลาทำให้อนุภาคนาโนของเงินที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเล็กและมีความเข้มข้นสูง และอีกหนึ่งวิธีที่นิยมใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนคือวิธีการยิงด้วยเลเซอร์ (laser ablation) ซึ่งสามารถควบคุมขนาดและรูปร่างได้ง่ายด้วยการควบคุมปัจจัยต่างๆ เช่น ความยาวคลื่นของเลเซอร์ ความเข้มของแสงเลเซอร์ และเวลาในการยิงเลเซอร์ เป็นต้น

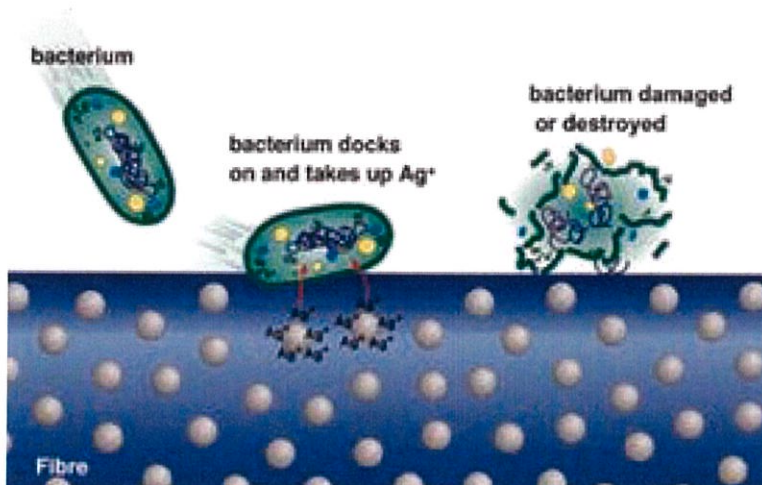
2.5.3 วิธีการทางชีวภาพ (biological approach)

ปัจจุบันนักวิจัยให้ความสนใจการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินด้วยวิธีทางชีวภาพมากขึ้น เนื่องจากสามารถลดการใช้สารเคมีที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมแล้ว ยังสามารถใช้แบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์และสารสกัดจากพืชในการสังเคราะห์ได้อีกด้วย ซึ่งส่วนประกอบหลักในการสังเคราะห์มี 3 ส่วน คือ 1) สารละลายตัวกลางในการสังเคราะห์ 2) ตัวรีดิวซ์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และ 3) สารให้ความคงตัวที่ไม่เป็นพิษ ข้อดีของวิธีการสังเคราะห์ทางชีวภาพคือใช้สารเคมีในปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีและทางกายภาพ เนื่องจากสารชีวโมเลกุลที่อยู่ในจุลินทรีย์และสารสกัดจากพืชสามารถเป็นได้ทั้งตัวรีดิวซ์และสารให้ความคงตัว ทำให้มีต้นทุนในการผลิตต่ำ แต่ข้อเสียคือควบคุมขนาด รูปร่าง ความเป็นผลึกได้ยาก และหากเปรียบเทียบการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์กับการใช้สารสกัดจากพืชในแง่ของระยะเวลา เครื่องมือ ความเป็นพิษ และการควบคุมขนาดและรูปร่างในการสังเคราะห์พบว่าวิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินด้วยสารสกัดจากพืชมีขั้นตอนในการผลิตที่ไม่ยุ่งยาก เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสังเคราะห์จากเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากการสังเคราะห์จากเชื้อจุลินทรีย์นั้นต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อและใช้เครื่องมือที่จำเพาะ อีกทั้งยังต้องมีการควบคุมการเจริญของเชื้อในขั้นตอนการสังเคราะห์เพื่อไม่ให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อที่ก่อให้เกิดอันตรายกับมนุษย์หรือสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้การสังเคราะห์ด้วยสารสกัดจากพืชยังสามารถควบคุมขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโนของเงินได้ง่ายกว่าการสังเคราะห์จากเชื้อจุลินทรีย์ เพราะการควบคุมขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโนที่ผลิตนั้นสามารถทำได้โดยการปรับเปลี่ยนปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิหรือความเป็นกรดต่าง ซึ่งการปรับเปลี่ยนปัจจัยดังกล่าวอาจจะส่งผลต่อการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Gan และ Li, 2012)

2.6 กลไกการทำงานของอนุภาคนาโนของเงิน

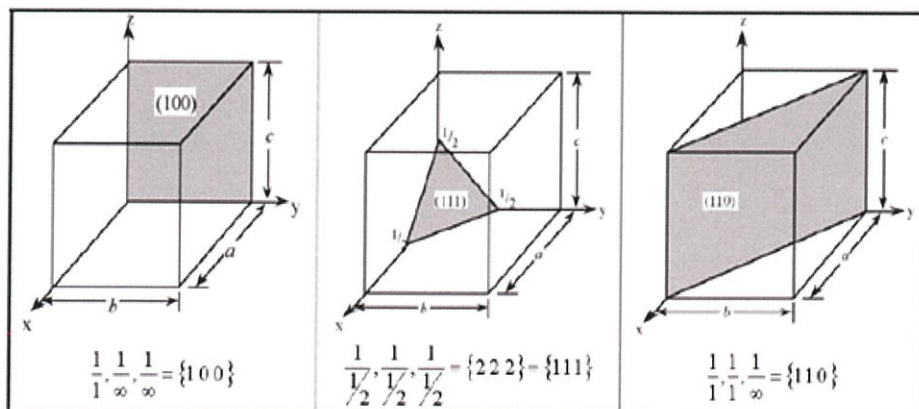
กลไกการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของเงิน ดังแสดงในรูปที่ 2.4 พบว่าอนุภาคนาโนของเงินที่มีประจุบวก (Ag^+) เมื่อสัมผัสกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียหรือเชื้อราจะสามารถแพร่กระจายประจุไปเกาะตามผนังเซลล์และแทรกเข้าไปภายในเซลล์ของแบคทีเรียทำให้เกิดภาวะการรวมตัวของ DNA (Condensation) ภายในเซลล์ ทำให้ประจุบวกของซิลเวอร์ (Ag^+) เข้าไปจับกับเอนไซม์โปรตีนเนส (Proteinase) ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบเมแทบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งจะจับกับหมู่ซัลฟิโดรล (-SH) ที่มีอะตอมของซัลเฟอร์ (S) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีประจุเป็นลบ (S^{2-}) และทำให้กระบวนการทำงานของเอนไซม์หยุดการทำงาน จนกระทั่งเซลล์แบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโตและเสื่อมสภาพตายในที่สุด กลไกการทำงานของอนุภาคนาโนของเงินมี 3 ตามขั้นตอนดังนี้

1. อนุภาคนาโนของเงินในช่วง 1-10 นาโนเมตร จับกับผิวหน้าของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียและรบกวนการทำงานระดับเซลล์ของแบคทีเรีย เช่น การขนส่งสารเข้าออกเซลล์
2. อนุภาคนาโนของเงินสามารถแทรกเข้าไปภายในเซลล์แบคทีเรียและรบกวนการทำงานระดับโมเลกุล โดยจับกับสารที่มีซัลเฟอร์ (S) และฟอสฟอรัส (P) เป็นองค์ประกอบ เช่น DNA
3. อนุภาคนาโนของเงินเกิดการสลายตัวและปลดปล่อย Silver ion (Ag^+) เนื่องจากอนุภาคนาโนของเงินมีขนาดเล็กและมีเป็นจำนวนมาก ทำให้สามารถปลดปล่อย Silver ion (Ag^+) ออกมาด้วยความเข้มข้นสูง จึงสามารถฆ่าแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว (พวงรัตน์ และจิรภัทร์, 2555)



รูปที่ 2.4 แสดงกลไกการทำงานของอนุภาคนาโนของเงินต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย
ที่มา : Nordqvist (2011)

อนุภาคนาโนของเงินเป็นสารที่ฆ่าเชื้อโรคได้ในวงกว้างทั้งในส่วนจุลินทรีย์ที่เป็นแกรมบวกและแกรมลบ โดยตัวอย่างของจุลินทรีย์แกรมลบได้แก่ *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella* และ *Vibrio acinetobacter* และ ตัวอย่างของจุลินทรีย์แกรมบวกได้แก่ *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus* และ *Streptococcus* ขนาดของอนุภาคนาโนของเงินที่มีขนาดเล็กมาก ทำให้สามารถฆ่าจุลินทรีย์ได้ดี แม้ว่าจุลินทรีย์จะมีในปริมาณน้อยมากๆ นอกจากนี้รูปร่างของซิลเวอร์ที่แตกต่างกัน เช่น ทรงกลม แท่ง หรือแผ่นสามเหลี่ยม ทำให้เกิดการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แกรมลบได้แตกต่างกันอีกด้วย โดยอนุภาคนาโนของเงินที่มีรูปร่างแผ่นสามเหลี่ยมสามารถกำจัดจุลินทรีย์ได้มีประสิทธิภาพมากที่สุด เนื่องจากระนาบด้านบนเป็นบริเวณที่มีการจัดเรียงตัวที่ทำให้พื้นที่ผิวมีความหนาแน่นของอะตอมซิลเวอร์สูงสุด เช่น การเรียงตัว {111} เป็นต้น ในขณะที่อนุภาคนาโนของเงินทรงกลมจะมีลักษณะเป็น {100} โดยมีส่วนน้อยที่เป็น {111} ส่วนอนุภาคนาโนของเงินแบบแท่งจะมีด้านเป็น {100} และมีส่วนด้านปลายเท่านั้นที่เป็น {111} ดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 ลักษณะโครงสร้างของผลึกของอนุภาคนาโนซิลเวอร์
ที่มา : <http://web.eng.nu.ac.th/eng2012/ceri/nanodatabase> (13 มีนาคม 2561)

อนุภาคนาโนของเงินจะไปยึดติดและผ่านทะลุเข้าไปในผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้โครงสร้างของเมมเบรนของเซลล์เปลี่ยนไปและไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าออกของไซโตพลาสซึม เมมเบรนทำให้สิ่งต่างๆ ซึมผ่านเมมเบรนได้ ซึ่งทำให้เซลล์ตายในที่สุด นอกจากนี้ได้มีการรายงาน กลไกในการฆ่าเชื้อโรคของอนุภาคนาโนของเงินว่ามาจากการเกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้ ทำลายเมมเบรน ทำให้อนุภาคนาโนของเงินสามารถผ่านเข้าออกเซลล์ได้ ซึ่งทำให้เซลล์จุลินทรีย์ ตายในที่สุด การทำลายเซลล์อาจมาจากการทำปฏิกิริยาของอนุภาคนาโนของเงินกับสารประกอบ ดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้เซลล์ไม่สามารถแบ่งตัวได้ และไม่สามารถสร้างดีเอ็นเอได้ ซึ่งทำให้เซลล์ตายใน ที่สุด อนุภาคนาโนของเงินทำให้สารฟอสโฟไทโรซีนในเปปไทด์ของแบคทีเรียลดน้อยลง ซึ่งจะทำให้ การส่งผลต่อการส่งสัญญาณของเซลล์ ทำให้เกิดการขัดขวางการเจริญเติบโตของเซลล์ และทำให้ เซลล์ตายในที่สุด

2.7 แบคทีเรียก่อโรคบนผิวหนัง

แบคทีเรียก่อโรคบนผิวหนัง ดังแสดงในรูปที่ 2.6 แบคทีเรียจัดเป็นโพรแคริโอต (prokaryotes) ซึ่งเซลล์ประกอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) แต่ขาดเยื่อหุ้มนิวเคลียสและ ออร์แกเนลล์ (organelle) ที่มีเยื่อหุ้มผนังเซลล์ (cell wall) ของแบคทีเรียมีองค์ประกอบ คือ เปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลที่เชื่อมกันด้วยสายของเปปไทด์ (peptide) โดยแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะมีความหนาของชั้นเปปทิโดไกลแคนที่แตกต่างกันออกไป ทำให้สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียออกได้เป็น 1) กลุ่มที่มีชั้นของเปปทิโดไกลแคนที่หนา ซึ่งเมื่อนำมาย้อมสีด้วยวิธี Gram stain จะติดสีม่วง (แบคทีเรียแกรมบวก) และ 2) กลุ่มที่มีชั้นของเปปทิโด ไกลแคนที่บาง แต่มีชั้นของ bilayer phospholipid ที่หนากว่า กลุ่มนี้เมื่อย้อมสีด้วยวิธี Gram stain จะติดสีแดง (แบคทีเรียแกรมลบ) ซึ่งสามารถจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียได้หลายแบบ เช่น จำแนก ตามการติดสีแกรม (แกรมบวกหรือแกรมลบ) จำแนกตามรูปร่างกลม (cocci) ทรงกระบอกหรือท่อน (bacilli) และรูปเกลียว (spiral) เป็นต้น เชื้อแบคทีเรียบางชนิดเคลื่อนที่ได้ บางชนิดเคลื่อนที่ไม่ได้ โดยชนิดที่เคลื่อนที่ได้มักจะมีแฟลกเจลลา (flagella) ซึ่งอาจจะเป็นการงอกออกมาจากขั้วใดขั้วหนึ่งของเซลล์หรือการงอออกรอบๆ เซลล์ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียบางชนิดมีพิไล (pili) ซึ่งทำให้เชื้อสามารถยึด เกาะกับเซลล์เจ้าบ้าน (host cells) หรือเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) ได้

นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียยังสามารถสังเคราะห์สารพันธุกรรมของตัวเองเพื่อสืบพันธุ์ได้ โดยทั่วไปแล้วในคนนั้นจะมีเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนังประมาณ 10^{12} ตัว ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่นี้จะอยู่บนผิว ของมนุษย์โดยไม่ก่อโรค เราเรียกว่าจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรียที่ เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis* บนผิวหนัง และ *Streptococcus mutans* ในช่องปาก เป็นต้น ซึ่งจุลินทรีย์ประจำถิ่นเหล่านี้จะคอยช่วยรักษาสมดุลของสภาวะ แวดล้อมในอวัยวะเหล่านั้น และช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นมาได้ในบางสภาวะ ที่ร่างกายสูญเสียจุลินทรีย์ประจำถิ่นไป เมื่อนั้นเชื้อก่อโรคจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นและทำให้เกิดโรค ขึ้นมาได้ ซึ่งร่างกายของมนุษย์นั้นมียูทิลิตี้ป้องกันไม่ให้ติดเชื้อแบคทีเรียได้หลายทาง แต่ใน ขณะเดียวกันเชื้อแบคทีเรียก็พัฒนาตัวเองให้สามารถรุกรานเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ได้โดยอาศัยส่วนของ เซลล์แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค (virulent factor) (Alexander และคณะ, 2010)



รูปที่ 2.6 จุลินทรีย์บนผิวหนัง

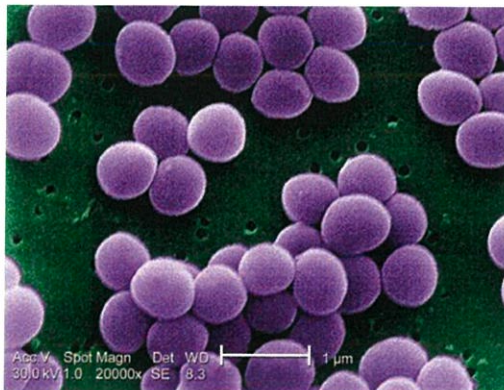
ที่มา : <https://www.pastiche-training.com/flosaid/the-importance-of-the-skin-surface-microflora> (13 มีนาคม 2561)

2.7.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus ดังแสดงในรูปที่ 2.7 เป็นจุลินทรีย์ในวงศ์ Micrococcaceae ซึ่งมีคุณสมบัติยอมติดสีแกรมบวก ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะกลม ขนาดประมาณ 0.5–1.0 ไมครอน เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น แต่บางครั้งอาจจะเป็นเชลล์เดี่ยว เชลล์คู่ หรือเป็นสายสั้นๆ ปกติแล้วมากไม่เกิน 4 เชลล์ อยู่ปะปนด้วยกันเสมอเวลาแยกแถม แบคทีเรียที่ไม่เคลื่อนที่และไม่สร้างสปอร์ มีลักษณะโคโลนีเป็นทรงกลม ขอบเรียบ นูน มีสีครีม เหลือง ส้ม ซึ่งจะขึ้นอยู่กับชนิดของคาร์บอนยัดในเชลล์เมมเบรน รวมถึงอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะแวดล้อมที่ทำให้เชื้อเจริญ *S. aureus* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 6–46 องศาเซลเซียส โดยมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30–37 องศาเซลเซียส ทนความร้อนได้ถึง 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และยังสามารถสร้างสารพิษที่อุณหภูมิมากกว่า 10 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชที่สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 4.0–10.0 พีเอชช่วงที่เหมาะสมคือ 7.0–7.5 ค่าแอกติวิตีของน้ำ (water activity) อยู่ในช่วง 0.85–0.999 ถ้าค่าแอกติวิตีของน้ำน้อยกว่า 0.94 จะเจริญได้อย่างช้าๆ สามารถทนเกลือได้ที่ร้อยละ 18–20

S. aureus ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Facultative anaerobe คือ สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจนมากกว่าในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน และสามารถสร้างสารพิษ enterotoxin แบ่งออกเป็น 8 ชนิดได้แก่ A, B, C1, C2, C3, D, E และ H ชนิดที่ พบบ่อยซึ่งเป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษ คือ A กับ D สารพิษนี้มีคุณสมบัติพิเศษ คือทนความร้อน ไม่ถูกทำลายแม้ต้มในน้ำเดือดครึ่งชั่วโมง และทนความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สารพิษนี้ละลายได้ในน้ำและในสารละลายเกลือ เชื้อ *S. aureus* จะสร้างสารพิษดังกล่าวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าที่ 25 และ 10 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ทั้งยังสามารถทนต่อรังสีแกมมาในปริมาณที่อนุญาตให้ใช้กับอาหารอีกด้วย แหล่งที่พบเชื้อสามารถพบได้ที่ผิวหนัง โพรงจมูก เยื่ออุทงเดินหายใจ ทางเดินอาหาร และบาดแผลที่เป็นฝีหนองรวมถึงในดิน ผุ่นละออง อาหารที่มักพบเชื้อ *S. aureus* ปนเปื้อน ได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ เนื้อสัตว์ปีก และผลิตภัณฑ์จากไข่ อาหารประเภทสลัด เช่น ไข่ พูน่า เนื้อไก่ มันฝรั่ง และมักกะโรนี ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ครีมพาย แอแคลร์ ซ็อกโกแลต แซนวิช และผลิตภัณฑ์นมที่เก็บไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม และเก็บไว้เป็นเวลานานก่อนรับประทาน การทำให้เกิดโรค เชื้อ *S. aureus* ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีการ

ปนเปื้อนสารพิษแม้ในปริมาณน้อยกว่า 1 ไมโครกรัม ก็สามารถทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยได้ สารพิษชนิดนี้จะมีปริมาณสูงมากเมื่อเชื้อ *S. aureus* ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร 100,000 เซลล์ต่อกรัมอาหาร ทำให้เกิดโรค Acute infection (ฝีหนองแผลติดเชื้อ septicemia) และ Acute toxemia (heat stable enterotoxin) (ศิวพร ศิวเวช, 2542)

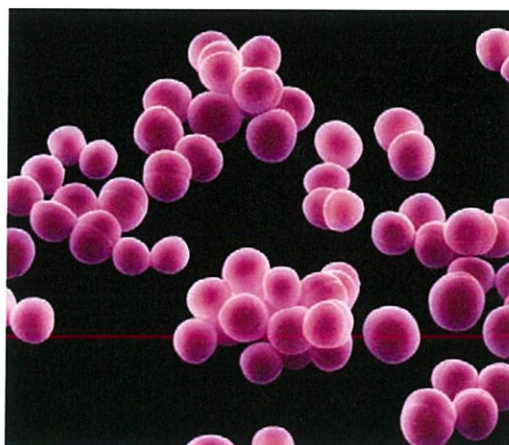


รูปที่ 2.7 ลักษณะเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

ที่มา : <https://medicalxpress.com/bacteriopathogenic.html> (13 มีนาคม 2561)

2.7.2 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis ดังแสดงในรูปที่ 2.8 เป็นจุลินทรีย์ในวงศ์ Micrococcaceae ซึ่งมีคุณสมบัติยึดอมติสแกรมบวก ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะกลม ขนาดประมาณ 0.5–1.5 ไมครอน เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น แต่บางครั้งอาจพบเป็นเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่ หรือเป็นสายสั้นๆ ลักษณะโคโลนีมีขนาดเล็ก สีขาว สามารถเจริญได้ทั้งภาวะที่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นแบคทีเรียที่พบได้บ่อยที่สุดในกลุ่ม *Staphylococcus* ที่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase) และยังไม่สร้างแอลฟาที่ออกซิน (α -toxin) เอกซ์โฟลิเอติน (exfoliatin) และซูเปอร์แอนติเจนที่ออกซิน (superantigen toxins) ได้



รูปที่ 2.8 ลักษณะเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis*

ที่มา : <https://fineartamerica.com/staphylococcus-epidermidis> (13 มีนาคม 2561)

S. epidermidis เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) พบที่ผิวหนัง โพรงจมูก รูหู และทางเดินปัสสาวะส่วนปลาย ในอดีตไม่พบเป็นสาเหตุของการติดเชื้อ แต่เนื่องจากการใช้สายสวนท่อปัสสาวะ (catheters) และชิ้นส่วนเทียม (prosthesis) กันอย่างแพร่หลาย จึงพบว่าในการติดเชื้อในโรงพยาบาลมากขึ้นและยังยากต่อการรักษาเนื่องจาก *S. epidermidis* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ และมีแบบแผนการดื้อยาไม่แน่นอนและแตกต่างกับ *S. aureus* และยังพบว่าดื้อยาต่อกลุ่ม penicillinase-resistant penicillin และ cephalosporin มากกว่า *S. aureus* อีกด้วย

2.7.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa ดังแสดงในรูปที่ 2.9 เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนตรง ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ไม่ได้ สามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำเงินที่เรียกว่า Pyocyanin โคโลนีแบคทีเรียจะสร้างกลิ่น คล้ายกลิ่นองุ่น (Grape-like odor) จัดเป็นพวกแซฟโฟไฟท์ (saprophyte) พบได้ตามพื้นดิน แหล่งน้ำ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเชื้อฉวยโอกาส



รูปที่ 2.9 ลักษณะเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*

ที่มา : <https://fineartamerica.com/pseudomonas-aeruginosa> (13 มีนาคม 2561)

แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญและแพร่กระจายไปยังอวัยวะของผู้ป่วยในส่วนต่างๆ พร้อมทั้งมีการทำลายเนื้อเยื่อของผู้ป่วยโดยสร้างสารพิษและเอนไซม์ต่างๆ (Strateva และ Mitov, 2011) เช่น 1) แอลจินेट (Alginate) ซึ่งแบคทีเรียใช้ในการยึดเกาะเซลล์เจ้าบ้านและป้องกันการถูกกำจัดจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย 2) ไฟไลหรือฟิมเบรีย จะเป็นส่วนที่คล้ายเส้นขนเล็กๆ ที่ยื่นออกมาจากผิวเซลล์เพื่อที่จะจับกับเยื่อผิวทางเดินหายใจ 3) เอนโดทอกซินหรือลิพิดเอ (Endotoxin หรือ lipid A) เอนโดทอกซินเป็นลิพโพลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่ตามผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบและเป็นแอนติเจน (antigen) ที่สำคัญอีกด้วย ส่วนลิพิดเอเป็นองค์ประกอบของเอนโดซินที่เกี่ยวกับความเป็นพิษ แต่ความเป็นพิษของเชื้อ *P. aeruginosa* นั้นจะน้อยกว่าแบคทีเรียในตระกูลเอนเทอโรแบคทีเรียอยู่ประมาณ 10 เท่า 4) อีลาสเทส (Elastase) เป็นเอนไซม์ที่จะทำลายอีลาสติกไฟเบอร์ที่ผนังหลอดเลือด ซึ่งจะทำให้เกิดเลือดออกและเชื้อแพร่กระจายออกไปอีกด้วย 5) เอกโซทอกซินเอ (Exotoxin A) เป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการเชื้อรุนแรง โดยจะขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ยูคาริโอต ซึ่งสารพิษนี้จะทำให้เซลล์ตายและมีความเป็นพิษแต่น้อยกว่าดิฟทีเรีย 6) โปรตีเอส (Proteases) เป็นเอนไซม์ที่ถูกขับออกมานอกเซลล์ โดยจะย่อยสลาย

เนื้อเยื่อของเซลล์เจ้าบ้านและทำลายอิมมูโนโกลอบิวลินและคอมพลีเมนต์ นอกจากนี้ยังจะช่วยให้เชื้อบูกรุกและแพร่กระจายออกไป 7) เอกโซทอกซินเอส (Exotoxin S) เป็นสารที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนจะต่างกับเอกโซทอกซินเอ ตรงที่ทนความร้อนได้ พบในบางสายพันธุ์ของ *P. aeruginosa* 8) ฟอสโฟลิเพสซี (Phospholipase C) จะย่อยสลายไขมันและเลซิทีนเพื่อที่จะให้ปล่อยฟอสโฟริลโคลีนออกมาช่วยทำลายเนื้อเยื่อ 9) ลิวโคซิดีน (Leukocidin) จะยับยั้งการทำงานของลิมโฟไซต์ และนิวโทรฟิลว โรคที่ติดเชื้อในโรงพยาบาลที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *P. aeruginosa* มักพบในการติดเชื้อที่บาดแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อในกระแสโลหิต การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ การติดเชื้อหลังการผ่าตัดต่อกระจก (Bitsori และคณะ, 2012)

2.8 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antibacterial activity)

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ทดสอบได้ 2 วิธี คือ

2.8.1 Dilution Method

เป็นการเจือจางสารให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ กันในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารความเข้มข้นที่ระดับต่างๆ มาทดสอบกับเชื้อ วิธีนี้สามารถหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อได้ (Minimal Inhibition Concentration, MIC) ซึ่งสามารถแบ่งย่อยออกเป็น 2 วิธี คือการเจือจางสารในอาหารเหลว (Broth dilution method) และการเจือจางในอาหารแข็ง (Agar dilution method) ซึ่งจะต้องใช้เวลา เครื่องมือ และแรงงานในการทำมากแต่ผลการทดลองที่ได้แน่นนอนกว่า

2.8.2 Diffusion Method

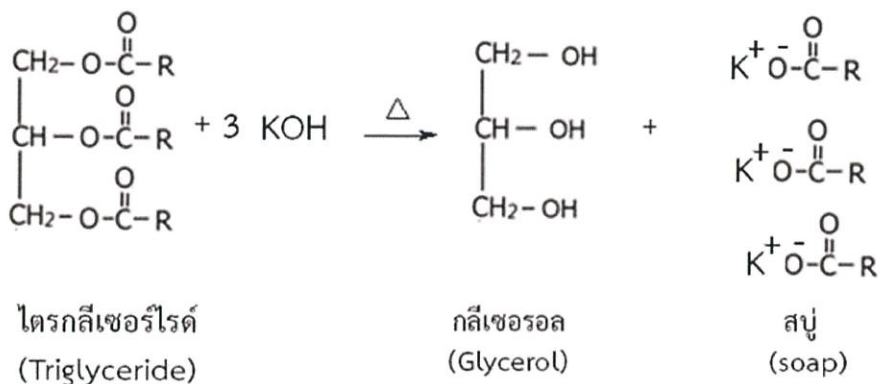
เป็นการทดสอบโดยทำให้ตัวสารจากที่หนึ่งซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้ออาจใช้แผ่นสารเป็นกระดาษกรอง หรือเป็นเม็ด หรือเจาะหลุมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วใส่สารลงไป เพื่อให้สารซึมจากบริเวณหนึ่งที่มีความเข้มข้นสูงไปสู่ที่มีความเข้มข้นต่ำ อ่านผลการทดสอบโดยดูบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้งการเจริญ (clear zone หรือ inhibition zone) วิธีนี้ไม่สามารถอ่านผลเป็นค่าความเข้มข้นของสารโดยตรงได้ แต่ก็เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากทำได้ง่าย ใช้เวลาน้อยและวิธีที่นิยมทดสอบมากที่สุดคือแบบที่ใช้แผ่นกระดาษกรอง (disc diffusion method) (ธีรวิฑูมิ และรัชณี, 2550)

2.9 สบู่

สบู่หรือเกลือของกรดไขมัน เป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ชำระล้างหรือทำความสะอาดร่างกาย ซึ่งมีลักษณะเป็นก้อน สบู่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง ไขมันหรือน้ำมัน (ไตรเอซิลกลีเซอรอล) กับสารละลายต่าง เกิดเป็นเกลือของกรดไขมันกับกลีเซอรอล ดังแสดงในรูปที่ 2.10

แต่เดิมคนไทยมีการผลิตสบู่โดยใช้ไขมันหรือน้ำมันผสมกับน้ำขี้เถ้าไว้ใช้สำหรับอาบน้ำ สระผมตลอดจนล้างจานในครัวเรือน ภายหลังมีการผลิตสบู่ในระดับอุตสาหกรรมมากขึ้น สบู่เริ่มถูกเติมแต่งด้วยสารต่าง ๆ ตามความต้องการของผู้บริโภค นอกเหนือจากน้ำมันกับด่างแล้ว ยังได้ผสมกับน้ำหอม สี สารเพิ่มฟองเพื่อให้สบู่มีคุณสมบัติที่น่าใช้ยิ่งขึ้น อีกทั้งในอุตสาหกรรมการผลิตสบู่มีการแยกกลีเซอรอลหรือกลีเซอรินออกไปเพื่อจำหน่ายให้กับอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและอุตสาหกรรมยา เพราะได้ราคาสูงกว่าการจำหน่ายสบู่เพียงอย่างเดียว ซึ่งสบู่ที่ได้ต่างจากสบู่ที่เราผลิตขึ้นมาเอง โดย

จะมีกลีเซอรอลหรือกลีเซอรินปนอยู่ในเนื้อสบู่อยู่แล้ว ทำให้ได้สบู่ที่ให้ความชุ่มชื้นกับผิวหลังอาบน้ำ ก่อนล้างสูงกว่าสบู่ที่วางขายตามท้องตลาดทั่วไป



รูปที่ 2.10 การเกิดปฏิกิริยาซาฟอนิฟิเคชัน (saponification)

ที่มา : <http://www.foodnetworksolution.com/1631/saponification> (14 มีนาคม 2561)

สบู่จัดเป็นสินค้าที่ผู้บริโภคโดยทั่วไปไม่ยึดติดกับตราสินค้ามากนัก เนื่องจากสามารถใช้ทดแทนกันได้อย่างสมบูรณ์ การที่สบู่มีผู้ผลิตมากประกอบกับต้นทุนการผลิตไม่สูงมาก จึงเป็นช่องทางให้ผู้ผลิตรายใหม่สามารถเข้าสู่ตลาดได้ง่าย และมีการแข่งขันในตลาดค่อนข้างสูง โดยถ้าผู้ประกอบการสามารถนำเสนอจุดขายที่แปลกใหม่ตรงกับความต้องการของผู้บริโภคก็จะสามารถครอบครองส่วนแบ่งการตลาดได้ในระยะเวลาที่สั้น ผู้ผลิตจึงพยายามพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเพื่อเพิ่มคุณภาพผลิตภัณฑ์ให้ได้มาตรฐานสูงขึ้น มีความหลากหลายและให้ผลิตภัณฑ์ที่มีความแตกต่างจากคู่แข่ง เช่น การพัฒนารูปแบบบรรจุภัณฑ์ การเพิ่มตราผลิตภัณฑ์ หรือการเพิ่มส่วนประกอบต่างๆ ที่ทำให้เกิดจุดเด่นในสินค้า เช่น สี หวานหอม สารให้ความชุ่มชื้น (moisturizer) วิตามิน สารเพิ่มฟอง สารระงับเชื้อ สารสกัดจากธรรมชาติชนิดต่าง ๆ นอกจากนี้อาจจะเพิ่มเมนทอลเพื่อเพิ่มทางเลือกให้ผู้บริโภค



รูปที่ 2.11 สบู่

ที่มา : <http://www.siamchemi.com/สบู่> (14 มีนาคม 2561)

2.9.1 ประเภทของผลิตภัณฑ์สบู่

ผลิตภัณฑ์สบู่ที่จำหน่ายในท้องตลาดแบ่งตามลักษณะของผลิตภัณฑ์เป็น 2 ลักษณะ คือ สบู่ก้อน (bar soaps) ดังแสดงในรูปที่ 2.11 ลักษณะที่ดี คือเป็นก้อนไม่มีสิ่งแปลกปลอมปนเปื้อน และสบู่เหลว (liquid soaps) ลักษณะที่ดี คือเป็นเนื้อเดียวไม่แยกชั้น อย่างไรก็ตามสามารถแบ่งตามลักษณะการใช้เป็น 3 ประเภท คือ

1. สบู่หอมถนอมผิว จะมีส่วนผสมของสารบำรุงผิว สารให้ความชุ่มชื้น (moisturizer) สารช่วยในการทำมาสะอาด และวิตามินต่างๆ ที่ช่วยบำรุงผิวพรรณ
2. สบู่อนามัย มีส่วนผสมของสารที่ใช้ระงับเชื้อและกลิ่น ใช้ทำความสะอาดผิวกาย ขำระล้างสิ่งสกปรกและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหนึ่งของกลิ่นกาย
3. สบู่เด็ก จะมีส่วนผสมที่สำคัญที่เหมาะสมสำหรับผิวที่ละเอียดและอ่อนโยน

2.9.2 ส่วนประกอบที่สำคัญของผลิตภัณฑ์สบู่

1. ไขมันและน้ำมันจากพืชหรือสัตว์ เช่น น้ำมันมะกอก น้ำมันมะพร้าว เป็นต้น
2. ด่าง (alkali) เป็นตัวทำปฏิกิริยากับกรดไขมันและส่วนประกอบอื่นๆ ทำให้สารลดแรงตึงผิวและสารลดความกระด้างของน้ำทำงานมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น นิยมใช้มี 2 ชนิด คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์
3. สารลดความกระด้างของน้ำ (builders) ใช้ลดความกระด้างของน้ำ เพื่อเพิ่มความสามารถในการทำมาสะอาดและป้องกันการเสื่อมของผลิตภัณฑ์
4. สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (synthetic surfactants) บางชนิดไม่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ทำให้เกิดการตกค้างและสะสมในสิ่งแวดล้อม
5. สารปรับสภาพ (conditioners) เพื่อให้ผิวเกิดความชุ่มชื้นและเกิดความระคายเคืองต่อผิวน้อยลง เช่น ลาโนลิน และโคลด์ครีม เป็นต้น
6. สี ซึ่งจะต้องเป็นสีตามพระราชบัญญัติเครื่องสำอาง พ.ศ. 2535 เช่น คลอโรฟิลด์ ซินนาบาร์อัลตรามารีนกรีน เป็นต้น
7. สารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial agents) ทำหน้าที่ฆ่าและยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดเชื้อโรคและกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์
8. หัวน้ำหอม (fragrances) ทำหน้าที่ปกปิดกลิ่นของส่วนประกอบต่าง ๆ และให้กลิ่นหอมน่าใช้เพิ่มขึ้น

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Nurmila และคณะ (2016) ได้ศึกษาการปรับปรุงการผลิตคอร์ไดเซปินบนผิวหน้าอาหารเหลวของ *Cordyceps militaris* ที่แยกได้จากสายพันธุ์ตามธรรมชาติ ซึ่งพบว่า *C. militaris* NBRC 103752-3 สามารถผลิตคอร์ไดเซปิน ได้เป็น 2 เท่าบนผิวหน้าอาหารซึ่งดีกว่าในอาหารเหลว การผลิตคอร์ไดเซปินมีผลอย่างมีนัยสำคัญ โดยพื้นที่ผิวจำเพาะ (specific surface area : SSA) ในการเพาะเลี้ยงแบบผิวหน้าอาหารเหลว มีพื้นที่ผิวจำเพาะ 1.57 ต่อเซนติเมตร (จากอาหาร 50 มิลลิลิตร) สามารถผลิตคอร์ไดเซปินได้ถึง 120.9 มิลลิกรัม เมื่อเพิ่มอะดีนีนลงไป 6.75 กรัม/ลิตรในอาหารสามารถผลิตคอร์ไดเซปิน ได้ถึง 312.2 มิลลิกรัม จากอาหาร 50 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นการปรับปรุงการผลิตคอร์ไดเซปินได้ถึง 4.6 เท่า ในงานศึกษานี้จะศึกษาการผลิตและผลผลิตของคอร์ไดเซปินที่ได้

ปรับปรุงจากสายพันธุ์ตามธรรมชาติอย่างมีนัยสำคัญ โดยการแยกเซลล์จากโคลนเดี่ยวและไม่เติมสารเพิ่มเติมหรือใช้เทคโนโลยีในการกลายพันธุ์ ซึ่ง *C. militaris* NBRC10352-3 สามารถผลิตคอร์ไดเซปินได้ในปริมาณมากกว่าที่ได้จากการกลายพันธุ์

Dong และคณะ (2013) ศึกษาองค์ประกอบและการกระจายของสารออกฤทธิ์สำคัญในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง พบว่าแร่ธาตุต่างๆ ซึ่งได้แก่ ซีลีเนียม (Se; selenium) สังกะสี (Zn; zinc) เหล็ก (Fe; iron) และสารออกฤทธิ์หลักอย่างอะดีโนซีน คอร์ไดเซปิน และแคโรทีนอยด์ (carotenoid) ส่วนใหญ่จะแพร่กระจายอยู่ในส่วนหัวของดอกเห็ด ส่วนฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมแพร่กระจายอยู่ทั่วดอกเห็ด

Li และคณะ (2015) ทำการศึกษาผลของการสกัดต่อปริมาณอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ ZORBAX SB-C18 (5 ไมโครเมตร และ 4.6×150 มิลลิเมตร) เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยเมทานอลและน้ำบริสุทธิ์ในอัตราส่วน (16:84) ที่มีอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 27 องศาเซลเซียส และปริมาณการฉีดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ใช้ช่วงแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารอะดีโนซีนซินิบินอยู่ที่ 40 และสารคอร์ไดเซปินอยู่ที่ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งถ้าหากอุณหภูมิสูงไปกว่านี้สารอะดีโนซีนซินิบินจะลดลงอย่างรวดเร็วทำให้เสียสรรพคุณทางยาของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

Wang และคณะ (2016) ได้ศึกษาการใช้เส้นใยของเห็ดถั่งเช่าสีทองในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน ซึ่งเส้นใยของเห็ดถั่งเช่าสีทองเป็นสารรีดิวซ์ในการสร้างอนุภาคนาโนของเงิน ได้มีการยืนยันโดยใช้เทคนิค surface plasmon resonance ที่แสดงผลในเครื่อง UV-visible spectrophotometer และวิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสี X-ray พบว่าอนุภาคนาโนของเงินประกอบไปด้วยผลึกของเงิน (silver; Ag) ปริมาณมาก และเมื่อนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope: TEM) พบว่าอนุภาคนาโนของเงิน มีรูปร่างเป็นทรงกลมและมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 15 นาโนเมตร นอกจากนี้แล้ว การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน แสดงให้เห็นว่าสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางน้ำ เช่นเดียวกับแบคทีเรียก่อโรคลทางคลินิก อีกทั้งอนุภาคนาโนของเงินได้รับการยืนยันแล้วว่ามีความคงตัวสูง แม้จะเก็บรักษาเป็นระยะเวลาาน จากข้อมูลทั้งหมดนี้สามารถยืนยันได้ว่าสารสกัดจาก *C. militaris* สามารถใช้สังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินได้

Lin และคณะ (2010) พบว่าหากสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินจากสารสกัดใบราชพฤกษ์ (*Cassia fistula*) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อนุภาคนาโนของเงินที่สังเคราะห์ได้จะมีลักษณะเป็นแท่ง แต่หากสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อนุภาคนาโนของเงินที่ได้จะมีรูปร่างเป็นทรงกลม

Cruz และคณะ (2010) ได้สังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินจากเลมอนเวอปีน่า (*Lippia citriodora*) พบว่าอุณหภูมิในการสังเคราะห์มีผลต่อขนาดของอนุภาคนาโนของเงิน ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน มีค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนของเงินจะมีความยาวคลื่นที่น้อยกว่า นั่นแสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส อนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ได้มีขนาดเล็กกว่าอนุภาคนาโนของเงินที่สังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้อุณหภูมิยังมีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยารีดักชันคือเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นปฏิกิริยารีดักชันเกิดได้เร็วขึ้น และพบว่า ณ เวลาการเกิดปฏิกิริยาเท่ากันปฏิกิริยาที่เกิดที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส

จะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นั้นแสดงว่ามีอนุภาคนาโนของเงินเกิดขึ้นมากกว่า

Rajakannu และคณะ (2015) ได้ศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินโดยใช้สารสกัดจากเปลือกมังคุดและศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดที่นำมาสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินด้วยวิธีทางชีวภาพ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa*, *S. aureus* และ *E. coli* ได้ดีกว่าเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ

Rai และคณะ (2009) ได้ศึกษากระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินด้วยการสังเคราะห์ทางชีวภาพ พบว่าอนุภาคนาโนของเงินมีขนาดเท่ากับ 100-200 นาโนเมตร จึงมีความสามารถในการที่จะเข้าไปจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ดีมากขึ้น ซึ่งอนุภาคนาโนของเงินมีประจุบวก (Ag^+) เมื่อสัมผัสกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย สามารถแพร่ประจุบวกไปเกาะตามผนังเซลล์และแทรกเข้าไปภายในเซลล์ของแบคทีเรียทำให้เกิดการรวมตัวของ DNA เกิดเป็น DNA condensation และยังรบกวนการทำงานของสารขนส่งสารเข้าออกระหว่างเซลล์และการหายใจระดับเซลล์ และหลังจากนั้นอนุภาคนาโนของเงินเกิดการสลายตัวและปลดปล่อย silver ion (Ag^+) ที่มีขนาดเล็กและจำนวนมากออกมาฆ่าแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว

Das และคณะ (2013) ได้ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของเงินที่สังเคราะห์ด้วยสารสกัดจากใบแค (*Sesbania grandiflora*) พบว่าค่าการดูดกลืนสเปกตรัมสูงสุดอยู่ที่ 422 นาโนเมตร และมีรูปร่างเป็นทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-25 นาโนเมตร อีกทั้งสามารถต้านเชื้อ *Salmonella enterica* (แกรมลบ) และ *Staphylococcus aureus* (แกรมบวก) โดยสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่า ซึ่งสามารถสังเกตได้จากขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งได้มากกว่า 10 มิลลิเมตร

Singh และคณะ (2013) ได้ศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินจากสารสกัดจากใบโกก้างใบใหญ่ (*Rhizophora mucronata*) และศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* และ *Cryptococcus neoformans* โดยได้เปรียบเทียบความสามารถในการต้านเชื้อของ fluconazole และ itraconazole ที่ใช้เป็นยาด้านเชื้อกับ fluconazole และ itraconazole ที่มีการผสมรวมกับอนุภาคนาโนของเงินพบว่ายาต้านเชื้อทั้งสองชนิดที่มีการผสมรวมกับอนุภาคนาโนของเงินมีความสามารถในการต้านเชื้อทุกชนิดได้ดีกว่าแบบที่ไม่ได้ผสมกับอนุภาคนาโนของเงิน

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

- 3.1.1.1 ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (ปทุมไรซ์มิล แอนด์ แกรนารี จำกัด)
- 3.1.1.2 ไข่ไก่ (ท็อปส์ มาร์เก็ต)
- 3.1.1.3 หนอนไหม (สยามแม็คโคร)
- 3.1.1.4 มันฝรั่ง (ท็อปส์ มาร์เก็ต)
- 3.1.1.5 ข้าวโพดอ่อน (ท็อปส์ มาร์เก็ต)

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

- 3.1.2.1 *Cordyceps militaris* (รศ.อารี ฤทธิบุรณ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20°ซ)
- 3.1.2.2 *Staphylococcus aureus* (ภาควิชาชีววิทยา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ)
- 3.1.2.3 *Staphylococcus epidermidis* (ภาควิชาชีววิทยา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ)
- 3.1.2.4 *Pseudomonas aeruginosa* (ภาควิชาชีววิทยา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ)

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ก)

- 3.1.3.1 Potato Dextrose Agar เสริมไข่ไก่
- 3.1.3.2 Potato Dextrose Broth เสริมไข่ไก่
- 3.1.3.3 Mueller Hinton Agar
- 3.1.3.4 Nutrient Agar
- 3.1.3.5 Nutrient Broth

3.1.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 3.1.4.1 ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น HT,VT (BOSSTECH ประเทศไทย)
- 3.1.4.2 ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (BINDER ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.1.4.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น HSYC-2112B (SHANGHAI HASNC INSTRUMENT MANUFACTURE ประเทศจีน)
- 3.1.4.4 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น BSA224S-CW (SARTORIUS ประเทศเยอรมนี)
- 3.1.4.5 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง รุ่น LC-20A (BARA SCIENTIFIC ประเทศญี่ปุ่น)
- 3.1.4.6 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (HIRAYAMA ประเทศญี่ปุ่น)
- 3.1.4.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น Z 216MK (HERMLE ประเทศเยอรมนี)
- 3.1.4.8 เครื่องเขย่าคลื่นเสียงความถี่สูง (พี.อินเตอร์เทรต อีคิวเม้นท์)
- 3.1.4.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น UV-1800 (BARA SCIENTIFIC ประเทศญี่ปุ่น)
- 3.1.4.10 ตู้อบความร้อนแบบสุญญากาศ (BINDER ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.1.4.11 ตู้อบลมร้อน (MEMMERT ประเทศเยอรมนี)

3.1.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ (ต่อ)

- 3.1.4.12 เครื่องกวนสารให้ความร้อนแบบแท่งแม่เหล็ก รุ่น UC152 (STUART ประเทศอังกฤษ)
- 3.1.4.13 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) รุ่น QUANTA 250 (THERMO FISHER SCIENTIFIC ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.1.4.14 เครื่องฉาบทอง (CRESSINGTON SCIENTIFIC INSTRUMENTS ประเทศอังกฤษ)
- 3.1.4.15 ไมโครปิเปต (GILSON ประเทศเยอรมนี)
- 3.1.4.16 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 และ 250 มิลลิลิตร (SCHOTT DURAN ประเทศเยอรมนี)
- 3.1.4.17 ปีกเกอร์ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร (SCHOTT DURAN ประเทศเยอรมนี)
- 3.1.4.18 จานเพาะเชื้อ (SCHOTT DURAN ประเทศเยอรมนี)
- 3.1.4.19 กระจกบอทดวง (VITLAB ประเทศเยอรมนี)
- 3.1.4.20 หลอดทดลอง (PYREX ประเทศเยอรมนี)
- 3.1.4.21 กรวยแก้วกรอง (PYREX ประเทศเยอรมนี)
- 3.1.4.22 เวย์เนอร์ คาร์ลิเปอร์ (MOTUTOYO ประเทศญี่ปุ่น)
- 3.1.4.23 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.1.4.24 เต้าแก๊ส
- 3.1.4.25 ผ้าขาวบาง
- 3.1.4.26 เข็มเย็บเย็บ
- 3.1.4.27 ขวดแก้วแบน
- 3.1.4.28 กระจกทรงเบอร์ 1
- 3.1.4.29 ขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 3.1.4.30 หลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 3.1.4.31 ซ้อนตักสาร
- 3.1.4.32 ขวดแก้วสำหรับเพาะเลี้ยงขนาด 16 ออนซ์

3.1.5 สารเคมี

- 3.1.5.1 สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)
- 3.1.5.2 เปปโตน (peptone)
- 3.1.5.3 กลูโคส
- 3.1.5.4 ผงวุ้น (agar)
- 3.1.5.5 น้ำบริสุทธิ์สูง (ultrapure)
- 3.1.5.6 สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (AgNO_3)
- 3.1.5.7 เอทานอลร้อยละ 95
- 3.1.5.8 ยาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (tetracycline)
- 3.1.5.9 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
- 3.1.5.10 สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 3 (hydrogen peroxide)

3.2 การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง

3.2.1 การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยหนอนในขวดแก้ว

เริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงเส้นใยในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีหนอนไหม จนเกิดเป็นดอกเห็ด (ดัดแปลงจากหยุด, 2556)

3.2.2 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารแข็ง PDA เสริม

นำดอกเห็ดที่ได้มาทำการฆ่าเชื้อด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วอีก 2 ครั้ง จากนั้นตัดเป็นชิ้นๆ ความยาวประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร นำชิ้นส่วนที่ตัดแล้วไปวางบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร PDA ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้คือ มันฝรั่ง 200 กรัมต่อลิตร ข้าวโพดอ่อน 50 กรัมต่อลิตร กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ไข่ไก่ 50 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 20 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน (ดัดแปลงจากหยุด, 2556)

3.2.3 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารเหลว PDB เสริม

นำหัวเชื้อเริ่มต้นจากอาหารแข็ง PDA เสริม มาคือกจำนวน 3 ชิ้นนำไปใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว PDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้คือ มันฝรั่ง 200 กรัมต่อลิตร ข้าวโพดอ่อน 50 กรัมต่อลิตร กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และไข่ไก่ 50 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงในที่มืดในเครื่องบ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน (ดัดแปลงจากหยุด, 2556)

3.2.4 การถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลว PDB เสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อสถานะแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นแหล่งคาร์บอน

ทำการถ่ายหัวเชื้อในอาหารเหลว PDB เสริม ในหัวข้อ 3.2.3 ร้อยละ 5 ลงไปตรงกลางขวดอาหารแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นนำไปบ่มในที่มืดโดยใช้ผ้าดำคลุมที่ขวดเพาะเลี้ยงอีกที่อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 14 วัน เส้นใยจะเจริญเต็มขวดเพาะเลี้ยง (เส้นใยมีสีขาว) จากนั้นทำการเปิดดอกโดยให้แสงกับเส้นใย รอจนเกิดเป็นดอกเห็ดมีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นทำการฉีดฮอร์โมนและนำไปเลี้ยงต่อจนครบเวลาประมาณ 45 วัน นับตั้งแต่วันที่ทำการเปิดดอก โดยสูตรอาหารแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นแหล่งคาร์บอน มีส่วนประกอบดังนี้คือ มันฝรั่ง 200 กรัมต่อลิตร ข้าวโพดอ่อน 50 กรัมต่อลิตร กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ไข่ไก่ 50 กรัมต่อลิตร ดักแด้ 30 กรัมต่อลิตร และข้าวไรซ์เบอร์รี่ 60 กรัมต่อขวดเพาะเลี้ยง

3.3 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

3.3.1 การเตรียมตัวอย่าง

ทำการตัดแบ่งเห็ดถั่งเช่าสีทองออกเป็นสองส่วนคือส่วนดอกและฐาน นำไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรืออบจนกว่าจะมีความชื้นเท่ากับร้อยละ 7-10 บันทึกน้ำหนักแห้ง จากนั้นบดเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้โกร่ง (ดัดแปลงจากสุกัญญา และคณะ, 2558)

3.3.2 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำปีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องกวนสารให้ความร้อนแบบแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) จากนั้นนำดอกเห็ดที่บดแล้ว 1.5 กรัม ใส่ลงในปีกเกอร์ โดยทำการกวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบ 30 นาทีแล้วทำการกรองโดยใช้กระดาษกรองเพื่อแยกส่วนใส (ดัดแปลงจาก Cruz และคณะ, 2010)

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

3.4.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำสารสกัดที่ได้ในหัวข้อ 3.3.2 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แยกตะกอนกับส่วนใส จากนั้นนำส่วนใสไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน ใส่ลงในขวดเก็บสารละลาย (vial) ขนาด 2 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และทำการเตรียมเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยนำน้ำบริสุทธิ์สูง (ultrapure) และเมทานอล นำไปเข้าเครื่องเขย่าคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic sonicator) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30-45 นาที จากนั้นนำมากรองผ่านตัวกรอง 0.45 ไมครอนก่อนการวิเคราะห์ (ดัดแปลงจาก Li และคณะ, 2015)

3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารคอร์โดเซปินและสารมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ C18 (ขนาด 3.5 ไมโครเมตร× 250 มิลลิเมตร×4.6 มิลลิเมตร) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส ผิดตัวอย่างเข้าคอลัมน์ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร โดยใช้เมทานอลต่อน้ำบริสุทธิ์สูงในอัตราส่วน 15:85 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (ดัดแปลงจาก Li และคณะ, 2015) แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณสารคอร์โดเซปินจากพื้นที่ใต้กราฟ โดยการนำค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารคอร์โดเซปินที่วัดได้แทนในสมการเส้นตรง คือ $Y=mX+c$ ของสารคอร์โดเซปินมาตรฐาน โดยกำหนด Y คือ ค่าที่วัดได้จากพื้นที่ใต้กราฟ และ X คือ ค่าปริมาณสารคอร์โดเซปิน

3.5 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน

นำบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องกวนสารให้ความร้อนแบบแท่งแม่เหล็ก จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ในหัวข้อ 3.3.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 5 มิลลิลิตร โดยทำการกวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรท เป็น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ (ดัดแปลงจาก Cruz และคณะ, 2010)

3.6 การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้เทคนิค UV-Visible Spectrophotometry

นำอนุภาคนาโนของเงินในหัวข้อ 3.5 มาตรวจสอบลักษณะเฉพาะโดยใช้เทคนิค UV-Visible Spectrophotometry โดยใช้แสง UV-visible (UV-vis) จากเครื่อง Shimadzu UV-1800 spectrophotometer ในช่วงความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร (Wang และคณะ, 2016)

3.7 การวิเคราะห์ลักษณะ ขนาด และธาตุต่างๆ ของอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

นำอนุภาคนาโนเงินที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาทีจากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมงเพื่อกำจัดน้ำออก แล้วนำมาบดโดยใช้โกร่งหยกเพื่อให้เป็นผงละเอียด จากนั้นไปวางลงบนเทปคาร์บอน (carbon tape) แล้วนำไปทำให้พื้นผิวมีคุณสมบัตินำไฟฟ้าโดยการฉาบทองด้วยเครื่องฉาบทอง (sputter coater) เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบลักษณะ ขนาด และธาตุต่างๆ ของอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

3.8 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

3.8.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* ที่อยู่ในหลอดอาหารเอียง (slant) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) ซึ่งประกอบด้วย Beef extract 3 กรัมต่อลิตร และเปปโตเน 5 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียที่บ่มมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ซึ่งเจือจางด้วยน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 แล้วนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร สำหรับการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion เจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2 (จำนวนเซลล์เท่ากับ 10^8 โคโลนีฟอร์มมิ่งยูนิตต่อมิลลิลิตร) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.09 (จำนวนเซลล์เท่ากับ 10^6 โคโลนีฟอร์มมิ่งยูนิตต่อมิลลิลิตร) ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของตัวอย่าง (ดัดแปลงจากรัชฎาวรรณ และสุตฤดี, 2548)

3.8.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar disc diffusion

ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนเงิน ด้วยวิธี agar disc diffusion โดยนำเชื้อแบคทีเรียในหัวข้อ 3.8.1 ที่ปรับความขุ่นไว้ซึ่งมีเชื้อประมาณ 10^8 โคโลนีฟอร์มมิ่งยูนิตต่อมิลลิลิตร นำมาทำการ swab โดยใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ซึ่งประกอบด้วย Beef extract 2 กรัมต่อลิตร Acid Hydrolysate of Casein 17.5 กรัมต่อลิตร แป้ง (starch) 1.5 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 17 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำ paper disc (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิลิตร) ที่หยดสารสกัดจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง สารละลายอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพที่เติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 มิลลิโมลาร์ และ 10 มิลลิโมลาร์ รวมทั้งหยดสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท และสุดท้ายหยดยาปฏิชีวนะเตตระไซคลิน โดยใช้ automatic pipette ที่ปราศจากเชื้อ หยดสารสกัดตำแหน่งละ 10 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้นเดียวกัน คือ 25,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ใช้ความเข้มข้น 2,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยาปฏิชีวนะ ใช้ความเข้มข้น 3000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) โดยวัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร (ดัดแปลงจากชลิตา อนุพันธ์, 2558)

3.8.3 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของอนุภาคนาโนของเงินที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *P. aeruginosa* ซึ่งใช้วิธีเจือจางในอาหารเหลว Nutrient Broth โดยนำอนุภาคนาโนของเงินที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่คัดเลือกในหัวข้อ 3.8.2 มาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยเจือจางอนุภาคนาโนของเงินเป็นลำดับส่วนจะได้ความเข้มข้นเป็น 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9, 1.9 และ 0.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เติมลงไปจำนวนหลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *P. aeruginosa* ที่ปรับความขุ่นไว้ซึ่งมีเชื้อประมาณ 10^6 โคโลนีฟอร์มมิ่งยูนิตต่อมิลลิลิตร จำนวนหลอดละ 1 มิลลิลิตร และสุดท้ายใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth จำนวนหลอดละ 1 มิลลิลิตรเช่นเดียวกัน ส่วนตัวควบคุมเชิงลบคือหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth เพียงอย่างเดียวและตัวควบคุมเชิงบวกคือหลอดที่มีอนุภาคนาโนของเงินเพียงอย่างเดียว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นบันทึกผลเป็นบวกลบสำหรับหลอดที่อาหารมีลักษณะขุ่น (เชื้อเจริญเติบโต) และบันทึกผลเป็นลบสำหรับหลอดที่อาหารมีลักษณะไม่ขุ่น (เชื้อไม่เจริญเติบโต) (ดัดแปลงจากธนภพ โสตรโยม และคณะ, 2558)

3.8.4 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC)

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้เชื้อไม่เจริญในอาหารเหลวนั้น สามารถนำมาหาค่า MBC ได้ โดยนำหลอดที่ทำการทดสอบจากการหาค่า MIC ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอดมา 0.1 มิลลิลิตร นำมา spread plate บนอาหาร Nutrient agar (NA) ซึ่งประกอบด้วย Beef extract 3 เปปโตน 5 และผงวุ้น 15 กรัมต่อลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจากธนภพ โสตรโยม และคณะ, 2558)

3.9 การนำอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพไปใช้ในการทำสบู่เพื่อยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย

นำเบสสบู่กลีเซอรินใส่ไปหลอมละลายในไมโครเวฟ จากนั้นเติมอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพลงไปในไม่เกินร้อยละ 4 ของน้ำหนักเบสสบู่กลีเซอรินใส่ คนให้เข้ากัน หากเกิดฟองให้ใช้สเปรย์แอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ฉีดบางๆ บนผิวหน้าเพื่อลดการเกิดฟอง จากนั้นเทลงพิมพ์สบู่และฉีดด้วยสเปรย์แอลกอฮอล์ร้อยละ 95 บางๆ อีกครั้ง รอจนแข็งจะได้สบู่จากอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพ

3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Minitab 16 ในหัวข้อที่ 3.8.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar disc diffusion โดยใช้วิธี Factorial design เพื่อหาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่ยับยั้งได้ดีที่สุด โดยวิธีที่ใช้จะประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ เชื้อแบคทีเรียและสารที่ใช้ทดสอบ ซึ่งปัจจัยแรกจะมี 3 ระดับ คือ *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *P. aeruginosa* ส่วนปัจจัยที่ 2 มี 3 ระดับ คือ อนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 10 มิลลิโมลาร์ สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท และยาปฏิชีวนะเตตระไซคลิน ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยค่า $p \leq 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

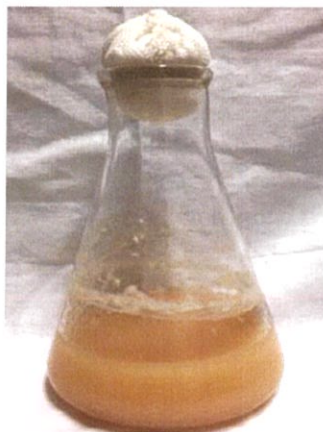
4.1 ผลของการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง

จากการศึกษาระยะการเจริญเติบโตของหัวเชื้อเริ่มต้นและลักษณะเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA เสริมไข่ไก่ ดังแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลาประมาณ 14 วัน ลักษณะของเส้นใยมีสีขาว แผ่กระจายเป็นวงรอบขึ้นส่วนของเห็ดถั่งเช่าสีทอง



รูปที่ 4.1 ลักษณะเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA เสริม ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 14 วัน

การศึกษาระยะการเจริญเติบโตของหัวเชื้อเริ่มต้นเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ดังแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่าอาหารเหลว PDB เสริมไข่ไก่ มีลักษณะหนืดและขุ่นขึ้น เนื่องจากเส้นใยของเห็ดถั่งเช่าสีทองมีการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณมากขึ้น จึงทำให้อาหารมีลักษณะที่แตกต่างจากอาหารเริ่มต้น



รูปที่ 4.2 ลักษณะเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เจริญในอาหารเหลว PDB เสริม ในที่มืด ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อผลิตดอกในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อนำมาเปิดดอกในที่ที่มีแสงสว่างเป็นเวลา 7 วัน เส้นใยจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีส้มทอง จากนั้นเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาประมาณ 14 วันจะมีตุ่มดอกเกิดขึ้น และเมื่อครบเวลาประมาณ 45 วัน เห็ดถั่งเช่าสีทองจะมีการเจริญเติบโตเต็มที่ ดอกของเห็ดมีลักษณะสูงยาวเป็นทรงกระบอก มีสีส้มทอง ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 ลักษณะของเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารเหลว PDB เสริม ในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 45 วัน

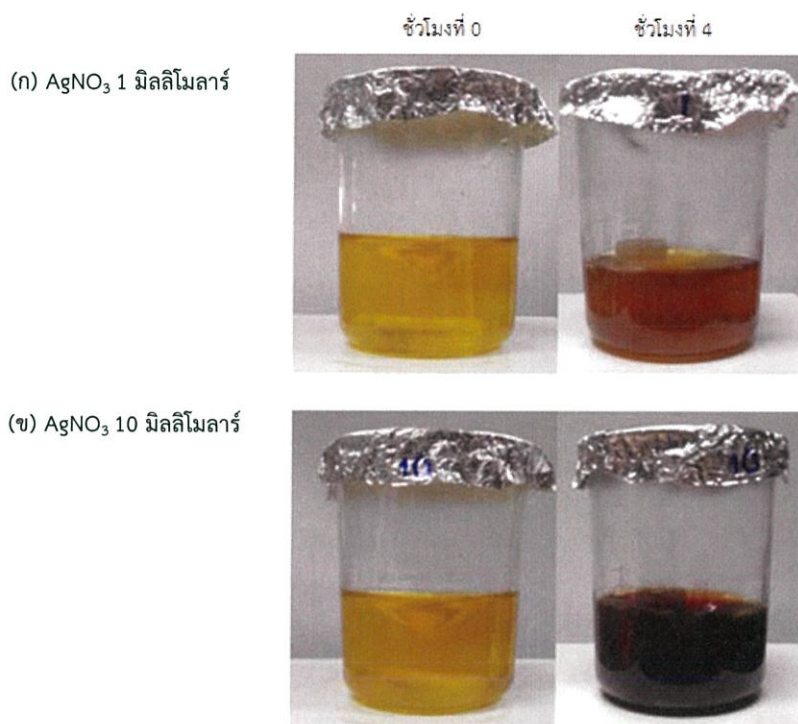
4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

จากการศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยการนำสารสกัดที่ได้จากเห็ดถั่งเช่าสีทองมาวิเคราะห์ปริมาณสารคอร์โคเซปินด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง พบว่ามีสารคอร์โคเซปินใน Retention Time (Rt) ใกล้เคียงกับ Rt ของคอร์โคเซปินมาตรฐานที่เวลา 12.16 นาที ในปริมาณ 4.11 มิลลิกรัมต่อ 1 กรัม น้ำหนักแห้ง ซึ่งปริมาณสารคอร์โคเซปินที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้มีปริมาณที่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยการตรวจสอบและวิเคราะห์ปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์โคเซปินในเห็ดถั่งเช่า พบว่าดอกของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน มีปริมาณสารคอร์โคเซปินเท่ากับ 3.41 มิลลิกรัมต่อ 1 กรัม น้ำหนักแห้ง (Lei และคณะ, 2009) จะเห็นได้ว่ามีปริมาณสารคอร์โคเซปินน้อยกว่า อย่างไรก็ตามปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น สายพันธุ์อาหารเพาะเลี้ยง ความเป็นกรดต่างของอาหาร สภาวะแวดล้อมที่ใช้เพาะเลี้ยง ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ระยะเวลาการเก็บผลผลิต และวิธีการสกัดสาร เป็นต้น

4.3 ผลการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินและการวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้เทคนิค UV-Visible Spectrophotometry

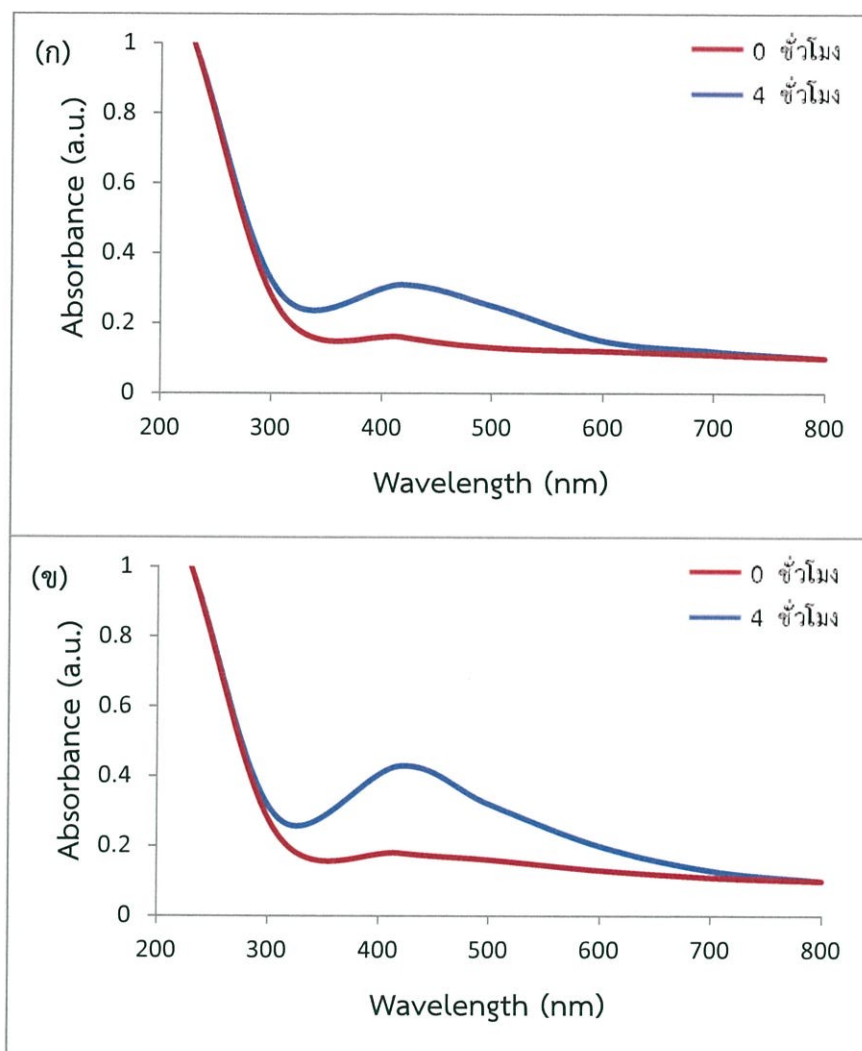
ในการศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินโดยการนำสารสกัดของเห็ดถั่งเช่าสีทอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมนลงในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นค่อยๆ เติมนสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 5 มิลลิลิตร โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท เป็น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ ทำการกวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 4 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.4 พบว่าสีของสารละลายจะมีสีเหลืองอ่อนก่อนทำปฏิกิริยา และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มหลังจากทำปฏิกิริยา 4 ชั่วโมง กับสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท แต่จะเห็นได้ว่า ภาพที่ 4.4 (ข) สีของสารละลายจะมีสีเข้มกว่ารูปที่ 4.4 (ก) เนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทต่างกัน ซึ่งลักษณะสีน้ำตาลเข้มที่ปรากฏเนื่องจากการปลดปล่อยคลื่นผิวพลาสมอน (Surface plasmon resonance, SPR) ของอนุภาคนาโนของเงิน ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ของการเกิดอนุภาคนาโนของเงินในส่วนผสมของปฏิกิริยา (Wang และคณะ, 2016)



รูปที่ 4.4 (ก) การเปลี่ยนสีของสารละลายก่อนและหลังการเติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ (ข) การเปลี่ยนสีของสารละลายก่อนและหลังการเติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่เติมลงไปใต้น้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรและสารสกัดของดอกเห็ดถึงเช่าสีทอง 10 มิลลิลิตร

ซึ่งอนุภาคนาโนของเงินที่ได้จะนำไปวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะโดยใช้เทคนิค UV-Visible Spectrophotometry ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ผลการดูดกลืนสเปกตรัมของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 418 และ 419 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการงานวิจัยฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้สารสกัดจากเห็ดถึงเช่าสีทองที่แสดงค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนของเงินสูงสุดที่ 415 นาโนเมตร และพีกก็จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยา เนื่องจากเห็ดถึงเช่าสีทอง ประกอบด้วย พอลิแซคคาไรด์ คอร์โดเซปิน กรดคอร์โดเซปิก ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส และไฟบริโอไลซิน ปริมาณมาก อีกทั้งองค์ประกอบเหล่านี้ในสารสกัดของเห็ดถึงเช่าสีทองสามารถเป็นตัวรีดิวซ์สารเคมีและมีปริมาณเพียงพอสำหรับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินทางชีวภาพ (Wang และคณะ, 2016)

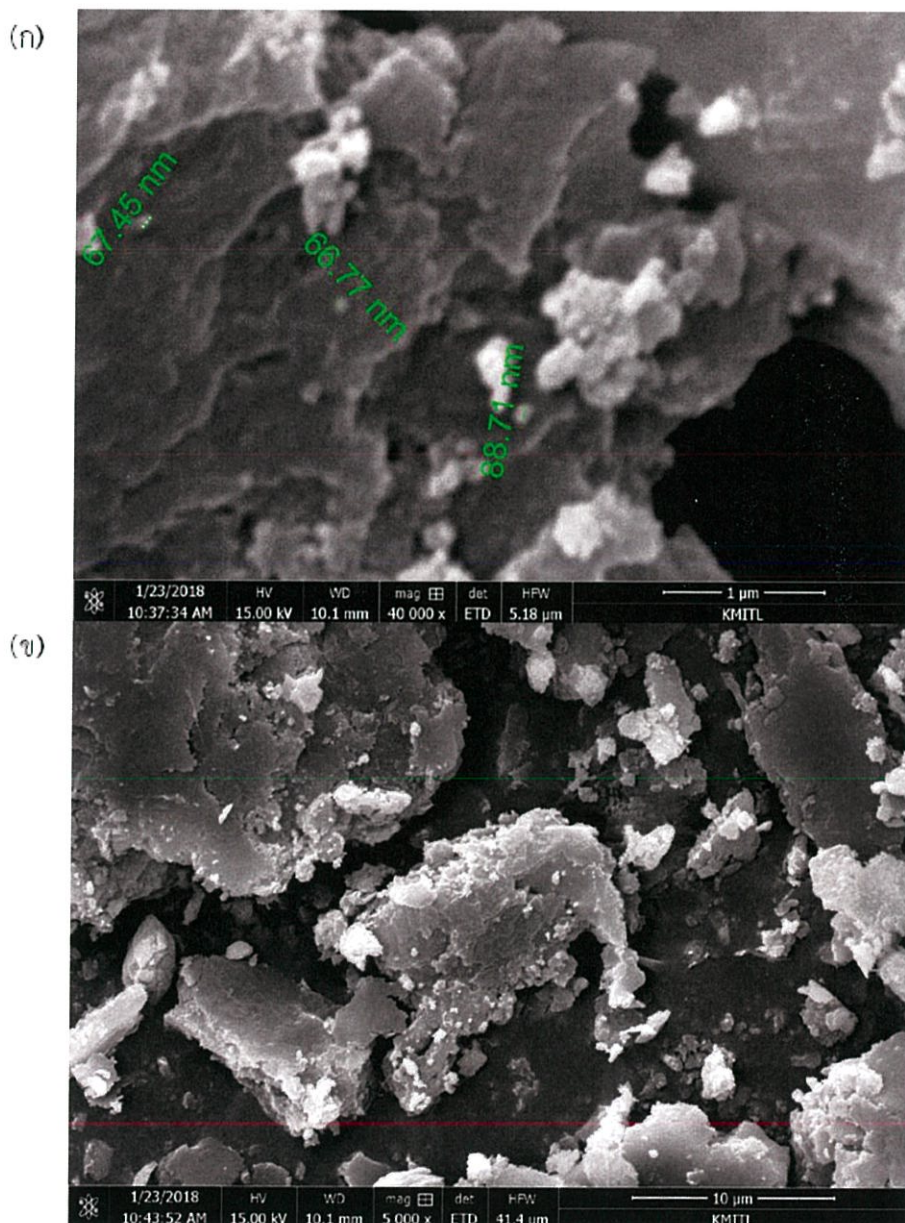


รูปที่ 4.5 (ก) การดูดกลืนสเปกตรัมของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ในเตรทความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ (ข) การดูดกลืนสเปกตรัมของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ในเตรทความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

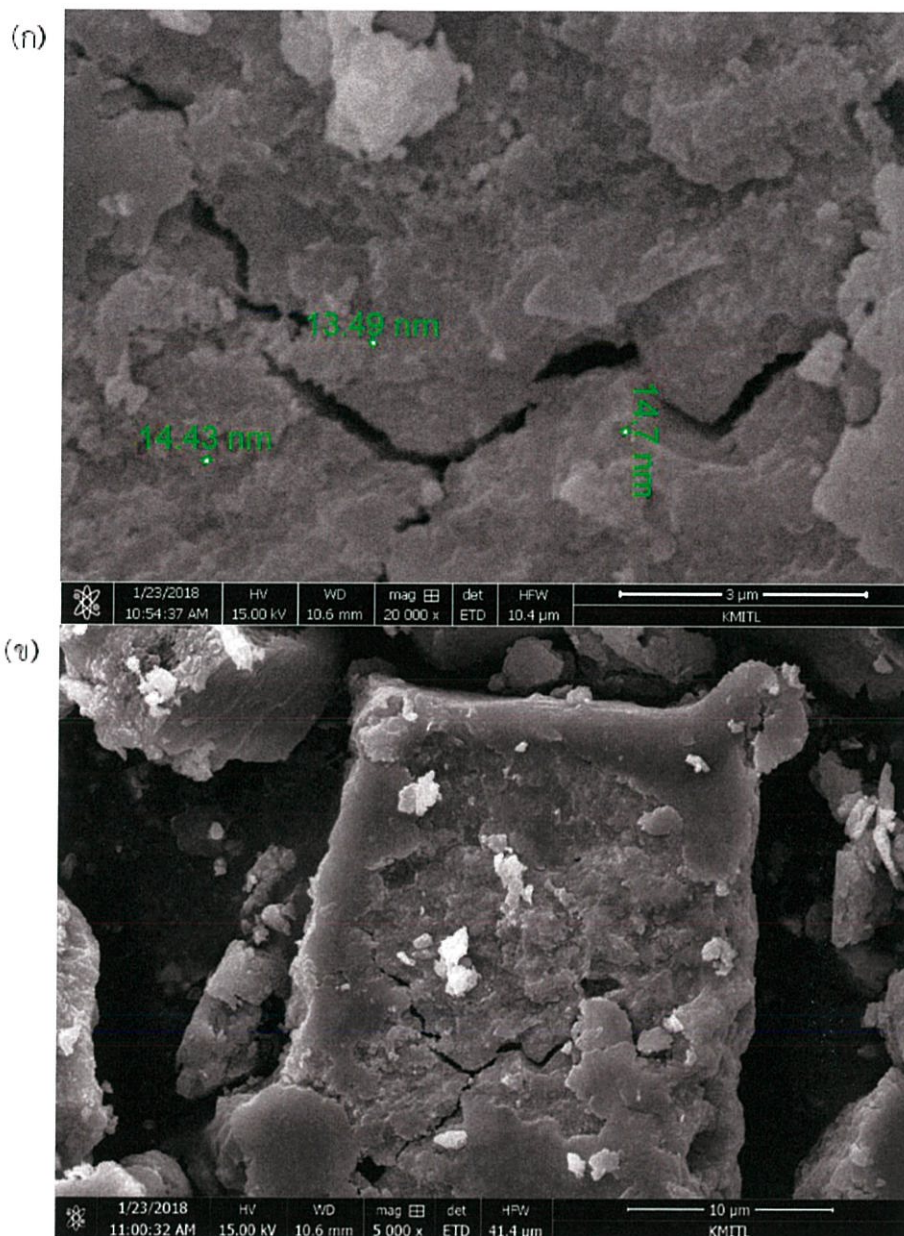
4.4 ผลการวิเคราะห์ลักษณะ ขนาด และธาตุต่างๆ ของอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

การวิเคราะห์ลักษณะและขนาดของอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเป็นการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโนของเงิน ดังแสดงในรูปที่ 4.6 และ 4.7 แสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนของเงินมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอจึงสามารถระบุถึงความเสถียรภาพของอนุภาคนาโนของเงินได้ (Sadeghi และ Gholamhoseinpoor, 2015) และอนุภาคนาโนของเงินจะมีลักษณะเป็นทรงกลม โดยอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ในเตรทความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 74.31 และ 14.21 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ในเตรทความ

เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ มีขนาดที่ใหญ่กว่าอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และพบว่าขนาดของอนุภาคนาโนที่นำไปประยุกต์ใช้ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 1-100 นาโนเมตร ซึ่งเป็นระดับขนาดที่มีความน่าสนใจทางนาโนเทคโนโลยีเป็นอย่างมาก (Dahl, Mqddux และ Hutchison, 2007) นอกจากนี้มีงานวิจัยได้ศึกษาการใช้เส้นใยของเห็ดถั่งเช่าสีทองในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน พบว่าเมื่อนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope: TEM) อนุภาคนาโนของเงิน มีรูปร่างเป็นทรงกลมและมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 15 นาโนเมตร (Wang และคณะ, 2016) ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการทดลองของผู้วิจัย



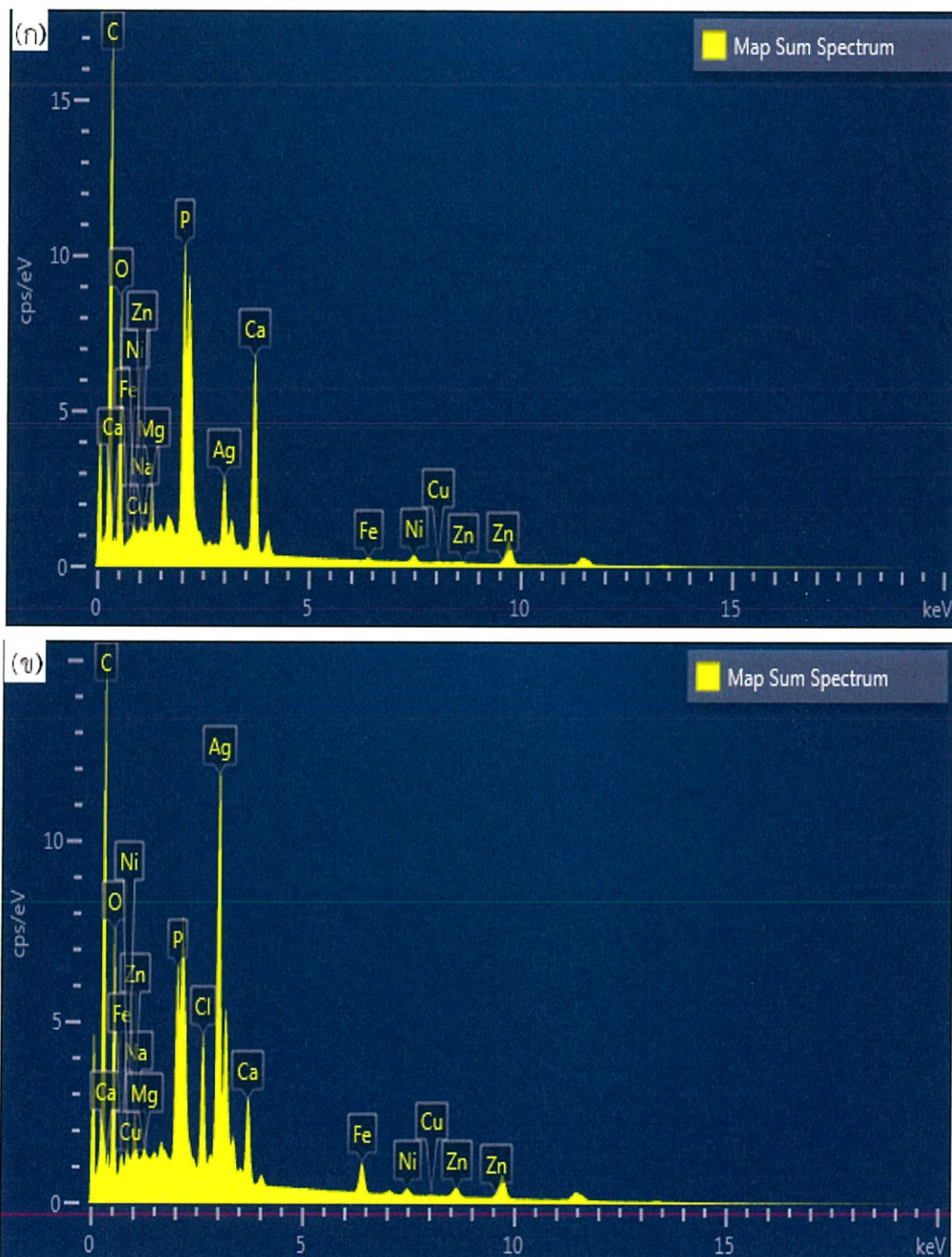
รูปที่ 4.6 ลักษณะและขนาดของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 มิลลิโมลาร์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ก) ที่กำลังขยาย 40000 เท่า (ข) ที่กำลังขยาย 5000 เท่า



รูปที่ 4.7 ลักษณะและขนาดของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 10 มิลลิโมลาร์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ก) ที่กำลังขยาย 20000 เท่า (ข) ที่กำลังขยาย 5000 เท่า

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุต่างๆ ในอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ดังแสดงในรูปที่ 4.8 และ 4.9 เป็นการศึกษาเพื่อหาชนิดและปริมาณของธาตุที่อยู่ในอนุภาคนาโนของเงิน โดยอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ พบปริมาณธาตุคาร์บอนสูงที่สุดร้อยละ 23.09 และ 20.73 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 เนื่องจากแผ่นเทปคาร์บอนที่นำมาติดอนุภาคนาโนของเงินเพื่อนำไปศึกษาลักษณะขนาด และธาตุต่างๆ เมื่อนำไปศึกษาหาปริมาณธาตุแล้วจึงทำให้พบธาตุคาร์บอนอยู่ในปริมาณมากสำหรับปริมาณธาตุซิลเวอร์ของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ พบอยู่ที่ร้อยละ 2.78 ซึ่งน้อยกว่าอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พบอยู่ที่ร้อยละ 13.36 รองจากธาตุคาร์บอน ซึ่ง

สอดคล้องกับงานวิจัยการศึกษาความคงตัวและการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินโดยใช้สารสกัดจาก *Ziziphora tenuior* (Zt) ที่อุณหภูมิต้อง พบว่าเมื่อนำอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ได้มาวิเคราะห์ธาตุต่างๆ มีปริมาณธาตุซิลเวอร์ของอนุภาคนาโนของเงินที่สูงเช่นกัน (Sadeghi และ Gholamhoseinpoor, 2015)



รูปที่ 4.8 ธาตุต่างๆ ของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจาก (ก) สารละลายซิลเวอร์ในเตรท 1 มิลลิโมลาร์ (ข) สารละลายซิลเวอร์ในเตรท 10 มิลลิโมลาร์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ตารางที่ 4.1 ปริมาณธาตุๆ ของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 และ 10 มิลลิโมลาร์

ธาตุ	ร้อยละของน้ำหนัก AgNPs ที่เตรียมจาก AgNO ₃ 1 mM	ร้อยละของน้ำหนัก AgNPs ที่เตรียมจาก AgNO ₃ 10 mM
คาร์บอน (C)	23.09	20.73
ออกซิเจน (O)	66.74	59.00
โซเดียม (Na)	0.00	0.24
แมกนีเซียม (Mg)	0.71	0.16
ฟอสฟอรัส (P)	2.23	1.01
คลอรีน (Cl)	0.00	1.41
แคลเซียม (Ca)	3.69	1.40
เหล็ก (Fe)	0.13	1.36
นิกเกิล (Ni)	0.51	0.41
ทองแดง (Cu)	0.12	0.10
สังกะสี (Zn)	0.00	0.82
เงิน (Ag)	2.78	13.36

4.5 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar disc diffusion

การทดสอบบริเวณที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (inhibition zone test) ด้วยวิธี agar disc diffusion โดยใช้แบคทีเรียก่อโรคบนผิวหนัง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Pseudomonas aeruginosa* ในการทดสอบ ดังแสดงในรูปที่ 4.9 พบว่าอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 10 มิลลิโมลาร์ มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้ดี เนื่องจากได้มีศึกษากระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินที่ได้จากการสังเคราะห์ทางชีวภาพ พบว่าอนุภาคนาโนของเงินที่มีขนาดเล็ก จะมีความสามารถในการที่จะเข้าไปจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ดีมากขึ้น ซึ่งอนุภาคนาโนของเงินมีประจุบวก (Ag⁺) เมื่อสัมผัสกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย จะสามารถแพร่ประจุบวกไปเกาะตามผนังเซลล์และแทรกเข้าไปภายในเซลล์ของแบคทีเรียทำให้เกิดการรวมตัวของ DNA ซึ่งเกิดเป็น DNA condensation และยังรบกวนการทำงานของสารส่งสารเข้าออกระหว่างเซลล์ การหายใจระดับเซลล์ และหลังจากนั้นอนุภาคนาโนของเงินจะเกิดการสลายตัวและปลดปล่อย silver ion (Ag⁺) ที่มีขนาดเล็กและจำนวนมากออกมายับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว (Rai และคณะ, 2009) แต่ในทางตรงกันข้ามอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 มิลลิโมลาร์และสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากอาจใช้ความเข้มข้นของสารดังกล่าวน้อยเกินไปจึงส่งผลให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ สารละลายซิลเวอร์ไนเตรทซึ่งเป็นตัวควบคุมเชิงลบ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้เพียงเล็กน้อย และสุดท้ายยาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน ซึ่งเป็นตัวควบคุมเชิงบวกสามารถยับยั้งการเจริญ

ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนของเงินที่สังเคราะห์ทางชีวภาพโดยใช้ดอกของเห็ดถั่งเช่าสีทองมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียก่อโรคบนผิวหนังได้ดี



รูปที่ 4.9 ผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar disc diffusion ของเชื้อแบคทีเรีย (ก) *Staphylococcus aureus* (ข) *Staphylococcus epidermidis* (ค) *Pseudomonas aeruginosa*

ในขณะเดียวกัน ได้ทำการเปรียบเทียบบริเวณที่มีการยับยั้งของอนุภาคนาโนของเงินโดยแบคทีเรียก่อโรคบนผิวหนัง 3 ชนิด ซึ่งมีแบคทีเรียแกรมบวก (Gram Positive) 2 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* แบคทีเรียเป็นแกรมลบ (Gram Negative) 1 ชนิด คือ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของเงินสามารถต้านแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ พบว่าความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบคือความหนาของชั้นเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ในผนังเซลล์ ดังนั้นผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการต้านเชื้อของอนุภาคนาโนของเงินลดลงอาจจะเกิดจากความหนาผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (Wang และคณะ, 2016)

ตารางที่ 4.2 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ยับยั้ง (มิลลิเมตร) ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบนผิวหนังต่างๆ

เชื้อแบคทีเรีย	AgNPs ที่เตรียมจาก AgNO ₃ 1 mM	AgNPs ที่เตรียมจาก AgNO ₃ 10 mM	AgNO ₃	สารสกัด	ยาปฏิชีวนะ
<i>S. aureus</i>	-	14.53±0.96 ^b	7.30±0.10 ^b	-	20.87±0.75 ^a
<i>S. epidermidis</i>	-	15.27±0.90 ^b	7.13±0.15 ^b	-	20.53±0.40 ^a
<i>P. aeruginosa</i>	-	17.37±0.75 ^a	8.03±0.05 ^a	-	21.97±0.05 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์ที่ต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p≤0.05)

4.6 ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)

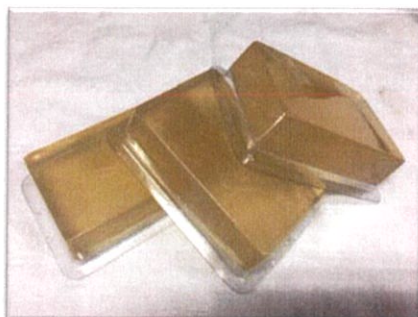
การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของอนุภาคนาโนของเงินที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนของเงินที่แตกต่างกัน คือ 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9, 1.9 และ 0.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *S. epidermidis* ได้ คือ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ได้ คือ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งสามารถสังเกตได้จากความขุ่นของอาหาร ถ้าหากอาหารมีลักษณะขุ่นเมื่อเทียบกับตัวควบคุมคืออาหารเหลว NB แสดงว่าเชื้อมีการเจริญเติบโต และถ้าอาหารมีลักษณะใสเมื่อเทียบกับตัวควบคุมคืออาหารเหลว NB แสดงว่าเชื้อไม่มีการเจริญเติบโต ดังแสดงในรูปที่ 4.11

4.7 ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC)

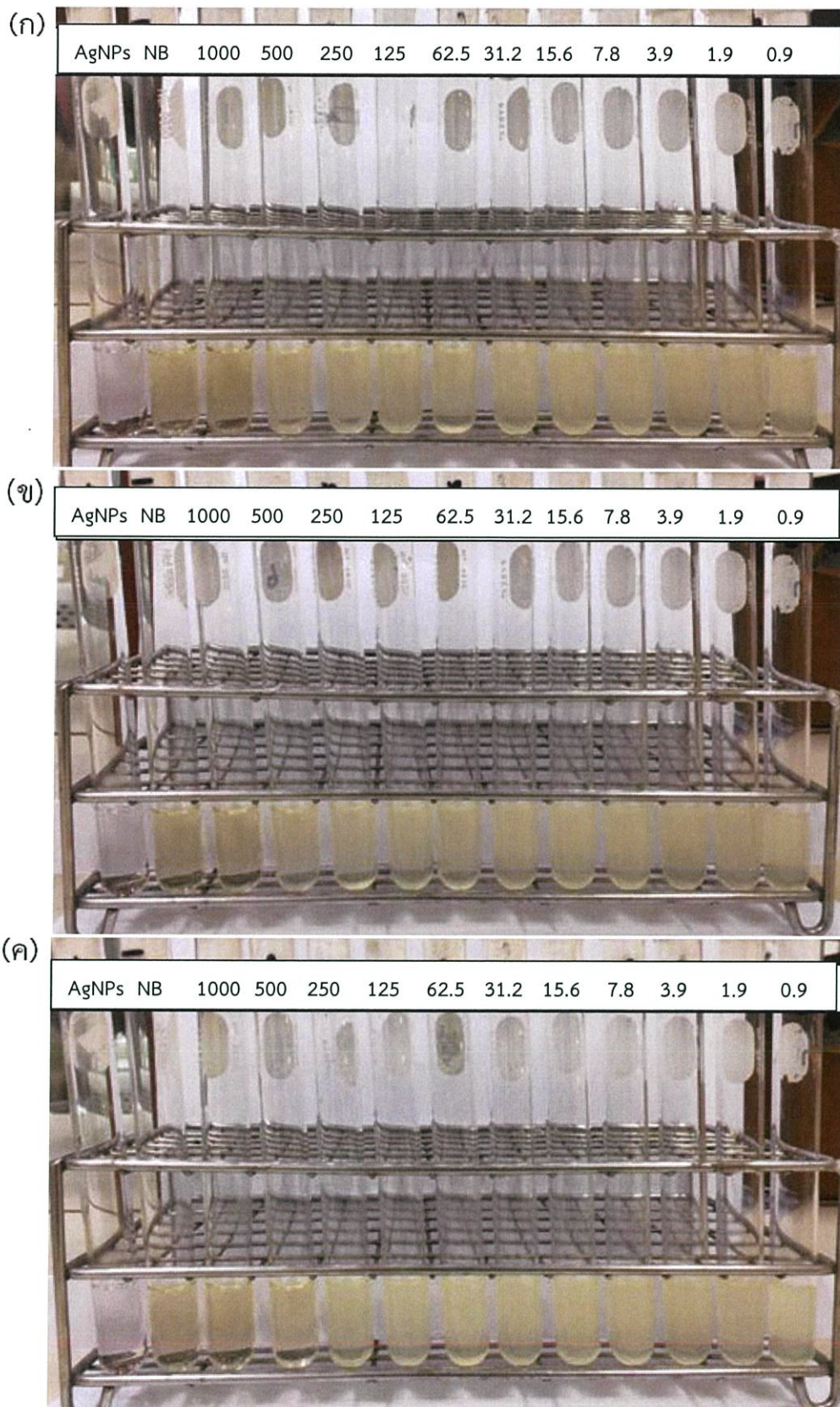
จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เชื้อไม่เจริญในอาหารเหลวนั้น สามารถนำมาหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ โดยนำหลอดที่ทำการทดสอบในหัวข้อ 4.6 ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอดมาศึกษา พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง NA ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 เนื่องจากเชื้อถูกยับยั้งการเจริญเติบโตในขั้นตอนการทดสอบการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของอนุภาคนาโนของเงินที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้

4.8 ผลการนำอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพไปใช้ในการทำสบู่เพื่อยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย

จากการทดลองการนำอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพไปใช้ในการทำสบู่เพื่อยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียพบว่าสบู่ที่ได้นั้นมีค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ 5.5 ซึ่งเป็นระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อผิวหรือทำลายชั้นไขมันของผิว (วัลย์อร และอาภรณ์, 2553) ลักษณะภายนอกของสบู่มีลักษณะเป็นก้อนไม่มีเนื้อเหลวหรือแตกหักง่าย ดังแสดงในรูปที่ 4.10 ไม่มีกลิ่นหืน และมีคุณสมบัติเฉพาะในบางกรณี เช่น สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากในขั้นตอนการทำสบู่ได้เติมอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 10 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปร้อยละ 4 ของน้ำหนักเบสบู่กลีเซอรินใส



รูปที่ 4.10 ลักษณะภายนอกของสบู่



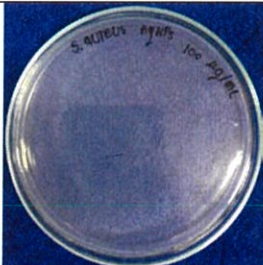


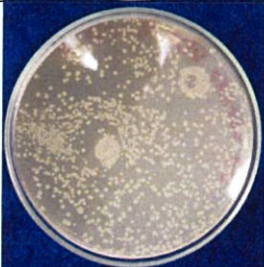


รูปที่ 4.11 ผลของความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (ก) *Staphylococcus aureus* (ข) *Staphylococcus epidermidis* (ค) *Pseudomonas aeruginosa*

ตารางที่ 4.3 ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมล.)	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1000	-	-	-
500	+	+	-
250	+	+	+
125	+	+	+
62.5	+	+	+
31.2	+	+	+
15.6	+	+	+
7.8	+	+	+
3.9	+	+	+
1.9	+	+	+
0.9	+	+	+

หมายเหตุ : “-” หมายถึง เชื้อไม่เจริญเติบโต และ “+” หมายถึง เชื้อเจริญเติบโต โดยจะมีตัวควบคุม คือ อาหารเหลว NB

ตารางที่ 4.4 ผลการหาความเข้มข้นของอนุภาคนาโนของเงินต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้

เชื้อแบคทีเรีย	อนุภาคนาโนเงินสังเคราะห์ ที่ความเข้มข้น 1000 µg/mL	อนุภาคนาโนเงินสังเคราะห์ ที่ความเข้มข้น 500 µg/mL
<i>S. aureus</i>		
<i>S. epidermidis</i>		
<i>P. aeruginosa</i>		

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินโดยใช้สารสกัดจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย เมื่อนำมาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง ผลที่ได้จากการทดลองพบว่าปริมาณคอร์ไดเซปิน เท่ากับ 4.11 มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำมาวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนของเงิน พบว่าอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 74.31 และ 14.21 นาโนเมตร ตามลำดับ สำหรับการดูดกลืนสเปกตรัม พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 418 และ 419 นาโนเมตร ตามลำดับ และเมื่อนำไปศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย พบว่าอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 10 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ดี และยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (*P. aeruginosa*) ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ *S. epidermidis*) โดยบริเวณที่มีการยับยั้งมีค่าเท่ากับ 17.37, 15.27 และ 14.53 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่อนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 มิลลิโมลาร์และสารสกัดจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ และเมื่อนำอนุภาคนาโนของเงินมาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ *S. epidermidis*) ได้ คือ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเชื้อแบคทีเรีย (*P. aeruginosa*) คือ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดลองคาดว่าผลที่ได้จากศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปสู่งานวิจัยและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการดูแลการติดเชื้อที่ผิวหนัง เช่น การนำไปทำสบู่หรือครีมบำรุงผิว เป็นต้น อีกทั้งยังลดปัญหาการดื้อยาของเชื้อ ช่วยเพิ่มมูลค่าและสนับสนุนการใช้สารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง รวมทั้งกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินโดยใช้สารสกัดจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในโครงการพิเศษฉบับนี้ได้ทำการศึกษาการสกัดสารในดอกของเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อสังเคราะห์เป็นอนุภาคนาโนของเงิน เนื่องจากสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทองมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นควรศึกษาสารตัวอื่นๆ ในเห็ดถั่งเช่าสีทอง เพื่อหาความจำเพาะของสารแต่ละชนิด และนำไปสังเคราะห์เป็นอนุภาคนาโนของเงินสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

2. ในโครงการพิเศษฉบับนี้ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 14.21 นาโนเมตร ซึ่งได้มีงานวิจัยก่อนหน้านี้กล่าวว่าหากอนุภาคนาโนของเงินมีขนาดเล็กก็ จะทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีด้วย ดังนั้นควรจะทำการศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโน

โนของเงินให้มีขนาดที่เล็กลงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด

3. ในโครงการพิเศษฉบับนี้ได้ศึกษาการทำสบู่เพื่อนำใช้ในการดูแลการติดเชื้อที่ผิวหนัง ดังนั้นควรศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อของสบู่ และการทำผลิตภัณฑ์ตัวอื่น เช่นครีมทาผิว เพื่อช่วยลดปัญหาการดื้อยาของเชื้อ ช่วยเพิ่มมูลค่าและสนับสนุนการใช้สารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

เอกสารอ้างอิง

- จารุวรรณ ฤทธิ์เดช ไอยรดา จันทรโสม ถาวร วินิจสานันท์ หนึ่งฤทัย ธาราว์ชรสาศตร และประภาพรพรรณ ซอหะซัน. 2558. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทอง. วิทยาศาสตร์เกษตร 46 (3): 703.
- ชลิดา อนุพันธ์. 2558. ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากมะสัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยราชภัฏกาญจนบุรี, กาญจนบุรี.
- ธนภพ โสตรโยม. 2558. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย *Echerichia coli* และ *Salmonella spp.* ของสารสกัดจากหอมหัวใหญ่. โครงการวิจัย. มหาวิทยาลัย เทคโนโลยีราชมงคลพระนคร, กรุงเทพมหานคร.
- ธัญญา ทะพิงค์แก. 2555. เห็ดถั่งเช่า.(ออนไลน์). Available :<http://www.facagri.cmru.ac.th/2013/wp-content/uploads/2015/02/poster-cordyceps>. (สืบค้นวันที่ 13 มีนาคม 2561).
- ธีรวิมล หวังอำนวยการ และรัชณี ไสยประจง. 2550. ความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์และสารต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพรไทยบางชนิด. รายงานการวิจัยนี้ได้รับทุนส่งเสริมงานวิจัยจากมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย, กรุงเทพมหานคร.
- พวงรัตน์ ขจิตวิทยานุกูล และจิรภัทร อนันต์ภัทรชัย. 2555. นาโนซิลเวอร์ (Nano-Ag). (ออนไลน์). Available : http://web.eng.nu.ac.th/eng2012/cei/nanodatabase/info2.php?cat_id=8&p_id=235. (สืบค้นวันที่ 13 มีนาคม 2561).
- รัชฎาวรรณ เดชมณี และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2548. แถบ Thin-layer Chromatography ของสารทุติยภูมิที่ผลิตโดย *Bacillus firmus* และการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *Glycines*. รายงานการประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 1-4 กุมภาพันธ์ 2548. หน้า 313 -320.
- วลัยอร ปรัชญพฤทธิ และอาภรณ์ บุรีธาร. 2553. ค่าความเป็นกรด-ด่างของผิวหนังหลังล้างด้วยสบู่เหลว น้ำประปา และน้ำกลั่น ณ เวลาต่างๆ. วารสารกรมการแพทย์. 35 (2): 86-93.
- วิโรจน์ แก้วเรือง. 2556. ถั่งเช่าใหม่ไทย. (ออนไลน์). Available : <https://www.gotoknow.org/Posts/552691>. (สืบค้นวันที่ 13 มีนาคม 2561).
- ศิวาพร ศิวาเวช . 2542. การสุขาภิบาลโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.
- สุกัญญา หลีแจ้ นาชนิน บากาสะแต วรียา อินตะมนต์ ชณิสสา ก่อกิจไพศาล ธีรทัศน์ สุดสาย และอัมพรรัตน์ ประไพวงศ์. 2558. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงบนข้าวไรซ์เบอร์รี่และข้าวหอมมะลิ. รายงานการประชุมวิชาการระดับชาติ ณ มหาวิทยาลัยรังสิต. 24 เมษายน 2558. หน้า 210-217.
- หยุด แซ่มประเสริฐ. 2556. การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง. การนำเสนอการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง. สระบุรี.
- Alexander J.M., Arlene H.S. 2010. Infectious diseases. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 8th edition. Philadelphia: Elsevier pp.357-380.

- Bitsori M., Maraki S., Koukouraki S. 2012. *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infection in children: risk factors and outcomes. *Journal of Urology*. 187: 260-4.
- Byung-Joo Lee, Mi-Ae Lee, Yong-Gyun Kim, Kwang-Won Lee, Young-Sang Choi, Byung-Eui Lee and Ho-Yeon Song. 2013. Cultural characteristics of *C. militaris* strain 'Yedang 3' on various media and nutritional conditions. *Journal*.
- C. Nordqvist. 2011. What Is Body Odor (B.O.)? What Causes Body Odor. (Online). Available : <http://www.vali-tech.net/home/article-read.php?ArticleId=9>.
- Cruz D., P.L. Fale, A. Mourato, P.D. Vaz, M.L. Serralheiro, A.L. Lino. 2010. Preparation and physicochemical characterization of Ag nanoparticles biosynthesized by *Lippia citriodora* (Lemon Verbena). *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 81: 67-73.
- Dahl J.A., Maddux B.L. and Hutchison, J.E. 2007. Toward greener nanosynthesis. *Chemical Reviews (ACS Publications)*. 107: 2228-2269.
- Das J., Paul Das, M., and Velusamy, P. 2013. *Sesbania grandiflora* leaf extract media-ated green synthesis of antibacterial silver nanoparticles against selected human pathogens. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 104: 265-270.
- Dong J.Z., Ding, J., Yu P.Z., Lei, C., Zheng, J.X. and Wang, Y. 2013. Composition and distribution of the main active components in selenium-enriched fruit bodies of *Cordyceps militaris* link. *Food Chemistry*. 137: 164-167.
- Gan P.P., and Li S. 2012. Potential of plant as a biological factory to synthesize gold and silver nanoparticles and their applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 11: 169-206.
- Gu Y.X., Wang Z.S., Li S.X., Yuan Q.S. 2007. Effect of multiple factors on accumulation of nucleoside and bases in *Cordyceps militaris*. *Food Chemistry*. 102: 1304-1309.
- John B. 1999. Experimental Staph Vaccine Broadly Protective in Animal Studies. *National Institutes of Health*. 301: 402-1663.
- Lei H., Li Q., Chen Y., Wang X. and Zhou X. 2009. Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp. *African Journal of Microbiology Research*. 3: 957-961.
- Lin L., Wang W., Huang J., Li, Q., Sun D., Yang X. and Wang Y. 2010. Nature factory of silver nanowires: Plant-mediated synthesis using broth of *Cassia fistula* leaf. *Chemical Engineering Journal*. 162: 852-858.
- Linnaeus and Fries. 1818. *Cordyceps militaris*. (ออนไลน์). Available : https://inpn.mnhn.fr/Espece/cd_nom/46486/tab/taxo?lg=en. (สืบค้นวันที่ 13 มีนาคม 2561).
- Li Yi., Guan M., Li J. 2015. Effects of cooking on the contents of adenosine and cordycepin in *Cordyceps militaris*. *Procedia Engineering*. 102: 485-491.

- Mafuné F., Kohno J.y., Takeda Y. and Kondow T. 2002. Full Physical Preparation of Size-Selected Gold Nanoparticles in Solution: Laser Ablation and Laser-Induced Size Control. *The Journal of Physical Chemistry*. 106: 7575-7577.
- Nurmila Nari, Ahmad Suparmin, Tatsuya Kato, and Enoch Y. Park. 2016. Improved Cordycepin Production in a Liquid Surface Culture of *Cordyceps militaris* Isolated from Wild Strain. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 21: 595-600.
- Rai M.K., Deshmukh S.D., Ingle A.P. and Gade A.K. 2009. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug - resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 112: 841-852.
- Rajakannu S., Shankar S. and Subramanian S. 2015. Original Research Article Biosynthesis of silver Nanoparticles using *Garcinia mangostana* Fruit Extract and their Antibacterial, Antioxidant Activity. *International Journal of Current Microbiology*. 4: 944-952.
- Sadeghi B. and Gholamhoseinpoor F. 2015. A study on the stability and green synthesis of silver nanoparticles using *Ziziphora tenuior* (Zt) extract at room temperature. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 134: 310-315.
- Shankar S.S., Rai A., Ahmad A. and Sastry M. 2004. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. *Journal of Colloid and Interface Science*. 275: 496- 502.
- Shih I.L., Tsai K.L. and Hsieh C.Y. 2007. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. *Biochemical Engineering Journal*. 33: 193-201.
- Singh M., Kumar M., Kalaivani R., Manikandan S. and Kumaraguru, A.K. 2013. Metallic silver nanoparticle: a therapeutic agent in combination with antifungal drug against human fungal pathogen. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 36: 407-415.
- Strateva T., Mitov I. 2011. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Annals of Microbiology*. 61: 717-32.
- Tuli H.S., Sharma A.K., Sandhu S.S., Kashyap D. 2014. Optimization of fermentation conditions for Cordycepin production using *Cordyceps militaris* 3936. *Journal of Biological and Chemical Sciences*. 1: 35-47.
- Walker T.S., Bais H.P. and Déziel E. 2004. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation and root exudation. *Plant Physiol*. 134: 320-331.

- Wang L., Liu C.C., Wang Y.Y., Xu H., Su H., Cheng X. 2016. Antibacterial activities of the novel silver nanoparticles biosynthesized using *Cordyceps militaris* extract. *Current Applied Physics*. 16: 969-973.
- Wen T.C., Li M.F., Kang J.C., Kevin D.H. 2014. Optimization of Solid-state Fermentation of fruiting body growth and cordycepin production by *Cordyceps militaris*. *Chiang Mai Journal of Science*. 41: 858-872.
- Zielinska A., Skwarek E., Zaleska A., Gazda M. and Hupka J. 2009. Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size. *Procedia Chemistry*. 1: 1560-1566.
- Yi Z.L., Huang W.F., Yan R., Eugen O., Zhou G.F., Sheng P., Wang X.J., Li H.H., 2014. LED lights increase bioactive substances at low energy costs in culturing fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *Scientia Horticulturae*. 175: 139–143.

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร

1. สูตรอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar เสริมไข่ไก่ (ดัดแปลงจากสูตรลู่หยุด)

ตารางภาคผนวก ก-1 สูตรอาหารแข็ง PDA เสริมไข่ไก่

วัตถุดิบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
มันฝรั่ง	200
ข้าวโพดอ่อน	50
กลูโคส	20
ไข่ไก่	50
ผงวุ้น	20
น้ำกลั่น	ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ขั้นตอนการทำอาหารเพาะเลี้ยง

1. นำมันฝรั่งไปล้างน้ำให้สะอาดและปอกเปลือก นำมาหั่นเป็นลูกเต๋าขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ชั่งมันฝรั่งที่หั่นแล้วให้ได้ 200 กรัม
2. นำข้าวโพดอ่อนมาปอกเปลือกออกล้างให้สะอาดแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กหนาประมาณ 1 เซนติเมตร ชั่งข้าวโพดอ่อนที่หั่นแล้วให้ได้ 50 กรัม
3. ต้มน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร เมื่อน้ำเดือดให้ใส่มันฝรั่งและข้าวโพดอ่อนที่ชั่งไว้ลงไปจับเวลา 20 นาที
4. กรองเอาแต่น้ำด้วยผ้าขาวบาง
5. ใส่น้ำตาลกลูโคส ไข่ไก่ และผงวุ้นรวมกันในน้ำมันฝรั่งและข้าวโพดอ่อน แล้วคนส่วนผสมให้เข้ากัน
6. ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร
7. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

2. สูตรอาหารเหลว Potato Dextrose Broth เสริมไข่ไก่ (ดัดแปลงจากสูตรลู่หยุด)

ตารางภาคผนวก ก-2 สูตรอาหารแข็ง PDB เสริมไข่ไก่

วัตถุดิบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
มันฝรั่ง	200
ข้าวโพดอ่อน	50
กลูโคส	20
ไข่ไก่	50
น้ำกลั่น	ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ขั้นตอนการทำอาหารเพาะเลี้ยง

1. นำมันฝรั่งไปล้างน้ำให้สะอาดและปอกเปลือก นำมาหั่นเป็นลูกเต๋าขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ชั่งมันฝรั่งที่หั่นแล้วให้ได้ 200 กรัม
2. นำข้าวโพดอ่อนมาปอกเปลือกออกล้างให้สะอาดแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กหนาประมาณ 1 เซนติเมตร ชั่งข้าวโพดอ่อนที่หั่นแล้วให้ได้ 50 กรัม
3. ต้มน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร เมื่อน้ำเดือดให้ใส่มันฝรั่งและข้าวโพดอ่อนที่ซังไว้ลงไปจับเวลา 20 นาที
4. กรองเอาแต่น้ำด้วยผ้าขาวบาง
5. ใส่น้ำตาลกลูโคส และไซไ้่ รวมกันในน้ำมันฝรั่งและข้าวโพดอ่อน แล้วคนส่วนผสมให้เข้ากัน
6. ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร
7. เทอาหารลงขวดรูปชมพู่ ขวดละ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

3. สูตรอาหาร Potato Dextrose Broth เสริมไซไ้่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นแหล่งคาร์บอน (ดัดแปลงจากสูตรลู่หยุด)

อาหารเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ข้าวไรซ์เบอร์รี่และสูตรอาหาร PDB เสริมไซไ้่ โดยจะเตรียมทั้ง 2 ส่วนแยกออกจากกัน

ส่วนที่ 1

ตารางภาคผนวก ก-3 น้ำหนักข้าวไรซ์เบอร์รี่กรัมต่อขวด

วัตถุดิบ	ปริมาณ (กรัมต่อขวด)
ข้าวไรซ์เบอร์รี่	60

ส่วนที่ 2

ตารางภาคผนวก ก-4 สูตรอาหารเหลว PDB เสริมไซไ้่

วัตถุดิบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
มันฝรั่ง	200
ข้าวโพดอ่อน	50
กลูโคส	20
ไซไ้่	50
ดักแด้	30
น้ำกลั่น	ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ขั้นตอนการทำอาหารเพาะเลี้ยง

1. นำมันฝรั่งไปล้างน้ำให้สะอาดและปอกเปลือก นำมาหั่นเป็นลูกเต๋าขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ชั่งมันฝรั่งที่หั่นแล้วให้ได้ 200 กรัม

2. นำข้าวโพดอ่อนมาปอกเปลือกออกล้างให้สะอาดแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กหนาประมาณ 1 เซนติเมตร ชั่งข้าวโพดอ่อนที่หั่นแล้วให้ได้ 50 กรัม
3. ต้มน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร เมื่อน้ำเดือดให้ใส่มันฝรั่งและข้าวโพดอ่อนที่ชั่งไว้ลงไปจับเวลา 20 นาที
4. กรองเอาแต่น้ำด้วยผ้าขาวบาง
5. ใส่น้ำตาลกลูโคส โซ้ไก่และดักแค้ รวมกันในน้ำมันฝรั่งและข้าวโพดอ่อน แล้วคนส่วนผสมให้เข้ากัน
6. ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร
7. ชั่งข้าวไรซ์เบอร์รี่ลงในขวดเพาะเลี้ยง ขวดละ 60 กรัม แล้วนำส่วนผสมตามข้อ 6 ใส่ลงไปในแต่ละขวด ขวดละ 40 มิลลิลิตร
8. จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

4. สูตรอาหาร Nutrient Agar

ตารางภาคผนวก ก-5 สูตรอาหารแข็ง NA

วัตถุดิบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
Beef extract	3
เปปโตเน	5
ผงวุ้น	15
น้ำกลั่น	ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5. สูตรอาหาร Nutrient Broth

ตารางภาคผนวก ก-6 สูตรอาหารเหลว NB

วัตถุดิบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
Beef extract	3
เปปโตเน	5
น้ำกลั่น	ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

6. สูตรอาหาร Mueller Hinton Agar

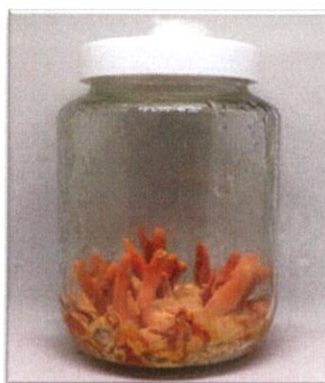
ตารางภาคผนวก ก-7 สูตรอาหารแข็ง MHA

วัตถุดิบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
Beef extract	2
Acid Hydrolysate of Casein	17.5
แป้ง	1.5
ผงวุ้น	17
น้ำกลั่น	ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนและรูปภาพการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง

1. ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยหนอนในขวดแก้ว



1.1 การเพาะเลี้ยงเส้นใยในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีหนอนไหมร้อยละ 100 จนเกิดเป็นดอกเห็ด

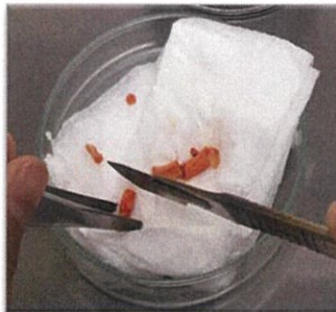
2. ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อในอาหารแข็ง PDA เสริมไข่ไก่



2.1 ดอกเห็ดที่ได้มาทำการฆ่าเชื้อด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นเวลา 5 นาที



2.2 ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วอีก 2 ครั้ง



2.3 ตัดเป็นชิ้นๆ ความยาวประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร



2.4 นำชิ้นส่วนที่ตัดแล้วไปวางบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร PDA จากนั้นนำไปบ่มในที่มืดอุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

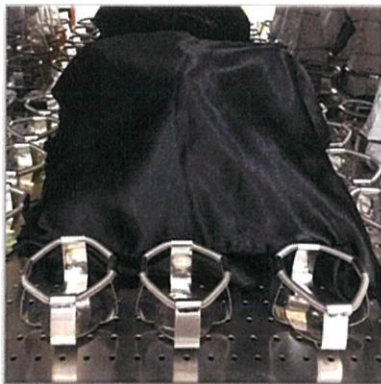
3. ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อในอาหารเหลว PDB เสริมไข่ไก่



3.1 นำหัวเชื้อเริ่มต้นจากอาหารแข็ง PDA เสริม มาคือกจำนวน 3 ชิ้น



3.2 นำไปใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว PDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

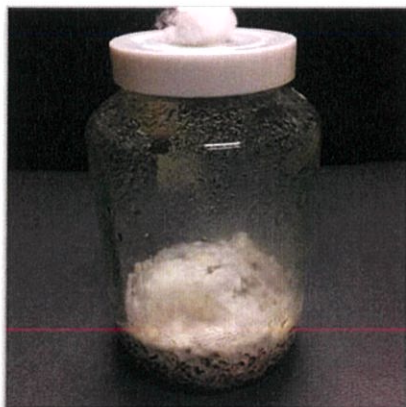


3.3 จากนั้นนำไปเลี้ยงในที่มีดในเครื่องปมแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

4. ขั้นตอนการถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลว PDB เสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อสถานะแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นแหล่งคาร์บอน



4.1 ทำการถ่ายหัวเชื้อในอาหารเหลว PDB เสริม ร้อยละ 5 ลงไปตรงกลางขวดอาหารแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นแหล่งคาร์บอน



4.2 จากนั้นนำไปปมในที่มีดโดยใช้ผ้าดำคลุมที่ขวดเพาะเลี้ยงอีกที่ที่อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 14 วัน เส้นใยจะเจริญเต็มขวดเพาะเลี้ยง



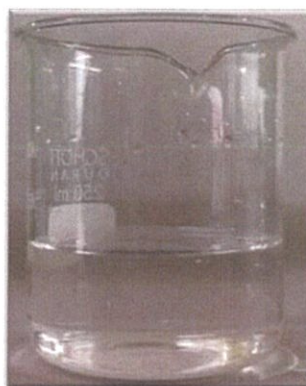
4.3 จากนั้นทำการเปิดดอกโดยให้แสงกับเส้นใย รอกจนเกิดเป็นดอกเห็ดมีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร



4.4 นำไปเลี้ยงต่อจนครบเวลาประมาณ 45 วัน นับตั้งแต่วันที่ทำการเปิดดอก

ภาคผนวก ค

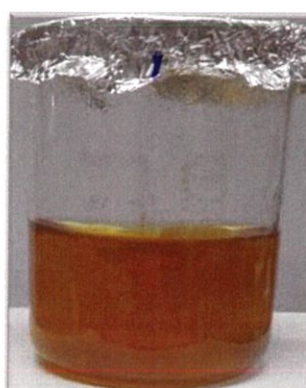
ขั้นตอนและรูปภาพการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน



1. นำปิ๊กเกอร์ที่มีน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ไปให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องกวนสารให้ความร้อนแบบแท่งแม่เหล็ก



2. จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในปิ๊กเกอร์



3. จากนั้นค่อยๆเติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 5 มิลลิลิตร โดยทำการกวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรท เป็น 1 และ 10 มิลลิโมล

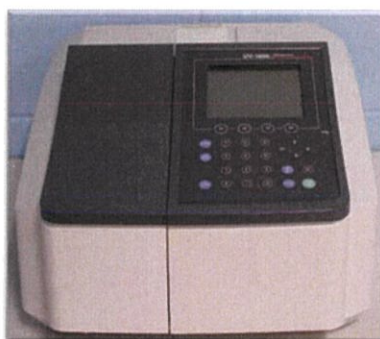
ภาคผนวก ง

ขั้นตอนและรูปภาพการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย



1.1 นำเชื้อแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB และนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชม.



1.2 วัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

2. การทดสอบการยับยั้งเชื้อด้วยวิธี Agar disc diffusion



2.1 นำเชื้อแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นไว้มาทำการ swab ให้ทั่วบนผิวอาหาร MHA



2.2 จากนั้นนำ paper disc วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration : MIC)



3.1 ทำการเติมอนุภาคนาโนของเงินที่เจือจางเป็นลำดับส่วน เชื้อแบคทีเรีย และอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth เติมลงไปจำนวนหลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

4. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal bactericidal concentration : MBC)



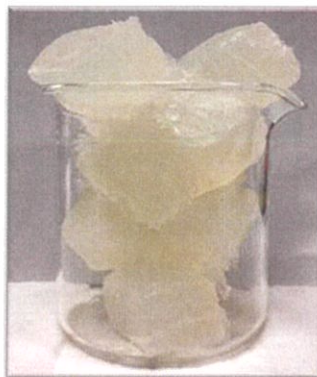
4.1 นำหลอดที่ทำการทดสอบจากการหาค่า MIC ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอดมา 0.1 มิลลิลิตร



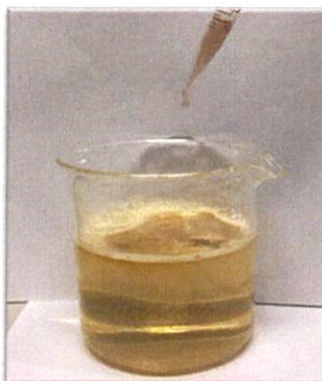
4.2 spread plate บนอาหาร NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

ภาคผนวก จ

ขั้นตอนและรูปภาพการทำสบู่



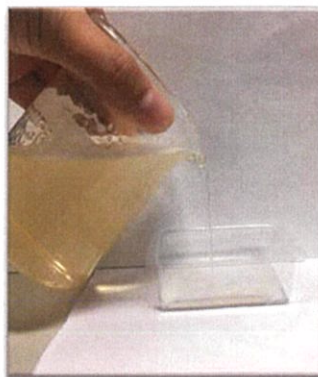
1. นำเบสสบู่กลีเซอรีนใสไปหลอมละลายในไมโครเวฟ



2. จากนั้นเติมอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพลงไปไม่เกินร้อยละ 4 ของน้ำหนักเบสสบู่กลีเซอรีนใส



3. คนให้เข้ากัน หากเกิดฟองให้ใช้สเปรย์แอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ฉีดบางๆ บนผิวหน้าเพื่อลดการเกิดฟอง



4. เทลงพิมพ์สบู่



5. ฉีดด้วยสเปรย์แอลกอฮอล์ร้อยละ 95 บางๆ อีกครั้ง



6. รอจนแข็งจะได้สบู่จากอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพ

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์และการคำนวณ

1. วิธีการคำนวณน้ำหนักแห้ง

1. ชั่งน้ำหนักถาดเปล่าที่อบแล้วบันทึกค่า
2. เก็บตัวอย่างและชั่งน้ำหนัก (น้ำหนักถาดเปล่าและน้ำหนักเห็ด)
3. นำไปอบแห้งแล้วบันทึกค่า
4. นำค่าที่ได้มาคำนวณตามสมการดังนี้

$$\text{น้ำหนักแห้ง} = \text{น้ำหนักถาดที่มีเห็ดแห้งหลังอบ} - \text{น้ำหนักถาดเปล่าหลังอบ}$$

2. วิธีการคำนวณร้อยละความชื้น

1. ชั่งกระดาษฟรอยด์เปล่าหลังอบแล้วบันทึกค่า
2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างก่อนนำไปอบแห้ง บันทึกค่าและนำไปอบแห้ง
3. ชั่งน้ำหนักฟรอยด์พร้อมตัวอย่างหลังอบแห้ง
4. นำค่าที่ได้มาคำนวณตามสมการดังนี้

$$\text{ร้อยละความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนอบ} - \text{น้ำหนักหลังอบ}}{\text{น้ำหนักก่อนอบ}} \times 100$$

3. วิธีการคำนวณสารละลายเข้มข้น (Stock Solution)

เตรียมสารละลายมาตรฐานคอร์โดเซปิน 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยการชั่งสารมาตรฐานคอร์โดเซปินมา 0.002 กรัม ละลายในน้ำบริสุทธิ์สูง 2 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 0.001 กรัมต่อมิลลิลิตร

1	กรัม	เท่ากับ	1000	มิลลิกรัม
0.001	กรัม	เท่ากับ	1	มิลลิกรัม
1	มิลลิกรัม	เท่ากับ	1000	ไมโครกรัม

ดังนั้น สารละลายมาตรฐานคอร์โดเซปินความเข้มข้น 0.001 กรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ถ้าต้องการสารละลายความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตร สามารถเตรียมโดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1000 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร} \times V_1 = 100 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร} \times 2000 \text{ ไมโครลิตร}$$

$$V_1 = 200 \text{ ไมโครลิตร}$$

ดังนั้นถ้าต้องการความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะต้องใช้สารละลายมาตรฐานคอร์ไตเซป็นความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และเติมน้ำบริสุทธิ์สูงปริมาณ 1800 ไมโครลิตร

ถ้าต้องการสารละลายความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตร สามารถเตรียมโดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1000 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร} \times V_1 = 80 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร} \times 2000 \text{ ไมโครลิตร}$$

$$V_1 = 160 \text{ ไมโครลิตร}$$

ดังนั้นถ้าต้องการความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะต้องใช้สารละลายมาตรฐานคอร์ไตเซป็นความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 160 ไมโครลิตร และเติมน้ำบริสุทธิ์สูงปริมาตร 1840 ไมโครลิตร

ถ้าต้องการสารละลายความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตร สามารถเตรียมโดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1000 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร} \times V_1 = 60 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร} \times 2000 \text{ ไมโครลิตร}$$

$$V_1 = 120 \text{ ไมโครลิตร}$$

ดังนั้นถ้าต้องการความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะต้องใช้สารละลายมาตรฐานคอร์ไตเซป็นความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 120 ไมโครลิตร และเติมน้ำบริสุทธิ์สูงปริมาตร 1880 ไมโครลิตร

ถ้าต้องการสารละลายความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตร สามารถเตรียมโดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1000 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร} \times V_1 = 40 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร} \times 2000 \text{ ไมโครลิตร}$$

$$V_1 = 80 \text{ ไมโครลิตร}$$

ดังนั้นถ้าต้องการความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะต้องใช้สารละลายมาตรฐานคอร์โดเซปินความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 80 ไมโครลิตร และเติมน้ำบริสุทธิ์สูง ปริมาตร 1920 ไมโครลิตร

ถ้าต้องการสารละลายความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตร สามารถเตรียมโดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1000 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร} \times V_1 = 20 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร} \times 2000 \text{ ไมโครลิตร}$$

$$V_1 = 40 \text{ ไมโครลิตร}$$

ดังนั้นถ้าต้องการความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะต้องใช้สารละลายมาตรฐานคอร์โดเซปินความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร และเติมน้ำบริสุทธิ์สูง ปริมาตร 1960 ไมโครลิตร

4. การหาปริมาณคอร์โดเซปิน

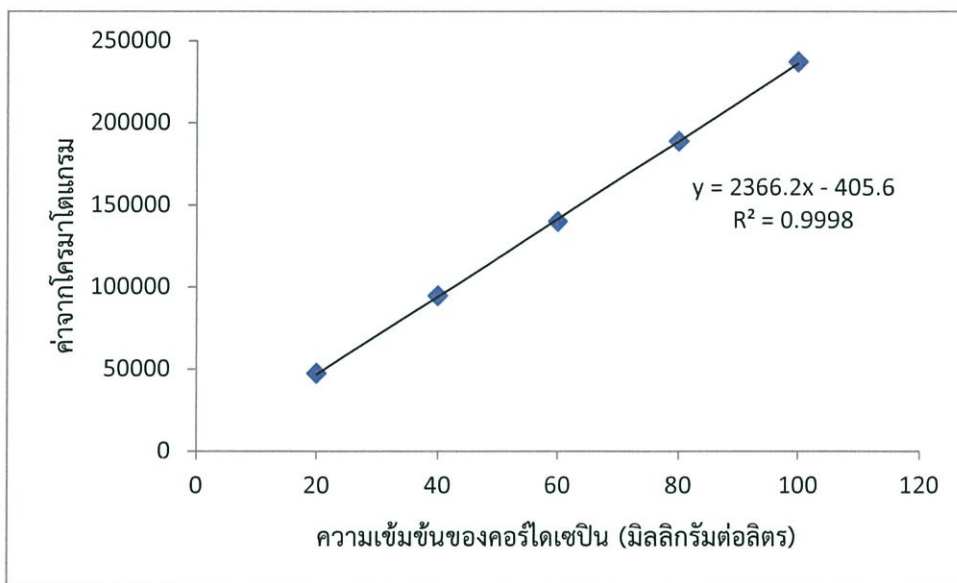
จากผลการทดสอบปริมาณคอร์โดเซปินมาตรฐาน โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูงจะได้สมการเส้นตรง $y = ax + b$ (ดังรูปภาคผนวกที่ ฉ-1) เมื่อนำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากตารางภาคผนวกที่ ฉ-1 แทนลงในสมการที่ 1 เพื่อหาค่าปริมาณคอร์โดเซปิน

ตารางภาคผนวกที่ ฉ-1 ตารางแสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมของคอร์โดเซปินในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง

จำนวนซ้ำ	ค่าพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมของคอร์โดเซปิน
1	146795
2	145110
3	144626

หมายเหตุ ค่าโครมาโตแกรมที่อ่านได้จากเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูงของปริมาณคอร์โดเซปินดูได้จากภาคผนวก ข

วิธีการคำนวณปริมาณคอร์โดเซปิน



รูปภาพผนวกที่ ฉ-1 กราฟมาตรฐานคอร์โดเซปิน ในการวิเคราะห์ด้วยการใช้ HPLC ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นำค่าโครมาโตแกรมที่ได้จากการสกัดตัวอย่างมาคำนวณหาปริมาณคอร์โดเซปินโดยใช้สมการ ดังนี้

$$Y = 2366.17x - 405.406$$

โดย Y = ค่าจากโครมาโตแกรม

X = ความเข้มข้นของคอร์โดเซปิน

ตัวอย่างเช่น

$$X = \frac{146795 - 405.406}{2366.17}$$

$$X = 61.868 \text{ มิลลิกรัมต่อลิตร}$$

ใช้ตัวอย่างเห็ดต่อน้ำบริสุทธิ์สูง 1.5 กรัม : 100 มิลลิลิตร (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ความเข้มข้นของสารคอร์โดเซปินที่ได้ 61.868 มิลลิกรัมต่อลิตร

ดังนั้น ใน 1000 มิลลิลิตร มีสาร 61.868 มิลลิกรัม

ถ้า 100 มิลลิลิตร มีสาร 6.1868 มิลลิกรัม

ดังนั้น ในตัวอย่างเห็ด 1.5 กรัม มีสาร 6.1868 มิลลิกรัม

ถ้าตัวอย่างเห็ด 1 กรัม มีสาร 4.1245 มิลลิกรัม

ดังนั้นความเข้มข้นของสารคอร์โดเซปินในเห็ด 1 กรัม เท่ากับ 4.1245 มิลลิกรัม

5. การเตรียมสารเคมีและการคำนวณความเข้มข้นของสารต่างๆที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี Agar disc diffusion

5.1 การคำนวณและการเตรียมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

$$M \times V = \frac{g}{M.W.}$$

$$\begin{aligned} g &= M \times V \times M.W. \\ &= 0.001 \text{ โมลต่อลิตร} \times 0.05 \text{ ลิตร} \times 169.87 \text{ กรัมต่อโมล} \\ &= 0.0085 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

ดังนั้น การเตรียมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะต้องชั่งซิลเวอร์ไนเตรท 0.0085 กรัม

5.2 การคำนวณและการเตรียมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

$$M \times V = \frac{g}{M.W.}$$

$$\begin{aligned} g &= M \times V \times M.W. \\ &= 0.01 \text{ โมลต่อลิตร} \times 0.05 \text{ ลิตร} \times 169.87 \text{ กรัมต่อโมล} \\ &= 0.0850 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

ดังนั้น การเตรียมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะต้องชั่งซิลเวอร์ไนเตรท 0.0850 กรัม

5.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้เข้ากัน

5.4 การเตรียมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ความเข้มข้น 2500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

ชั่งซิลเวอร์ไนเตรท 0.05 กรัม ละลายในน้ำและปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้เข้ากัน

5.5 การเตรียมยาปฏิชีวนะเตตระไซคลิน ความเข้มข้น 3000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

ชั่งเตตระไซคลิน 0.06 กรัม ละลายในน้ำและปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้เข้ากัน

5.6 การคำนวณและการเตรียมอนุภาคนาโนของเงินที่เติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้น 25000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด 100 มิลลิลิตร มีเห็ด 1.5 กรัม ดังนั้นสารสกัด 10 มิลลิลิตร จะมีเห็ด 1.5 กรัม

ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน ใช้สารสกัด 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และซิลเวอร์ไนเตรท 1 และ 10 มิลลิโมลาร์

ดังนั้น ในสารสกัดผสมน้ำกลั่นรวม 60 มิลลิลิตร มีเห็ด 1.5 กรัม

ถ้าสารสกัดผสมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร มีเห็ด 0.025 กรัม

ดังนั้นความเข้มข้นของอนุภาคนาโนของเงินที่สังเคราะห์ได้คือ 0.025 กรัมต่อ มิลลิลิตรหรือ 25000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.7 การคำนวณและการเตรียมอนุภาคนาโนของเงินที่เติมสารละลายซิลเวอร์ในเตรท 10 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ต้องการอนุภาคนาโนของเงินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จาก Stock ความเข้มข้น 25000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเตรียมโดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$25000 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร} \times V_1 = 1000 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร} \times 10 \text{ มิลลิลิตร}$$

$$V_1 = 0.4 \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้น ทำการปิเปตอนุภาคนาโนของเงินจาก Stock มา 0.4 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำ 9.6 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.8 การคำนวณและการเตรียมสารสกัดจากเห็ดถึงเข้าสีทอง ความเข้มข้น 25000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในขั้นตอนการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ใช้เห็ด 1.5 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร ต้องการเตรียมสารสกัดความเข้มข้น 25000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

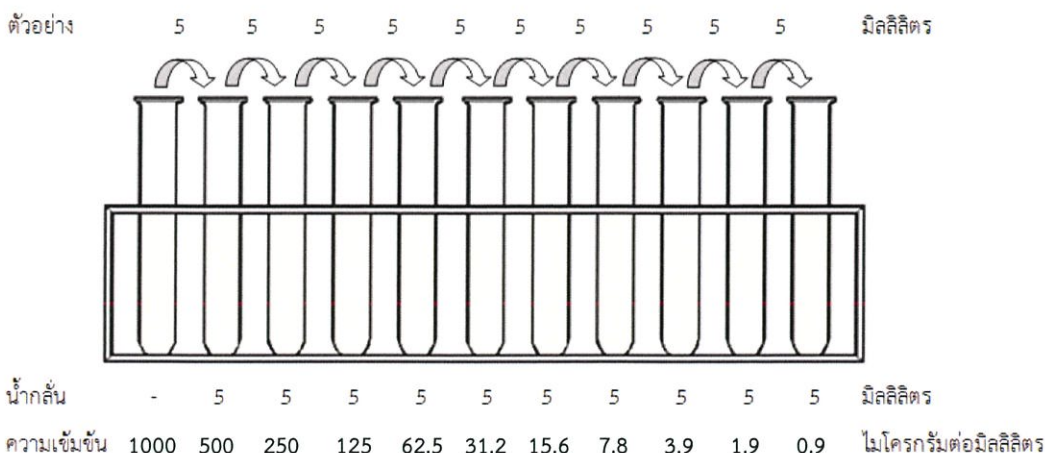
ดังนั้น ในสารสกัดผสมน้ำกลั่นรวม 60 มิลลิลิตร มีเห็ด 1.5 กรัม

ถ้าสารสกัดผสมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร มีเห็ด 0.025 กรัม

ดังนั้นความเข้มข้นของสารสกัด คือ 0.025 กรัมต่อมิลลิลิตรหรือ 25000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

6.การเจือจางอนุภาคนาโนของเงินเป็นลำดับส่วน

โดยจะทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9, 1.9 และ 0.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

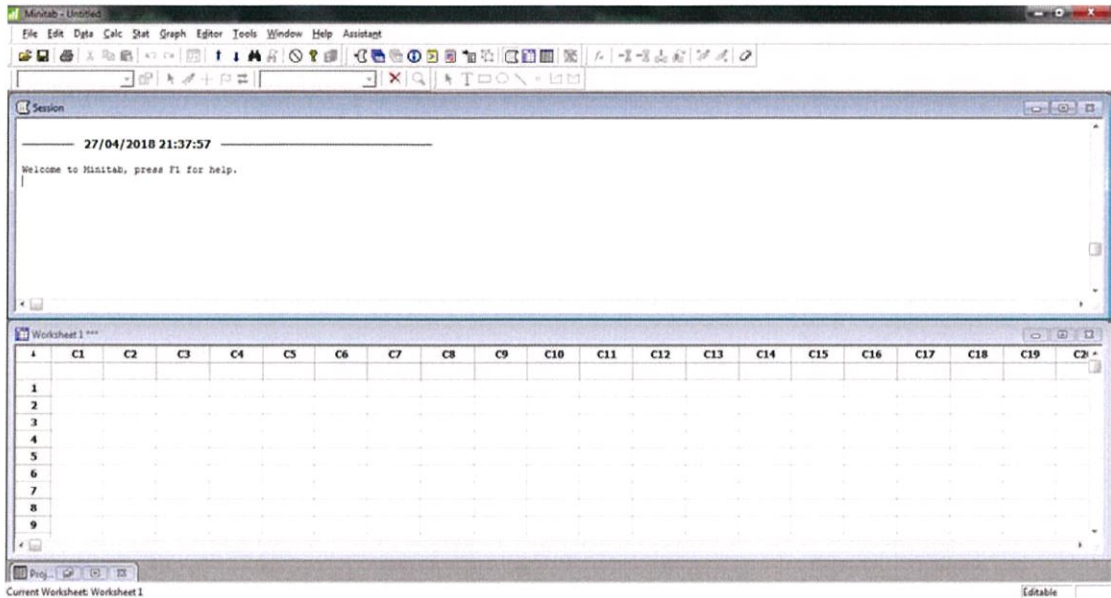


รูปภาพผนวก ฉ-2 การเจือจางอนุภาคนาโนของเงินเป็นลำดับส่วน

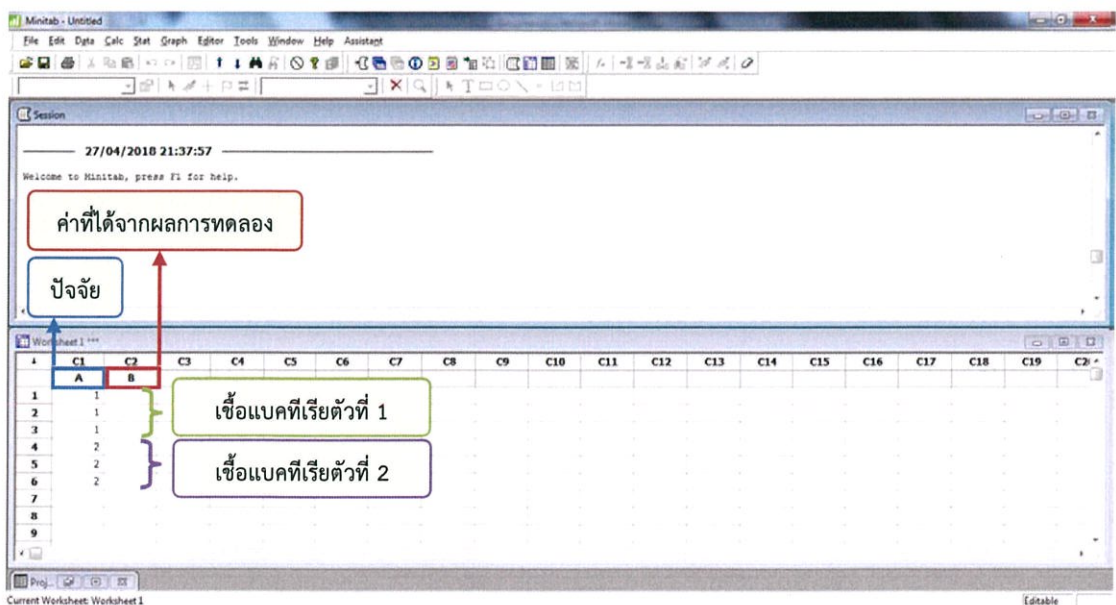
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางสถิติ

ขั้นตอนการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม Minitab 16

1.เปิดโปรแกรม Minitab 16



2.กำหนดตัวแปรในตารางโดยให้ A เป็นปัจจัย และ B เป็นค่าที่ได้จากผลการทดลองในรูปแบบนี้จะกำหนดให้ A มี 2 ปัจจัย คือสูตรอาหารเสริมเปปโตนิยีสต์สกัด (1) และสูตรอาหารเสริมไข่ไก่ (2) ซึ่งจะทำการทดลอง 3 ซ้ำดังรูป



3.หลังจากนั้นใส่ค่าผลการทดลองที่ได้ในแต่ละซ้ำลงไปดังแสดงดังรูป

The screenshot shows the Minitab interface with a worksheet containing the following data:

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20
	A	B																		
1	1	15.4																		
2	1	13.5																		
3	1	14.7																		
4	2	16.1																		
5	2	15.4																		
6	2	14.3																		

A red box highlights the values in column C2 (15.4, 13.5, 14.7, 16.1, 15.4, 14.3). A callout box with an arrow points to this box, containing the text "ค่าที่ได้จากผลการทดลอง".

4.กด Stat » ANOVA » One – Way ตามลำดับ

The screenshot shows the Minitab interface with the 'Stat' menu open. The 'ANOVA' option is selected, and the 'One-Way...' option is highlighted. The worksheet data is visible in the background, matching the data from the previous screenshot.

Stat

- Basic Statistics
- Regression
- ANOVA
 - One-Way...
 - One Way (Unstacked)...
 - Two-Way...
 - Analysis of Means...
 - Balanced ANOVA...
 - General Linear Model...
 - Fully Nested ANOVA...
 - Balanced MANOVA...
 - General MANOVA...
 - Test for Equal Variances...
 - Interval Plot...
 - Main Effects Plot...
 - Interactions Plot...
- DOE
- Control Charts
- Quality Tools
- Reliability/Survival
- Multivariate
- Time Series
- Tables
- Nonparametrics
- EDA
- Power and Sample Size

5. เมื่อขึ้นดังรูปให้ใส่ A ในช่อง Factor และใส่ B ในช่อง Response หลังจากนั้นกดตกลง

The screenshot shows the Minitab interface with the 'One-Way Analysis of Variance' dialog box open. The 'Response' field is set to 'B' and the 'Factor' field is set to 'A'. The 'Confidence level' is set to 95.0. The background worksheet shows the following data:

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
	A	B					
1	1	15.4					
2	1	13.5					
3	1	14.7					
4	2	16.1					
5	2	15.4					
6	2	14.3					
7							
8							
9							

6. จะได้ค่าที่คำนวณได้จากโปรแกรม Minitab 16 ดังรูป ให้สังเกตจากค่า P ถ้าหากค่า $P \leq 0.05$ แสดงว่าผลการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

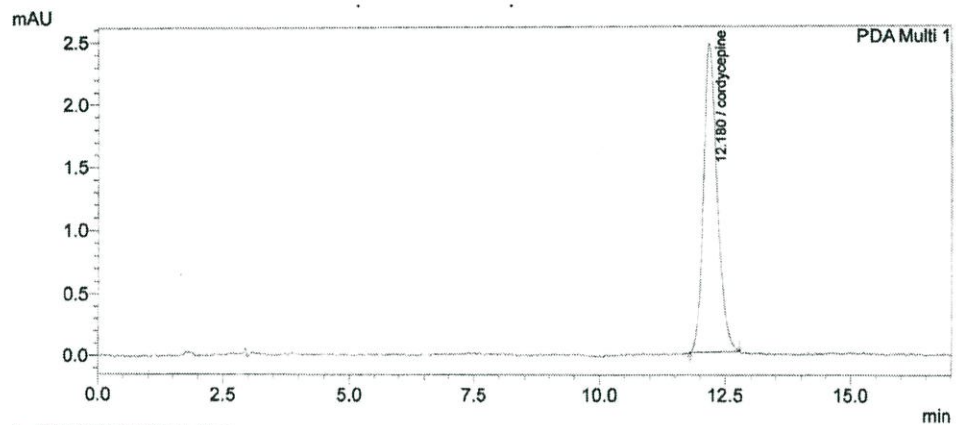
The screenshot shows the Minitab interface with the results of a One-way ANOVA. The P-value is 0.291, which is greater than 0.05, indicating no significant difference. The ANOVA table is as follows:

Source	DF	SS	MS	F	P
A	1	0.807	0.807	0.92	0.291
Error	4	3.493	0.873		
Total	5	4.300			

The background worksheet shows the same data as in the previous screenshot.

ภาคผนวก ข ผลการทดลอง

1. โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานคอร์ไดเซปินที่ความเข้มข้นร้อยละ 20, 40, 60, 80, 100

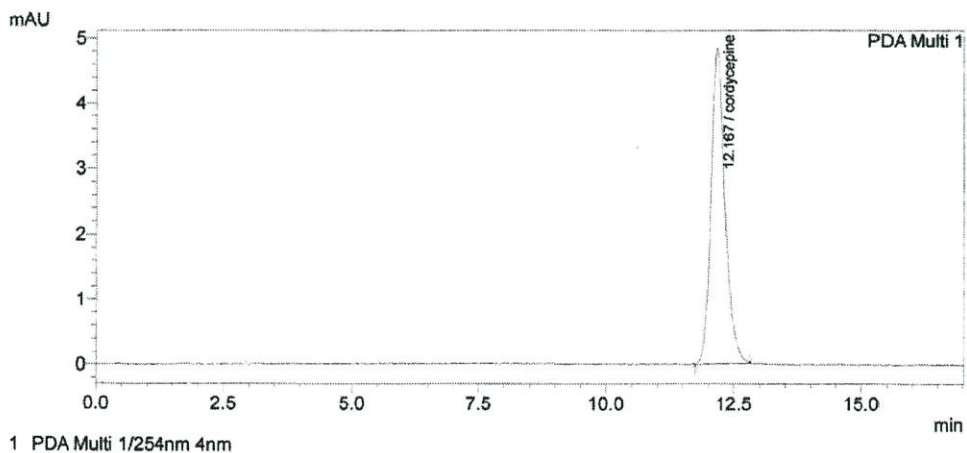


<Results>

PDA Ch1 254nm 4nm

Peak #	Name	Ret. Time	Area	Height	Tailing Factor	Resolution	Conc.	Units
1	cordycepin	12.180	47468	2440	1.278	0.000	20.000	mg/L
Total			47468	2440				

- 1.1 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานคอร์ไดเซปินที่ความเข้มข้นร้อยละ 20

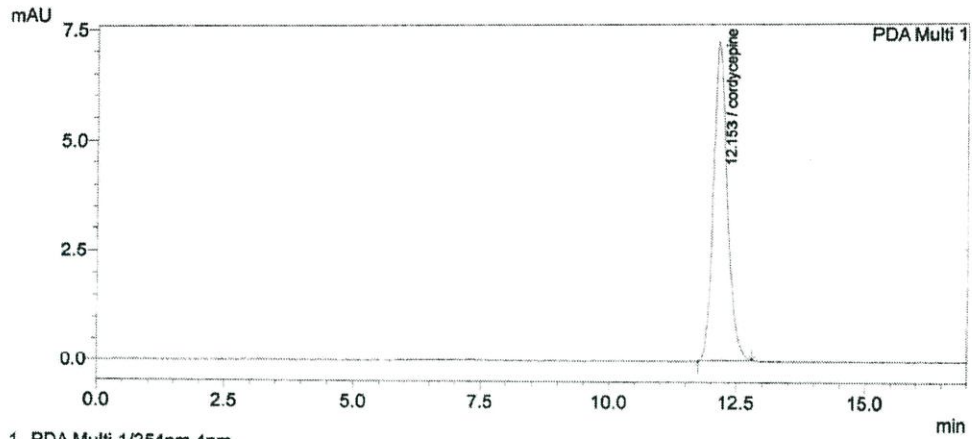


<Results>

PDA Ch1 254nm 4nm

Peak #	Name	Ret. Time	Area	Height	Tailing Factor	Resolution	Conc.	Units
1	cordycepin	12.167	94665	4827	1.297	0.000	40.000	mg/L
Total			94665	4827				

- 1.2 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานคอร์ไดเซปินที่ความเข้มข้นร้อยละ 40

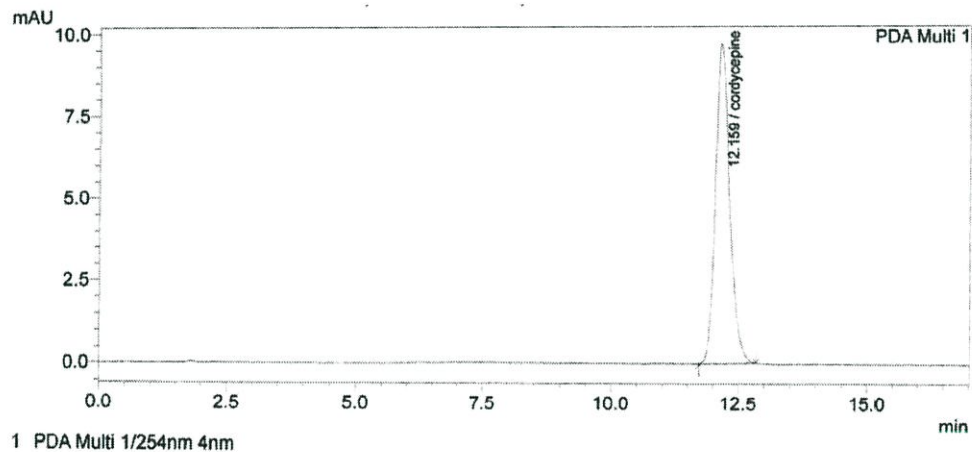


<Results>

PDA Ch1 254nm 4nm

Peak #	Name	Ret. Time	Area	Height	Tailing Factor	Resolution	Conc.	Units
1	cordycepine	12.153	139893	7162	1.298	0.000	59.858	mg/L
Total			139893	7162				

1.3 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานคอร์โดเซปินที่ความเข้มข้นร้อยละ 60

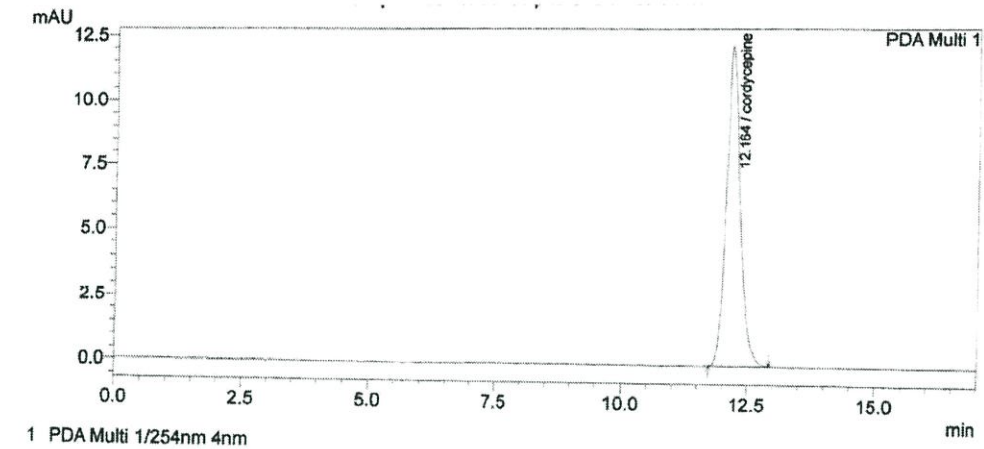


<Results>

PDA Ch1 254nm 4nm

Peak #	Name	Ret. Time	Area	Height	Tailing Factor	Resolution	Conc.	Units
1	cordycepine	12.159	188760	9647	1.300	0.000	80.298	mg/L
Total			188760	9647				

1.4 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานคอร์โดเซปินที่ความเข้มข้นร้อยละ 80



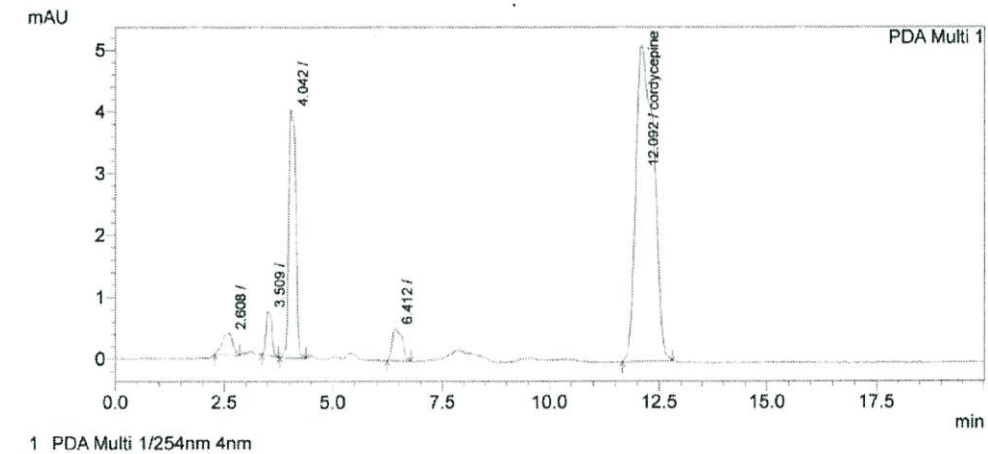
<Results>

PDA Ch1 254nm 4nm

Peak #	Name	Ret. Time	Area	Height	Tailing Factor	Resolution	Conc.	Units
1	cordycepine	12.164	237038	12084	1.301	0.000	100.349	mg/L
Total			237038	12084				

1.5 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานคอร์โดเซปินที่ความเข้มข้นร้อยละ 100

2. โครมาโทแกรมแสดงพีคคอร์โดเซปินของตัวอย่าง ในผลการทดลองหัวข้อที่ 4.2 การหาปริมาณคอร์โดเซปินด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง (HPLC)

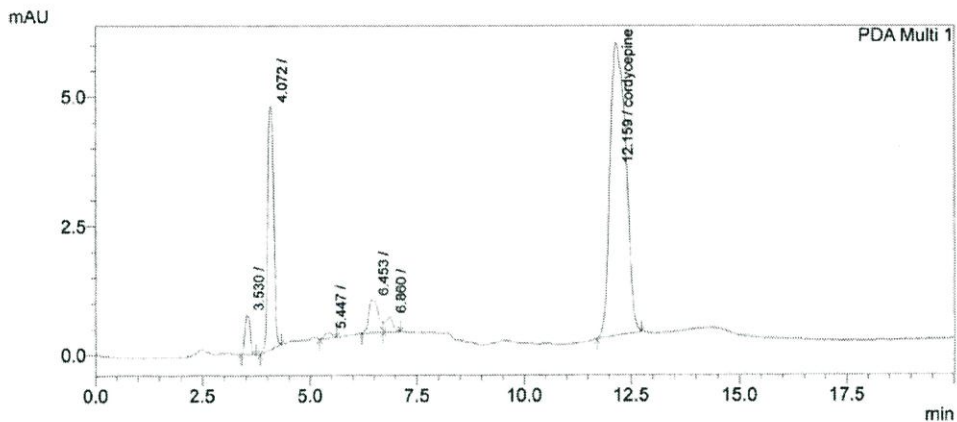


<Results>

PDA Ch1 254nm 4nm

Peak #	Name	Ret. Time	Area	Height	Tailing Factor	Resolution	Conc.	Units
1		2.608	5874	348	0.813	0.000	0.000	
2		3.509	6337	708	1.367	2.701	0.000	
3		4.042	44413	4008	1.346	2.097	0.000	
4		6.412	8039	535	1.444	7.140	0.000	
5	cordycepine	12.092	146795	5127	1.405	10.149	0.000	mg/L
Total			211458	10726				

2.1 จากการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารเลี้ยงเชื้อสถานะแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งค่า retention time ของโครมาโตแกรมของคอร์โดเซปินในนาที่ 12.092



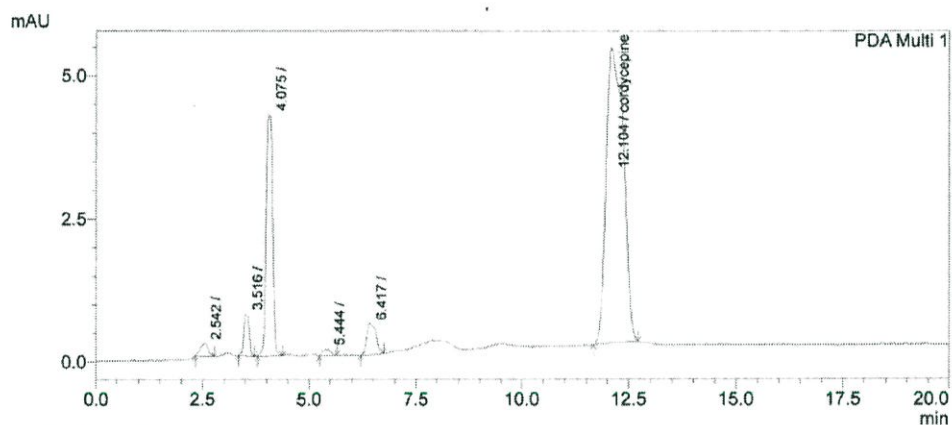
1 PDA Multi 1/254nm 4nm

<Results>

PDA Ch1 254nm 4nm

Peak #	Name	Ret. Time	Area	Height	Tailing Factor	Resolution	Conc.	Units
1		3.530	6182	775	1.171	0.000	0.000	
2		4.072	44999	4707	1.169	2.329	0.000	
3		5.447	1287	104	0.967	4.900	0.000	
4		6.453	10162	646	0.000	2.840	0.000	
5		6.860	3653	294	0.000	0.713	0.000	
6	cordycepine	12.159	145110	5666	1.249	7.566	0.000	mg/L
Total			211393	12192				

2.2 จากการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งค่า retention time ของโครมาโตแกรมของคอร์ไดเซปินในนาที่ที่ 12.159



1 PDA Multi 1/254nm 4nm

<Results>

PDA Ch1 254nm 4nm

Peak #	Name	Ret. Time	Area	Height	Tailing Factor	Resolution	Conc.	Units
1		2.542	2897	222	0.972	0.000	0.000	
2		3.516	6517	739	1.132	3.328	0.000	
3		4.075	44843	4213	1.021	2.264	0.000	
4		5.444	1454	107	0.978	4.455	0.000	
5		6.417	7924	538	1.393	2.702	0.000	
6	cordycepine	12.104	144626	5144	1.351	10.571	0.000	mg/L
Total			208262	10963				

2.3 จากการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งค่า retention time ของโครมาโตแกรมของคอร์ไดเซปินในนาที่ที่ 12.104



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ

วันที่ 20 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2561

ข้าพเจ้า นายธนาวัฒน์ อินตา รหัสประจำตัว 57050698

นางสาวปรียาภรณ์ ใจนันทะ รหัสประจำตัว 57050724

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา ขอรับรองว่า
โครงการพิเศษ เรื่อง

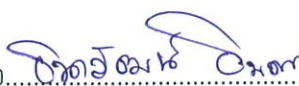
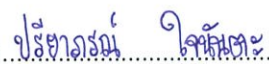
ชื่อภาษาไทย ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพจาก
สารสกัดของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ชื่อภาษาอังกฤษ Antibacterial activities of the novel silver nanoparticles biosynthesis
from *Cordyceps militaris* fruiting body extract

ปีการศึกษา 2560

เป็นผลงานวิจัยที่มีได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อน
เรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่ม
โครงการพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขรวิสุทธิ 1.48 %

ลงชื่อ.......... ลงชื่อ..........


(นายธนาวัฒน์ อินตา)

(นางสาวปรียาภรณ์ ใจนันทะ)

นักศึกษา

นักศึกษา

ข้าพเจ้า รศ. อารี ฤทธิบุรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงการพิเศษ ของ
นักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้
เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ..........

(รศ.อารี ฤทธิบุรณ์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

Plagiarism Checking Report

Created on Jun 11, 2018 at 12:43 PM

Submission Information

ID	SUBMISSION DATE	SUBMITTED BY	ORGANIZATION	FILENAME	STATUS	SIMILARITY INDEX
860557	Jun 11, 2018 at 12:43 PM	570506985@kmid.ac.th	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	เล่มสมบูรณ์.pdf	Completed	1.48 %

Match Overview

NO.	TITLE	AUTHOR(S)	SOURCE	SIMILARITY INDEX
1	ฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อ Pseudomonas aeruginosa ที่สกัดแยกจากน้ำคั้นบรรจุขวด	ชุตินันท์ คงสรินทร์	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	0.77 %
2	เปรียบเทียบแรงจูงใจสมุนไพรปรารถนาและสมุนไพรที่ใช้, Comparison of motivation between desired soap and uses soap	ฐานิดา กมลลาสน์ ณ อุตยา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	0.37 %
3	รายงานการวิจัยผลการเสริมฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดจากเห็ดกินได้กับยาปฏิชีวนะต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค	ศิริขวัญ ทินรัตน์	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ	0.34 %